

Г.Г. Черепанов, З.Н. Макара, В.Б. Решетов

**СИСТЕМА КОМПЛЕКСНОЙ ОЦЕНКИ
СОСТОЯНИЯ ОБМЕННЫХ ПРОЦЕССОВ
У ЛАКТИРУЮЩИХ ЖИВОТНЫХ
НА ОСНОВЕ ПОСТРОЕНИЯ МОДЕЛЕЙ
БИОКИНЕТИКИ И БАЗ ДАННЫХ**

Боровск, 2007

Всероссийская академия сельскохозяйственных наук

*Всероссийский научно-исследовательский институт
физиологии, биохимии и питания
сельскохозяйственных наук*

Г.Г. Черепанов, З.Н. Макара

**СИСТЕМА КОМПЛЕКСНОЙ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ
ОБМЕННЫХ ПРОЦЕССОВ У ЛАКТИРУЮЩИХ ЖИВОТНЫХ
НА ОСНОВЕ ПОСТРОЕНИЯ МОДЕЛЕЙ БИОКИНЕТИКИ И
БАЗ ДАННЫХ**

Боровск, 2007

УДК 57.087.1:519.2:612.015.3:612.664

ББК 28.07

Ч – 46

Черепанов Г.Г., Макара З.Н., Решетов В.Б.

Система комплексной оценки состояния обменных процессов у лактирующих животных на основе построения моделей биокинетики и баз данных.

Монография. Боровск, ВНИИФБиП, 2007, 85 с.

Рекомендовано Ученым Советом ВНИИФБиП с.-х. животных в качестве учебного пособия по курсу «Биоинформационные технологии» для научных работников, студентов и аспирантов

В книге рассматриваются современные подходы к количественной оценке процессов метаболизма и молокообразования у животных в условиях *in vivo*, основанные на принципе косвенного измерения. Анализируется кинетика транспорта из крови и использования субстратов в клетках молочной железы. Описаны приемы идентификации параметров с использованием компьютерных моделей и баз данных. Издание предназначено для научных работников, аспирантов, студентов и преподавателей вузов и техникумов.

System of complex estimation of metabolic state in lactating animals on the base of development of biokinetic models and data base

G.G. Cherepanov, Z.N. Makar, V.B. Reshetov, 2007. 85 p.

In the book the modern approaches to quantitative *in vivo* estimation of metabolism and milk formation in the animals are discussed, based on the principle of indirect measurement. The kinetics of transport of substrates from the blood and their utilization in the mammary secretory cells are analyzed. The procedures of parameter identification using computer models and data bases are presented.

При подготовке издания использованы материалы исследований, проведенных при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Калужской обл., проекты №№ 00-04-96077/а, 02-04-96018, 04-04-97234, 07-04-96429.

ISBN 978-5-901656-12-9

© Черепанов Г.Г.,

Макара З.Н.,

Решетов В.Б.

© ВНИИФБиП с.-х. животных

Содержание

1	Введение.....	4
2	Кинетика транспорта субстратов из крови в секреторные клетки молочной железы.....	7
2.1	Простейшая схема транспорта водорастворимых метаболитов с односторонним потоком в клетку.....	7
2.1.1	Первый проверочный эксперимент.....	12
2.1.2	Второй проверочный эксперимент.....	14
2.1.3	Третий проверочный эксперимент.....	17
2.1.4	Анализ взаимосвязи параметров артерио-венозного баланса с активностью транспорта водорастворимых метаболитов в клетку.....	19
2.1.5	Расширенные варианты простейшей модели.....	22
2.1.6	Исследование статистических свойств модели.....	25
2.1.7	Рекомендации по применению модели.....	31
2.2	Модель формирования артерио-венозного баланса липидных компонентов крови.....	33
2.3	Применение технологии баз данных для оценки состояния обменных процессов.....	
3	Изучение процессов транспорта и метаболизма с применением компьютерного моделирования.....	38
3.1	Теоретические исследования процессов молокообразования с использованием имитационной компьютерной модели.....	
3.1.1	Влияние концентрации субстратов в крови и кровотока.....	40
3.1.2	Влияние параметров метаболической активности.....	42
3.2	Применение компьютерной модели для анализа данных физиологического эксперимента.....	44
3.2.1	Исследование эффектов субстратного лимитирования молокообразования при кратковременном голодании.....	44
3.2.2	Исследование лактогенного действия внутривенной нагрузки инсулином в условиях поддержания нормогликемии.....	49
3.2.3	Моделирование общего интермедиарного обмена у коров при разном уровне продуктивности.....	55
3.2.3.1	Идентификация метаболических потоков у коров разной продуктивности с использованием базовой модели интермедиарного обмена.....	57
3.2.3.2	Сравнение двух вариантов прогноза молокообразования с использованием базовой и модифицированной модели интермедиарного обмена.....	60
3.3	Применение технологии баз данных для оценки состояния обменных процессов у продуктивных животных.....	61
4	Заключение.....	65
	Рекомендуемая литература.....	68
	Приложение.....	72

1. Введение

Физиолого-биохимические факторы, лимитирующие темпы молокообразования и биосинтеза, имеют количественную природу и поэтому особенно трудны для исследования. В отличие от ветеринарии, имеющей дело, как правило, с качественными сущностями – болезнетворными агентами, в области физиологии продуктивных животных объектом изучения обычно являются процессы метаболизма, направленность и интенсивность которых определяются сложной сетью количественных взаимодействий.

Динамическая природа этих процессов была установлена и интенсивно изучалась в 50-е – 70-е годы прошлого столетия благодаря изобретению метода изотопных индикаторов. В силу определенных ограничений, свойственных этому методу (как и любому другому научному методу), в последующий период такие работы уже не были столь же масштабными и исследования в области физиологии и биохимии продуктивных животных разделились на две ветви. В одной из них исследователи вернулись к тому набору методических приемов, которые существовали в «доизотопный» период – к анализу состава крови, убойного материала, валовых балансовых показателей и т.д., так что огромный наработанный материал по динамике процессов для этой ветви вплоть до настоящего времени остается по существу невостребованным. Другая, менее многочисленная когорта исследователей, опираясь на весь массив наработанной информации, пытается сделать логический шаг вперед по отношению к изотопно-индикаторным численным описаниям, являющимся по существу лишь «моментальными снимками» метаболизма в одной конкретной ситуации. Такие исследования, как правило, абсорбируют значительный объем ранее проведенных изотопно-индикаторных данных, чтобы на их основе, с привлечением новой информации разрабатывать системные модели, способные работать в широкой области значений биологических параметров и концентраций, в силу того, что такие модели оказываются достаточно адекватными реальным процессам. Метод изотопных индикаторов при этом часто используется в качестве референтного метода для того, чтобы подтвердить обоснованность модельного прогноза.

Оценивая под этим углом зрения ситуацию, сложившуюся в конкретной области исследований, связанной с изучением метаболизма и биосинтеза в молочной железе, можно констатировать, что многочисленные исследования, проведенные на тканевых срезах, на клеточных культурах и реконструированных препаратах, дали много ценного для понимания деталей, но не функционирования системы в целом. Поэтому прогресс в понимании того, как регулируется темп биосинтеза и компонентный состав молока *in vivo*, т.е. в интактной молочной железе, очень медленный. Известно, что обеспеченность субстратами – предшественниками, уровень кровоснабжения и метаболическая активность клеток молочной железы имеют критическое значение для синтеза компонентов молока, однако механизмы влияния этих факторов

(и их взаимодействий) на интенсивность процессов биосинтеза изучены недостаточно. Скорость молокообразования зависит от количества клеток секреторного эпителия альвеол и от их функциональной активности, которая в разных ситуациях может определяться не только центральными (гуморальными), но и местными факторами регуляции, влияющими на распределение субстратных потоков и на эффективность процессов биосинтеза в самой секреторной клетке.

Фундаментальной проблемой в исследовании этих процессов является трудность получения информации о функционировании тканевых и клеточных систем в условиях *in vivo*. Разработанные в предшествующий период приемы измерения отдельных показателей в физиологическом эксперименте решают некоторые, но не все ключевые вопросы, так как изучить множественные процессы в их взаимосвязи возможно лишь при комплексном подходе и применении компьютерной техники. Поэтому в последние годы все шире применяется новый подход, сочетающий физиологический эксперимент с компьютерным моделированием динамики процессов. Хотя даже чисто теоретическое изучение функционирования моделей метаболизма само по себе может дать полезную информацию, но в научно-практическом плане больший интерес представляет их использование для планирования и интерпретации физиологического эксперимента.

В физиологических опытах на животных в настоящее время можно использовать широкий арсенал средств и приемов исследования, включая изотопно-индикаторные, электрофизиологические, реографические, радиоспектроскопические и другие методы, а также сочетание их с основным методическим приемом, который состоит в том, что в опыте измеряют объемный кровоток в питающей артерии, концентрацию субстратов в крови артерии и вены, периодически регистрируют показатели молокообразования и состав молока. В последние годы в этот методический прием внесены усовершенствования, которые состоят в том, что его сочетают с использованием методов численной идентификации, когда путем сопоставления данных опыта и модельного прогноза производят косвенное измерение внутренних параметров, в том числе активности транспорта субстратов в секреторную клетку, максимальных скоростей синтеза и текущих значений потоков (Baldwin, 1995; Cant, McBride, 1995; CAB Intern., 2000; Cherepanov et al., 2000; Hanigan et al., 2001a,b; Черепанов, 2002; Макара и др., 2004). Такую информацию нельзя получить прямыми методами, например, путем проведения биопсии с последующим анализом состава гомогенатов ткани или изучения культуры выделенных клеток. С другой стороны, информация о численных значениях метаболических параметров в условиях *in vivo* необходима для количественного анализа регуляции и идентификации узких мест в интактной лактирующей молочной железе.

В настоящей работе представлены методические материалы и результаты исследований, проведенных авторами с использованием этой новой методологии на лактирующих жвачных животных (на коровах и козах). При изучении процессов метаболизма на уровне ткани и органа обычно считают целесообразным выделить две составляющие: 1) перенос субстратов из крови в

межклеточное пространство и далее внутрь клеток и 2) внутриклеточный обмен поступающих в клетку нутриентов и использование их в процессах биосинтеза или энергообеспечения клетки. Обеспеченность субстратами биосинтетической функции клеток определяется в основном тремя физиологическими факторами: концентрацией в притекающей крови, уровнем кровоснабжения органа и состоянием системы трансмембранного переноса из интерстиция в клетку. Описанию новых методических подходов к количественной оценке этих факторов в физиологическом эксперименте посвящен первый раздел данного пособия.

Несомненно, что в основе наблюдаемых в опыте колебаний в темпах молокообразования лежат скоординированные сдвиги в соотношениях кинетических параметров и концентраций на уровне микроциркуляции, мембранного транспорта и клеточного метаболизма. Если ставится задача научиться выявлять узкие места в этой целостной сети взаимосвязанных процессов и предсказывать продуктивный эффект, то для этого необходимо иметь, как минимум, две теоретические разработки: 1) количественное описание системы (модель) и 2) методы идентификации узких мест на основе синтеза теории и измерительных данных. Хотя исследования биосинтетической функции молочной железы по этим двум направлениям в настоящее время делают лишь первые шаги, непосредственный полезный эффект может состоять в том, что разрабатываемые системно-функциональные модели позволят лучше интерпретировать опытные данные, изучить возможные следствия, вытекающие из принятых гипотез, провести проверочные эксперименты для заполнения «белых пятен». Этот путь более сложный и трудный, по сравнению с эмпирическим исследованием, но он необходим для выяснения факторов и механизмов, лимитирующих биосинтез. Некоторые методические приемы такого исследования и полученные результаты представлены во второй части пособия.

В задачу настоящей работы не входило изложение общих аспектов биологической кинетики, также как и методов аналитического и компьютерного моделирования, поскольку для их освоения необходима специальная подготовка и соответствующие материалы освещены в доступной литературе (Рубин и др., 1977; Корниш-Боуден, 1979; Любимов, 1980; Димитров, 1982; Франс, Торнли, 1987; Гачок, 1987; Вартофский, 1988; Лищук, 1991; Черепанов, 1998, 2002). Целью изложения в основном было ознакомление широкого круга физиологов, биофизиков и биохимиков с теми возможностями, которые предоставляют методы системной биокинетики – сами по себе и в сочетании с применением современной компьютерной технологии, - в исследованиях метаболизма *in vivo*, т.е. при изучении обменных процессов, протекающих в интактных органах и тканях с использованием обычной физиологической техники. Некоторые простые расчетные методики, вытекающие из анализа кинетических схем транспорта и использования субстратов в системе капилляр – интерстиций – клетка, физиолог-экспериментатор может использовать для оценки количественных параметров по данным измерения артериовенозной разницы концентраций (ABP) и объемной скорости кровотока. Дру-

гие, более сложные подходы, требующие применения компьютерной техники, изложены без привлечения математических формул с целью иллюстрации возможностей метода. Верификация полученных результатов проведена в серии опытов на животных, в том числе с регистрацией переходного процесса при вызванном отклонении от стационарного состояния.

Хотя эти результаты касаются пока лишь отдельных частных аспектов метаболизма, взятые в совокупности, они позволяют говорить о формировании новой системы оценки состояния обменных процессов, основанной на комплексном использовании современной техники физиолого-биохимических измерений и новой информационной технологии. Практическое значение эта система может иметь в связи с задачами совершенствования молочного скота по признакам продуктивного долголетия и качества получаемой продукции, так как одним из критических звеньев в реализации этой задачи является разработка и внедрение новых систем питания, физиологического мониторинга продуктивных функций, поддержания здоровья и комфортности условий содержания животных.

2. Кинетика транспорта субстратов из крови в секреторные клетки молочной железы

2.1. Простейшая схема транспорта водорастворимых метаболитов с односторонним потоком в клетку

Рассмотрим транскапиллярный перенос низкомолекулярных водорастворимых субстратов (метаболитов), предполагая, что он осуществляется в основном путем конвективного и диффузионного переноса через заполненные водой поры по старлинговскому механизму: фильтрация на артериальной стороне капилляра и реабсорбция на венозной стороне (и, вероятно, в мелких венах).

Обозначения: c_a, c_v, c_2, c_1 - концентрация метаболита в плазме артериальной и венозной крови, во вне- и внутриклеточной жидкости соответственно, мМ; V_{max} - максимальная скорость транспорта метаболита через плазматические мембраны клеток (молей в единицу времени на весь орган); Q - объемная скорость плазмотока (л/ед. времени); Sup - поступление к органу с кровью (моль/час или моль/мин, $Sup = c_a Q$).

Если система находится в стационарном состоянии, общая скорость поглощения метаболита органом равна суммарной скорости транспорта внутрь клеток (v), которая в общем случае зависит от внеклеточной концентрации с эффектом насыщения:

$$Q(c_a - c_v) = \frac{V_{max} c_2}{K_m + c_2} \quad (1)$$

В этой зависимости V_{max} представляет собой мощность мембранных систем транспорта, т.е. максимальная скорость транспорта при избытке суб-

стра (моль/ед. времени), а K_m – характеристику средства (аффинность), которая численно равна концентрации, соответствующей точке полунасыщения. Для многих реальных транспортных систем физиологическая область концентраций находится левее точки полунасыщения. Если текущая концентрация существенно меньше значения K_m , то скорость транспорта линейно зависит от концентрации, так как правая часть в уравнении (1) в этом случае выражается простым соотношением $v = (V_{max}/K_m) c_2$. Выполнимость данного ограничения для основных метаболитов - нутриентов будет проанализирована ниже.

Рассмотрим наиболее простой случай системы с однонаправленным потоком метаболита через плазматическую мембрану клетки:

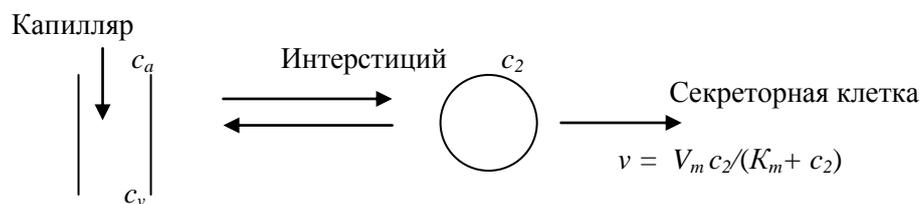


Рис. 1. Простейшая схема переноса водорастворимых метаболитов из крови в клетку. Полная фильтрация водной фазы капиллярной крови без шунтирования ($c_v = c_2$). Транспорт внутрь клеток не насыщен по субстрату. По данным артерио-венозного баланса в этой системе возможна несмещенная оценка константы скорости транспорта метаболита в клетку.

В соотношении (1) не учитываются некоторые факторы, реально действующие в ткани, например, изменения в значениях гематокрита и венозной концентрации, связанные с оттоком жидкости с молоком и лимфой, поскольку вклад этих факторов в общую величину артерио-венозного баланса в данном случае малозначим, так как соотношение объема протекающей через орган крови к объему молока составляет в среднем 500:1.

Концентрацию метаболита во внеклеточной жидкости в обычных условиях физиологического эксперимента измерить трудно, но определенную информацию о ней содержат данные по составу крови, взятой из вен. При наличии интенсивного транкапиллярного обмена через водопроницаемые поры эндотелия, обычно многочисленные в паренхиматозных секреторных тканях, можно в первом приближении принять, что венозная концентрация метаболита выровнена с концентрацией его в интерстиции, т.е. $c_v = c_2$. Экспериментальные данные, свидетельствующие о выполнении данного условия для лактирующей молочной железы, приведены в нижеследующем разделе.

Для области концентраций $c_2 \ll K_m$ из уравнения (1), с учетом условий $c_v = c_2$ и $v = V_{max} c_2 / K_m$, вводя дополнительное обозначение $T = V_{max} / K_m$ (константа скорости или активность транспорта, выраженная в единицах клирен-

са в расчете на орган, л/ед. времени), согласно уравнения (1), имеют место следующие соотношения:

$$Q(c_a - c_v) = c_v T \quad (2)$$

Зависимость венозной концентрации от артериальной:

$$c_v = \frac{Qc_a}{T + Q} = \frac{c_a}{1 + \frac{T}{Q}} \quad (3)$$

Артерио-венозная разница концентраций :

$$c_a - c_v = \frac{Tc_a}{T + Q} = \frac{c_a}{1 + \frac{Q}{T}} = \frac{c_v T}{Q} \quad (4)$$

Эффективность поглощения из крови $E = (c_a - c_v)/c_a$:

$$E = \frac{T}{T + Q} = \frac{1}{1 + \frac{Q}{T}} \quad (5)$$

Обратим внимание, что в этой модели величина E не зависит от c_a .

Общая скорость потребления метаболита органом P :

$$P = Q(c_a - c_v) = \frac{Qc_a}{1 + \frac{Q}{T}} = c_v T \quad (6)$$

Из соотношений (4) и (6) следуют выражения для оценки *in vivo* величины T :

$$T = \frac{Q(c_a - c_v)}{c_v} = \frac{P}{c_v} \quad (7)$$

Кроме того, путем преобразования из выражения (7) можно получить дополнительное соотношение:

$$T = Q \frac{E}{1 - E} \quad (8)$$

Это выражение можно использовать для пересчета результатов опытов, описанных в литературе, в тех случаях, когда авторы приводят не первичные данные по артериальной и венозной крови, а величины Q и E или Sup , P и Q .

Соотношение (8) можно переписать в форме зависимости E от T и Q :

$$E = \frac{T}{Q + T} = \frac{1}{1 + \frac{Q}{T}} \quad (9)$$

Из анализа соотношения (9), формально эквивалентного формуле Михаэлиса-Ментен при $V_{\max} = 1$, следуют два заключения: 1) коэффициент извлечения из крови нелинейно зависит от активности транспорта с выходом на уровень плато при больших значениях T и 2) при постоянных значениях активности транспорта изменения коэффициента извлечения обратны по знаку изменениям кровотока. Поскольку эти заключения важны для правильной

интерпретации физиологических опытов, мы вернемся к ним после того, как проверим выполнимость постулатов, принятых при формулировке модели.

Изложенный подход к анализу данных физиологического эксперимента отличается от традиционного тем, что вместо эффективности извлечения метаболита из крови рассчитывается показатель клиренса, который, согласно вышеизложенному, для многих метаболитов количественно отражает активность их транспорта в клетку. С целью иллюстрации различий в этих подходах в табл. 1 приведена сводка основных формул, используемых при традиционном и новом подходе.

Таблица 1. Сводка формул для расчета показателей артериовенозного баланса с использованием традиционного и нового методов

Традиционный метод	Новый метод
$E = \frac{Ca - Cv}{Ca}$ (1)	$T = Q \frac{Ca - Cv}{Cv} = Q \frac{E}{1 - E}$ (2)
$Sup = Q Ca$ (3)	$Cv = \frac{QCa}{Q + T}$ (4)
$P = Q (Ca - Cv)$ (5)	$P = T Cv$ (6)

Экспериментальные данные, свидетельствующие о возможности применения простейшей схемы транспорта низкомолекулярных водорастворимых метаболитов из крови в клетку, состоят в следующем.

По данным ряда исследований, физиологическая область концентрации свободных аминокислот обычно не достигает значения константы Михаэлиса для соответствующих систем, транспортирующих эти аминокислоты в клетки разных тканей (Baumrucker, 1985; Christensen, 1965, 1990). Так, в опытах, проведенных *in vivo* с использованием инфузии меченых аминокислот, линейная зависимость скорости транспорта в скелетной мышце у крыс в широкой области концентраций выявлена для аргинина, лизина, треонина и триптофана (Vanos et al., 1973). Значение K_m для транспорта гистидина в сердце у свиней равно 0,7 мМ, что примерно на порядок выше физиологической концентрации в крови (Hinde, Ahmed, 1998). Для метионина значение K_m для транспорта в клетки печени крыс равно 1,56 мМ при физиологической концентрации 0,04 мМ (Crawhall, Purkiss, 1973). В опытах с перфузией *in situ* лактирующей молочной железы крыс линейная зависимость скорости поглощения глутамина от концентрации была линейной в области до 2 мМ, а физиологически нормальная концентрация глутамина в плазме крови и в молоке составляет 0,7 и 0,03 мМ (Calvert et al., 1998).

Данные, характеризующие двусторонний транспорт глюкозы на базолатеральной и апикальной стороне секреторных клеток, показывают, что переносчики глюкозы не насыщены при физиологических концентрациях (Faulkner, 1985; Faulkner et al., 1987). Если концентрацию глюкозы в притекающей крови поддерживать на постоянном повышенном уровне, то ее концентрация

в молоке (отражающая внутриклеточную концентрацию) у женщин увеличивается в течение нескольких часов (Neville et al., 1990). Поток расходования ацетата в молочной железе линейно зависит от его концентрации в артериальной крови (King et al., 1985). Источником внутриклеточного ацетата могут быть также кетоновые тела (β -оксибутират). Учитывая низкую концентрацию ацетата внутри клеток (о физиологической области концентрации можно судить по значению K_m по ацетату для ацетил-КоА-синтетазы (0,1 мМ), которая не насыщена в нормальных условиях) и отсутствие специфических переносчиков, скорость его поступления внутрь клеток можно представить линейной зависимостью от концентрации в интерстициальной фазе.

Наличие интенсивного двунаправленного трансакапиллярного переноса низкомолекулярных метаболитов впервые было установлено и изучено в исследованиях, проведенных с использованием радиоактивно-меченых соединений, что послужило основанием для использования в кинетических расчетах модели, предполагающей наличие одного гомогенного пула плазмы крови и внеклеточной жидкости (Sheppard, 1962; Atkins, 1969; Shipley, Clark, 1972; Kronfeld, Ramberg, 1981). В последующие годы количественные данные по молочной железе и печени были получены с использованием различных методов (Goresky, 1980; Farr et al., 2000). В опытах, проведенных на козах новозеландской группой исследователей, в качестве метки использовалась ^{14}C -сахароза, которую вводили вместе с не диффундирующим индикатором (альбумин с флуоресцентной меткой) в виде болюса с 3 мл физраствора в срамную артерию с последующим отбором венозной крови через каждые 2 сек с применением микроасоса, откачивающего кровь из молочной вены в течение одной минуты после инъекции. Рассчитанная по данным регистрации метки общая скорость фильтрации, представляющая собой произведение капиллярной проницаемости на площадь поверхности капилляров, составила 45 мл/мин на 100 г ткани при объемной скорости кровотока, равной 50 мл/мин на 100 г ткани (Prosser et al., 1996; Farr et al., 2000). Благодаря интенсивной фильтрации и реабсорбции жидкой фазы темп использования метаболитов в клетках может эффективно регулироваться на уровне транспорта через плазматическую мембрану, тогда как при низком уровне фильтрации скорость метаболизации нутриента в основном лимитировалась бы проницаемостью капиллярной стенки.

Логическим следствием из факта интенсивного двустороннего трансакапиллярного переноса и перемешивания в интерстиции может быть заключение о том, что венозная концентрация отражает концентрацию во внеклеточной жидкости, непосредственно контактирующей с плазматической мембраной клетки и по этой причине А-В разницу логичнее было бы относить не к артериальной концентрации (коэффициент извлечения), а к венозной.

Косвенно выполнимость допущений, принятых при рассмотрении простейшей схемы транспорта водорастворимых субстратов, можно проверить, если на основе этой модели предсказать какие-то количественные эффекты, а затем поставить проверочный эксперимент, чтобы подтвердить или отвергнуть модельные допущения. Для проверки работоспособности модели необходимо также провести измерения с использованием независимого метода.

Подтверждение правильности модели было получено в серии проверочных экспериментов.

2.1.1. Первый проверочный эксперимент

Из выражений (3) и (4) следует, что при вариациях кровотока на фоне постоянства артериальной концентрации величины А-В разницы и коэффициента извлечения из крови будут изменяться с обратным знаком по отношению к изменениям кровотока. Это теоретическое предсказание было подтверждено результатами экспериментов (Макар и др., 2002). Опыт был проведен на лактирующих коровах в фазе установившейся лактации и включал в себя три периода – контрольный, опытный и заключительный длительностью 24 ч каждый. В опытном периоде отменяли дачу концентратов с последующим возобновлением кормления в полном объеме, при этом проводили непрерывные измерения регионального кровотока и периодические измерения концентрации водорастворимых метаболитов в крови. По данным измерений вычисляли А-В разницу, эффективность извлечения, скорость поглощения органом и активность транспорта в клетки молочной железы. На протяжении трех периодов уровень глюкозы, свободных аминокислот (альфа-аминного азота), бэта-оксибутирата и ацетата существенно не изменялся, но кровоток через молочную железу снижался, начиная с 3-4 часов после отмены дачи концентратов и к концу 24- часового периода снизился на 50% по отношению к контролю, параллельно наблюдалось снижение скорости поглощения метаболитов органом, тогда как значения А-В разницы и эффективности извлечения в этот период увеличивались (рис. 2-4).

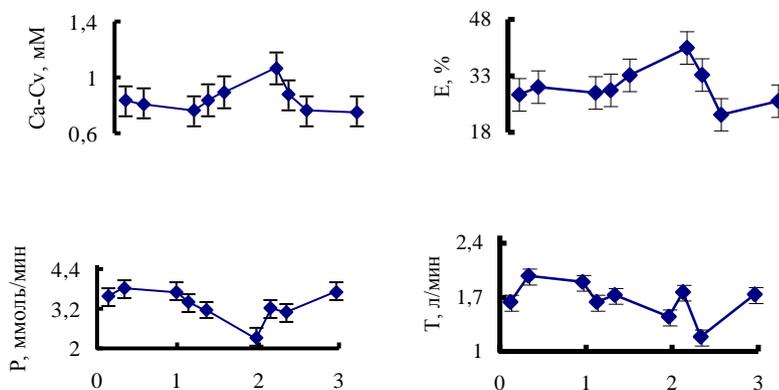


Рис. 2. Динамика показателей артерио-венозного баланса глюкозы в молочной железе коров на протяжении опыта. По оси абсцисс – время, сутки по периодам: предварительный период (0 – 1), период депривации (1 – 2), период восстановления кормления (2 – 3). Ca – артериальная концентрация, mM; Cv – венозная концентрация, mM; Ca - Cv – артерио-венозная разница, mM; E – коэффициент извлечения из крови, %; P – поглощение в органе,

ммоль/мин; T – активность транспорта в клетки, л/мин. Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего.

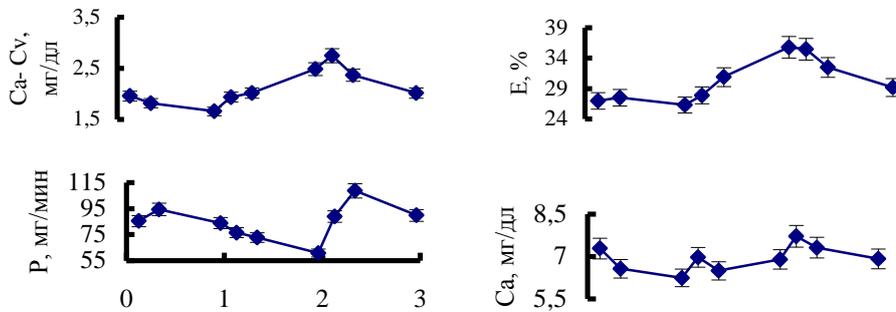


Рис. 3. Динамика показателей артерио-венозного баланса β -оксималяной кислоты на протяжении опыта. По оси абсцисс – время, сутки по периодам: предварительный период (0 – 1), период депривации (1 – 2), период восстановления кормления (2 – 3). Ca – артериальная концентрация, мМ; Cv – венозная концентрация, мМ; $Ca - Cv$ – артерио-венозная разница, мМ; E – коэффициент извлечения из крови, %; P – поглощение в органе, ммоль/мин; T – активность транспорта в клетки, л/мин. Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего.

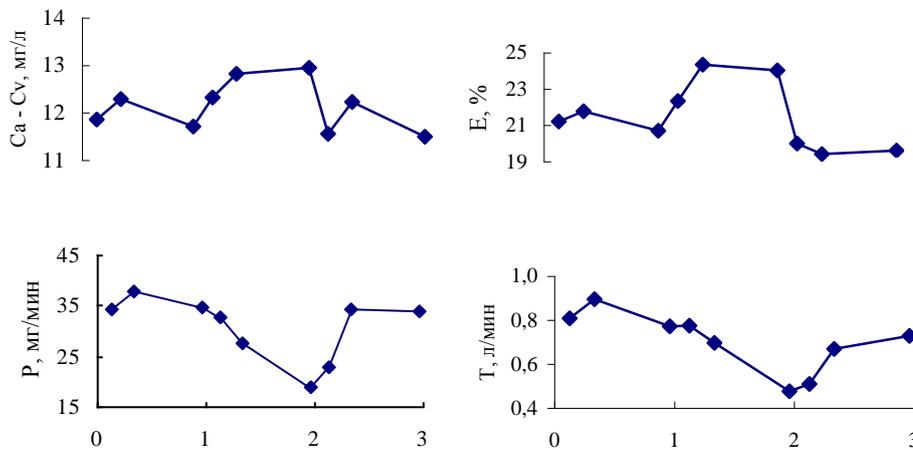
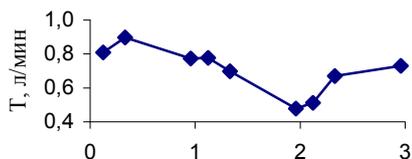


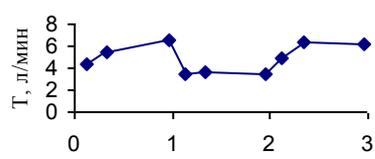
Рис. 4. Динамика показателей артерио-венозного баланса альфа-аминного азота на протяжении опыта. Обозначения те же, что и на рис. 2.

В отличие от А-В разницы и коэффициента извлечения, активность транспорта в период депривации концентратов не увеличивалась, а имела тенденцию к снижению, а в случае альфа-аминного азота это снижение было статистически достоверным (рис. 5).

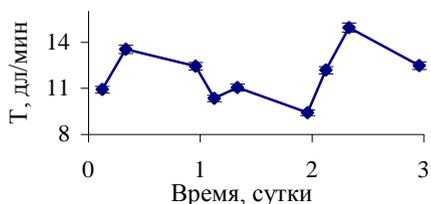
α -аминный азот



Ацетат



β -оксимасляная кислота



Кровоток

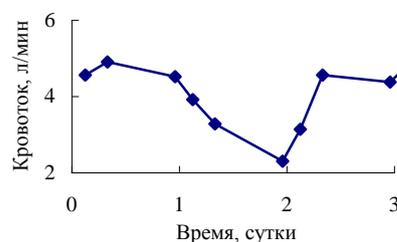


Рис. 5. Динамика объемной скорости кровотока в вымени (кровоток через половину вымени $\times 2$) и активность транспорта аминокислот, β -оксибутирата и ацетата в секреторные клетки молочной железы у коров в исходном состоянии (1-е сутки), в период частичной депривации корма (2-е сутки) и после возобновления кормления (3-е сутки).

2.1.2. Второй проверочный эксперимент

В качестве материала для анализа были взяты первичные данные, описанные в литературе, с пересчетом их по вышеизложенной методике. Вычисленные величины T были сопоставлены со значениями константы одностороннего переноса индивидуальных аминокислот из интерстиция в секреторные клетки молочной железы (K_{in}), полученными на тех же животных с использованием смеси U- 13 C-аминокислот, которую авторы вводили в яремную вену в течение 7 ч с периодическим взятием проб из артерии и молочной вены и регистрацией объемного кровотока (Bequette et al., 2000). После этой апробации метода расчет значений T был сделан для описанных в литературе опытов, проведенных на коровах с регистрацией показателей артериовенозного баланса и кровотока на фоне поструминальных инфузий индивидуальных аминокислот (Cant et al., 2003).

Таблица 2. Значения активности транспорта аминокислот в клетки молочной железы коз, оцененные по кинетике изотопной метки $U\text{-}^{13}\text{C}$ (K_{in} , л/мин) (Bequette et al., 2000) и по эффективности извлечения из крови с учетом объемного кровотока (T , л/мин)

Аминокислоты	E		K_{in} , л/мин		T , л/мин		Ca , мкмоль/л	
	+Н	-Н	+Н	-Н	+Н	-Н	+Н	-Н
Гистидин	0,17	0,74	0,14	6,05	0,094	1,747	73	8
Фенилаланин	0,45	0,21	0,56	0,25	0,377	0,163	40	46
Тирозин	0,37	0,15	0,57	0,17	0,271	0,108	44	55
Лейцин	0,72	0,49	1,63	0,77	1,186	0,590	79	88
Изолейцин	0,57	0,42	0,76	0,59	0,612	0,445	75	75
Валин	0,52	0,32	0,69	0,35	0,500	0,289	108	129
Лизин	0,41	0,19	0,32	0,2	0,321	0,144	147	182
Треонин	0,3	0,17	0,27	0,17	0,198	0,126	106	106
Пролин	0,27	0,14	0,05	0,16	0,171	0,100	126	131
Аланин	0,31	0,17	0,43	0,42	0,207	0,126	142	115
Глицин	0,01	-0,1	0,05	0,04	0,005	-0,06	897	819

Примечание: +Н: инфузия в яремную вену сбалансированной смеси аминокислот; -Н: такая же инфузия смеси аминокислот без гистидина; объемная скорость плазмотока в молочной железе по этим периодам опыта: 27,68 и 36,83 л/час (0,46 и 0,61 л/мин) соответственно.

При сопоставлении значений K_{in} , оцененных по кинетике изотопной метки, с соответствующими значениями T , вычисленными для контрольного (+Н, инфузия сбалансированной смеси аминокислот) и опытного (-Н, смесь без гистидина) периодов, было выявлено соответствие по 9 исследованным аминокислотам (табл. 2, рис. 6а), хотя по абсолютной величине значения T были меньше значений K_{in} , как и следовало ожидать, поскольку односторонний перенос частично компенсируется обратным транспортом из клетки. Аналогичное соответствие, хотя и с несколько большим разбросом точек, отмечено в данном опыте и для связи величин K_{in} и E в области значений E от 0 до 0,5 с тенденцией к выходу на уровень плато для E при больших значениях K (рис. 6б).

При инфузии смеси аминокислот без гистидина в данной работе кровоток через молочную железу был увеличен, поэтому величина E для других аминокислот могла снизиться из-за рассмотренного выше эффекта разведения, однако измерения K_{in} и наш расчет величины T показали, что в этот период была снижена и транспортная активность клеток по ряду аминокислот на фоне резкого увеличения ее по гистидину. При дефиците гистидина изменялся уровень в крови ряда индивидуальных свободных аминокислот, что, вероятно, было вызвано сдвигами в транспортной активности мембран секреторных клеток молочной железы. При сопоставлении относительной вариации активности транспорта с относительной вариацией уровня данной

аминокислоты в крови ((+H)-(-H))/+H) положительная корреляция была выявлена для четырех незаменимых аминокислот (лизин, фенилаланин, лейцин, тирозин; относительная вариация Ca : 0,238; 0,150; 0,114; 0,250 соответственно; рис. 7).

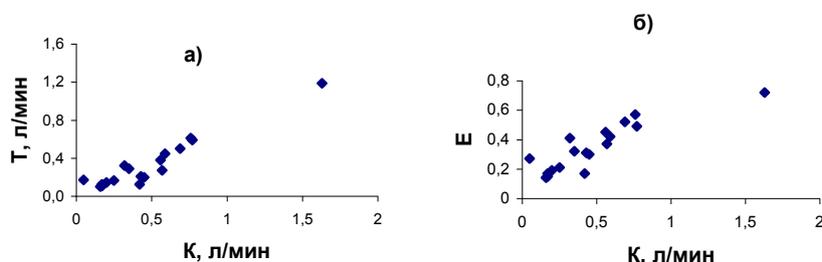


Рис. 6. Сопоставление значений активности транспорта аминокислот (K), оцененных с использованием ^{13}C (K , л/мин) (4) и по артериовенозному балансу в тех же условиях опыта (T , л/мин). а) Объединенные данные по контрольной и опытной инфузиям; приведены значения K и T для 9 аминокислот (табл. 3, без гистидина и глицина), полученные в контрольном периоде с инфузией в сычуг сбалансированной смеси аминокислот, восполняющей дефицит 23% от потребности в доступном для усвоения белке, и в опытном периоде с инфузией той же смеси без гистидина; б) то же самое для K и E ;

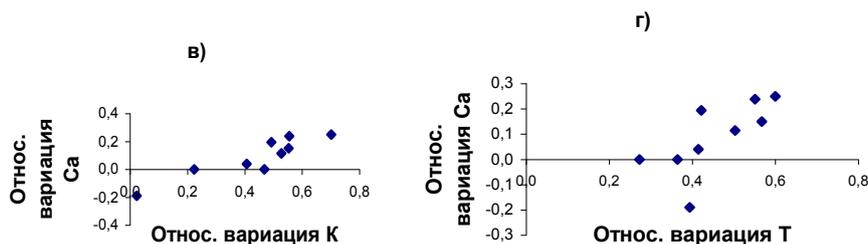


Рис. 7. Сопоставление относительной вариации значений K и T с относительной вариацией уровня в крови для 9 индивидуальных аминокислот ((+H)-(-H))/+H). Обозначения те же, что и на рис. 5.

В отличие от рассмотренной ситуации с дефицитом гистидина, в серии опытов, выполненных на коровах с поструминальным введением индивидуальных аминокислот и измерениями артериовенозного баланса (E , P , Ca) и кровотока в молочной железе (Cant et al., 2003), объемная скорость кровотока при нагрузках аминокислотами (также как и активность транспорта) в большинстве случаев снижалась, что должно было привести к завышенным значениям величины E , если экспериментальное воздействие снижало интенсивность транспорта аминокислот в клетку. Действительно, в первом опыте с инфузией метионина (мет1) в исследованном интервале доз величина E для метионина снизилась в 3,5 раза, тогда как величина T – в 5,6 раз; в опыте с инфузией гистидина (гис1) эти значения составили 2 и 4,2 соответственно. Различие по величине сдвигов в этих величинах связано с тем, что зависи-

мость $E = f(T)$ нелинейная (см. соотношение (9) и рис. 9а). Этот аспект будет более подробно проанализирован в нижеследующем разделе.

Адаптивное снижение активности транспорта в данном опыте привело к тому, что величина А-В разницы (так же как и общее поглощение аминокислоты органом) (рис. 8б) оставалась практически постоянной, что иллюстрирует малую информативность этого показателя в рассмотренной экспериментальной ситуации.

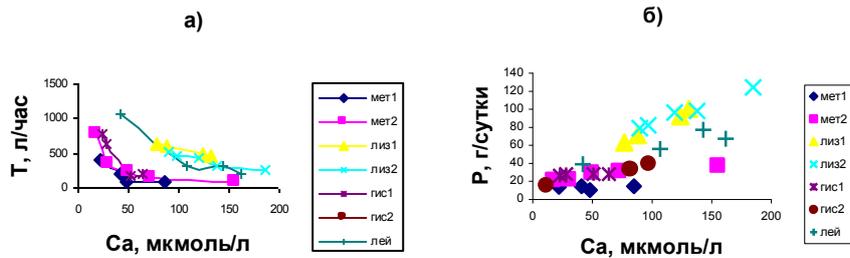


Рис. 8. Активность транспорта аминокислот в секреторные клетки молочной железы (а) и их поглощение (б) в зависимости от артериальной концентрации при поструминальных инфузиях индивидуальных аминокислот (Источники данных по вариантам опытов приведены в работе: Черепанов, Макар, 2005).

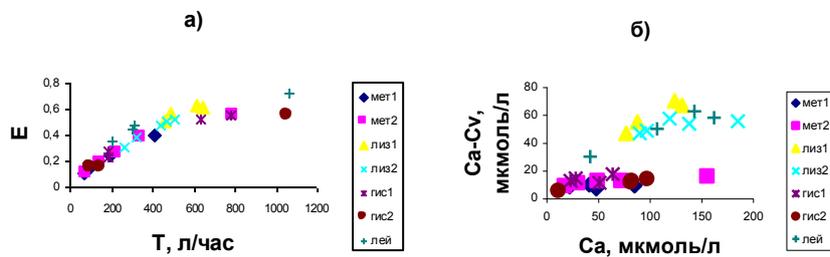


Рис. 9. Взаимосвязь величин E и T (а) и артериовенозной разницы с содержанием аминокислоты в крови (б) по данным 7 серий опытов с поструминальным введением индивидуальных аминокислот (Источники данных те же, что и на рис. 8).

2.1.3. Третий проверочный эксперимент

Опыт был проведен методом периодов на лактирующих козах, которым предварительно были вживлены хронические катетеры в левую и правую яремную вены. В контрольном периоде животным инфузировали физраствор в течение 6 часов, а затем ежедневно в такой же прописи вводили инсулин в

сочетании с глюкозой. С целью поддержания нормогликемии периодически после начала инфузии из яремной вены отбирали пробы крови для определения в них содержания глюкозы с последующей коррекцией скорости ее введения (Макар и др., 2005). Внутривенное введение инсулина с глюкозой не оказало заметного влияния на концентрацию альфа-аминоазота и глюкозы в крови и на содержание белка в молоке, существенно стимулировало региональный кровоток, скорость молокообразования и продукцию белка. Поглощение аминокислот и глюкозы в опытный период существенно увеличивалось, что отражает повышенную скорость молокообразования и продукции белка; при этом показатели А-В разницы и эффективности извлечения из крови по альфа-аминоазоту оказались статистически достоверно ниже, по глюкозе они не отличались от контроля, а значения активности транспорта аминокислот и глюкозы для опытных периодов были существенно выше, чем в контроле (табл. 3).

При анализе объединенных данных по трем периодам была выявлена высокодостоверная корреляция активности транспорта аминокислот в клетки молочной железы со скоростью продукции молочного белка (рис. 10; $r=0,8$, $P=0,001$), тогда как эффективность извлечения аминокислот из крови не была статистически достоверно связана с продукцией белка (с тенденцией к отрицательной взаимосвязи).

Таблица 3. Параметры кровоснабжения и артерио-венозного баланса альфа-аминного азота и глюкозы в молочной железе у коз при внутривенной инфузии инсулина с глюкозой

Показатели	Периоды опыта			Оценка эффекта ⁺
	кон- трольный M±m	опытный, M±m		
		1-я инфузия	2-я инфузия	
Плазмоток, мл/мин	415±106	557±106	729±101	228±66*
Поглощение:				
глюкоза, ммоль/мин	0,26±0,08	0,38±0,11	0,51±0,09	0,19±0,04**
α-аминоазот, мг/мин	5,47±0,47	6,62±0,41	7,05±0,34	1,36±0,48*
Эффективность извлечения из крови, %:				
α-аминоазот	25,6±2,65	23,1±2,45	17,7±2,65	-7,9±2,5*
глюкоза	20,7±2,52	21,1±1,97	21,0±1,92	0,34±4,32
Активность транспорта, мл/мин:				
α-аминоазот	132±13	159±14	152±11	23,6±8,9 ^{*)}
глюкоза	106±41	146±44	200±16	67,2±26,5 ^{*)}

Примечание: ⁺ - средняя разность при парных сравнениях с контролем ± стандартная ошибка средней разности; * $P<0,05$; ** $P<0,01$ по парному t-критерию; ^{*)} $P=0,05$ по критерию знаков.

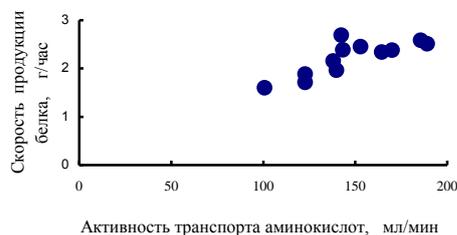


Рис. 10. Взаимосвязь скорости продукции молочного белка с активностью транспорта аминокислот (α -аминного азота) в клетки молочной железы ($r = 0,8$, $P = 0,001$).

Таким образом, фактические данные, полученные в серии проверочных опытов, не противоречат следствиям, вытекающим из анализа простейшей модели транспорта и соотношений (3) - (8). Совпадение модельного прогноза с данными наблюдений служит дополнительным аргументом в пользу модели, хотя в строгом смысле не является доказательством ее истинности. Поэтому для правильного ее применения необходимо иметь более тщательно проработанную доказательную базу и четко определить область применимости модельных расчетов.

2.1.4. Анализ взаимосвязи параметров артерио-венозного баланса с активностью транспорта водорастворимых метаболитов в клетку

Соотношение между общей величиной поглощения метаболита клеткой и активностью транспорта аналогично соотношению между скоростью химической реакции и константой скорости реакции, поскольку элементарные стадии и химической реакции, и процесса транспорта подчиняются одному и тому же закону действующих масс. В простейшем случае односубстратной реакции скорость процесса пропорциональна концентрации, а коэффициент пропорциональности есть константа скорости. Если общая скорость отнесена к единице реакционного объема, то константа скорости имеет размерность [ед. времени]⁻¹, если же скорость реакции рассчитана на весь объем, то получается величина, имеющая размерность [ед. объема/ед. времени]. Эту величину называют клиренсом и она выражает реакционный объем, который «очищается» от субстрата за единицу времени за счет того процесса, к которому относится данная константа скорости. Для оценки ее численного значения скорость наработки продукта или скорость убыли субстрата приводят к концентрации, равной единице, т.е. величину скорости, измеренной в стандартных условиях (рН, температура и т.д.), делят на концентрацию субстрата в среде.

Аналогично этому активность транспорта есть скорость поглощения, приведенная к стандартным условиям измерения, т.е. к концентрации, равной единице. Для примера, если скорость поглощения метаболита органом равна

10 ммоль/час при концентрации в межклеточной жидкости 5 моль/мл, то активность суммарного транспорта равна $10/5 = 2$ мл/час. Константа скорости и клиренс характеризуют природу реагирующего вещества в случае химической реакции и свойства материала или мембранной транспортной системы в случае процессов массопереноса. При проведении сравнительных биологических исследований с использованием животных – аналогов по возрасту, живой массе и фазе лактации активность транспорта можно выражать в единицах клиренса. В лактирующей молочной железе величина общего поглощения метаболита – предшественника молока практически полностью обусловлена скоростью его использования клетками секреторного эпителия альвеол. Процесс может быть пассивным и активным, т.е. он может протекать по типу простой диффузии или осуществляться мембранными транспортерами. Скорость диффузии всегда прямо пропорциональна концентрации, но скорость транспорта при наличии мембранных переносчиков также пропорциональна концентрации, если исследуемые значения концентрации значительно меньше точки полунасыщения (K_m). При изучении систем активного транспорта измерения убыли субстрата или накопления продукта проводят в более широкой области концентраций и затем проводят расчет параметров (в простейшем случае – значений V_{max} и K_m) с использованием той или иной модели кинетики ферментов.

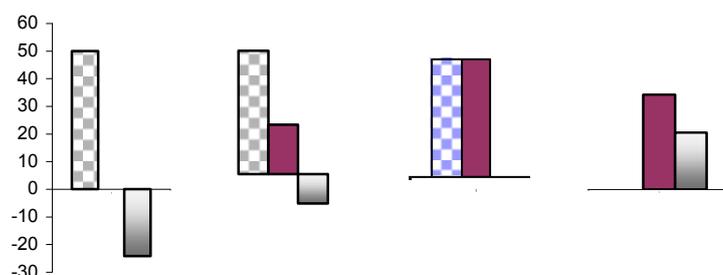
В физиологическом эксперименте убыль субстрата оценивают по величине артерио-венозного баланса, при этом скорость кровотока может быть определена как результат прямого независимого измерения, остальные же традиционно используемые показатели – А-В разницу концентраций, коэффициент извлечения из крови и общую скорость поглощения определяют расчетным путем, при этом показатели абсолютной и относительной А-В разницы, как было показано выше, наиболее трудно интерпретировать содержательно. В контексте рассматриваемой модели транспорта водорастворимых метаболитов причина этого заключается в том, что А-В разница концентраций зависит и от кровотока, и от активности транспорта, но эти два компонента влияют на величину А-В разницы с противоположным знаком, поэтому оценить реальную картину без применения специальной методики пересчета данных часто бывает практически невозможно.

Для иллюстрации рассмотрим несколько случаев с определенными значениями кровотока Q и активности транспорта T , которые, согласно соотношения (8), определяют численное значение А-В разницы и эффективности извлечения из крови E . В одном случае в исходном состоянии $E = 0,33$, во втором $E = 0,75$. Для каждого из этих случаев значения Q и T были проварьированы в небольших пределах, по соотношению (9) вычислены соответствующие значения E и все величины выражены в процентах к исходному состоянию. Результаты расчетов приведены на рис. 11.

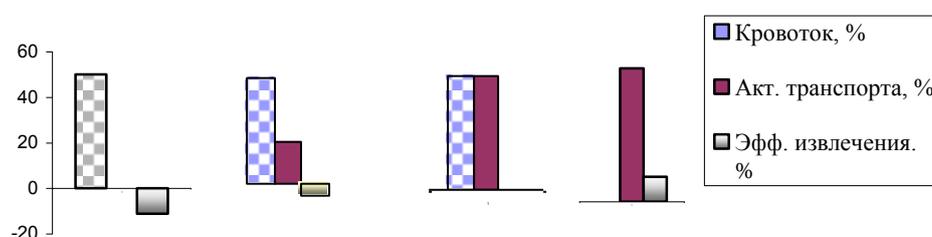
В первой ситуации, когда увеличен кровоток, а активность транспорта не меняется, изменения величины E противоположны по знаку фактическим сдвигам в активности транспорта. Во второй ситуации, когда прирост величины кровотока больше прироста активности транспорта, сдвиг рассчитанной величины E также противоположен по знаку фактическим изменениям

активности транспорта. В третьей ситуации процентное увеличение кровотока и активности транспорта идентично и в этой ситуации величина E остается на исходном уровне, т.е. ее определение в такой ситуации не информативно. В последней из рассмотренных ситуаций, когда кровоток не изменяется, величина E адекватно отражает сдвиги в транспортной активности по знаку изменения, но по мере увеличения базовых значений E этот показатель становится малочувствительным к фактическим изменениям активности транспорта (см. рис. 9а).

Q	T	E	$\Delta E\%$	Q	T	E	$\Delta E\%$
4	2	0,33		2	6	0,75	
6	2	0,25	-24	3	6	0,67	-11
6	2,4	0,29	-12	3	7,2	0,71	-5,3
6	3	0,33	0	3	9	0,75	0
4	3	0,43	30	2	9	0,82	9,3



$E = 0,33$



$E = 0,75$

Рис. 11. Численный пример и диаграммы, иллюстрирующие влияние процентных изменений объемного кровотока и активности транспорта субстрата в клетку на регистрируемые в опыте сдвиги в значениях показателя относительной $A-B$ разницы концентраций (эффективности извлечения из крови).

Приведенные примеры грубых ошибок интерпретации, возможных при использовании показателей абсолютной и относительной А-В разницы, могут вызвать недоуменный вопрос по поводу того, почему же эти показатели в течение длительного времени использовались и до сих пор используются в физиологических исследованиях для характеристики «сродства» тканевых систем к конкретным субстратам? Одной из причин этого может быть то, что в некоторых случаях, в том числе в последней ситуации, проиллюстрированной на рис. 11, эти показатели дают достаточно объективную информацию об «аффинности» соответствующих систем, например, при сравнении величин E для индивидуальных свободных аминокислот крови. Некорректность перенесения этого приема для характеристики транспортных активностей в ситуациях, характеризующихся одновременными сдвигами в величине кровотока, далеко не очевидна для исследователя-экспериментатора, и хотя некоторые расчетные модели появились в публикациях в последние годы, определенная осторожность в их практическом применении вполне объяснима ввиду сложности и недостаточной изученности микроциркуляторных процессов. Ниже рассмотрены некоторые аспекты, касающиеся ограничений в использовании простейшей модели и путей возможного ее расширения.

2.1.5. Расширенные варианты простейшей модели

Выражение (1) для стационарного состояния означает, что описанную модель можно отразить физиологически менее наглядной, но формально более корректной диаграммой (рис. 12, А или В):



Рис. 12. Модифицированные схемы транспорта водорастворимых субстратов из крови в клетку. В схеме В имеется байпасный путь, т.е. артерио-венозное шунтирование. c – концентрация, v – поток субстрата.

В варианте А фильтруется вся жидкостная фаза артериальной крови. Модификацией этого варианта может быть схема с дополнительным не идентифицированным источником поступления метаболита из крови в интерстиций, например аминокислот из пептидов крови. В варианте В имеется байпасный путь, выражаемый потоком v_4 , который может иметь морфологический смысл, ввиду возможного существования артерио-венозных шунтов, или функциональный, связанный с неполной фильтрацией жидкости или вкладом метаболически малоактивных тканей органа. Рассмотрим несколько возможных вариантов этой схемы.

1. *Наличие дополнительного не идентифицированного источника поступления метаболита из крови в интерстиций.* Используя диаграмму А, рассмотрим ситуацию, когда поступающий из крови в интерстиций поток v_1 , помимо рассмотренного выше члена $c_a Q$, содержит дополнительный компонент, который трудно измерить в опыте. Поскольку этот компонент потока также зависит от величины Q , его можно выразить в аналогичной форме $c_x Q$, где c_x имеет смысл «эффективной» концентрации не идентифицированного в данном опыте источника.

Составляем стационарный баланс потоков для пула интерстиция в прежних обозначениях при отсутствии насыщения потока v_3 :

$$c_a Q + c_x Q = c_2 Q + T c_2 \quad (10)$$

Перегруппировав члены и заменив c_2 на c_v , получаем:

$$c_v = c_a / (1 + T/Q) + c_x / (1 + T/Q) \quad (11)$$

$$c_a - c_v = c_a / (1 + Q/T) - c_x / (1 + T/Q) \quad (12)$$

В первоначальной схеме зависимость венозной концентрации от артериальной прямо пропорциональная, т.е. линия регрессии должна быть линейной и проходить через начало координат. Из проведенного анализа модифицированной схемы вытекают два заключения: 1) линейность рассматриваемой зависимости c_v от c_a в данной ситуации сохраняется, но линии регрессии c_v и $c_a - c_v$ от c_a смещены относительно начала координат; 2) при построении эмпирической линии регрессии c_v от c_a (или $c_a - c_v$ от c_a) в принципе имеется возможность найти неизвестные значения c_x и T (по величине наклона и свободного члена функции регрессии).

2. *Влияние артерио-венозного шунтирования.* Пусть β – доля плазмотока по байпасному пути, $\gamma = (1 - \beta)$, тогда $v_1 = c_a Q \gamma$, $v_2 = c_2 Q \gamma$ и измеряемая венозная концентрация составлена из двух компонентов, пропорциональных двум компонентам плазмотока

$$c_v = c_a \beta + c_2 \gamma \quad (13)$$

Составив стационарный баланс потоков для пула интерстиция и решив полученное уравнение относительно c_2 , получим:

$$c_2 = c_a (Q \gamma / (Q \gamma + T)) \quad (14)$$

После подстановки выражения (13) в правую часть (12), имеем:

$$c_v = c_a / (1 + T/Q \gamma) \quad (15)$$

$$c_a - c_v = c_a / (1 + Q \gamma / T) \quad (16)$$

Таким образом, для данного случая имеют место линейные зависимости, не смещенные относительно начала координат. Если при анализе данных в этой ситуации используется модель А (соотношения 3 и 4), не учитывающая возможный эффект шунтирования, то получаемые оценки T могут оказаться завышенными с коэффициентом $1/\gamma$.

3. Система с двунаправленным транспортом через плазматическую мембрану. Модель с однонаправленным потоком метаболита в клетку является редуцированной схемой по отношению к более сложной системе с двунаправленным потоком (рис. 13), в которой C_2 обозначает внутриклеточную концентрацию метаболита, K_3 , K_4 – активности однонаправленных компонент трансмембранного переноса, K_5 – суммарная активность внутриклеточного использования метаболита, имеющая такую же размерность, как и T . Анализ этой системы (Черепанов и др., 2003) показал следующее. Если экспериментальные данные, полученные в этой системе, интерпретируются с использованием схемы, приведенной на рис. I, то получаемое при этом значение транспортного параметра T , фактически является функцией трех коэффициентов K_3 , K_4 , K_5 :

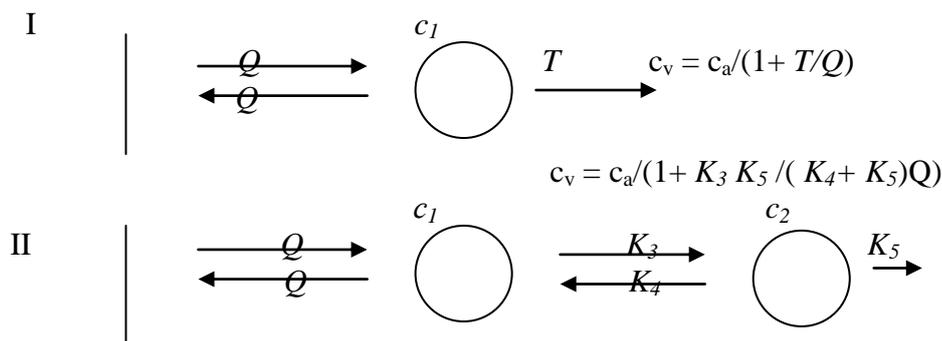


Рис. 13. Простейшая (I) и расширенная (II) схемы переноса водорастворимых метаболитов из крови в клетку. В расширенной схеме имеется противотранспорт из клетки в интерстиций.

т.е. $T = K_3 K_5 / (K_4 + K_5) = K_3 / ((K_4 / K_5) + 1)$. Поэтому необходимо определить те условия, при которых получаемая расчетная величина T имеет физиологический смысл. По имеющимся данным, полученным, как правило, в условиях *in vitro*, стационарные значения внутриклеточной концентрации для ряда метаболитов, включая глюкозу и свободные аминокислоты, характеризуются линейной пропорциональной зависимостью от внеклеточной концентрации (Park et al., 1976; Clark et al., 1980; Neville et al., 1990). Если принять $C_2 = m C_1$, то, как нетрудно показать, $K_3 = m (K_4 + K_5)$, $T = K_3 - m K_4 = m K_5$ и, сле-

довательно, $C_1 T = C_1 m K_5 = C_2 K_5$. Таким образом, в этом случае схема II с формальной точки зрения эквивалентна упрощенной модели с однонаправленным потоком (Hanigan et al., 1998; Черепанов и др., 2003).

2.1.6. Исследование статистических свойств модели

Описанная выше модель допускает проверку ее адекватности реальным процессам, например, путем анализа эмпирических зависимостей типа соотношений (3) – (6). Однако при анализе имеющихся собственных и литературных данных обнаружилось, что постулируемые линейные зависимости АВР от артериальной концентрации на сводных эмпирических графиках для некоторых метаболитов в физиологической области концентраций (например, для глюкозы) обычно не выявляются, а для других они часто оказываются сильно смещенными относительно начала координат, так что свободный член регрессии имеет не нулевую, как предсказывает модель, а большую отрицательную величину (Baldwin, Smith, 1983; Cant et al., 1993; Hanigan et al., 1992; Harris et al., 1992; Cherepanov et al., 2000). Такое расхождение между модельным прогнозом и фактическими данными должно, конечно, получить объяснение, иначе все приведенные выше рассуждения повисают в воздухе. Для анализа возможных причин указанного расхождения потребовалось около шести лет. Это расхождение могло означать, что модель в принципе не адекватна изучаемым процессам (хотя вышеприведенные эксперименты говорят об обратном) или она не учитывает какие-то дополнительные факторы, действующие в условиях опыта. Например, оказалось, что смещение линии регрессии относительно начала координат теоретически могло бы быть связано с динамической стабилизацией венозной концентрации при быстрых колебаниях содержания метаболита в притекающей крови (или скорости кровотока) вследствие инерционности системы. Другая, по-видимому, более вероятная причина, которая будет рассмотрена ниже, состоит в том, что указанное смещение может проявиться как артефакт при значительной величине вариабельности измерительных данных.

Для проверки этого предположения мы провели численный эксперимент с использованием метода статистических испытаний (метод Монте-Карло). Был рассмотрен стационарный случай, когда артериальная и венозная концентрации постоянны, а рассеяние опытных точек возникает в результате случайной ошибки опыта (суммарной ошибки при взятии крови, подготовке проб и в ходе проведения химического анализа). В таком случае можно принять, что значения артериальной (c_a) и венозной (c_v) концентраций распределены нормально с некоторой величиной дисперсии, так что результаты биохимического анализа равносильны последовательному извлечению чисел из соответствующих статистических совокупностей. Мы проанализировали несколько вариантов такого модельного опыта при одной и той же артериальной концентрации и разных значениях венозной концентрации. Для моделирования повторных измерений фоновой концентрации были взяты по 30 чисел (z_i) из таблицы случайных чисел для нормального распределения (Большов, Смирнов, 1968) при среднем значении $M = 0$ и дисперсии $\sigma = 1$ и

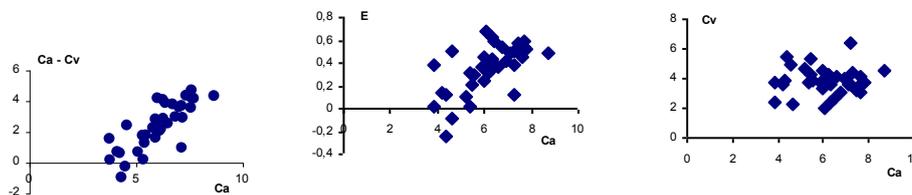
затем значения «измеренных» артериальной и венозной концентраций были вычислены по соотношению $C_i = M + z_i \sigma$, при одном и том же значении средней артериальной концентрации ($C_a = 6$) в предположении, что артериальная и венозная концентрации определяются с одной и той же относительной ошибкой.

Таким образом, в трех вариантах расчета было получено по 30 пар значений c_a и c_v , по которым были построены соответствующие графики. Как и следовало ожидать, на таких графиках отсутствует зависимость c_v от c_a , однако при этом проявляются артефактные зависимости артерио-венозной разницы и коэффициента поглощения от артериальной концентрации (рис. 14).

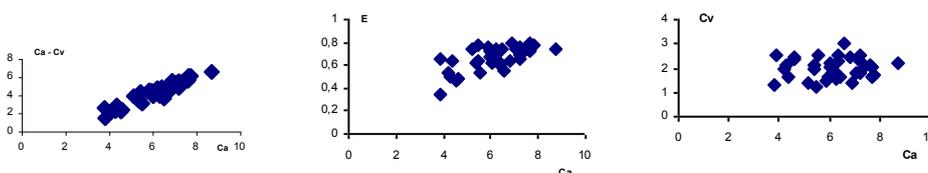
Из проведенного анализа следует сделать заключение о недопустимости использования индивидуальных значений c_a и c_v при построении сводных опытных графиков для показателей артерио-венозной разницы и E , если разброс этих значений обусловлен в основном статистическим рассеянием дат. На наличие такой ситуации может указывать характерное расположение опытных точек на графиках зависимости c_v от c_a с большой осью корреляционного эллипса, параллельной оси абсцисс. В вышеприведенных модельных вариантах корректным было бы использование лишь одной опытной точки, представленной средними значениями c_a и c_v . Для выявления «истинной» зависимости артерио-венозной разницы от c_a с теоретической точки зрения следовало бы модифицировать опыт, обеспечив получение другой пары стационарных значений c_a и c_v , чтобы проверить линейность и несмещенность линии регрессии относительно начала координат. Трудность проведения таких опытов *in vivo* состоит в том, что большое изменение величины артериальной концентрации (например, при внутривенной инфузии) может вызвать адаптивные сдвиги параметров транспортных и ферментативных процессов, в таком случае это будет уже совершенно другая биохимическая система. С другой стороны, эффекты небольшого изменения величины c_a могут перекрываться ошибками измерений.

Для оценки этих эффектов был проведен второй вычислительный эксперимент по аналогичной методике, при этом априори принималась линейная зависимость А-В разницы от артериальной концентрации, но на принятые три значения артериальной концентрации: $c_a = 2; 2,5$ и 3 и три значения венозной концентрации $c_v = 1,33; 1,66$ и 2 накладывалось статистическое рассеяние, обусловленное 10%-ной ошибкой опыта ($M \pm \sigma$). Кроме того, предполагалось, что объемный кровоток имеет среднее значение $Q = 5$ с 10%-ным статистическим рассеянием. После вычисления соответствующих значений А-В разницы были рассчитаны величины поглощения P . Таким образом были получены три набора по 12 пар значений, по которым были построены корреляционные зависимости, приведенные на рис. 15.

$$c_a = 6 \pm 1,2; c_v = 4 \pm 0,8 (M \pm \sigma); E = 33,3\%$$



$$c_a = 6 \pm 1,2; c_v = 2 \pm 0,4 (M \pm \sigma); E = 66,6\%$$



$$c_a = 6 \pm 1,2; c_v = 1 \pm 0,2 (M \pm \sigma); E = 83,3\%$$

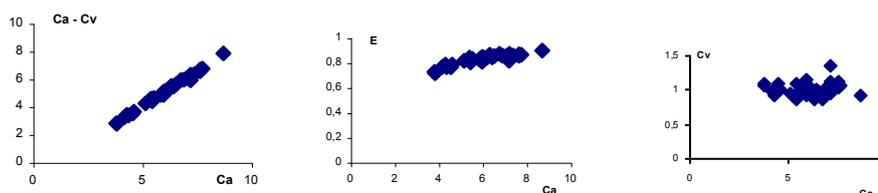


Рис. 14. Результаты численного эксперимента, имитирующего повторные измерения фоновой артериальной и венозной концентрации при нормальном распределении дат (метод статистических испытаний).

Эксперимент демонстрирует появление ложной зависимости А-В разницы ($Ca - Cv$) и коэффициента поглощения из крови (E) от артериальной концентрации, обусловленные случайным рассеянием (ошибкой опыта).

В этом случае оказалось, что полученная корреляционная зависимость А-В разницы и венозной концентрации также имеет тенденцию к смещению относительно начала координат, но зависимость венозной концентрации от артериальной не параллельна оси абсцисс, как это имело место на рис. 14. Поэтому при сопоставлении этих двух зависимостей при проведении физиологических исследований можно сделать определенные заключения по поводу правомерности описанных выше модельных представлений. С другой стороны, по виду корреляционного эллипса для эмпирической зависимости поглощения P от артериальной концентрации, судя по результатам моделирования, приведенным на рис. 15, во многих случаях, по-видимому трудно заключить что-то определенное, так как «истинная» зависимость может быть размыта вследствие эффектов сложения статистического разброса значений А-В разницы и кровотока.

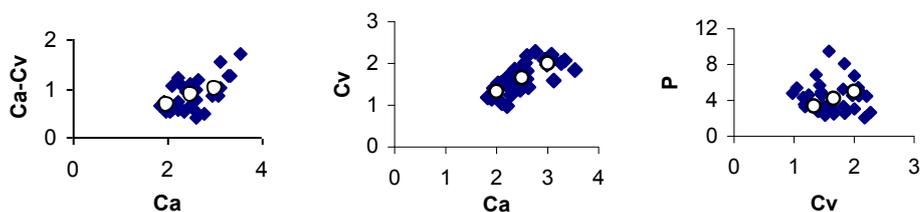


Рис. 15. Результаты численного эксперимента, имитирующего повторные измерения при наличии линейной прямо пропорциональной зависимости А-В разницы от артериальной концентрации (метод статистических испытаний). «Истинные» значения обозначены светлыми кружками. Ромбики соответствуют индивидуальным результатам «измерения» при нормальном распределении дат.

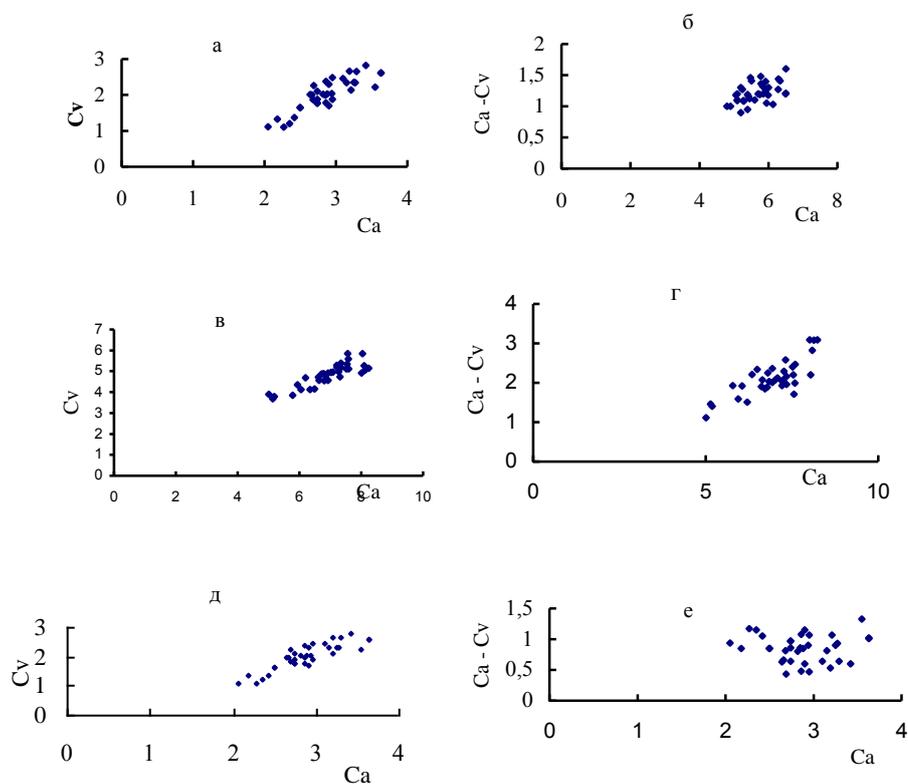


Рис. 16. Полученные в опыте сводные зависимости содержания метаболитов в венозной крови (C_v) и артерио-венозной разницы ($Ca - C_v$) от артериальной концентрации (Ca). а и б - α -аминный азот, мг/дл; в и г - β -оксималяная кислота, мг/дл, д и е - глюкоза, мМ. Каждая точка означает измерение на одном животном, измерения проведены на четырех коровах 9 раз на протяжении 3-х дней (Макар и др., 2002).

На рис. 16 приведены сводные зависимости содержания водорастворимых метаболитов в венозной крови и А-В разницы от артериальной концентрации, полученные в описанном выше опыте на коровах с частичной депривацией корма (1-й проверочный эксперимент). Четкая зависимость венозной концентрации от артериальной на сводных графиках указывает на то, что разброс опытных значений не был обусловлен только статистическим рассеянием дат. С другой стороны, на графиках зависимости А-В разницы от артериальной концентрации имеется небольшое смещение линий регрессии относительно начала координат, что, согласно результатам моделирования, приведенным на рис. 15, может быть следствием наложения эффекта статистического «маскирования» на линейную зависимость, проходящую через начало координат.

Такая форма зависимости, прогнозируемая на основе вышеизложенной модели, с большей вероятностью может проявиться при условии минимизации источников статистического рассеяния, одним из которых является вариабельность кровотока у разных животных. Если этот источник разброса исключить, используя, например, при построении графика по одной опытной точке для разных аминокислот, концентрация которых была измерена в одной и той же пробе крови, то постулируемая линейная зависимость проявится более четко (рис. 17).

Аналогичная зависимость А-В разницы в молочной железе у свиноматок от артериальной концентрации по 10 аминокислотам (мет, три, гис, лиз, илей, арг, тре, лей, вал) описана в работе (Trottier et al., 1997) при использовании средних значений по четырем взятиям крови. В этой же работе установлено отсутствие зависимости эффективности извлечения из крови этих аминокислот от их артериальной концентрации, что прогнозируется по вышеизложенной модели (соотношение (5) в разделе 2.1).

В целом результаты проведенных проверочных экспериментов с учетом литературных данных свидетельствуют о правомерности изложенных выше модельных представлений о процессах формирования артерио-венозного баланса и транспорта низкомолекулярных водорастворимых метаболитов в клетки лактирующей молочной железы.

Определенные ориентиры к планированию физиологического опыта в той части, которая касается выбора необходимого числа животных и количества измерений при использовании показателя А-В разницы и других производных от нее величин, можно получить, проанализировав, из чего складывается дисперсия этих величин при использовании первичных измерений концентрации в крови и скорости кровотока.

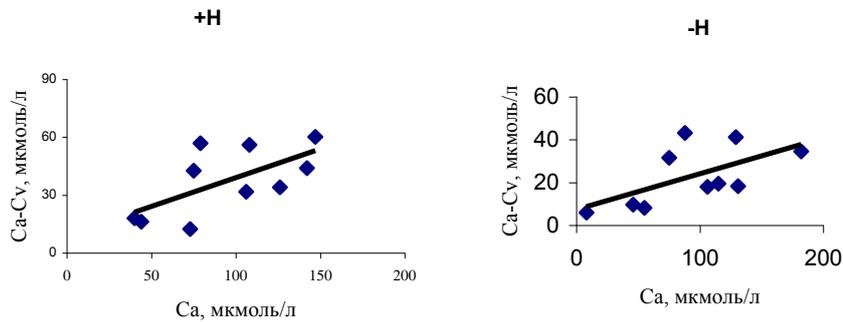


Рис. 17. Зависимость А-В разницы концентраций для 11 индивидуальных свободных аминокислот (гис, фен, тир, лей, илей, вал, лиз, тре, про, ала) в молочной железе у коз от их артериальной концентрации, построенная по данным (Bequette et al., 2000) для контрольного (+Н, инфузия сбалансированной смеси аминокислот) и опытного (-Н, смесь без гистидина) периодов (см. объяснения к табл. 2).

Артерио-венозная разница, эффективность извлечения из крови и общее поглощение органом не являются результатом независимого измерения, так как определяется косвенно по соответствующим формулам, поэтому дисперсию артерио-венозной разницы и поглощения органом следует определять по общему методу оценивания ошибки косвенного измерения (Кр. хим. энциклопедия, 1964).

Для А-В разницы $y = c_a - c_v$:

$$s_y^2 = \left(\frac{\partial y}{\partial c_a} \right)^2 s_{c_a}^2 + \left(\frac{\partial y}{\partial c_v} \right)^2 s_{c_v}^2 = (1)^2 s_{c_a}^2 + (-1)^2 s_{c_v}^2 = s_{c_a}^2 + s_{c_v}^2$$

Для поглощения органом $y = Q (c_a - c_v)$

$$s_y^2 = \left(\frac{\partial y}{\partial Q} \right)^2 s_Q^2 + \left(\frac{\partial y}{\partial c_a} \right)^2 s_{c_a}^2 + \left(\frac{\partial y}{\partial c_v} \right)^2 s_{c_v}^2 = (\bar{c}_a - \bar{c}_v)^2 s_Q^2 + \bar{Q}^2 s_{c_a}^2 + \bar{Q}^2 s_{c_v}^2$$

Таким образом, ошибка определения А-В разницы определяется суммой величин ошибок измерения концентраций артериальной и венозной крови. Поэтому при небольших значениях относительной А-В разницы ее ошибка значительно больше ошибки определения концентрации. Например, если средние значения и дисперсии ($M \pm \sigma$) для концентрации в крови артерии и вены при 10%-ной ошибке составляют $3,0 \pm 0,3$ и $2,5 \pm 0,25$, то соответствующие значения А-В разницы равны $0,5 \pm \sqrt{(0,3^2 + 0,25^2)} = 0,5 \pm 0,39$, т.е. ошибка А-В разницы в этом случае составляет 78%. Если в данном примере кровотоков

определяется также с 10%-ным рассеянием ($5 \pm 0,5$), то среднее значение и дисперсия косвенно определяемой величины поглощения в данном случае составят: $2,5 \pm \sqrt{(0,5^2 * 0,5^2 + 25 * 0,3^2 + 25 * 0,25^2)} = 2,5 \pm 1,96$, т.е. величина поглощения в данном случае также определяется с 78%-ной ошибкой. Если основной источник статистического разброса связан не с ошибкой аналитического определения, а с ошибкой опыта (межиндивидуальные различия, временные колебания концентрации и кровотока и др.), то для снижения ошибки этих величин следует по возможности увеличивать число взятий крови, т.е. использовать катетеризацию сосудов и проводить многократные взятия крови при соблюдении общего требования о минимальном стрессовом воздействии на животное.

2.1.7. Рекомендации по применению модели

На основании проведенного анализа можно заключить, что измерения артерио-венозного баланса при соблюдении определенных требований к статистическим характеристикам выборки и применении дополнительных процедур обработки данных в целом дают информацию, необходимую для количественной оценки параметров транспорта водорастворимых метаболитов в клетки. Если необходимо провести сравнительные исследования активности транспорта в подопытных группах животных, различающихся по массе функционально активной ткани органа, величину клиренса T следует заменить эквивалентным выражением $T = k V_2$, где k - константа скорости транспорта данного метаболита в клетку (ед. времени⁻¹), а V_2 - объем внеклеточной жидкости органа. Для молочной железы соотношение объема вне- и внутриклеточной фаз у продуктивных жвачных животных (коров и коз) составляет приблизительно 65:35, общее содержание воды в ткани – около 80%. С учетом известной в физиологии лактации относительной константности секреторного потенциала клеток возможна следующая приближенная оценка массы секреторной ткани молочной железы: масса секреторной ткани (кг) = $\frac{1}{2}$ суточного объема секреции (кг).

Для более строгого определения области применимости описанной модели необходимо накапливать данные о физиологической области концентраций и о значениях точки полунасыщения (K_m) скорости транспорта для основных водорастворимых метаболитов, транспортируемых в клетку. Описанную выше методику расчета величины T в строгом смысле нельзя применять в тех случаях, когда изученные концентрации сопоставимы по величине со значением K_m для соответствующих транспортных систем, хотя для целей сравнительных исследований допускаемая ошибка, по-видимому, не будет иметь критического значения, поскольку некоторое смещение в оценках активности транспорта будет одинаковым для сравниваемых групп или периодов опыта.

Кроме того, при сопоставлении результатов измерений, полученных на разных группах животных или для различных периодов исследования, при интерпретации получаемых расчетных данных необходимо иметь в виду то

ограничение в использовании модели, которое связано с условием параллельности изменений вне- и внутриклеточной концентрации изучаемых метаболитов. Этот аспект будет подробнее рассмотрен в нижеследующем разделе, так как для учета следствий, вытекающих из отклонения от этого условия, необходимо обратиться к более сложным моделям и методам компьютерного моделирования.

Заканчивая рассмотрение данного раздела, авторы считают своим долгом предостеречь читателя, чтобы у него не сложилось впечатление, что изложенные выше теоретические представления, модели и алгоритмы их применения возникли на пустом месте и не имеют каких-либо исторических прецедентов. Достаточно четкие ориентиры для выработки таких представлений были, например, сформулированы более 45 лет назад, в частности, К. Цирлером, который в статье «Теория использования артериовенозной разницы концентраций для измерения метаболизма в стационарных и нестационарных состояниях» отметил, что состояния, при которых А-В разница является корректной мерой метаболизма, достаточно ограничены и что в некоторых условиях (в частности, когда изменяется кровоток), нельзя говорить даже о качественном соответствии А-В разницы величинам поглощения или выхода вещества из ткани (Zierler, 1961). В опытах, проведенных Д.Л. Линзеллом с использованием перфузии изолированной молочной железы, был отмечен факт резкого снижения А-В разницы по глюкозе (и соответственно эффективности ее извлечения из артериальной крови) при увеличении скорости кровотока (частоты тактов перфузионного насоса) (Linzell, 1974).

Аналитическое выражение, аналогичное соотношению (3), было получено для молочной железы и печени в работе (Hanigan et al., 1998a), а в работе (Hanigan, 2001) в аналогичном выражении величина T трактуется как некоторая функция от внутриклеточной концентрации субстрата. Как отмечается в работе (Hanigan et al., 1998b), при низких значениях коэффициента извлечения из крови (например, от 5 до 10%) изменения в скорости кровотока не оказывают существенного влияния на поглощение (моль/сут), однако при умеренных или больших величинах эффективности извлечения кровотока становится важным детерминантом поглощения. Смысл этого умозаключения в некоторой степени можно прояснить, подставив выражение (5) для E в соотношение (6), тогда $P = Q E c_a$, т.е. в этом случае произведение $E c_a$ представляет собой наклон прямой, отражающей зависимость поглощения от кровотока. Понятно, что при малых значениях E этот наклон будет небольшим, и наоборот. С другой стороны, для уяснения физиологического смысла взаимосвязи скорости поглощения и величины кровотока нет необходимости обращаться к такому трудно интерпретируемому расчетному показателю, как коэффициент извлечения из артериальной крови, достаточно проанализировать соотношение (6), связывающее три реально существующие величины – поглощение, кровоток и активность транспорта в клетку. Эти соотношения применимы не только для молочной железы, но и для других органов. Так, при инфузии в бедренную артерию вазодилататора наблюдали снижение А-В разницы по глюкозе, пропорциональное увеличению кровотока (Baron et al., 1994).

2.2. Модель формирования артерио-венозного баланса липидных компонентов крови

Высшие жирные кислоты поступают в молочную железу из крови в составе хиломикронов, липопротеинов очень низкой плотности и в форме свободных жирных кислот (на альбумине). В отличие от моногастричных, у жвачных животных хиломикроны и кишечные липопротеины являются минорными компонентами липидов крови. При анализе А-В баланса по липидным компонентам крови необходимо принять в расчет два пути переноса свободных жирных кислот из крови в клетку: из пула НЭЖК плазмы крови и в форме свободных жирных кислот, появляющихся в результате действия липопротеинлипазы (ЛПЛ, 3.1.1.34) на триацилглицеролы (ТАГ) крови. Липопротеинлипаза локализована в основном на люминальной поверхности эндотелия капилляров. Определенное количество жирных кислот, образующихся при гидролизе триацилглицеролов, не поглощается эндотелием сосудов, а поступает в венозную кровь

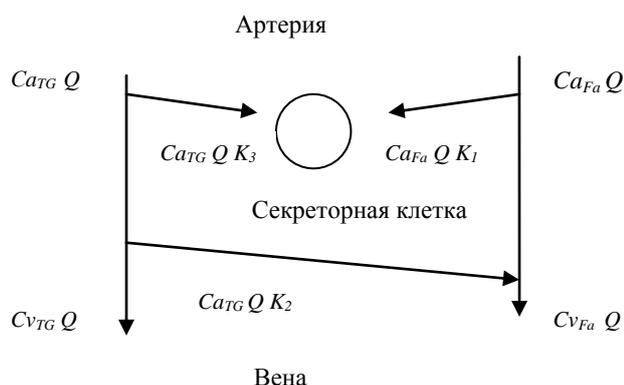


Рис. 18. Простейшая схема транспорта незатерифицированных жирных кислот (НЭЖК, Fa) из пула НЭЖК крови и триацилглицеролов (ТГ, TG) крови в клетку. Ca_{TG} и Cv_{TG} - концентрация триацилглицеролов в крови артерии и вены (мг/л); Ca_{Fa} и Cv_{Fa} - соответствующие концентрации НЭЖК; Q - объемная скорость плазматочка (мл/мин). Стрелками обозначены потоки в расчете на орган (мг/мин); K - константа переноса (доля общего потока, переносимая в данном направлении).

Гидрофобные жирные кислоты транспортируются в клетку, по-видимому, посредством векторного механизма без реабсорбции в венозных капиллярах. Предполагаемый механизм транспорта гидрофобных молекул жирных кислот, по-видимому, включает в себя латеральную диффузию в плазматической мембране клеток эндотелия и через точки контакта с соседними клетками до базальной мембраны секреторных клеток. В процессе

трансmemбранного переноса и создания градиента концентрации используются также специфические белковые транслокаторы.

Алгоритм расчета потоковых компонент, согласно простейшей модели, приведенной на рис. 18, проиллюстрируем с использованием данных первого проверочного опыта (опыт на коровах с частичной депривацией корма). В этом опыте, состоящем из исходного периода, периода депривации и восстановления кормления в полном объеме, концентрация ТАГ существенно не изменялась по периодам опыта, а концентрация НЭЖК при депривации корма заметно увеличивалась. Сводные зависимости А-В разницы и венозной концентрации от артериальной концентрации для НЭЖК приведены на рис. 19, а средние значения скорости плазмотока и концентрации липидных компонентов в крови – в табл. 4.

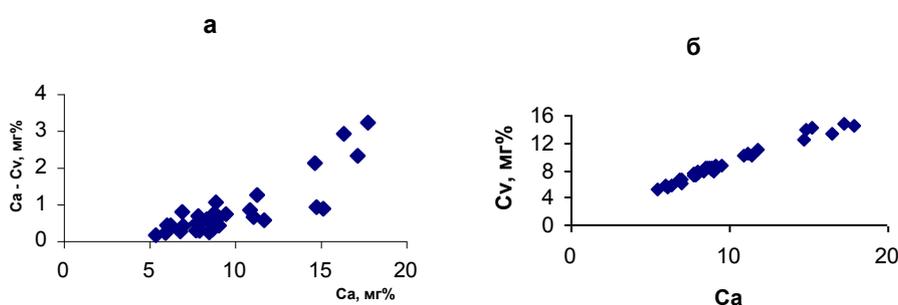


Рис. 19. Сводные зависимости артерио-венозной разницы (а) и венозной концентрации (б) НЭЖК от их концентрации в артериальной крови. Каждая точка означает измерение на одном животном; измерения проведены 9 раз на четырех коровах на протяжении 3-х дней опыта.

Определить численные значения констант переноса и соответствующих величин потоков можно по эмпирическим регрессиям артерио-венозного баланса Fa и TG . На сводных графиках, приведенных на рис. 19, хорошо различимы две области, соответствующие норме (исходное состояние, уровень НЭЖ до 12 мг%) и периоду лишения концентратов (выше 12 мг%). Первой области значений венозной концентрации НЭЖК соответствует функция регрессии $Cv_{Fa} = 0,5 + 0,91 Ca_{Fa}$, второй области: $Cv_{Fa} = 3 + 0,725 Ca_{Fa}$. Для расчета составляющих потоков согласно приведенной схеме имеем следующие соотношения:

$$Cv_{Fa} = Ca_{TG} K_2 + (1 - K_1) Ca_{Fa} \quad (17)$$

$$Cv_{TG} = Ca_{TG} (1 - K_2 - K_3) \quad (18)$$

Для расчета используем усредненные по периодам опыта значения объемной скорости кровотока через молочную железу, концентрации НЭЖК и

ТАГ в крови при обычном уровне кормления (норма) и в период депривации концентратной части рациона (табл. 4).

Таблица 4. Усредненные по периодам опыта значения скорости плазмотока и концентрации НЭЖК и ТАГ в плазме крови, использованные для расчета потоков НЭЖК в молочной железе коров с использованием функций регрессии (16) и (17).

Измеренные в опыте показатели	Обозначение	Контроль (норма)	Период депривации концентратов
Скорость плазмотока, л/мин	Q	3,13	1,91
Концентрация НЭЖК в артериальной крови, мг/л	Ca_{Fa}	80	160
Концентрация ТАГ в артериальной крови, мг/л	Ca_{TG}	62	64
Концентрация ТАГ в венозной крови, мг/л	Cv_{TG}	28	22

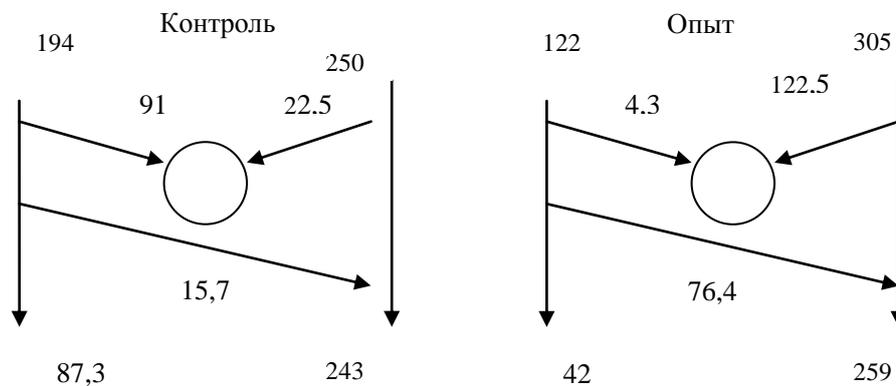
Процедуру вычислений проиллюстрируем на численном примере для первой области, т.е. для периода обычного уровня кормления. Используя выражение для наклона линии регрессии по соотношению (17) и эмпирически найденное (графически по рис. 19) его значение, получаем равенство $1 - K_1 = 0,91$, откуда $K_1 = 0,09$, поэтому поток НЭЖК в клетки определяется соотношением $Ca_{Fa} Q K_1 = 80 \times 3,13 \times 0,09 = 22,5$ мг/мин. Используя выражение для свободного члена в соотношении (17) и эмпирически найденное его значение, получаем равенств: $62 K_2 = 5$, откуда $K_2 = 0,081$, поэтому $Ca_{TG} Q K_2 = 62 \times 3,13 \times 0,081 = 15,7$ мг/мин. Используя средние значения Ca_{TG} и Cv_{TG} находим, что численное значение коэффициента пропорциональности в выражении (18) равно 0,45, поэтому по соотношению $1 - K_2 - K_2 \cdot 0,45$ с учетом ранее найденного значения K_2 находим $K_3 = 0,469$ и поток $Ca_{TG} Q K_3 = 62 \times 3,13 \times 0,469 = 91$ мг/мин.

Результаты расчетов для двух периодов опыта приведены в табл. 5. Результаты расчета показали, что в период сниженного уровня питания увеличилась не только концентрация НЭЖК в крови, но и активность переноса их из крови в клетки, при этом, хотя поток свободных жирных кислот от ТАГ в клетки резко снизился, тем не менее общий поток жирных кислот в клетки даже несколько превысил исходный уровень, что, вероятно, компенсировалось снижением использования ацетата при синтезе молочного жира, поскольку выход жира с молоком в этот период не изменился (Макар и др., 2002). Общее образование НЭЖК из ТАГ крови, характеризующее активность ЛПЛ, снизилось незначительно на фоне 20-кратного спада поступления образующихся продуктов в клетку.

Таблица 5. Значения потоков НЭЖК и констант переноса в молочной железе коров при обычном уровне кормления (норма) и в период лишения концентратной части рациона

Показатели А-В баланса НЭЖК и ТАГ	Обозначение	Контроль (норма)	Период депривации
Поток НЭЖК от НЭЖК крови в клетки, мг/мин	$Ca_{Fa} Q K_1$	22,5	122,2
Константа переноса	K_1	0,09	0,4
Поток НЭЖК от ТАГ крови в клетки, мг/мин	$Ca_{TG} Q K_3$	91,0	4,3
Константа переноса	K_3	0,47	0,035
Суммарный поток НЭЖК в клетки, мг/мин		113,5	126,5
Поступление НЭЖК от ТАГ артериальной крови в венозную кровь, мг/мин	$Ca_{TG} Q K_2$	15,7	76,4
Константа переноса	K_2	0,08	0,625

Численные значения потоков переноса липидных компонентов крови из крови в секреторные клетки молочной железы (мг/мин) для двух периодов опыта приведены на рис. 20. Для сравнения на рисунке приведен также расчет относительной А-В разницы (эффективности извлечения из крови) для триацилглицеролов, свободных жирных кислот и суммы этих двух компонентов, т.е. показателей, используемых при традиционном анализе данных. При сопоставлении значений потоков, приведенных на диаграмме, и показателя эффективности извлечения из крови можно сделать заключение о том, что при большой относительной величине потока, «загрязняющего» венозную кровь по НЭЖК вследствие действия ЛПЛ, использование этого показателя для НЭЖК сильно искажает оценку фактического состояния системы, тогда как для ТАГ этот показатель идентичен активности ЛПЛ, хотя он не дает оценки относительной доли продуктивного использования и поступления транзитом в венозную кровь образующихся при этом НЭЖК.



$$E_{TG} = (62 - 28)/62 = 0.55$$

$$E_{TG} = (64 - 22)/64 = 0.66$$

$$E_{Fa} = (160 - 140)/160 = 0.125$$

$$E_{Fa} = (160 - 135)/160 = 0.15$$

$$E_{TG+Fa} = (78 - 42)/78 = 0.46$$

$$E_{TG+Fa} = (224 - 157)/224 = 0.30$$

Рис. 20. Диаграммы потоков переноса липидных компонентов крови из крови в секреторные клетки молочной железы (мг/мин), построенные по данным опыта на коровах с депривацией концентратной части рациона. В нижней части рисунка приведен расчет относительной А-В разницы (эффективности извлечения из крови) для триацилглицеролов, свободных жирных кислот и суммы этих двух компонентов.

Для приближенной оценки эффекта такого «загрязнения» можно использовать графический прием анализа сводной эмпирической зависимости венозной концентрации НЭЖК от ее концентрации в артериальной крови (рис. 19). Согласно соотношения (17), если константа переноса K_2 равна нулю, то линия регрессии проходит через начало координат, так что выраженность эффекта «загрязнения» можно оценить графически, продолжив линию регрессии до пересечения с осью ординат. Величина отрезка от нуля до точки пересечения, деленная на среднюю концентрацию триацилглицеролов в крови, согласно соотношения (17), равна относительной доле общего потока, поступающей в венозную кровь в виде НЭЖК.

3. Изучение процессов транспорта и метаболизма с применением компьютерного моделирования

3.1. Теоретические исследования процессов молокообразования с использованием имитационной компьютерной модели

В задачу настоящей работы не входило описание техники построения моделей метаболизма, так же как и подробный анализ результатов отдельных исследований, в той или иной мере использующих эту технику. Моделирование в сущности означает непрерывный процесс разработки последовательных версий моделей. Это не исключает возможности того, что отдельные разработки на этом пути отпочковываются и становятся на путь рутинного использования, как это случилось, например, с формулой Михаэлиса-Ментен для описания кинетики ферментов или с соотношением Харди-Вайнберга для частот аллельных вариантов в популяции. В современной исследовательской практике, в связи с широким применением персональных компьютеров и соответствующего автоматизированного программного обеспечения, все более привычной становится ситуация, в которой научный сотрудник, не имеющий специального образования и опыта в построении моделей, может приобрести копию модельной разработки, например в виде программы, записанной на компакт-диске, также как и ее подробное описание в виде статей, монографий и т.д. Он всегда почти может найти помощника для работы с вычислительной техникой, так что от основного исполнителя требуется выполнить в основном содержательную часть работы, т.е. сформулировать задачу исследования, определить условия функционирования моделируемого объекта, задать численные значения параметров и т.д. Поэтому наше изложение ориентировано в большей степени на то, чтобы этот основной исполнитель имел представление о том, на какие вопросы может дать ответ работа с компьютерными моделями. Так, в процессе этой работы может быть получена информация о тех взаимосвязях и показателях, которые очень трудно или вообще невозможно оценить или измерить в физиологическом опыте. Кроме того, при таком подходе могут быть выявлены «белые пятна» и сформулированы некоторые вопросы, немаловажные с точки зрения планирования дальнейших серий экспериментов.

В нижеследующих разделах приведено несколько примеров применения такого подхода при исследовании метаболизма лактирующей молочной железы. Приведены некоторые наиболее информативные в этом плане фрагменты теоретических исследований, проведенных с использованием компьютерной модели, а также примеры применения ее для интерпретации данных физиологического эксперимента.

Хотя разработанные модели метаболизма молочной железы в целом оказались перспективными для исследования интегративных аспектов молокообразования, сам по себе прогноз по машинным распечаткам часто мало что дает для понимания причины того, почему удои и продукцию белка в той или иной ситуации лимитируют те или иные факторы. Для содержательного

анализа часто бывает необходимо предпринять более детальное исследование. В частности, важно иметь представление о том, как может влиять на темп молокообразования каждый из трех основных действующих факторов: 1) кровотока, 2) концентрация субстратов в крови и 3) значения внутренних параметров (активностей, мощностей, максимальных скоростей, связанных с вариациями количества молекул ферментов и мембранных переносчиков). Поэтому возникает необходимость изучить поведение модели при вариациях отдельных внутренних параметров, оценить чувствительность продуктивных показателей к изменениям коэффициентов транспорта и максимальных скоростей синтеза, выработать ориентиры для дальнейших исследований.

Концептуальные положения, структура модели и полная схема вычислений, использованные при численной имитации процессов, протекающих в лактирующей молочной железе, описаны ранее (Cherepanov et al., 2000; Черепанов, 2002). Схема основных путей транспорта из крови и использования в молочной железе предшественников молока приведена на рис. 21. Основные обозначения и размерности величин приведены ниже в табл. 7.

Концентрация субстратов в межклеточной среде зависит от скорости кровотока и от скорости переноса внутрь клеток. Основные метаболиты используются в клетке и как пластические, и как энергетические субстраты. Темпы использования разных субстратов не являются независимыми, но они взаимосвязаны через скорость кровотока и общие кофакторы, поэтому мы здесь имеем дело со сложным динамическим уравниванием системы метаболических потоков.

Для оценки влияния изменений кровотока и содержания субстратов в крови на локальные концентрации и показатели молокообразования были проведены прогоны программы с варьированием параметра кровотока G_{12} и артериальной концентрации глюкозы c_{7A} , при этом значения остальных параметров и артериальных концентраций были идентичны найденным ранее для коз в период после 26-часовой голодной выдержки (Макар и др., 2005).

Роль третьей группы факторов (максимальных скоростей синтеза и активностей трансмембранного переноса субстратов из интерстиция в клетку) оценивали на модели методом исследования поверхности отклика при варьировании двух параметров, связанных с метаболизмом аминокислот: V_3 (максимальная скорость синтеза молочного белка в интервале 0,25 – 0,55) и K_3 (константа транспорта аминокислот в секреторную клетку: 1,0 – 1,5) и с метаболизмом глюкозы: V_1 (максимальная скорость синтеза лактозы: 1,0 – 2,0) и K_1 (константа трансмембранного переноса глюкозы в клетку: 0,3 – 0,6) (Черепанов, 2005).

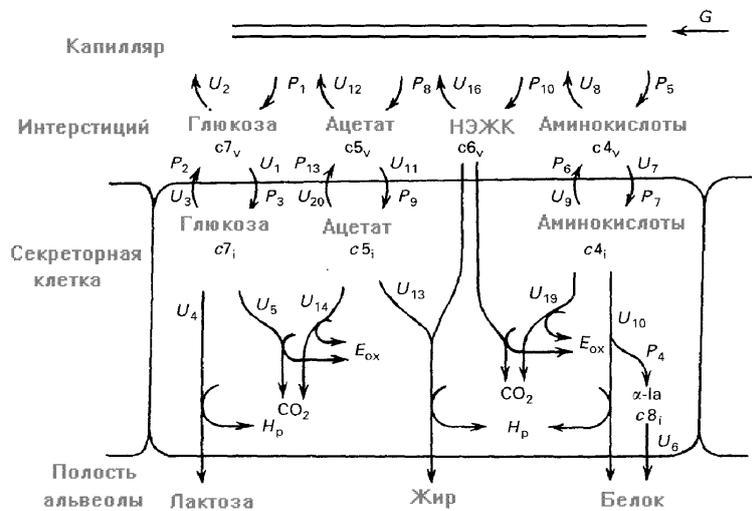
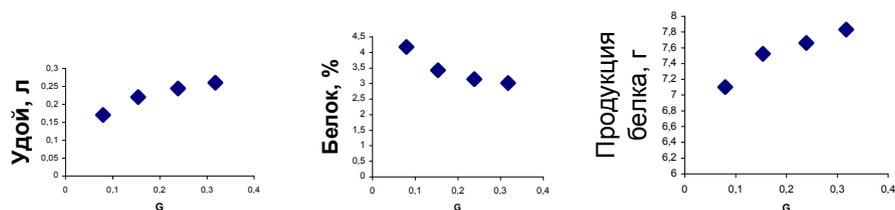


Рис. 21. Схема транспорта из крови и использования основных субстратов-предшественников в лактирующей молочной железе. Расшифровка обозначений приведена в табл. 7.

С целью сравнительной оценки влияния факторов на показатели, имеющие разную размерность, использовали безразмерную величину силы влияния $\alpha = (\text{разность крайних интервальных значений показателя} / \text{среднее значение показателя}) / (\text{разность крайних значений фактора} / \text{среднее значение фактора})$. Величину α можно также трактовать как чувствительность продуктивного показателя к изменениям изучаемого метаболического фактора. Для интегрирования системы уравнений применяли метод Рунге-Кутты четвертого порядка с фиксированным шагом 0,001; пределы интегрирования 0 - 6 (сутки).

3.1.1. Влияние концентрации субстратов в крови и кровотока

Результаты расчетов, представленные в табл. 6 и на рис. 22, показали, что сила влияния артериальной концентрации глюкозы на удой в исследованной ситуации оказалась приблизительно в два раза большей, по сравнению с фактором кровотока (0,610 и 0,336 соответственно). Судя по быстрому подъему внутриклеточной концентрации глюкозы по мере повышения ее артериальной концентрации, этот эффект мог бы быть еще большим, но он демпфируется падением локальной концентрации α -лактальбумина.



Кровоток через молочную железу

Рис. 22. Модельный прогноз зависимости удоя (P50), концентрации молочного белка (белок, %) и суточной продукции белка от объемной скорости кровотока через молочную железу у коз. При расчетах варьировали параметр кровотока G12; значения остальных параметров и артериальных концентраций при этом не менялись (лактацирующие козы в период после суточной голодной выдержки).

Таблица 6. Прогноз изменений внутриклеточных концентраций и продуктивных показателей при варьировании базового параметра кровотока G12 и артериальной концентрации глюкозы C7A и теоретическая оценка силы влияния этих факторов (α)* на соответствующие показатели у коз.

Показатели**	G12				α	C7A				α
	.4	.8	1.2	1.6		1.7	2.3	2.9	3.5	
C7i	.07	.12	.16	.18	0.66	.12	.23	.39	.64	2.2
C8i	.99	.82	.75	.72	-0.3	.82	.66	.58	.53	-0.65
P50	.17	.22	.24	.26	0.34	.22	.27	.31	.34	0.61
G	.08	.15	.24	.32	1.0	.15	.15	.15	.15	-0.04
C4i	5.7	6.4	6.8	6.9	0.16	6.4	6.4	6.4	6.4	-0.01
Pm%	4.2	3.4	3.1	3.01	-0.3	3.4	2.8	2.4	2.2	-0.65
Tm%	5.6	5.7	5.7	5.7	0.02	5.7	4.6	4.0	3.7	-0.65
Pm, г/с	7.1	7.5	7.7	7.8	0.08	7.5	7.5	7.5	7.5	-0.01

Примечания: *сила влияния α данного фактора на исследуемый показатель выражена в виде безразмерной величины (разность крайних интервальных значений показателя/ среднее значение показателя)/(разность крайних значений фактора/среднее значение фактора**); P50 - удой, кг; Pm – белок молока, %; Tm - жир молока, %; C7i – внутриклеточная концентрация глюкозы, mM; C8i – локальная концентрация α -лактальбумина, мг/мл; G - объемная скорость кровотока, (л/сут) 10^3). Значения метаболических параметров соответствуют периоду после 26-часовой голодной выдержки.

Теоретически полученная зависимость удоя, концентрации белка в молоке и суточной продукции молочного белка от кровотока через молочную железу характеризовались на модели тенденцией к выходу на уровень плато при больших значениях кровотока (рис. 22).

Эти данные на первый взгляд противоречат эмпирически найденной прямолинейной взаимосвязи удоя и кровотока, вошедшей во многие руково-

дства по физиологии лактации, поэтому такое несовпадение прогноза и опыта требует объяснения. Известно, что парная корреляционная взаимосвязь не обязательно отражает функциональную связь. Корреляция, построенная по объединенным данным для разных животных и разных дней лактации, может быть обусловлена действием третьего фактора – количества клеток. Если существует линейная зависимость удоя и кровотока от числа функционально активных секреторных клеток, то при варьировании численности клеток будет наблюдаться линейная зависимость удоя от кровотока. Поэтому для нахождения истинной физиологической связи «кровоток – удой» следовало бы проводить измерения с фиксированным значением этой сопутствующей переменной, а такое условие трудно выполнить в эксперименте. На существование нелинейной зависимости удоя от кровотока указывают экспериментальные данные исследований, свидетельствующие о малой степени выраженности или даже отсутствии продуктивного эффекта при введении в питающую артерию вазодилататоров (аденозина, инсулиноподобных факторов роста) на фоне четкого снижения удоя при введении вазоконстрикторов (адреналина) (Fleet et al., 1991; Prosser et al., 1994, 1996). Сходная картина с эффектом насыщения прогнозируется для зависимости величины внутриклеточного парциального давления кислорода от скорости кровотока (Иванов, 2001). Модельное исследование показывает, что уровень плато на графике зависимости скорости поглощения лактогенных субстратов (следовательно, и удоя) от кровотока может определяться величиной сродства мембранных транспортеров к данному агенту (Черепанов и др., 2003).

3.1.2. Влияние параметров метаболической активности

Третья группа факторов, влияющих на молокообразование, связана с возможными изменениями параметров метаболической активности клеток молочной железы. При варьировании активности транспорта аминокислот в клетку ($K3$) и максимальной скорости синтеза белка ($V3$) на модели прогнозировалось повышение удоя и белковомолочности, закономерные изменения внутриклеточной концентрации глюкозы (синфазные по отношению к вариациям $K3$ и противофазные по отношению к $V3$) и отсутствие заметных изменений объемного кровотока в области повышенных значений $V3$ и $K3$. Значение силы влияния α на продукцию молочного белка составило 1,11 по параметру $V3$ (при фиксированном уровне $K3 = 1.6$) и 0,6 по параметру $K3$ (при фиксированном уровне $V3 = 0.45$), что намного выше соответствующего значения α по кровотоку (0,084 по интервалу G12: 0.4 – 1.6 и 0.092 по интервалу G12: 0,4 – 0,8, см. табл. 6).

Стимуляция удоя, вызванная гиперпродукцией лактозы, сопровождалась на модели пропорциональным спадом содержания жира и белка в молоке при отсутствии заметных изменений объемного кровотока в области повышенных значений $V1$ (максимальная скорость образования лактозы) и $K1$ (активности транспорта глюкозы в клетку). Значение силы влияния α на величину суточного удоя составило 0,45 по параметру $V1$ (при фиксированном уровне $K1 = 0,5$) и 0,43 по параметру $K1$ (при фиксированном уровне $V = 1,8$).

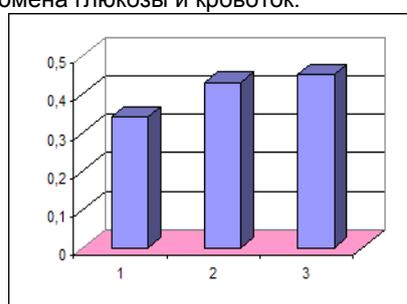
В целом, согласно полученного прогноза, роль кровотока в исследованной метаболической ситуации оказалась примерно равной влиянию на удой изменений активности транспорта глюкозы и мощности лактозосинтетазного комплекса, но она была существенно меньшей в отношении продукции белка, в сравнении с факторами, связанными с транспортом аминокислот и мощностью системы синтеза белка (рис. 23). Возможно, что такое различие в отношении глюкозы и аминокислот обусловлено тем, что внутриклеточная концентрация глюкозы на порядок меньше внеклеточной концентрации, а для большинства аминокислот имеет место обратное соотношение.

а) Результирующий показатель: продукция белка.
Варьируемые показатели: параметры обмена аминокислот и кровотока.



1 – кровоток
2 – активность транспорта аминокислот в клетку
3 – мощность системы синтеза белка

б) Результирующий показатель: удой.
Варьируемые показатели: параметры обмена глюкозы и кровотока.



1 – кровоток
2 – активность транспорта глюкозы в клетку
3 – мощность лактозосинтетазного комплекса

Рис. 23. Сравнительная оценка влияния факторов, связанных с параметрами метаболизма и кровотоком, на суточную продукцию белка (а) и удой (б) у коз. Высота столбиков означает частное от деления относительной вариации продуктивного показателя к относительной вариации фактора.

Выявленные закономерности в целом не являются специфическими для конкретного варианта «привязки» модели (лактующие козы после суточной голодной выдержки), так как они проявляются и при использовании модели, адаптированной для коров (Макар и др., 2003; Черепанов, 2002; Черепанов и др., 2003). На данном этапе качественные предсказания так же важны, как и количественный прогноз в более отдаленной перспективе. Хотя степень обоснованности модельного прогноза обычно обратно пропорциональна числу принятых допущений, существенных для данного показателя, но недостаточно обоснованных в опыте, возможные неточности прогноза не для всех аспектов имеют критическое значение

Так, в отношении формирования артерио-венозного баланса субстратов прогноз достаточно надежен, поскольку этот фрагмент модели, описанный в предыдущих разделах, исследован в серии проверочных опытов. Требуют

уточнения в опыте вопросы, связанные с функцией α -лактальбумина и с механизмами ауторегуляции кровотока. Правильный учет этих механизмов необходим при анализе переходных состояний после резких отклонениях от равновесного состояния, но их роль может быть не так существенна при сравнительном исследовании стационарных состояний. В целом, несмотря на небольшой «возраст» модели, адекватность ее в отношении некоторых важных аспектов метаболизма, по-видимому, достаточно обоснована для продолжения дальнейших исследований. Важно и то, что работа с моделями влияет на мышление экспериментатора в том плане, что побуждает содержательно интерпретировать данные, оперируя не формальными корреляциями, а категориями ключевых процессов и точек контроля. Хотя любая модель – это не более чем кандидат на роль имитатора системы, последовательный переход к более адекватным ее версиям означает продвижение по пути лучшего понимания, разработки способов прогнозирования и в последующем - управления процессами биосинтеза.

3.2. Применение компьютерной модели для анализа данных физиологического эксперимента

Ниже приведено описание методики и результаты исследований, в которых компьютерное моделирование использовалось с целью оценки (численной идентификации) некоторых метаболических параметров, которые играют важную роль в процессах молокообразования, но их трудно или невозможно измерить непосредственно в опытах на животных. Численная идентификация параметров широко используется в технике, в том числе в химических технологиях, при этом используются или автоматизированные приемы решения обратных задач (Крутько, 1988; Спивак, 1987), или так называемые методы прямого перебора с использованием специальных приемов содержательного анализа и верификации (Зонон и др., 1992). На данном этапе исследований в первую очередь важно аргументировать целесообразность использования самого принципа получения количественных оценок на основе косвенных данных, тогда как технику конкретных расчетов можно заимствовать из других дисциплин, имеющих большой опыт в этом плане.

3.2.1. Исследование эффектов субстратного лимитирования молокообразования при кратковременном голодании

Первое исследование было проведено с целью оценки эффектов субстратного лимитирования молокообразования при кратковременном голодании у лактирующих животных (Макар и др., 2005). Опыт был проведен на козах, которым предварительно были наложены электромагнитные датчики объемной скорости кровотока на наружную срамную артерию. Опыт состоял из двух периодов: исходного и основного. В исходный период, с 10:00 ч до 16:00 ч проводилась регистрация регионального кровотока. На следующий день, с 8:00, животные были лишены корма. Через 26 ч после депривации

корма (основной период) в яремную вену через хронический катетер в течение 6-ти часов вводили следующие инфузаты: физиологический раствор (контроль), глюкоза (4 г/ч) или смесь 20-ти аминокислот (2,5 г/ч) в том же соотношении, в котором они входят в состав молочного белка. Во время инфузии регистрировали гемодинамику вымени. Во всех периодах опыта животных доили два раза – в 10 ч и 16 ч, после каждой дойки производили забор проб крови из яремной вены для определения в них содержания основных предшественников молока.

Таблица 7. Обозначения и размерности

Символ	Расшифровка символа	Размерность
Концентрации		
C4	Аминокислоты	мМ
C5	Ацетат	мМ
C6	Неэтерифицированные жирные кислоты	мМ
C7	Глюкоза	мМ
C9	Триацилглицеролы в плазме крови	мМ
Потоки и коэффициенты		
U _i	Выходы из i-го пула	моль/сут
P _i	Входы для i-го пула	моль/сут
V _i	Максимальные скорости при избытке субстрата	моль/сут*кг
K _i	Коэффициенты (активности) транспорта	(л/сут*кг)10 ⁻³
M	Масса секреторной ткани (паренхимы) молочной железы	кг
KK _i	Концентрация, соответствующая точке полунасыщения потока	мМ
G	Фильтрующаяся фракция органного плазмотока	(л/сут) 10 ⁻³
E _m	Потребность в энергии на поддержание основного обмена в молочной железе	МДж/сут
E _{ox}	Свободная энергия, генерируемая при окислении субстратов в молочной железе	МДж/сут
H _p	Теплопотери при биосинтезе молочного белка, жира и лактозы	МДж/сут

Для интерпретации данных опыта была использована ранее описанная модель метаболизма молочной железы. Основные обозначения и размерности приведены в табл. 7; значения параметров, модифицированные для исходного состояния, периодов голодания и инфузаций глюкозы и аминокислот, представлены в табл. 8 и 9. Эти расчетные величины были найдены методом прямого перебора путем многократного прогона программы и определения комбинации численных значений параметров, обеспечивающей совпадение прогнозных и фактических показателей молокообразования при заданных концентрациях субстратов в крови. Масса паренхимы вымени была оценена косвенно по суточному удою ($M = 1/2$ удою в кг). При оценке параметров транспорта субстратов в клетку и скорости синтеза белка и лактозы учитывали известное из опыта соотношение внутриклеточной и внеклеточной концентраций, составляющее приблизительно 0,1 для глюкозы и 3-5 для суммы свободных аминокислот. Для интегрирования системы уравнений применял-

ся метод Рунге-Кутты четвертого порядка с фиксированным шагом 0,001; пределы интегрирования 0 - 0,06 (сутки).

Таблица 8. Значения параметров, общие для исходного состояния, периода голодания и инфузий глюкозы и аминокислот

V2	.458	G13	.8	KK3	.2	Начальные значения пулов, мольх10 ⁻⁴	
V4	.5	G14	.927	KK4	.5		
V5	.8	G15	.45	KK6	3.36	4v(0)	
V7	.0681	A	1	KK8	.1	4i(0)	13
V8	.167	B	6	KK9	.07	5v(0)	1.17
G1	.65	C	.5	KK11	.8	5i(0)	.07
G2	.35	D	8	KK12	.8	6v(0)	2.78
G3	.024	M	.2	KK13	15	7v(0)	1.4
G4	.05			E4	2.74	7i(0)	.8
G6	.8	K2	.661	E5	.875	8i(0)	19
G7	.85	K4	.626	E6	7.5	G(0)	.08
G8	.96			E7	2.87		
G9	.1	KK1	1	E9	30		
G11	.85	KK2	.2	E10	5.6		

Таблица 9. Значения артериальных концентраций субстратов и параметров, модифицированных при адаптации модели к исходному состоянию, к периодам голодания, инфузий глюкозы и аминокислот

Показатель	Обозначение	Периоды			
		Исходный	Голодание	Голод + глюкоза	Голод + аминокис+ты
Концентрации в крови (моль/л):					
Ацетат	C5A	1.45	1.3	1.3	1.3
Свободные аминокислоты	C4A	2.7	2.7	2.6	3.4
Глюкоза	C7A	2.0	1.8	2.6	1.7
Триацилглицеролы	C9A	0,26	0,26	0,26	0,25
НЭЖК	C6A	0,3	0,6	0,6	0,6
Максимальные скорости (моль/сут*кг):					
Глюкоза – лактоза ¹	V1	2,6	1.8	1.5	1.57
Аминокислоты – белок ²	V3	0,68	0,52	0,6	0,47
НЭЖК – жир ³	V6	0,43	0,59	0,5	0,37
Базовый кровоток ⁴	G12	1.32	.55	.8	.77
Коэффициенты транспорта в клетку (л/сут*кг):					
Глюкоза	K1	0,65	0,5	0,5	0,5
Аминокислоты	K3	2.5	1.2	1.5	1.2
Ацетат	K5	1.2	1.0	1.0	1.0

Примечание: Расшифровка потоков: ¹ $U4=V1/((1+KK1/c8i)(1+KK2/c7i))$; ² $U10=V3/(1+KK6/c4i)$; ³ $U15=V6/(1+KK11/c6v)$; ⁴ Объемный кровоток $G=G12*M*F1$; $F1=C+A/((B/(Z+B))^8+1)$; $Z=Hr-E_{ox}$; M - масса паренхимы молочной железы; Z - энергетический баланс секреторной клетки.

К концу 26-ч периода голодания объемный кровоток через молочную железу у подопытных коз снизился на 50%. Спад удоя и продукции основных компонентов молока был выражен в меньшей степени по сравнению с кровотоком, а содержание в крови альфа-аминного азота, триацилглицеролов и глюкозы существенно не изменилось.

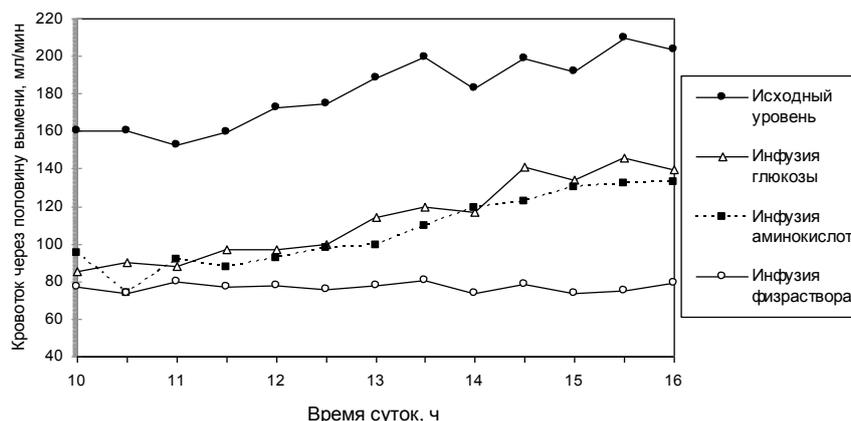


Рис. 24. Динамика кровотока через молочную железу в контроле (исходный период) и в ходе 6-ч внутривенной инфузии физраствора, смеси аминокислот и глюкозы у коз, голодавших в течение 26 ч к началу инфузии (Макар и др., 2005).

Внутривенное введение смеси аминокислот или глюкозы сопровождалось аналогичным увеличением кровотока через молочную железу, однако продуктивный эффект оказался различным. При инфузии глюкозы удои и продукция белка увеличились на 44,2 и 28,6%, а при введении смеси аминокислот эти показатели не изменились.

Данные опыта были сопоставлены с модельным прогнозом, полученным при использовании двух вариантов расчета: 1) с измененными значениями параметров (см. табл. 8) и 2) с теми же значениями параметров, что и для периода голодания. Во втором варианте предполагалось, что 6-ч интервал недостаточен для адаптивной перестройки параметров и наблюдаемые эффекты обусловлены только теми сдвигами локальных концентраций в местах синтеза, которые обусловлены изменениями артериальной концентрации вводимого субстрата и объемного кровотока. Оказалось, что второй вариант расчета в качественном отношении соответствовал опытным данным по удою, хотя несколько занижал показатели по белку при введении глюкозы и завышал значения по жиру при введении аминокислот (табл. 10). В первом варианте было идентифицировано увеличение максимальной скорости синтеза молочного белка (сдвиг в значении V_1 с 0,52 до 0,6) и активности транспорта глюкозы в клетку (сдвиг в значении K_3 с 1,2 до 1,5) при введении глюкозы

и снижение максимальной скорости этерификации жирных кислот (сдвиг V6 с 0,59 до 0,37) при введении аминокислот (табл. 9).

Таблица 10. Выходные данные модели для исходного состояния, периода голодания, инфузий глюкозы и аминокислот и средние значения измеренных в опыте величин.

Показатель	Исходный период	Голодание	Инфузия глюкозы		Инфузия аминокислот	
			P1	P2	P1	P2
Удой, л/сут	.4 (.4)	.2 (.2)	.28 (.29)	.29	.2 (.2)	.22
Кровоток, (л/сут)10 ⁻³	.26 (.26)	.11 (.11)	.157 (.160)	.157	.15 (.15)	.154
Жир, %	4.7 (4.7)	5.5 (5.5)	3.97 (4.0)	4.35	4.3 (4.4)	5.68
Белок, %	2.85 (2.8)	3.4 (3.4)	3.02 (3.0)	2.41	3.3 (3.3)	3.43
Продукция жира, г	18.8 (18.6)	11 (11)	11.1 (11.6)	12.6	8.7 (8.8)	12.5
Продукция белка, г	11.4 (11.2)	6.7 (6.8)	8.46 (8.7)	7.0	6.7 (6.6)	7.55

Примечание: P1 – расчет по модели с измененными значениями параметров (см. табл. 3); P2 – расчет по модели с теми же значениями параметров, что и для периода голодания, за исключением артериальной концентрации вводимого субстрата и величины объемного кровотока. В скобках приведены средние значения измеренных в опыте величин.

Полученная на модели картина метаболических сдвигов согласуется с данными прямых измерений, ранее проведенных в опытах с частичной депривацией корма, в частности, в отношении адаптивного снижения активности транспорта аминокислот в секреторную клетку и повышенного использования НЭЖК при синтезе молочного жира (Макар и др., 2003). К концу первого дня голодания уровень глюкозы молока, который отражает внутриклеточную концентрацию, снижается у коз приблизительно в два раза (Faulkner, Peaker, 1987). По данным численной идентификации, активность транспорта глюкозы и максимальная скорость образования лактозы несколько снизились при депривации корма. В литературе отмечено, что лактозосинтетазная активность клеток молочной железы, оцененная *in vitro*, существенно не изменяется при кратковременном голодании (Davis et al., 1993; Wilde, Kuhn, 1979), хотя *in vivo* эффект может быть несколько иным, поскольку галактозилтрансфераза - это мембраносвязанный фермент со сложной системой регуляции, чувствительной к условиям микроокружения.

Отсутствие стимуляции удоя при введении смеси аминокислот голодающим животным и значительный стимулирующий эффект при введении глюкозы воспроизводились на модели без учета возможных адаптивных изменений обменных параметров в ответ на введение субстратов. Это дает основание предполагать, что причиной выявленного различия в субстратном лимитировании молокообразования может быть специфическое соотношение концентраций и аффинностей (точек полунасыщения) в системах синтеза лактозы и молочного белка. Более лучшее соответствие модифицированного модельного прогноза фактическим данным по продукции молочного белка

при инфузии глюкозы, возможно, объясняется действием дополнительного освобождения инсулина, поскольку, согласно современным данным, инсулин участвует в стимуляции транспорта в секреторную клетку, по крайней мере, некоторых аминокислот (Sharma, Kausal, 2000), а в условиях нормогликемии стимулирует продукцию молочного белка (Mackle et al., 2000). Другое возможное объяснение может быть связано с влиянием на транспорт аминокислот и синтез белка дополнительной продукции кофакторов и энергетических эквивалентов, образующихся при окислении глюкозы.

Таким образом, результаты исследования показали, что в условиях 26-часового голодания молокообразование лимитируется глюкозой, но не лимитируется аминокислотами. Судя по результатам компьютерного моделирования, выявленные различия могут отражать специфическое соотношение концентраций и аффинностей в системах, утилизирующих глюкозу и аминокислоты. В условиях голодания внутриклеточная концентрация глюкозы существенно снижается, лимитируя образование лактозы – основного детерминанта удоя. Общая метаболическая ситуация при депривации корма характеризовалась следующими сдвигами: уменьшение параметров мощности (максимальной скорости при избытке субстратов) в системах синтеза лактозы и белка, снижение активности транспорта водорастворимых субстратов в секреторные клетки, повышенное использования НЭЖК для образования молочного жира.

3.2.2. Исследование лактогенного действия внутривенной нагрузки инсулином в условиях поддержания нормогликемии

Второе исследование было проведено с целью изучения механизмов лактогенного действия внутривенной нагрузки инсулином в условиях поддержания нормогликемии у лактирующих коз (см. выше - описание третьего проверочного опыта).

При анализе полученных данных в этом опыте, также как и в исследованиях, проведенных другими авторами по аналогичной схеме, возникает вопрос, за счет чего произошло увеличение удоя и продукции белка. Поскольку кровотоки при инфузии инсулина с глюкозой были существенно выше, чем в контроле, продуктивный ответ теоретически мог быть обеспечен лишь за счет более интенсивной «доставки» субстратов к органу. В литературе при описании аналогичных опытов также были отмечены лишь сдвиги в кровотоке и в показателях молокообразования, поэтому возникла необходимость принять или опровергнуть этот вариант объяснения, используя метод имитационного моделирования.

Для расчетов использовали тот же вариант модели, что и в предыдущем разделе, но с другими значениями параметров. Основные обозначения и размерности приведены выше в табл. 8. Значения параметров, общие для исходного состояния и периода инфузии инсулина с глюкозой приведены в табл. 11, а значения параметров, модифицированные для исходного состояния и периода инфузии инсулина с глюкозой, представлены в табл. 12. Эти расчетные величины были найдены методом прямого перебора путем многократно-

го прогона программы и определения комбинации численных значений параметров, обеспечивающей совпадение прогнозных и фактических показателей молокообразования при заданных значениях концентрации субстратов в крови, величины органоного кровотока.

Таблица 11. Значения параметров, общие для исходного состояния и периода инфузии инсулина с глюкозой

V2	.458	G11	.85	KK3	.2	Начальные значения пулов, моль $\times 10^{-4}$	
V5	.8	G13	.3	KK6	3.36	4v(0)	3.57
V6	1.2	G15	.45	KK8	.1	4i(0)	8.3
V7	.068			KK9	.07	5v(0)	2.1
V8	.167	C	.5	KK11	.1	5i(0)	.08
G1	.65	D	8	KK12	.8	6v(0)	1.17
G2	.35	M	.8	KK13	15	7v(0)	13.13
G3	.024			E4	2.74	7i(0)	.67
G4	.05	K2	.661	E5	.875	8i(0)	50.2
G6	.8	K4	.626	E6	7.5	G(0)	.9
G7	.85			E7	2.87		
G8	.96	KK1	1	E9	30		
G9	.1	KK2	.2	E10	5.6		

Масса паренхимы вымени была оценена косвенно по суточному удою ($M = 1/2$ удою в кг). При оценке параметров транспорта субстратов в клетку и скорости синтеза белка и лактозы учитывали известное из опыта соотношение внутриклеточной и внеклеточной концентраций, составляющее приблизительно 0,1 для глюкозы и 3-5 для суммы свободных аминокислот. Для интегрирования системы уравнений применялся метод Рунге-Кутты четвертого порядка с фиксированным шагом 0,001; пределы интегрирования 0 - 0,06 (сутки). Расчеты были проведены при использовании двух вариантов, различающихся величинами коэффициентов в уравнениях, описывающих подсистему ауторегуляции регионального кровотока (рис. 25).

Результаты проведенных модельных расчетов показали, что сдвиги в продуктивных показателях нельзя объяснить только изменениями в составе крови и величине плазмотока. В ходе этих расчетов в массив входных данных модели, адаптированной к исходному состоянию, были введены те показатели состава крови, которые наблюдались в период введения инсулина с глюкозой, и варьированием масштабного коэффициента G12 подбиралось значение выходной переменной Q (плазмоток), близкое к наблюдаемому в период опытной инфузии. При этом оказалось, что учет этих изменений при постоянных значениях остальных параметров дает существенно заниженные прогнозные оценки скорости молокообразования и продукции белка (85-87% от фактического значения) и завышенные величины содержания жира в молоке (на уровне 120-130 %) (табл. 13).

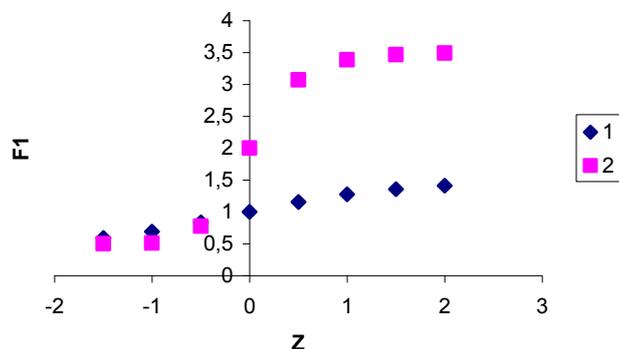


Рис. 25. Два варианта постулируемой зависимости относительной амплитуды вазомоторной реакции ($F1$) от величины энергетического баланса секреторных клеток (Z), использованные для расчетов. $F1 = C + A / ((B / (Z + B))^D + 1)$; текущее значение плазмотока $G = g12 * M * F1$, где M – масса секреторной ткани, $g12$ – коэффициент. Для обоих вариантов $C = 0.5$; $D = 8$. Для варианта 1: $A = 3$, $B = 2$; для варианта 2: $A = 1$, $B = 6$.

Таблица 12. Средние значения измеренной в опыте концентрации субстратов в артериальной крови и значения параметров, модифицированных при адаптации модели к исходному состоянию и к периоду внутривенного введения инсулина с глюкозой.

Показатель	Обозначение	Периоды	
		Исходный (инфузия физраствора)	Инфузия инсулина с глюкозой
Концентрация в плазме крови ммоль/л):			
Ацетат	C5A	1,45	1,45
Свободные аминокислоты	C4A	2,6	2,6
Глюкоза	C7A	3	3
Триацилглицеролы	C9A	.2	.13
НЭЖК	C6A	.16	.12
Максимальные скорости (моль/сут*кг):			
Аминокислоты – белок ¹	V3	.75	.92
Ацетат - жир ²	V4	.3	.39
Коэффициенты транспорта в клетку (л/сут*кг) 10 ⁻³			
Глюкоза	K1	.35	.45
Аминокислоты	K3	3.1	3.5
Ацетат	K5	1.2	1.65
Базовый кровотока ³	G12	Вариант 1:	.27
		Вариант 2:	.68

Примечания: Расшифровка потоков (см. рис. 21): ¹ $U10 = V3 / (1 + KK6 / c4i)$; ² $U13 = V4 / (1 + KK8 / c5i + KK9 / c7i)$; ³ плазматок $G = G12 * M * F1$; $F1 = C + A / ((B / (Z + B))^8 + 1)$; $Z = Hр - E_{ox}$; M – масса паренхимы молочной железы; Z – энергетический баланс секреторной клетки.

С другой стороны, хорошее совпадение прогнозных и фактических данных было получено при использовании увеличенных, в сравнении с исходным периодом, показателей максимальной скорости при избытке субстрата для процессов аминокислоты – белок (V3: с 0.75 до 0.92); ацетат - жир молока (V4: с 0,3 до 0,39) и констант скорости транспорта в клетки глюкозы (K1: с 0,35 до 0,45), аминокислот (с 3,1 до 3,5) и ацетата (K5 с 1,2 до 1,65) (табл. 12).

Выходные данные модели для двух вариантов гипотетической зависимости амплитуды вазомоторной реакции от величины энергетического баланса клетки, показанной на рис. 22, были практически идентичными (табл. 13). Это означает, что для определенного класса ситуаций, в частности, когда органический кровоток не прогнозируется, а подстраивается на модели к фактическим значениям за счет варьирования масштабного коэффициента, различия в параметрах подсистемы ауторегуляции кровотока никак не влияют на результаты модельного прогноза.

Таблица 13. Выходные данные модели для исходного состояния при значениях объемной скорости плазмотока и состава крови, наблюдавшихся в период контрольной и опытной инфузий*

	G12	C7v	C7i	E	Q	(%)	Pm (%)	Tm (%)	P50
P1к	0.68	2.11	0.11	0.30	598		3.2	5.2	1.52
P2к	0.27	2.11	0.11	0.30	601		3.19	5.22	1.52
P1	1.2	2.43	0.14	0,19	1050	(114)	2.9 (98)	5.2 (130)	1.72 (87)
P2	0.43	2,36	0.13	0,21	931	(101)	3.0 (99)	4,8 (120)	1,68 (85)

Примечания: *Проверка гипотезы о том, что сдвиги в продуктивных показателях были обусловлены только изменениями в величинах плазмотока и состава крови (для опытного периода C6A – 0,12; C9A=0,13, концентрация глюкозы и аминокислот одна и та же для двух периодов). В скобках - процентное изменение по отношению к фактическому значению в период опытной инфузии. к - контроль, о – опыт. E – эффективность извлечения из крови (относительная A-B разница). Расшифровка остальных обозначений приведена в табл. 7. Два варианта расчета P1 и P2 соответствуют двум кривым F1, показанным на рис. 22.

С другой стороны, точное знание этих параметров может иметь критическое значение для тех ситуаций, когда необходимо получить прогноз изменений кровотока при воздействиях, изменяющих энергетический баланс клеток, например, при кратковременном увеличении уровня в крови одного или нескольких энергетических субстратов. Так, когда на модели при значениях параметров, соответствующих исходному состоянию, увеличили концентрацию глюкозы в крови с 3 до 4,25 мМ, прогнозные оценки органического плазмотока оказались разными (табл. 14).

Таблица 14. Выходные данные модели для исходного состояния (инфузия физраствора) и периода инфузии инсулина с глюкозой

Показатель	Исходный период (инфузия физраствора)			Инфузия инсулина с глюкозой		
	Опыт	P1	P2	Опыт	P1	P2
Удой, л/сут	1,54	1,52	1,52	1,97	2,09	2,08
Кровоток, л/сут	598	601	598	922	929	921
Жир, %	5,2	5,2	5,2	4,0	4,0	4,0
Белок, %	3,2	3,2	3,2	3,0	3,0	3,0
Продукция жира, г	311	312	311	369	372	368
Продукция белка, г	191	192	191	277	279	276

Примечания: P1 – расчет по модели с использованием варианта 1 функции F1 (см. рис. 22); P2 – расчет по модели с использованием варианта 2 функции F1. Для сравнения приведены средние значения измеренных в опыте величин.

Для обоснования выбора конкретного варианта модели местной регуляции кровотока необходимы специально спланированные опыты. В работе (Cant et al., 2002) при введении глюкозы в питающую вымя артерию у коров было отмечено снижение кровотока на 16% и продукции молочного белка на 9%. С учетом этих данных второй расчетный вариант в табл. 14 и на рис. 25 представляется более реалистичным. Диапазон значений величины Z в данном исследовании был небольшим (0,1 - 0,5 МДж/сут) и не достигал постулированной теоретически области насыщения на кривой $F1 = f(Z)$. В условиях хронического опыта нагрузка глюкозой может сопровождаться не снижением, а повышением органного кровотока (Rulquin et al., 2004), что, вероятно, связано с индукцией гормонов и сдвигами в параметрах метаболизма.

Сопоставление результатов моделирования с фактическими данными дает основание заключить, что в условиях опыта усиление органного кровотока послужило лишь одним из причинных факторов в интенсификации молокообразования, так как продуктивный эффект сопровождался сдвигами в параметрах метаболической активности секреторных клеток.

Таблица 15. Выходные данные модели исходного состояния при увеличенном значении концентрации глюкозы в крови*

	C7v	C7i	E	Q (%)	Pm (%)	Tm (%)	P50 (%)
P1	3.0	0.23	0,29	576 (96)	2.45 (76)	3.9 (75)	1.97 (129)
P2	2.92	0.21	0,31	528 (88)	2.48 (77)	3.7 (71)	1.93 (126)

Примечания: *4,25 мМ, в исходном состоянии – 3 мМ. В скобках - процентное изменение по отношению к фактическому значению в исходном состоянии (инфузия физраствора). E – эффективность извлечения из крови (относительная A-B разница). Расшифровка остальных обозначений приведена в табл. 7. Два варианта расчета P1 и P2 соответствуют двум кривым F1, показанным на рис. 22.

Как было указано во введении, для поиска лимитирующих звеньев необходимо иметь набор тестов для количественной оценки ключевых метаболических параметров в условиях *in vivo*. Одним из таких тестов является описанный выше показатель активности суммарного транспорта в клетку, выраженный в единицах константы скорости или клиренса. Теоретический анализ показывает, что совпадение измеренного этим методом и фактического суммарного потока должно иметь место в случае пропорциональных изменений вне- и внутриклеточной концентраций субстрата (Hanigan et al., 2001; Черепанов и др., 2003). Внутриклеточная концентрация субстратов определяется соотношением параметров в системах их транспорта и расходования, поэтому с теоретической точки зрения при дифференциальной стимуляции синтеза соотношение вне- и внутриклеточной концентраций субстрата должно увеличиваться, а противотранспорт должен снижаться. Обратная ситуация может возникнуть, если увеличивается только концентрация в крови, а мощность системы синтеза (максимальная скорость при избытке субстрата) остается постоянной, как в модельном расчете, представленном в табл. 15. При этом может возникать некоторое смещение расчетной величины активности трансмембранного переноса по отношению к фактической величине, хотя анализ показывает, что это смещение может быть практически не значимым. Так, по данным табл. 15 величина T для контроля и опыта составила 256 и 246 (вариант P1) соответственно, хотя константы скорости транспорта глюкозы в клетку (K_1) для этих двух случаев были идентичными (венозную концентрацию можно в первом приближении считать равной внеклеточной, а внутриклеточную концентрацию – равной концентрации глюкозы в молоке). Артефактное смещение в 10 единиц (4%) здесь связано со сдвигом внутриклеточной концентрации глюкозы с 0,11 до 0,14 мМ ($C_v/C_i = 19$ и 17 соответственно). Если же сродство ткани к субстрату оценивать по величине E , как это делается традиционно, то артефактное смещение в данном случае составит 50%, а во многих случаях, как было показано выше, можно ошибиться даже и в знаке изменений. Вероятно по той причине, что вариации в системах синтеза обычно сопряжены с соответствующими изменениями в системах транспорта, расчетные значения активности суммарного переноса хорошо коррелируют с измеренными значениями константы однонаправленного транспорта, по крайней мере, для аминокислот (Черепанов и др., 2005).

В условиях проведенного опыта при использовании независимого теста (расчет величины T) было также выявлено увеличение активности транспорта аминокислот и глюкозы в секреторные клетки (Макар и др., 2006). Кроме того, при сопоставлении значений активности транспорта аминокислот и глюкозы в клетки со скоростью продукции молочного белка по объединенным данным была выявлена положительная корреляция активности транспорта с продукцией белка ($r = 0,8$; $P = 0,001$), тогда как при анализе взаимосвязи между эффективностью извлечения аминокислот из крови и продукцией белка корреляция характеризовалась даже небольшим отрицательным трендом и не достигала 1%-ного уровня значимости.

Таким образом, сопоставление данных опыта и результатов компьютерного моделирования указывает на то, что увеличенная скорость молокообра-

зования и выход молочного белка при совместной нагрузке инсулином и глюкозой были обусловлены стимуляцией как органного кровотока, так и метаболической активности клеток молочной железы, в частности, активности транспорта аминокислот в секреторные клетки.

3.2.3. Моделирование общего интермедиарного обмена у коров при разном уровне продуктивности

Современные подходы к обоснованию рационального питания животных и управления процессами биосинтеза требуют знания метаболических потоков и взаимодействий субстратов не только в основных продуктивных органах (молочная железа и др.) и тканях, но и на уровне целого организма. В силу исключительной сложности предмета, такие знания можно получить только в комплексных исследованиях, сочетающих теоретическое и экспериментальное изучение баланса потоков вещества и энергии в организме.

В связи с этим возникает необходимость в организации комплексных исследований, сочетающих физиологический эксперимент с использованием методов моделирования и современных средств информатики. Хотя это направление в мире развивается уже, по крайней мере, в течение двух десятков лет, в практическом его освоении имеются проблемы, связанные с необходимостью налаживания совместной работы разных специалистов – биохимиков, физиологов, специалистов по кормлению, ветврачей, математиков и программистов. Трудности возникают также на этапах, связанные с получением необходимого объема измерительных данных, их стандартизацией, накоплением, обработкой и использованием в составе баз и банков данных. В целом это многостадийный процесс, включающий разработку первичных вариантов модели, проверку их адекватности в физиологическом опыте, создание модифицированных версий модели, постановку расширенных опытов, формирование баз данных и использование их для целей многовариантного анализа и прогнозирования в рамках решения общей задачи оптимизации продукционных процессов (рис. 26).

В плане развития этого направления ранее были начаты работы по созданию интегрированной модели интермедиарного обмена у жвачных животных (Baldwin et al., 1987; Черепанов и др., 1994; Черепанов, 2002). В последние годы были получены новые данные о взаимосвязи органного кровоснабжения и использования субстратов в молочной железе (Cant, McBride, 1995; Cherepanov et al., 2000). Поэтому возникла задача проведения исследования по адаптации разрабатываемых вариантов модели интермедиарного обмена для лактирующих коров. Более конкретно задача состояла в идентификации распределения метаболических потоков в организме коров при разном уровне продуктивности и в проведении сравнительного исследования разных вариантов вычислительного прогноза молокообразования с использованием исходной версии модели и модифицированного варианта, учитывающего современные данные о механизмах ауторегуляции кровотока в молочной железе.

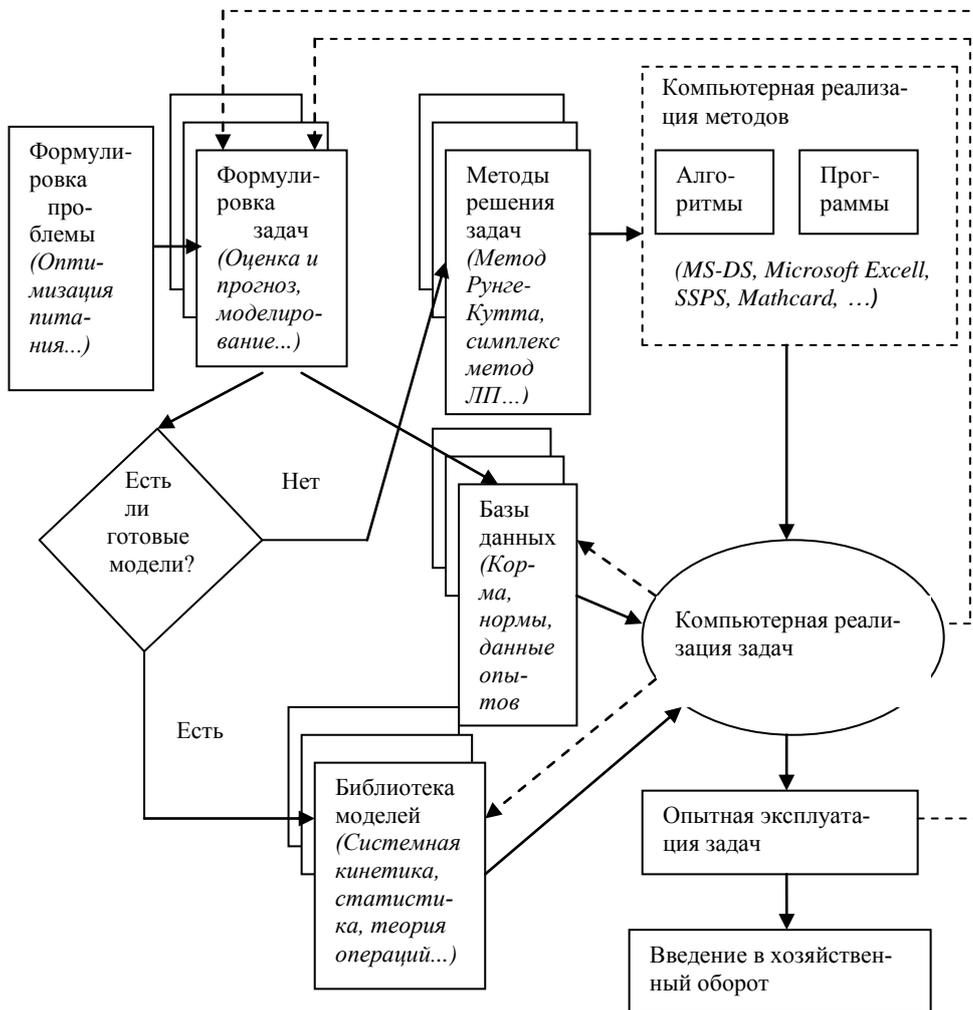


Рис. 26. Основные этапы применения новых информационных технологий для оптимизации первичных производственных процессов в молочном скотоводстве. Одно из центральных мест в этой системе занимает моделирование общего интермедиарного обмена.

Для идентификации распределения метаболических потоков у лактирующих коров использовали материалы отчета ВНИФБиП за 2000-2001 гг по комплексным опытам, проведенным на коровах с удоем 20-25 и 12-13 кг в сутки соответственно, получавших рацион, аналогичный по структуре и общему содержанию питательных веществ (обменная энергия 145,6 МДж, сухое вещество 15 кг). Значения потоков всасывания были взяты из отчета ВНИИФБиП (отчеты лабораторий пищеварения и энергетического обмена (табл. 16).

3.2.3.1. Идентификация метаболических потоков у коров разной продуктивности с использованием базовой модели интермедиарного обмена

Описание основных процессов метаболизма проведено в рамках модели локализованного обмена с однородным распределением концентраций в пределах каждого метаболического пула (Baldwin et al., 1987; Черепанов и др., 1994). Модель представлена системой нелинейных дифференциальных уравнений, описывающих процессы обмена в квазистационарном приближении; в простейшем случае односубстратной реакции без ингибирования зависимость метаболического потока (v) от концентрации субстрата (c) имеет вид, аналогичный формуле Михаэлиса-Ментен с двумя параметрами - максимальной скоростью при избытке субстрата (V_{\max}) и точкой полунасыщения или эффективной константой Михаэлиса:

$$V = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m}{c}}$$

В модели учитывались количественно наиболее важные реакции, влияющие на использование в организме ЛЖК, глюкозы, свободных аминокислот, высших жирных кислот с учетом баланса АТФ, НАДФ и потребляемого кислорода в системе, состоящей из трех групп органов (каждая группа представлена одним метаболическим пулом данного субстрата): 1) скелетные мышцы и кости; 2) жировая ткань; 3) внутренние органы. Регуляторные влияния со стороны комплекса гормонов учтены косвенно посредством введения нелинейной зависимости параметров от ключевых субстратов (глюкозы), играющих, согласно современным представлениям, роль индуктора секреции гормонов. Ориентировочные значения K_m взяты из литературных источников. Значения V_{\max} для конкретного случая оценивали по условию баланса потоков с использованием метода параметрической идентификации.

Входные данные: данные по составу рациона, потреблению сухого вещества, потоки всасывания метаболитов, оцененные по составу рациона по модели рубцового пищеварения, живая масса, значения метаболических параметров. *Выходные данные:* удой, выход жира и белка, теплопродукция, абсолютные значения метаболических потоков. Для исследования модели вычисления реализованы с использованием метода Рунге-Кутты четвертого порядка. Пределы интегрирования: 0 – 0,5 (суток); шаг интегрирования 0,005.

Метод идентификации заключался в решении обратной задачи кинетики в вычислительном эксперименте с использованием критерия наилучшего приближения выходных данных модели к фактическим зоотехническим данным при изменении минимально возможного числа коэффициентов уравнений.

При заданных постоянных значениях потоков всасывания общее соответствие прогнозных и фактических данных для коров с суточным удоем 22 и 12 кг по большинству зоотехнических показателей было достигнуто при изменении значений 5 параметров модели интермедиарного обмена (табл. 17, 18).

Таблица 16. *Потоки всасывания метаболитов, принятые постоянными при адаптации модели интермедиарного обмена для коров разной продуктивности*

Обозначение потока	Метаболит	Значение потока	
		г/сут	моль/сут
A1, A(FA)	Высшие жирные кислоты	239	1,16
A2, A(AC)	Ацетат	2988	49,8
A3, A(BU)	Бутират	643	7,31
A4, A(AA)	Аминокислоты	1256	11,49
A5, A(GL)	Глюкоза	806	4,48
A6, A(Pr)	Пропионат	1426	19,27
A7, A(AM)	Аммиак	54	3

Таблица 17. *Значения метаболических параметров (коэффициентов), измененных при адаптации модели интермедиарного обмена для коров разной продуктивности*

Параметр моль/сут	Расшифровка обозначения параметра	Суточный удой, кг	
		22	12
VV2	Максимальная скорость образования молочного жира из высших жирных кислот в молочной железе	5	2
VV4	« « « из ацетата «	10	6
VV5	« синтеза белков в мышцах	7	10
VV7	« синтеза молочного белка	11,7	6
VV9	« синтеза лактозы	19	10

Хорошее соответствие прогноза и фактических данных было отмечено по удою, энергии молока и балансу энергии, несколько более высокие прогнозные значения, в сравнении с измеренными в физиологическом опыте, были получены по теплопродукции и величине дыхательного коэффициента. Возможно, что расхождение по этим показателям связано со специфическими условиями данного опыта, так как в ранее проведенной проверке адекватности модели по этим показателям не было отмечено существенных расхождений (Черепанов и др., 1994).

Таблица 18. *Выходные данные модели интермедиарного обмена, адаптированной для коров разной продуктивности при одинаковых потоках всасывания метаболитов*

Обозначение в модели	Расшифровка обозначения	Значение	
		Коровы	Первотелки
P50	Удой, кг	22,2	12,1
E _{milk}	Энергия молока, МДж/сут	64,5	35,1
E _{ret}	Баланс энергии, МДж/сут	- 16,1	8,3
H _p	Теплопродукция, МДж/сут	94,9	100,2
H _r	Дыхательный коэффициент	0,94	0,94

На данном этапе, когда еще не накоплено достаточного количества комплексных измерений, сведенных в согласованные базы данных, количественный прогноз метаболических и продуктивных функций возможен лишь в общих чертах, в плане отработки подходов и методов. Контролируемые в опыте показатели обмена на уровне тканей организма связаны между собой сложной сетью вещественных потоков. Задача состоит в том, чтобы идентифицировать количественно наиболее важные точки в этой метаболической сети и оценить численные значения внутренних параметров в данных конкретных условиях (обратная задача кинетики).

Величины метаболических потоков в организме у коров разной продуктивности, спрогнозированные по модели для найденной комбинации вышеуказанных значений пяти параметров, приведены в Приложении (табл. П10). При использовании данной версии модели у коров с более высоким суточным удоем прогнозировался более интенсивный распад белков в мышцах, большее расходование аминокислот на глюконеогенез, большая величина окисления ВЖК и расход глюкозы на образование НАДФ в жировой ткани, при этом у них был меньше синтез белков в мышцах, меньше расход кислорода на окисление триозофосфатов во внутренних органах при приблизительно одинаковом общем расходе кислорода и образовании CO_2 . В целом полученная картина направленности метаболических потоков у коров с отрицательным балансом энергии, и у коров с меньшей величиной суточного удоя и положительным балансом энергии, соответствует имеющимся физиолого-биохимическим данным.

Полученный результат важен в методическом и теоретическом плане, поскольку он указывает на то, что имеется возможность ограничить множество неизвестных внутренних метаболических факторов определенным набором параметров, в основном определяющим уровень продуктивности и направленность обменных процессов у животных рассматриваемой производственной группы. В данном модельном исследовании видно, что многочисленные сдвиги в наблюдаемой картине распределения метаболических потоков обусловлены проявлением инвариантных регуляторно-метаболических систем, функционирующих в целом одинаково у разных групп лактирующих животных. Эта инвариантная часть регуляции метаболизма отражена в той части модели, которая не подверглась модификации для коров разной продуктивности.

Таким образом, полученные результаты позволяют сформулировать общую концепцию аналитической системы для физиологического мониторинга продуктивных функций животных, которая обеспечивает оценку (идентификацию) внутренних метаболических параметров по комплексу измеряемых на животных показателей на основе решения обратных задач кинетики.

3.2.3.2. Сравнение двух вариантов прогноза молокообразования с использованием базовой и модифицированной модели интермедиарного обмена

В новой версии модели интермедиарного обмена была введена отдельная субмодель метаболизма молочной железы, в которой учтены предполагаемые механизмы сопряжения органного кровотока и метаболизма секреторных клеток (Черепанов, 2002). Принято, что в регуляции активности гладкой мускулатуры кровеносных сосудов в молочных железах продуктивных животных при отсутствии стрессовых воздействий и резких колебаний в состоянии питания основную роль играет энергетический критерий ауторегуляции кровотока, при этом вазомоторная реакция определяется знаком и величиной энергетического баланса секреторных клеток, т.е. разницей между энергозатратами на синтез компонентов молока и генерацией энергетических эквивалентов из субстратов, поступающих из крови. Объем секреции молока определяется продукцией основного осмотически активного компонента – лактозы. Темп образования лактозы определяется в основном внутриклеточной концентрацией глюкозы и уровнем экспрессии регуляторного белка альфа-лактальбумина.

По данным исследований, проведенных в виварии института в 2000 г, при инфузии физиологических доз субстратов в желудочно-кишечный тракт (в рубец и в двенадцатиперстную кишку) были зарегистрированы небольшие отклонения жирности молока и белковомолочности: при инфузии ацетата – повышение жирности, при инфузии глюкозы – понижение ее и при инфузии смеси аминокислот – повышение уровня белка в молоке. Оба варианта модели при заданных уровнях субстратов в крови прогнозировали в общем аналогичные сдвиги этих показателей в условиях, имитирующих небольшое повышение концентрации субстратов в крови, по сравнению с базовыми уровнями (табл. 19).

С другой стороны, в серии вычислительных экспериментов, имитирующих изменение уровня субстратов в крови в более широких пределах, были выявлены определенные различия в прогнозных оценках состава молока между двумя вариантами модели, в частности по величине снижения жирности при вариации содержания глюкозы в крови.

Имеющихся в настоящее время данных измерений недостаточно для окончательного выбора того или иного варианта. Необходимо накопление их в форме базы данных, т.е. в виде массивов систематизированных, метрологически выверенных и согласованных результатов опытов, в том числе специально спланированных для идентификации метаболических параметров.

Таблица 19. Показатели состава молока при инфузиях субстратов и прогноз изменений суточного состава молока при изменении концентрации субстратов в крови, полученный с использованием первоначального варианта модели интермедиарного обмена (модель 1) и модифицированного варианта, учитывающего механизм ауторегуляции кровотока в молочной железе (модель 2).

Инфузия*	Содержание в молоке, %	Контроль	Опыт	Модель 2		Модель 1	
				База*	Прогноз	База*	Прогноз
Ацетат	Белок	2,73±0,03	2,65±0,10	2,88	2,89	2,89	2,89
	Жир	3,14±0,1	3,2±0,05	3,13	3,16	3,11	3,15
Глюкоза	Белок	2,74±0,03	2,82±0,08	2,88	2,78	2,89	2,82
	Жир	3,23±0,12	3,18±0,10	3,13	3,00	3,11	3,09
Аминокислоты	Белок	2,66±0,02	2,73±0,04	2,88	2,99	2,89	2,92
	Жир	3,45±0,23	3,52±0,10	3,13	3,09	3,11	2,96

Примечание: * Прогнозные уровни субстратов в крови для модельных расчетов по периодам инфузии (мМ):

Инфузируемый субстрат	Ацетат, мМ	Глюкоза, мМ	Свободные аминокислоты, мМ
Ацетат	2,1	2,7	2,1
Глюкоза	1,9	2,9	2,1
Смесь аминокислот	1,9	2,7	2,4

Базовые уровни субстратов в крови для модельных расчетов (мМ): глюкоза 2,7, свободные аминокислоты 2,1, ацетат 1,9, НЭЖК 0,35. Прогнозные значения получены при увеличении уровня в крови инфузируемого субстрата на 10% по отношению к базовому уровню.

3.3. Применение технологии баз данных для оценки состояния обменных процессов у продуктивных животных

В области информационного обеспечения аграрного производства в настоящее время широко применяются компьютеризированные системы мониторинга (контроля и управления). Разработаны и функционируют системы экологического, генетического, ветеринарного мониторинга, менее интенсивно в нашей стране ведутся разработки по мониторингу биохимических процессов и физиологического состояния животных, т.е. физиологического мониторинга. В других странах в последние годы начата разработка прототипов таких систем. Так, во Франции проводится комплексная программа по мониторингу питания, поведения, лактации, репродукции и стресса, организовано накопление данных физиологических измерений, в том числе по составу молока, поглощению нутриентов молочной железой, в Германии анализ состава молока используют для мониторинга состояния обмена у коров, в США функционирует сеть баз данных, включающих мониторинг молочной продуктивности, индекса упитанности коров и состава молока. Необходимость разработки таких систем диктуется масштабом потерь по показателям продуктивного долголетия коров и качества получаемой продукции (Решетов, Черепанов, 2003).

В сравнении с распространенными в настоящее время коммерческими базами данных, при создании исследовательских систем возникают специфические проблемы в связи со сложностью структуры данных и путей их

использования, а также с трудностями сбора источников данных, поскольку первичные данные, полученные разными исполнителями в разные годы, необходимо собрать, проверить их надежность, систематизировать, найти подходящие программные средства и отработать наиболее рациональные форматы записей. Специфика такой работы практически исключает возможность выполнения ее исключительно силами специалистов-информационщиков, поэтому в регламенты проведения такой работы исследователем-биологом должна входить работа по освоению и адаптации компьютерных технологий.

Для разработки системы физиологических тестов и моделей для мониторинга состояния обменных процессов у лактирующих животных необходимо иметь массивы измерительных данных, доступные для компьютерного анализа. Поскольку традиционно сложившаяся практика регистрации первичных данных в лабораторных журналах и «кусочная» публикация обобщенных сведений не отвечают требованиям компьютерных технологий, потребовалось создание системы электронной регистрации результатов физиологических измерений. В качестве апробации общей концепции создания такой системы была разработана система электронной архивации физиолого-биохимических данных по метаболизму молочной железы и по обмену энергии у коров.

База данных по метаболизму молочной железы

Для верификации вышеизложенных теоретических моделей и адаптации их к конкретным условиям применения необходимо накопление измерительной информации в форме, допускающей многоцелевое использование для численных расчетов. Для накопления и численного анализа экспериментальных данных по метаболизму молочной железы была использована программа Microsoft Excel. Структура размещения записей в базе данных показана в Приложении, табл. П3. Примеры представления результатов измерений по альфа-аминному азоту приведены в табл. П4-П7. Для каждого измеряемого показателя использовано до 10 листов, на которых представлены исходные данные по группам и периодам, графические зависимости и результаты вычислений. В одном опыте с измерением кровотока, концентрации метаболитов и показателей молокообразования, как правило, определяется в динамике от 10 до 18 показателей. Для проведения верификации модели и надежной оценки параметров необходимо накопление информации, как минимум, по 10 опытам. Таким образом, в целом для проведения всего цикла работ необходимо иметь базу данных объемом не менее 1000 листов описанного формата. Приведенные в предыдущих разделах обобщенные зависимости и взаимосвязи по метаболизму молочной железы получены при использовании этой базы данных.

База данных по обмену энергии у коров

В качестве источника данных использованы журналы регистрации физиологических опытов, проведенных лабораторией газэнергетического обмена в предшествующие годы на лактирующих коровах холмогорской и черно-пестрой породы.

Представленная ниже схема структуры и форматы данных по обмену энергии у коров – это результат предварительного этапа в выполнении долгосрочной программы и первый вариант электронной архивации комплексных первичных данных по обменным опытам для их использования в научно-исследовательских целях (рис. 27). Выбор системы Microsoft Excell обусловлен тем, что она наиболее широко используется в научных исследованиях и допускает перенос записей в другие более развитые системы хранения и использования данных.

В перечне показателей анализа корма в представленном варианте отсутствуют некоторые позиции, поскольку соответствующие показатели или не измерялись в проведенных опытах, или источники данных не удалось восстановить. В определенной степени этот недостаток компенсируется тем, что для каждого рациона приведен полный список кормов и химический состав можно оценить, используя базы данных по кормам.

Поскольку данный вариант базы данных не является окончательным, обработка перечня показателей и форматов записей будет продолжена и в скорректированном виде они составят основу будущей системы регистрации, хранения и использования комплексных физиологических данных, в том числе для разных видов животных.

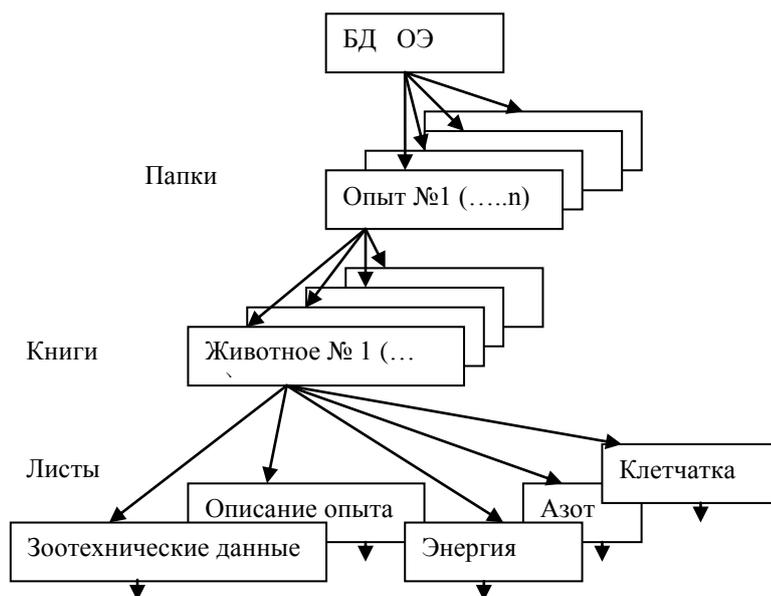


Рис. 27. Общая структура базы данных по обмену энергии у коров.

Принятые сокращения: БД – база данных; ОП – опыт; Ж – животное

А. Для всего массива материалов БД создается общая папка с определенным названием. В нее вкладываются вторичные папки: см. **В** и **С**.

В. Отдельные папки для материалов отдельных опытов с кодами БД-ОП... (ОП... - номер опыта).

Примеры: БД-ОП1, БД-ОП2 и т.д.

С. В каждую папку для материалов одного опыта, в свою очередь, вкладываются в виде папок файлы (книги - по терминологии EXEL) с материалами по отдельным животным в этом опыте. Файлы (книги) имеют коды БД-ОП...Ж... (Ж – порядковые номера животных от 1 до N по числу животных в опыте).

Примеры: БД-ОП1-Ж1, БД-ОП1-Ж2 и т.д.

В каждую книгу входят: лист 1 с повторяющимся общим описанием условий опыта; лист 2 со стандартной зоотехнической характеристикой данного животного и листы с материалами обменного опыта по отдельным показателям (в данной БД это листы 3, 4 и 5 по использованию данным животным энергии, азота и клетчатки рациона).

Использование системы электронной архивации данных позволяет оперативно анализировать весь накопленный числовой массив и получать обобщенную количественную информацию. В качестве примера на рис. 28 приведена зависимость переваримости питательных веществ рациона от уровня потребления сухого вещества у лактирующих коров разной продуктивности, выявленная при анализе результатов 80 обменных опытов.

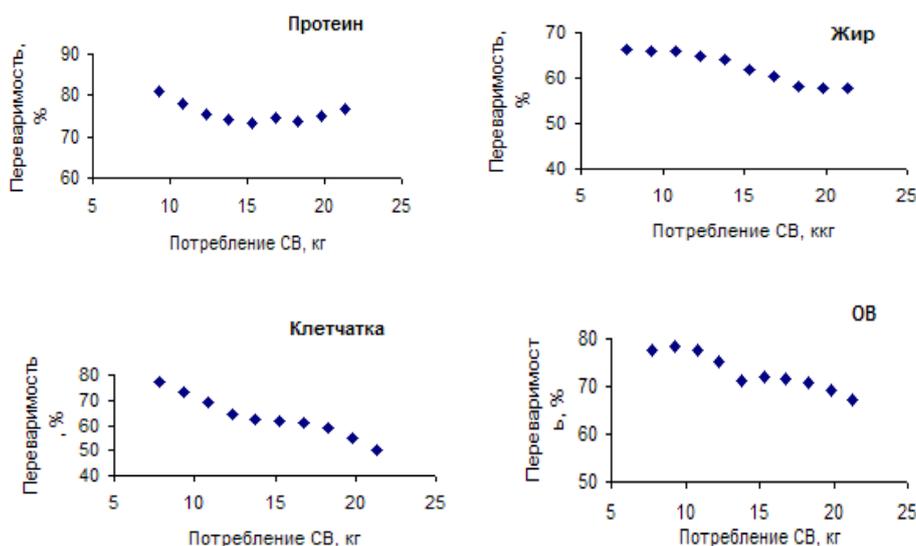


Рис. 28. Зависимость переваримости сырого протеина, жира, клетчатки и органического вещества у лактирующих коров от уровня потребления сухого вещества, выявленная при анализе 80 обменных опытов (исходные данные сглажены методом скользящей средней).

Практическое использование технологии БД в аспекте оценки состояния обмена веществ у продуктивных животных возможно по следующим направлениям:

- для построения обобщенных регрессионных зависимостей и индексов для физиологического мониторинга по данным оперативного анализа упитанности животных, энергетической ценности рационов и энергии молока;
- для совершенствования нормативов оценки кормов и кормления животных;
- для прогноза эффективности использования энергии и азота у лактирующих коров по данным анализа азотсодержащих соединений мочи и молока, потребления сырого протеина и по другим факторам.
- в качестве полигона научных данных для верификации и «привязки» интегрированных систем моделей продукционных процессов, создаваемых на основе физиолого-биохимических данных тканевого и клеточного уровня.

4. Заключение

Лимитирующие факторы в реализации генетического потенциала продуктивных животных имеют количественную природу и чаще всего кроются в несбалансированном развитии системы органов, поставляющих и метаболизирующих нутриенты, и в несбалансированном питании. Поэтому необходим количественный учет меры соответствия условий среды и интерьерных показателей для данных конкретных условий эксплуатации животных.

Важнейшей характеристикой состояния внутренней сферы организма является оценка интенсивности и направленности метаболических потоков, совокупный баланс которых определяет количество и качество получаемой животноводческой продукции. Вместе с тем возможности изучения количественной динамики потоков существенно ограничены фундаментальными особенностями интактных метаболических систем, в том числе их многопараметричностью и трудностями прямого измерения.

Поэтому на протяжении длительного периода практически единственным методом для количественной оценки параметров метаболических потоков в условиях *in vivo* был метод изотопных индикаторов, который, однако, позволяет получать информацию, относящуюся по существу лишь к одной конкретной ситуации. Кроме того, его практически невозможно использовать в широких масштабах вне научной лаборатории.

Отсутствие средств «съема информации» по ключевым параметрам создает ситуацию методологического тупика, поскольку эта информация критически необходима для оптимизации питания и идентификации узких мест в системах метаболизма и биосинтеза. Однако выход из этого тупика возможен на основе принципа, широко используемого в других областях естествознания, который гласит: если прямые измерения невозможны, то необходимо прибегнуть к методике косвенного измерения.

Вышеизложенные научно-методические подходы и результаты экспериментальных исследований в целом можно оценить как первый этап в по-

строении системы мониторинга физиологического состояния и продуктивных функций животных, обеспечивающей оценку (идентификацию) внутренних метаболических параметров по методике косвенного измерения - по комплексу показателей, доступных для измерения на животных, на основе построения и использования баз данных и алгоритмов решения обратных задач кинетики.

Этот подход, широко распространенный в естественных науках, применяется на протяжении многих лет и в отдельных разделах физиологической химии, в том числе при изучении ферментов, когда по измерениям скорости убыли субстрата или наработки продукта реакции производят численную оценку внутренних молекулярных параметров, в том числе сродства (аффинности), максимальной скорости, числа оборотов и т.д. с использованием той или иной расчетной модели (в простейшем случае – модели Михаэлиса-Ментен). На этом же принципе основано применение теории компартментного анализа при изучении метаболических потоков с применением изотопных индикаторов, когда по набору кривых накопления–выведения изотопной метки расчетным путем определяют численные значения потоковых параметров. Правомерность применения этого подхода к изучению динамики интактной метаболической системы зависит исключительно от того, имеется ли в наличии достаточно адекватная модель этой системы. Поэтому вопрос о методах измерения метаболических параметров неразрывно связан с вопросом моделирования процессов метаболизма. В контексте обсуждаемой проблемы это касается в первую очередь процессов, протекающих в лактирующей молочной железе. От уровня понимания этих процессов зависит не только качество разрабатываемых системно-кинетических моделей, но и темпы решения ряда прикладных технологических проблем, поскольку в процессе такого исследования всегда получают «сопутствующие» технические решения.

Молочные железы продуктивных жвачных животных представляют собой удобный объект для изучения общих вопросов физиологической регуляции биосинтеза, поскольку продукты биосинтеза практически полностью выводятся с молоком, а поверхностное расположение основных артерий и вен облегчает проведение хирургической подготовки животных для проведения длительных неинвазивных измерений.

Благодаря применению новейших методов в последние годы было установлено, что, помимо общих нейро-эндокринных влияний и вариаций субстратного фонда крови, на функциональную активность молочных желез оказывают существенное влияние изменения в уровне кровоснабжения, зависящие от регионального сосудистого сопротивления. Была известна общая корреляция между объемом кровоснабжения органа и уровнем тканевого метаболизма, однако не было ясно, из каких конкретно функциональных взаимосвязей эта корреляция вытекает и какими факторами обусловлена. Оказалось, в частности, что могут быть вариации в отношении того, какой фактор служит ведущим или пусковым для сдвигов в общей функциональной системе органа. Эмпирические наблюдения и молекулярно-физиологические исследования, посвященные отдельным частным механизмам, дают богатый

материал для возможного обобщения и систематизации, однако для выработки согласованной картины необходимы количественные критерии и уточненные оценки функционирования целостной системы, в противном случае отдельные факты остаются разрозненными и противоречивыми. Так, с момента открытия лактогенного действия щелочного экстракта из гипофиза прошло 70 лет, но детали физиологического действия гормона роста, помимо констатации увеличенного регионального кровотока, до сих пор не уточнены.

Поэтому разработка тестов для оценки активности транспорта субстратов в клетки молочной железы открывает новые исследовательские возможности. Сдвиги в активности переноса субстратов в клетку обычно обусловлены вариациями количества молекул транспортеров в плазматической мембране, а это связано с общей адаптацией клеточного метаболизма к изменившемуся статусу питания. В наших исследованиях было установлено, что активность транспорта аминокислот в секреторную клетку может регулироваться самой клеткой в зависимости от соотношения темпа синтеза молочных белков и уровня аминокислотной обеспеченности клетки. Совпадение результатов, полученных с использованием системы независимых тестов и с помощью компьютерной модели, указывает на то, что выявленные сдвиги не являются артефактом, а компьютерная модель отражает реальные процессы. Разработка методов количественной оценки транспорта и использования аминокислот в условиях *in vivo* важны не только в теоретическом, но и в прикладном аспекте, поскольку поиск аминокислот, лимитирующих молокообразование, несмотря на большой объем проведенных исследований, остается в числе актуальных нерешенных проблем.

В связи с этим становится актуальным поиск ответов на два вопроса: каким образом клетка рецептирует дефицит или избыток субстратов синтеза и осуществляет субстратный гомеостаз и в чем состоят механизмы интеграции физиологических процессов на уровне ткани и органа. В более широком плане поиск точек субстратного лимитирования биосинтеза видится на пути постепенного совершенствования моделей субстратного гомеостаза с последующим объединением теории и эксперимента для установления узких мест.

Полученные результаты создают научно-методическую основу для применения этого нового подхода к изучению метаболизма других, немamмарных тканей и органов, включая печень, жировую и мышечную ткани, функционирование которых в процессе лактации у высокопродуктивных животных имеет критическое значение для поддержания их продуктивности и жизнеспособности.

В связи с задачами совершенствования молочного скота по признакам продуктивного долголетия и качества продукции разработку системы оценки обменных процессов на основе построения баз данных и моделей физиологического мониторинга необходимо оценивать как важную и актуальную задачу и в плане фундаментальных исследований, и в прикладном аспекте. В настоящее время основной лимитирующий фактор в развитии этих работ – это дефицит измерительных данных, полученных в планируемых комплексных экспериментах и накопленных в электронной форме. После завершения этапа рекогносцировочных работ необходимо постепенно, по мере отработки

научно-методических предпосылок и условий, расширять список регистрируемых показателей, включая данные по характеристике внутренней сферы организма. Для того, чтобы не получить просто «кучу данных», нужно заранее определять цели работы, конкретные задачи и методы их решения, т.е. создавать базу данных «под модель». Поэтому в цели последующих разработок должно входить развитие теории баланса метаболических потоков и ее применение для решения прикладных задач, в том числе для физиологического мониторинга, рационализации кормления животных и условий их эксплуатации.

С учетом вышеизложенного, эту работу необходимо проводить одновременно в двух направлениях: 1) проведение модельных исследований для поиска новых идей и создания вычислительных алгоритмов и 2) проведение комплексных измерений на животных с электронной архивацией данных. После накопления достаточного объема измерительной информации можно будет оперативно «обкатывать» найденные теоретические подходы и вводить новые решения в хозяйственный оборот. В целом это большая коллективная работа, сопоставимая по сложности и народно-хозяйственной важности с рядом других новейших высоких технологий.

Рекомендуемая литература

- Большов Л.Н., Смирнов Н.В. Таблицы математической статистики. Л.: Наука, 1968.
- Вартофский М. Модели, репрезентация и научное понимание. М.: Прогресс, 1988.
- Гачок В.П. Кинетика биохимических процессов. Киев, 1987.
- Димитров В.И. Простая кинетика. Новосибирск, 1982.
- Иванов К.П. Основы энергетики организма. Т. 3, Спб: Наука, 2001.
- Корниш-Боуден Э. Основы биохимической кинетики. М.: Мир, 1979.
- Краткая химическая энциклопедия. Ошибки аналитического определения. 1964, с. 840.
- Крутько П.Д. Обратные задачи динамики управляемых систем: нелинейные модели. М.: Наука, 1988.
- Лищук В.А. Математическая теория кровообращения. М.: Медицина, 1991.
- Любимов Н.Н. Методы математической биологии. Кн. 1. Общие методы анализа биологических систем. Киев, 1980.
- Макар З.Н., Черепанов Г.Г., Бояршинов И.А., Корнеева Р.И., Матющенко П.В., Токарев Т.Ю. Взаимосвязь органного кровотока, поглощения субстратов из крови, активности транспорта в секреторные клетки молочной железы и образования компонентов молока у коров. Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова, 2003, 89, 8: 951-959.
- Макар З.Н., Черепанов Г.Г., Бояршинов И.А., Матющенко П.В., Корнеева Р.И., Токарев Т.Ю., Решетов В.Б. Динамика артерио-венозного баланса метаболитов крови и их транспорта в клетки молочной железы у коров при кратковременных сдвигах в уровне питания. Труды ВНИИФБиП, 2003б: 80-94.
- Макар З.Н., Черепанов Г.Г. и др. Исследование физиологических механизмов регуляции использования субстратов при синтезе компонентов молока у коров. Труды регион. конкурса научных проектов в области естеств. наук, вып. 6. Калуга: изд. дом «Эйдос», 2004: 344-355.

Макар З.Н., Черепанов Г.Г., Сапунов М.И., Корнеева Р.И., Бояршинов И.В. Исследование эффектов субстратного лимитирования молокообразования при кратковременном голодании у коз. Труды регион. конкурса научных проектов в области естеств. наук, вып. 8, Калуга: Полиграф-Информ, 2005: 293-299.

Макар З.Н., Сапунов М.И., Корнеева Р.И., Бояршинов И.В., Черепанов Г.Г. Особенности метаболизма и молокообразования у коз при нагрузке инсулином в условиях поддержания нормогликемии. Труды ВНИИФБиП, 2006, Т.45: 55-65.

Решетов В.Б., Черепанов Г.Г. Мониторинг физиологических функций и признаков продуктивности у коров. С.-х. биология, 2005, 4: 3-12.

Рубин А.Б., Пытьева Н.Ф., Ризниченко Г.Ю. Кинетика биологических процессов. М.: Изд. МГУ, 1977.

Спивак С.И. Информативность кинетического эксперимента и обратные задачи химической и биологической кинетики. Совр. проблемы биокинетики. М.: МГУ, 1987: 150-197.

Франс Дж., Торнли Дж. Математические модели в сельском хозяйстве. М.: Агропромиздат, 1987.

Черепанов Г.Г., Жиркова И.Н. Решетов В.Б. Количественный анализ процессов интермедиарного обмена у коров (эскизная модель). С.-х. биология, 1994, 4: 123-134.

Черепанов Г.Г. Системное моделирование в исследованиях питания. Методы исследований питания сельскохозяйственных животных. Боровск, 1998: 372-402.

Черепанов Г.Г. Системно-кинетические принципы и модели в теории питания продуктивных животных. Боровск: изд. ВНИИФБиП, 2002: 163 с.

Черепанов Г.Г., Токарев Т.Ю., Макар З.Н. Косвенная оценка транспорта метаболитов в клетку *in vivo* по данным измерения их артерио-венозного баланса. Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова, 2003, 89 (8): 1021-1028.

Черепанов Г.Г., Макар З.Н. Оценка активности транспорта аминокислот в секреторные клетки молочной железы: сопоставление прямого и косвенных методов. Труды ВНИИФБ, 2005: 23-32.

Черепанов Г.Г. Оценка дифференциальных эффектов, детерминирующих продукцию белка и удой на уровне молочной железы (модельное исследование). Труды ВНИИФБиП, 2005: 15-23.

Черепанов Г.Г., Макар З.Н. Адаптивные изменения активности транспорта аминокислот в секреторные клетки молочной железы при сдвигах нутритивного статуса. Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова, 2005, 91(10):1182-1194.

Atkins C.L., Multicompartmental models for biological systems. London, 1969.

Baldwin, R.L., Smith, N.E. Adaptation of metabolism to various conditions: milk production. Dynamic Biochemistry of Animal Production (Ed. P. M. Riis). Amsterdam: Elsevier, 1983: 359-388.

Baldwin R.L., France J., Gill M. Metabolism of the lactating cow. I. Animal elements of a mechanistic model. J. Dairy Res., 1987, 54: 583-595.

Baldwin R.L. Modeling ruminant digestion and metabolism. New York: Chapman & Hall., 1995.

Baron A.D., Steinberg H., Brechtel G., Johnson A. Skeletal muscle blood flow independently modulates insulin-mediated glucose uptake. Am. J. Physiol., 1994, 266 (Endocrinol. Metab. 29): E248-E253.

Bequette B.J., Hanigan M.D., Calder A.G., Reynolds C.K., Lobley G.E., MacRae J.C. Amino acid exchange by the mammary gland of lactating goats when histidine limits milk production. J. Dairy Sci., 2000, 83: 765-775.

CAB International 2000. Modelling Nutrient Utilization in Farm Animals (eds J.P. McNamara, J. France and D.E. Beaver), Amsterdam, 2000.

- Calvert D.T., Kim T.-G., Choung J.-J., Burns C., Shennan D.B. Characteristics of L-glutamine transport by lactating mammary tissue. *J. Dairy Res.*, 1998, 65: 199-208.
- Cant, J.P., McBride B.W. Mathematical analysis of the relationship between blood flow and uptake of nutrients in the mammary glands of a lactating cow. *J. Dairy Res.*, 62: 405-422. 1995
- Cant J.P., Berthiaume R., Lapierre H., Luimes P.H., McBride B.W., Pacheco D. Responses of the bovine mammary glands to absorptive supply of single amino acids. *Can J. Anim. Sci.*, 2003, 83: 341-355.
- Cant, J.P., DePeters, E.J., Baldwin, R.L. Mammary uptake of energy metabolites in dairy cows fed fat and its relationship to milk protein depression. *J. Dairy Sci.*, 76: 2254-2265. 1993.
- Cant J.P., Trout D.R., Qiao F., Purdie N.G. Milk synthetic response of the bovine mammary gland to an increase in the local concentration of arterial glucose. *J. Dairy Sci.*, 85: 494-503. 2002.
- Cherepanov, G.G., Danfaer, A., Cant J.P. Simulation analysis of substrate utilization in the mammary gland of lactating cows. *J. Dairy Res.* 67: 171-188. 2000
- Christensen H.N., Oxender D.L., Liang M., Vatz K.A. The use of N-methylation to direct the route of mediated transport of amino acids. *J. Biol. Chem.*, 1965, 240(9): 3609-3616.
- Clark R.M., Chandler P.T., Park C.S., Norman A. Extracellular amino acid effects on milk protein synthesis and intracellular amino acid pools within bovine mammary cells in culture. *J. Dairy Sci.*, 63 (8): 1230-1234. 1980.
- Crawhall J.C., Purkiss P. Transport of methionine and proline by rat liver slices and the effect of certain hormone. *Biochem. J.*, 1973, 136: 15-24.
- Christensen H.N. Role of amino acid transport and counter transport in nutrition and metabolism. *Physiol. Rev.*, 1990, 70: 43-77.
- Fleet, I.R., Davis J., Richardson, M. & Heap, R.B. 1992 The effects of recombinantly-derived insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-II on mammary vasodilation in the goat. *J. Physiol.*, 1991, 446: 69.
- Davis S.R., Eichler S.J., Callaghan M.R., Grieve R.C.J., Prosser C.G. Factors affecting the production of lactose by ovine mammary cells. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.*, 1993, 53: 147-149.
- Faulkner A. Glucose availability and lactose synthesis in the goat. *Biochim. Soc. Trans.*, 1985, 13(2): 495-496.
- Faulkner A., Peaker M. Regulation of mammary glucose metabolism in lactation. *The mammary gland* (Neville M.C., Daniel C.N., eds.), N.Y., 1987: 536-562.
- Hanigan M.D., Calvert C.C., DePeters E.J., Reis B.L., Baldwin R.L. Kinetics of amino acid extraction by lactating mammary glands in control and somatotrope-treated Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, 1992, 75: 161-173.
- Hanigan M.D., France J., Wray-Cahen D., Beever D.E., Lobley G.E., Reutzel L. Alternative models for analyses of liver and mammary transorgan metabolite extraction data. *Br. J. Nutr.*, 1998a, 79: 63-78.
- Hanigan M.D., Cant J.P., Weakley D.C., Beckett J.L. An evaluation of postabsorptive protein and amino acid metabolism in the lactating dairy cow. *J. Dairy Sci.*, 1998b, 81: 3385-3401.
- Hanigan M.D., Bequette B.J., Crompton L.A., France J. Modeling mammary amino acid metabolism. *Livest. Prod. Sci.*, 2001, 70: 63-78.
- Hanigan M.D., Crompton L.A., Bequette B.J., Mills J.A.N., France J. Modelling mammary metabolism in the dairy cow to predict milk constituent yield, with emphasis on

amino acid metabolism and milk protein production: model evaluation. *J. Theoret. Biol.*, 2001a, 217: 311-330.

Harris P.M., Skene P.A., Buchan V., Milne E., Calder A.G., Anderson S.E., Connell A., Lobley G.E. Effect of food intake on hind-limb and whole-body protein metabolism in young growing sheep: chronic studies based on arterio-venous techniques. *Br. J. Nutr.*, 1992, 68: 389-407.

Hinde A., Ahmed A. Identification and kinetic characterization of L-histidine transport in pig heart. *J. Physiol. Proc.*, 1998, 507: 6.

King K.R., Gooden J.M., Annison E.F. Acetate metabolism in the mammary gland of the lactating ewe. *Austral. J. Biol. Sci.*, 1985, 38 (1): 23-31.

Kronfeld D.S., Rasmberg C.P. Whole animal studies using tracer kinetics. *Proc. Nutr. Soc.*, 1981, 40(1): 129-138.

Mackle T.R., Dwyer D.A., Ingvarsen K.L., Chouinard P.Y., Ross D.A., Bauman D.E. Effects of insulin and postprandial supply of protein on use of amino acids by the mammary gland for milk protein synthesis. *J. Dairy Sci.*, 2000, 83: 93-105.

Neville M.C., Hay W.W., Fennessy P. Physiological significance on the concentration of human milk glucose. *Protoplasma*, 1990, 159: 118-128.

Park C.S., Chandler P.T. Response to labeled precursor amino acids, varying cell density and graded amino acid complement for protein synthesis in mammary cell culture. *J. Dairy Sci.*, 1976, 59 (2): 216-223.

Prosser C.G., Davis S.R., Moore L.G., Gluckman P.D. Effects of close arterial infusion of insulin-like growth factor-II on milk yield and mammary blood flow in lactating goats. *J. Endocrinol.*, 1994, 142: 93-99.

Prosser C.G., Davis S.R., Fair V.C., Lacasse P. Regulation of blood flow in the mammary microvasculature. *J. Dairy Sci.*, 1996, 79: 1184-1197.

Rulquin H., Rigout S., Lemosquet S., Bach A. Infusion of glucose directs circulating amino acids to the mammary gland in well-fed cows. *J. Dairy Sci.*, 2004, 87: 340-349.

Sharma R., Kausal V.K. Heterogeneity of cationic amino acid transport systems in mouse mammary gland and their regulation by lactogenic hormones, evidence for two broad spectrum systems. *J. Dairy Res.*, 2000, 66: 385-398.

Sheppard C.W. Basic principles of the tracer method. N.-Y., 1962.

Shipley R.A., Clark R.E. Tracer method for in vivo kinetics: theory and application. N.-Y., 1972.

Trottier N.L., Shipley C.F., Easter R.A. Plasma amino acid uptake by the mammary gland of the lactating sows. *J. Anim. Sci.*, 1997, 75: 1266-1278.

Wilde C.J., Kuhn N.J. Lactose synthesis in the rat, and the effects of litter size and malnutrition. *Biochem. J.*, 1979, 182: 287-294.

Zierler K.L. Theory of the use of arteriovenous concentration differences for measuring metabolism in steady and non-steady states. *J. Clin. Invest.*, 1961, 40(12): 2111-2125.

Приложение

Таблица III. Нормально распределенные случайные числа ($M = 0$; $\sigma=1$) (Большов, Смирнов, 1968).

0,464	0,137	2,455	-0,323	-0,068	0,296	-0,288	1,298	0,241	-0,957
0,060	-2,526	-0,531	-0,194	0,543	-1,558	0,187	-1,190	0,022	0,525
1,486	-0,354	-0,634	0,697	0,926	1,375	0,785	-0,963	-0,853	-1,865
1,022	-0,472	1,279	3,521	0,571	-1,851	0,194	1,192	-0,501	-0,273
1,394	-0,555	0,046	0,321	2,945	1,974	-0,258	0,412	0,439	-0,035
0,906	-0,513	-0,525	0,595	0,881	-0,934	1,579	0,161	-1,885	0,371
1,179	-1,055	0,007	0,769	0,971	0,712	1,090	-0,631	-0,255	-0,702
-1,501	-0,488	-0,162	-0,136	1,033	0,203	0,448	0,748	-0,423	-0,432
-0,690	0,756	-1,618	-0,345	-0,511	-2,051	-0,457	-0,218	0,857	-0,465
1,372	0,225	0,378	0,761	0,181	-0,736	0,960	-1,530	-0,260	0,120
-0,482	1,678	-0,057	-1,229	-0,486	0,856	-0,491	-1,983	-2,830	-0,238
-1,376	-0,150	1,356	-0,561	-0,256	-0,212	0,219	0,779	0,953	-0,869
-1,010	0,598	-0,918	1,598	0,065	0,415	-0,169	0,313	-0,973	-1,016
-0,005	-0,899	0,012	-0,725	1,147	-0,121	1,096	0,181	-1,691	0,417
1,393	-1,163	-0,911	1,231	-0,199	-0,246	1,239	-2,574	-0,558	0,056
-1,787	-0,251	1,237	1,046	-0,508	-1,630	-0,146	-0,392	-0,627	0,561
-0,105	-0,357	-1,384	0,360	-0,992	-0,116	-1,698	-2,832	-1,108	-2,357
-1,339	1,827	-0,959	0,424	0,969	-1,141	-1,041	0,362	-1,726	1,956
1,041	0,535	1,731	1,377	0,983	-1,330	1,620	-1,040	0,524	-0,281
0,279	-2,056	0,717	-0,873	-1,096	-1,396	1,047	0,089	-0,573	0,932
-1,805	-2,008	-1,633	0,542	0,250	-0,166	0,032	0,079	0,471	-1,029
-1,186	1,180	1,114	0,882	1,265	-0,202	0,151	-0,376	-0,310	0,479
0,658	-1,141	1,151	-1,210	-0,927	0,425	0,290	-0,902	0,610	2,709
-0,439	0,358	-1,939	0,891	-0,227	0,602	0,873	-0,437	-0,220	-0,057
-1,399	-0,230	0,385	-0,649	-0,577	0,237	-0,289	0,513	0,738	-0,300
0,199	0,208	-1,081	-0,219	-0,291	1,221	1,119	0,004	-2,015	-0,594
0,159	0,272	-0,313	0,084	-2,828	-0,439	-0,792	-1,275	-0,623	-1,047
2,273	0,606	0,606	-0,747	0,247	1,291	0,063	-1,793	-0,699	-1,347
0,041	-0,307	0,121	0,790	-0,584	0,541	0,484	-0,986	0,481	0,996
-1,132	-2,098	0,921	0,145	0,446	-1,661	1,045	-1,363	-0,586	-1,023
0,768	0,079	-1,473	0,034	-2,127	0,665	0,084	-0,880	-0,579	0,551
0,375	-1,658	-0,851	0,234	-0,656	0,340	-0,086	-0,158	-0,120	0,418
-0,513	-0,344	0,210	-0,736	1,041	0,008	0,427	-0,831	0,191	0,074
0,292	-0,521	1,266	-1,206	-0,899	0,110	-0,528	-0,813	0,071	0,524
1,026	2,990	-0,574	-0,491	-1,114	1,297	-1,433	-1,345	-3,001	0,479
-1,334	1,278	-0,568	-0,109	-0,515	-0,566	2,923	0,500	0,359	0,326
-0,287	-0,144	-0,254	0,574	-0,451	-1,181	-1,190	-0,318	-0,094	1,14
0,161	-0,886	-0,921	-0,509	1,410	-0,518	0,192	-0,432	1,501	1,068
-1,346	0,193	-1,202	0,394	-1,045	0,843	0,942	1,045	0,031	0,772
1,250	-0,199	-0,288	1,810	1,378	0,584	1,216	0,733	0,402	0,226

Таблица П2. Моделирование зависимости венозной концентрации, A-B разницы и поглощения метаболита органом от артериальной концентрации с использованием метода статистических испытаний (метод Монте-Карло).

	zi	Ca		zi	Cv	
$3 \pm 0,3*zi$	1	-0,041	2,988	$2 \pm 0,2*zi$	-0,135	1,973
	2	0,884	3,265		0,031	2,006
	3	-0,199	2,940		0,402	2,080
	4	-1,33	2,601		0,884	2,177
	5	-0,035	2,990		0,457	2,091
	6	1,807	3,542		-0,798	1,840
	7	-2,141	2,358		-0,768	1,846
	8	-1,452	2,564		0,023	2,005
	9	0,267	3,080		1,046	2,209
	10	1,121	3,336		0,36	2,072
	11	0,345	3,104		0,424	2,085
	12	-0,792	2,762		1,377	2,275
$2 \pm 0,2*zi$	13	-0,484	1,903	$1,33 \pm 0,2$	-0,873	1,155
	14	1,429	2,286		-0,43	1,244
	15	0,525	2,105		-1,42	1,046
	16	-0,025	1,995		0,3	1,390
	17	-0,255	1,949		0,388	1,408
	18	0,489	2,098		1,009	1,532
	19	1,033	2,207		-1,765	0,977
	20	-0,452	1,910		-0,77	1,176
	21	0,397	2,079		0,723	1,475
	22	-0,857	1,829		-0,73	1,184
	23	1,047	2,209		0,685	1,467
	24	0,162	2,032		0,937	1,517
$2,5 \pm 0,25*zi$	25	-1,132	2,217	$1,66 \pm 0,2$	0	1,660
	26	-0,121	2,470		-1,462	1,368
	27	-0,157	2,461		-1,039	1,452
	28	-0,432	2,392		-1,029	1,454
	29	2,504	3,126		-0,376	1,585
	30	0,276	2,569		-0,265	1,607
	31	0,379	2,595		0,803	1,821
	32	-0,066	2,484		0,835	1,827
	33	0,489	2,622		-1,161	1,428
	34	-1,054	2,237		-0,218	1,616
	35	-1,114	2,222		0,013	1,663
	36	0,359	2,590		-0,154	1,629

Продолжение таблицы П2

	zi	Q	Ca-Cv	P	E	T
1	-1,105	4,45	1,015	4,51	0,340	2,287
2	0,69	5,35	1,259	6,73	0,386	3,354
3	0,646	5,32	0,860	4,58	0,292	2,200
4	-0,418	4,79	0,424	2,03	0,163	0,934
5	1,122	5,56	0,898	4,99	0,300	2,388
6	-0,514	4,74	1,702	8,07	0,480	4,386
7	-0,171	4,91	0,511	2,51	0,217	1,361
8	0,813	5,41	0,560	3,03	0,218	1,510
9	0,222	5,11	0,871	4,45	0,283	2,015
10	-1,425	4,29	1,264	5,42	0,379	2,616
11	-1,158	4,42	1,019	4,50	0,328	2,160
12	0,891	5,45	0,487	2,65	0,176	1,165
13	1,484	5,74	0,748	4,29	0,393	3,716
14	-1,165	4,42	1,042	4,60	0,456	3,699
15	0,15	5,08	1,059	5,37	0,503	5,138
16	-0,7	4,65	0,605	2,81	0,303	2,024
17	0,083	5,04	0,541	2,73	0,278	1,939
18	0,41	5,21	0,566	2,95	0,270	1,923
19	-2,266	3,87	1,230	4,75	0,557	4,867
20	-0,352	4,82	0,734	3,54	0,384	3,009
21	1,583	5,79	0,605	3,50	0,291	2,375
22	0,127	5,06	0,645	3,26	0,353	2,757
23	2,285	6,14	0,742	4,56	0,336	3,109
24	-1,076	4,46	0,515	2,30	0,253	1,514
25	0,248	5,12	0,557	2,85	0,251	1,719
26	2,431	6,22	1,102	6,85	0,446	5,009
27	-0,785	4,61	1,009	4,65	0,410	3,200
28	0,459	5,23	0,938	4,90	0,392	3,372
29	2,272	6,14	1,541	9,46	0,493	5,967
30	-2,38	3,81	0,962	3,67	0,374	2,281
31	3,486	6,74	0,774	5,22	0,298	2,867
32	0,132	5,07	0,657	3,33	0,264	1,820
33	-0,522	4,74	1,194	5,66	0,456	3,964
34	0,818	5,41	0,620	3,35	0,277	2,075
35	-1,244	4,38	0,559	2,45	0,252	1,472
36	-1,284	4,36	0,961	4,19	0,371	2,569

Таблица ПЗ. Структура размещения записей в базе данных по метаболизму молочной железы(в системе Microsoft Excel)

Название книги	№ листа	Содержание листа		
2002 азот	1	Альфа-аминоазот	депривация	предварительный период
	2	Альфа-аминоазот	депривация	лишение концентратов
	3	Альфа-аминоазот	депривация	возобновление кормления
	4	«	«	динамика и корреляции
	5	«	«	графики зависимостей
	6	«	«	корреляции
2002 КТ	7	«	«	исходные данные
	1	БОБ	депривация	предварительный период
	2	БОБ	депривация	лишение концентратов
	3	БОБ	депривация	возобновление кормления
	4	«	«	динамика и корреляции
	5	«	«	средние данные в динамике
	6	«	«	корреляции
	7	«	«	первичные данные
2002 глюкоза	8	«	«	первичные и сводные данные
	1	Глюкоза	депривация	предварительный период
	2	Глюкоза	депривация	лишение концентратов
	3	Глюкоза	депривация	возобновление кормления
	4	«	«	динамика и корреляции
	5	«	«	средние данные в динамике
	6	«	«	корреляции
	7	«	«	первичные данные
Акт транс	8	«	«	первичные и сводные данные
	1	Cant 2003	инфузии	аминокислот
	2		Metcalf 1994	
	3	Mackle 2000	кормленческий опыт	
	4	Rulquin 2000	гистидин дуоденум	
2004 козы	5	Bequette 2000	C ¹³	
	1		Исходные данные	
	2		Расчет Т	
2005 козы	3		Диаграммы	
			опыт с нагрузкой инсулином и глюкозой	

Таблица П5. Форматы представления результатов измерений в базе данных по метаболизму молочной железы (альфа-аминный азот, динамика и корреляции)

Депривация 2002										
Динамика и корреляции		альфа аминокотот мг/л								
	Q	P	T	1/(1+Q/T)	1/(1+T/Q)	A	B	A-B	E	
предв 7	4,053	45,391	1,047	0,205	0,795	54,53	43,33	11,20	0,205	
	2,720	27,200	0,716	0,208	0,792	48,00	38,00	10,00	0,208	
	2,543	30,179	0,661	0,206	0,794	57,50	45,63	11,87	0,206	
	11	4,379	50,653	1,187	0,213	0,787	54,23	42,67	11,57	0,213
		2,802	30,537	0,731	0,207	0,793	52,67	41,77	10,90	0,207
		2,829	35,831	0,769	0,214	0,786	59,23	46,57	12,67	0,214
	16	3,590	45,478	0,907	0,202	0,798	62,83	50,17	12,67	0,202
		2,856	28,560	0,732	0,204	0,796	49,00	39,00	10,00	0,204
		2,774	30,518	0,678	0,196	0,804	56,00	45,00	11,00	0,196
депр 7	3,427	40,441	1,042	0,233	0,767	50,60	38,80	11,80	0,233	
	2,258	27,091	0,583	0,205	0,795	58,50	46,50	12,00	0,205	
	2,285	31,073	0,701	0,235	0,765	57,90	44,30	13,60	0,235	
	11	2,598	33,769	0,866	0,250	0,750	52,00	39,00	13,00	0,250
		1,958	21,542	0,539	0,216	0,784	51,00	40,00	11,00	0,216
		2,149	27,290	0,686	0,242	0,758	52,50	39,80	12,70	0,242
	16	1,442	20,327	0,496	0,256	0,744	55,10	41,00	14,10	0,256
		1,714	18,678	0,466	0,214	0,786	51,00	40,10	10,90	0,214
		1,520	18,240	0,468	0,235	0,765	51,00	39,00	12,00	0,235
возобн 7	2,149	25,356	0,527	0,197	0,803	59,90	48,10	11,80	0,197	
	2,054	19,509	0,438	0,176	0,824	54,00	44,50	9,50	0,176	
	2,203	23,795	0,567	0,205	0,795	52,80	42,00	10,80	0,205	
	11	3,604	43,608	0,823	0,186	0,814	65,10	53,00	12,10	0,186
		2,747	28,846	0,589	0,176	0,824	59,50	49,00	10,50	0,176
		2,951	30,397	0,596	0,168	0,832	61,30	51,00	10,30	0,168
	16	3,754	45,043	0,850	0,185	0,815	65,00	53,00	12,00	0,185
		2,720	24,480	0,569	0,173	0,827	52,00	43,00	9,00	0,173
		2,774	36,067	0,767	0,217	0,783	60,00	47,00	13,00	0,217

Таблица П8. Формат реестра опытов, занесенных в базу данных по обмену энергии у коров

п/п	Код опыта	Коды файлов (книг)	1. Учреждение. Лаборатория. Исполнитель. № журнала Страницы. Дата проведения опыта. 2. Иной источник	Общая характеристика: Место проведения. Животные. Количество групп (периодов). Физиологическое состояние. Условия кормления.
1	БД-ОП1	БД-ОП1-Ж1	ВНИИФБиП с.-х. животных. Лаборатория энергетического питания. Решетов В.Б. Журнал № 3. Листы 1-10. (12.04-17.04)1983 .	Научно-производственный опыт. Колхоз им. Горького Малоярославецкого района Калужской области. Лактирующие коровы холмогорской породы. 3 группы (I, IV, II). Различия в кормлении: разная распадаемость сырого протеина комбикорма вследствие подбора нативных компонентов (I, IV) и обработки комбикорма формалином (II).
		БД-ОП1-Ж2		
		БД-ОП1-Ж3		
		БД-ОП1-Ж4		
		БД-ОП1-Ж5		
		БД-ОП1-Ж6		
		БД-ОП1-Ж7		
		БД-ОП1-Ж8		
		БД-ОП1-Ж9		
2	БД-ОП2	БД-ОП2-Ж1	ВНИИФБиП с.-х. животных. Лаборатория энергетического питания. Решетов В.Б. Журнал № 3. Листы 10-16. (27.04-29.04)1983 г.	Виварий ВНИИФБиП. 2 лактирующие коровы чернопестрой породы с фистулой рубца и анастомозом 12-перстной кишки. 3 периода. Различия в кормлении: различная распадаемость сырого протеина высокопротеинового компонента комбикорма (нативный подсолнечниковый шрот, соевый шрот и обработанный формальдегидом подсолнечниковый шрот).
		БД-ОП2-Ж2		
		БД-ОП2-Ж3		
		БД-ОП2-Ж4		
		БД-ОП2-Ж5		
		БД-ОП2-Ж6		

Таблица П10. Стационарные значения метаболических потоков (скорости образования и расхода метаболитов, моль/сутки) в организме у коров с суточным удоем 22 и 12 кг (прогноз по модели)

	Расшифровка обозначения	Суточный удой, кг	
		22	12
P1	Образование триацилглицеролов в жировых депо		
	из жирных кислот	1,43	1,59
P2	« « из ацетата	0,365	0,387
P3	Образование жирных кислот при липолизе в жировых депо	8,45	7,16
P4	Образование ацетата при катаболизме аминокислот	1,34	1,00
P5	Образование аминокислот в процессе протеолиза в мышцах	2,26	1,65
P6	« « « во внутренних органах	2,02	1,48
P7	Образование мочевины, сопряженное с глюконеогенезом из аминокислот	1,39	1,03
P8	Синтез белков в скелетных мышцах (моль аминокислот/сут)	3,77	6,11
P9	« « во внутренних органах	2,97	3,37
P10	Образование глюкозы из пропионата	8,67	8,67
P11	« « из лактата	2,43	2,46
P12	« « из глицерола	1,81	1,42
P13	« « из аминокислот	1,05	0,784
P14	Образование триозофосфатов в жировых депо в процессе гликолиза	7,98	8,63
P15	« « « в реакциях ПФ-шунта	1,55	1,18
P16	« во внутренних органах при гликолизе	0,668	0,723
P17	« « « в реакциях ПФ-шунта	0,575	0,256
P18	Образование лактата в жировых депо из триозофосфатов	7,73	7,84
P19	« « в мышцах из глюкозы	0,432	0,455
P20	Поток лактата во внутренние органы из жировой ткани	4,61	4,67
P28	Образование АТФ при окислении лактата в мышцах	1,91	2,02
P29	« « « глюкозы в мышцах	1,73	1,82
P30	« « в реакции триозофосфаты – лактат в жировых депо	15,5	15,7
P31	« « при окислении лактата в жировой ткани	31,5	31,9
P32	« « « бутирата	182,7	182,7
P33	« « « пропионата	35,6	35,6
P34	« « « триозофосфатов во внутренних органах	5,99	8,90
P35	« « в реакции глицерол - глюкоза	7,25	5,68
P36	Образование CO ₂ при окислении лактата в мышцах	0,319	0,336
P37	« « « в жировой ткани	5,24	5,32
P38	« в реакциях ПФ-шунта в жировой ткани	4,65	3,55
P40	« при окислении триозофосфатов во внутренних органах	0,898	1,33
P41	« при окислении пропионата	5,78	5,78
P42	« « бутирата	29,2	29,2
P43	« « ацетата	78,3	79,0
P44	« « высших жирных кислот	46,2	35,3
P45	« « глюкозы	29,5	44,4
P46	Экономия кислорода за счет генерации НАДФН при окислении изоцитрата	1,72	2,61
P48	Образование мочевины из всосавшегося аммиака	1,5	1,5
P51	Общее образование CO ₂	201,9	205,0
P52	Суммарное потребление кислорода	215,6	217,5
U1	Расход жирных кислот на липогенез в жировой ткани	4,29	4,76
U3	« триацилглицеролов при липолизе в жировой ткани«	2,82	2,39

Продолжение табл. П10

U5	Расход жирных кислот на окисление до CO ₂	2,89	2,21
U6	« кислорода на окисление жирных кислот	66,5	50,8
U7	« аминокислот на глюконеогенез	2,28	1,67
U9	« ацетата на окисление до CO ₂	39,1	39,5
U10	« кислорода на окисление ацетата	78,3	79,0
U11	« бутирата на окисление до CO ₂	7,31	7,31
U12	Распад белков в мышцах (моль аминокислот/сут)	2,26	1,65
U13	« « во внутренних органах	2,02	1,48
U14	Расход аминокислот на синтез белков в мышцах	3,77	6,11
U15	« « « во внутренних органах	2,96	3,37
U17	Превращение пропионата в глюкозу	17,3	17,3
U18	« лактата в глюкозу	4,85	4,93
U19	« глицерола в глюкозу	3,62	2,83
U21	Расход глюкозы на образование лактата в мышцах	0,865	0,911
U22	« « на гликолиз в жировой ткани	3,99	4,32
U23	« « « во внутренних органах	0,334	0,361
U24	Расход глюкозы на образование НАДФН в жировых депо	1,55	1,18
U26	« « на окисление до CO ₂	4,92	7,40
U27	« кислорода на окисление глюкозы	29,5	44,4
U28	Превращение триозофосфатов в лактат в жировой ткани	7,73	7,84
U29	Расход триозофосфатов на липогенез в жировой ткани из ацетата	0,365	0,387
U30	« « « из жирных кислот	1,43	1,59
U31	« « на окисление во внутренних органах	0,299	0,445
U34	« на окисление в жировой ткани	1,75	1,77
U36	Расход лактата на окисление в мышцах	0,106	0,112
U37	Поток лактата во внутренние органы из мышц	0,326	0,343
U38	Окисление пропионата до CO ₂	1,93	1,93
U39	Расход АТФ на поддержание в мышцах	149,6	150,7
U40	« на синтез белков в мышцах	18,9	30,6
U41	« на поддержание в жировой ткани	19,5	19,8
U42	« на образование НАДФН в жировой ткани в реакциях ПФ-шунта	1,55	1,18
U43	« « триозофосфатов в жировой ткани	7,97	8,63
U44	« на этерификацию жирных кислот в жировой ткани	12,9	14,3
U45	« на синтез триацилглицеролов из ацетата «	43,2	54,1
U46	« на поддержание во внутренних органах	141,4	142,8
U50	« на синтез белков молока в молочной железе	33,6	17,0
U54	« « глюкозы из лактата	9,71	9,86
U55	« « глюкозы из пропионата	34,7	34,7
U56	« на всасывание глюкозы	4,48	4,48
U57	« « аминокислот	11,4	11,4
U61	Расход кислорода на окисление лактата в мышцах	0,319	0,336
U62	« « « в жировой ткани	5,24	5,32
U63	« « « триозофосфатов во внутренних органах	0,898	1,33
U64	« « « пропионата	6,74	6,74
U65	« « « батирата	21,4	23,8
U66	Поток мочевины в ЖКТ	0,180	0,158
U67	Выведение мочевины с мочой	2,70	2,37
	Общий дыхательный коэффициент	0,94	0,94
	Баланс энергии (МД/сут)	- 16,1	8,33
	Энергия молока (Мдж/сут)	64,5	35,1
	Теплопродукция «	95	100

**Система комплексной оценки состояния обменных процессов у
лактующих животных на основе построения моделей биокинетики и баз данных**

Г.Г. Черепанов, З.Н. Макара, В.Д. Решетов

Монография. Боровск, ВНИИФБиП, 2007, 85с

*Утверждено к печати Ученым советом ВНИИ физиологии,
биохимии и питания с.-х. животных.*

Компьютерная верстка Л.Л. Полякова
Полиграфическое исполнение А.В. Бочаров

Издательство ВНИИ физиологии, биохимии и питания
сельскохозяйственных животных.

Формат 70x100/16 Объем 7,0 п. л. Тираж 100 экз.

249013 Калужская обл., г. Боровск, ВНИИФБиП с.-х. животных
тел. 996-34-15