

УДК 612.664.3:611.64.018:576.3

СУБСТРАТНЫЙ ГОМЕОСТАЗ СЕКРЕТОРНЫХ КЛЕТОК И ЕГО РОЛЬ В ЛИМИТИРОВАНИИ БИОСИНТЕЗА В МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ

Черепанов Г.Г., Макар З.Н.

Институт физиологии, биохимии и питания с.-х. животных РАСХН, Боровск, Россия

Скорость молокообразования зависит от количества секреторных клеток 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 в самой секреторной клетке и тем самым - на эффективность биосинтеза. Поэтому в последние годы ставится задача разработать системную теорию формирования субстратного баланса и биосинтеза компонентов молока в клетках молочной железы, в которой должны быть интегрированы результаты исследований в области изучения микроциркуляции, транспорта метаболитов, синтеза компонентов молока, формирования секрета железы (Baldwin et al., 1987; Cant, McBride, 1995; Cherepanov et al., 2000; Hanigan et al., 2001, 2002). Клетки однослойного эпителия альвеол молочной железы в рамках такой обобщенной теории можно рассматривать как биореактор, выполненный в виде тонкой пленки, непрерывно поглощающей субстраты из межклеточной среды на базальной стороне и выделяющий продукты синтеза на апикальной стороне клеточного слоя (рис. 1).

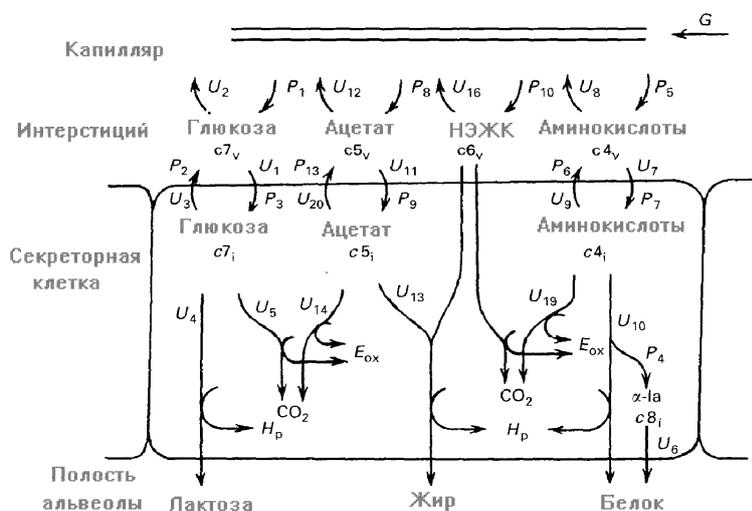


Рис. 1. Схема использования субстратов в лактирующей молочной железе

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 уравновешиванием системы метаболических потоков. Теоретически

из этого следует одно важное свойство - эффект кооперативности, когда темп утилизации каждого субстрата зависит от уровня и соотношения других субстратов. В физиологическом эксперименте этот феномен практически невозможно изучить «в чистом виде», вследствие этого разброс точек относят за счет анонимной «биологической вариабельности», но если имеется системная модель, то в компьютерном эксперименте при вариациях отдельных параметров эти эффекты могут быть выявлены и исследованы.

Результаты теоретических исследований, проведенных в последние годы, дают основание предполагать, что механизмы субстратного лимитирования молокообразования имеют количественную природу, поэтому необходимо количественное описание динамики целостной метаболической системы клетки. Определенный опыт в этом направлении имеется, в частности, в технической микробиологии, хотя уровень знаний, в том числе по кинетическим характеристикам ферментов, у прокариот и эукариот пока несопоставим. Причина этого в том, что ключевые ферменты лактопоза часто связаны с мембранами и чувствительны к микроокружению, поэтому в литературе имеется мало информации о численных значениях параметров в интактной секреторной клетке. Измерение активности ферментов в гомогенатах ткани не информативно для этих целей. В физиологическом опыте обычно измеряют кровоток, состав крови и артерио-венозную разницу концентраций. Применение изотопных индикаторов может быть более эффективным подходом, но, помимо дороговизны метода, он дает лишь «моментальный снимок» метаболической ситуации в одном конкретном случае. Цитофизиологические и биохимические исследования дали очень много для расшифровки молекулярно-структурных деталей лактопоза, но не для понимания функционирования целостной системы. Поэтому прогресс в понимании механизмов субстратного лимитирования биосинтеза очень медленный.

Так, со времени открытия лактогенного действия вытяжки из гипофиза прошло 70 лет, действующий фактор идентифицирован и клонирован, однако природа физиологического эффекта соматотропина (помимо констатации увеличенного органного кровотока) до сих пор недостаточно ясна. Если обычные методы не работают, то нужен определенный поворот в методологии, «смена ракурса». Поэтому в последние годы получает распространение новый подход, сочетающий физиологический эксперимент с использованием методов биокинетики, баз данных и компьютерного моделирования.

В нормальных физиологических условиях, при отсутствии стресса и регулярном опорожнении молоковыводящей системы, темп секреции молока в альвеолах определяется числом активно функционирующих клеток, кровотоком, уровнем субстратов в крови, удельной мощностью систем транспорта и ключевых ферментов биосинтеза. В свое время была открыта и изучалась система ауторегуляции, «срабатывающая» при задержке опорожнения вымени. В последние годы накапливаются данные о другой автономной системе, которая в нормальном состоянии «отслеживает» баланс между поступлением субстратов из крови и темпом макромолекулярных синтезов (рис. 2). Предполагают, что эта система действует по принципу поддержания баланса энергии, т.е. уравнивания энергозатрат на синтез компонентов молока с поступлением энергетических субстратов из крови. При отрицательном балансе происходит сдвиг макроэргов в сторону накопления АМФ и аденозина, а диффундирующий из клетки аденозин или функционально связанные с ним медиаторы оказывают вазодилаторное действие, компенсируя недостаток энергии (Davis, Collier, 1985; Prosser et al., 1990; Cant, McBride, 1995; Cherepanov et al., 2000; Капилевич и др., 2001; Медведева и др., 2001; Черепанов, Макап, 2004).

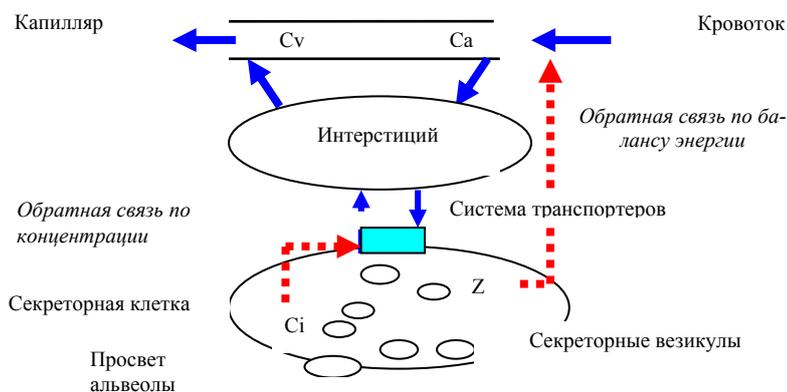


Рис. 2. Схема сопряженной регуляции органного кровотока и метаболизма секреторных клеток молочной железы

При избыточном поступлении энергетических субстратов согласно этой схеме следует ожидать снижения органного кровотока, что и наблюдается в опытах, особенно при краткосрочных инфузиях энергетических субстратов, когда эффект еще «не смазывается» адаптивными сдвигами. Так, при введении глюкозы в течение нескольких часов в питающую артерию снижается кровоток в ипсилатеральной половине вымени (Cant et al., 2002), хотя при длительных инфузиях в дуоденум кровоток через вымя может увеличиваться в связи с адаптивными сдвигами в параметрах обмена.

В эксперименте с функциональными нагрузками варьируют концентрацию, регистрируют скорость использования субстрата органом, кровоток в питающей артерии, выход продуктов синтеза с молоком. С помощью специально разработанных методик проводится идентификация, т.е. косвенное измерение внутренних параметров, в том числе активности транспорта субстратов в секреторную клетку, максимальных скоростей и текущих потоков путем сопоставления данных опыта и прогноза по модели. Такой анализ известен как решение обратной задачи кинетики: по известному поведению системы найти неизвестные численные значения внутренних параметров, обеспечивающие наилучшее соответствие прогнозируемых и фактических результатов измерений.

С использованием этих новых подходов мы показали, что активность транспорта аминокислот и других метаболитов в клетку может регулироваться самой клеткой в зависимости от обеспеченности субстратами и потребности в них для биосинтеза компонентов молока (Черепанов, Макар, 2005). Так, при инфузии в дуоденум индивидуальных аминокислот активность транспорта этой аминокислоты в секреторные клетки снижается, в то время как общее поглощение остается практически неизменным или увеличивается незначительно (рис. 3).

Таким образом, результаты наших исследований и данные литературы дают основание заключить, что система субстратного гомеостаза секреторных клеток молочной железы характеризуется двумя важными свойствами: 1) эффектом кооперативности (зависимостью эффектов лимитирования от уровня и соотношения комплекса субстратов) и 2) способностью к адаптивным сдвигам метаболических параметров, в том числе активности транспорта субстратов в клетку при изменениях в состоянии питания. Кроме того, выяснилось, что в наши представления о лимитирующих факторах нужно вносить определенные коррективы, поскольку месторасположение узкого звена может мигрировать в зависимости от уровня и соотношения параметров и концентраций.

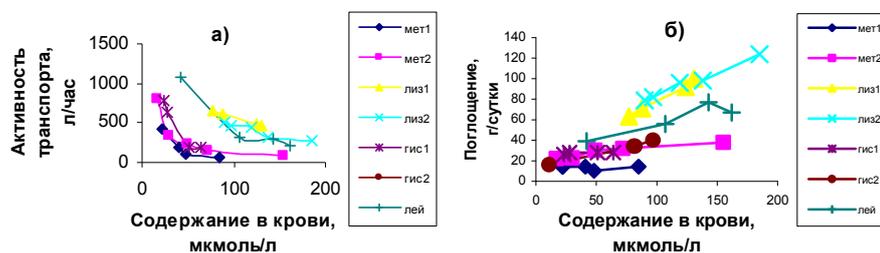


Рис. 3. Активность транспорта и поглощение аминокислот в молочной железе коров при поструминальных инфузиях индивидуальных аминокислот (Черепанов, Макар, 2005)

Регистрируемая в физиологическом опыте скорость поглощения субстрата (и, соответственно, скорость молокообразования) зависит в основном от трех факторов: 1) от темпа «доставки» субстрата к органу (т.е. величины произведения концентрации на кровотоке, определяющий концентрацию в межклеточной среде); 2) от параметров «мощности» транспортных и анаболических процессов (т.е. от количества молекул мембранных транспортеров и ферментов); 3) от соотношения локальных внутриклеточных концентраций и точек полунасыщения ферментов (их аффинитета). Если увеличить только концентрацию субстрата в артериальной крови или кровотоке, то скорость молокообразования в принципе может увеличиться только за счет сдвигов концентрации в межклеточной среде и внутри клетки. Если же при этом происходит индукция синтеза белков-транспортеров и ферментов – это другой аспект функциональной активности, связанный с проявлением деятельности внутриклеточной системы субстратного гомеостаза. Для того, чтобы выяснить, какие именно механизмы регуляции действуют при сдвигах в состоянии питания, были проведены специальные исследования.

Было проведено несколько серий физиологических опытов, результаты которых были интерпретированы с использованием имитационной компьютерной модели. В целом в результате синтеза теории и экспериментальных данных мы получили достаточно согласованную картину системной реакции органа на разные экспериментальные воздействия.

Так, в ходе опыта с 24-часовой отменой концентратов у коров установили, что первой во времени и, по-видимому, лимитирующей реакцией было снижение органного кровотока, через 6-8 часов происходили адаптивные сдвиги в активности транспорта субстратов внутрь клеток (Макар и др., 2003) (рис. 4) и после этого субстратный гомеостаз, по-видимому, осуществлялся по критерию поддержания энергетического баланса.

В опыте на козах после 26-часового голодания внутривенная 6-часовая инфузия глюкозы приводила к восстановлению молокообразования, тогда как при инфузии смеси аминокислот продуктивный эффект отсутствовал, хотя кровоток в обоих случаях увеличивался одинаково. Когда в компьютерную модель мы ввели данные по кровотоку, активности транспорта и уровню субстратов в артериальной крови, то получили такую же реакцию по скорости молокообразования, как и в опыте. Это говорит о том, что модель работает, хотя словами объяснить, в чем именно состоит причина наблюдаемого эффекта, трудно. Мы предполагаем, что причина может быть в определенном соотношении внутриклеточных концентраций и точек полунасыщения в системах синтеза молочного белка и лактозы по субстратам и регуляторным факторам (α -лактальбумину).

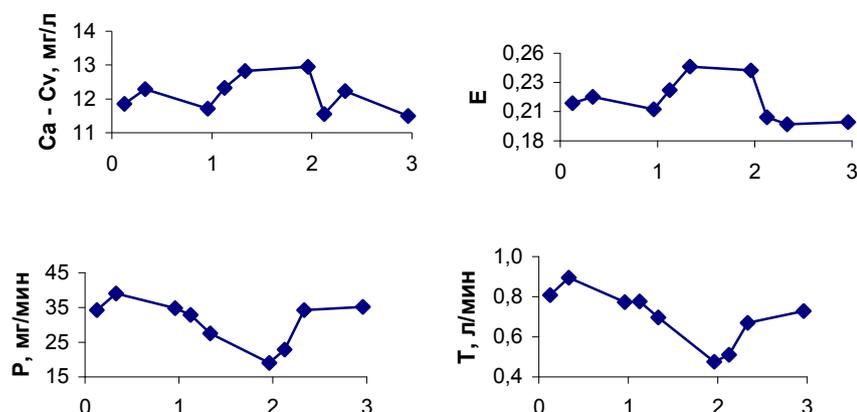


Рис. 4. Динамика показателей артерио-венозного баланса α -аминного азота в молочной железе коров по периодам опыта (сутки): (0 – 1), предварительный период; (1 – 2), депривация концентрации; (2 – 3), восстановления кормления; Ca - Cv – артерио-венозная разница; E – коэффициент извлечения из крови; P – поглощение в органе; T – активность транспорта в клетки (Макар и др., 2003)

Возможный механизм лимитирования удоя глюкозой мы исследовали также путем сопоставления теоретического прогноза с данными опыта, проведенного на коровах, которые в течение 6 суток получали рацион с 40%-ным дефицитом по обменной энергии (Черепанов и др., 1999). В области низких значений внутриклеточной концентрации глюкозы (глюкозы молока) при недокорме наблюдались пропорционально низким значениям удоя, тогда как в физиологически нормальной области (3,5–6 мг%) вариации внутриклеточной глюкозы не сказывались на удое. Компьютерный прогноз воспроизводил наблюдаемую динамику, если учитывалась зависимость активности синтетазы лактозы от концентрации глюкозы и α -альбумина. Если же на модели «отключали» регуляторное влияние α -альбумина, прогнозная кривая резко отличалась от фактической (рис. 5).

Синтетаза лактозы – это трехсубстратный фермент с очень сложными кинетическими характеристиками, тем не менее адаптированные нами и включенные в модель уравнения прогнозируют выход реакции, аналогичный данным прямым измерениям, проведенным на выделенных из молока препаратах фермента (рис. 6).

Роль гормональных факторов в формировании субстратного баланса секреторных клеток мало изучена. Ранее было распространено представление о том, что инсулин влияет на молокообразование косвенно путем перераспределения энергетических субстратов между молочной железой и жировыми депо тела (Tesseraud et al., 1992; Tucker, 2000). В наших исследованиях, проведенных на козах, введение инсулина в условиях поддержания нормогликемии оказало стимулирующее влияние на уровень кровоснабжения молочной железы, скорость молокообразования и продукцию молочного белка (Макар и др., 2006). Поскольку в условиях опыта кровотоки были существенно выше, чем в контроле, продуктивный ответ мог быть обусловлен лучшей обеспеченностью субстратами систем синтеза белка и лактозы.

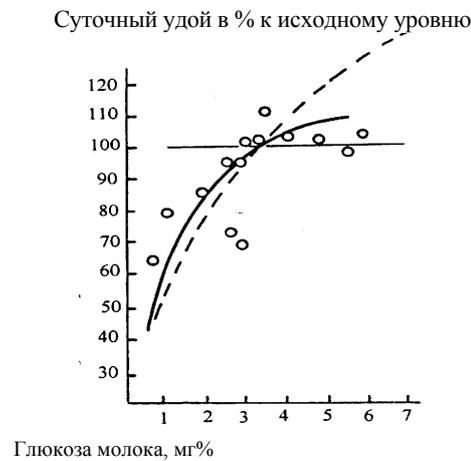


Рис. 5. Полученная в опыте и предсказанная на модели (сплошная линия) зависимость суточного удоя от внутриклеточной концентрации глюкозы (глюкозы молока). Пунктир - теоретическая зависимость без учета влияния α -лактальбумина при значении K_m для галактозилтрансферазы по глюкозе 0,2 мМ.

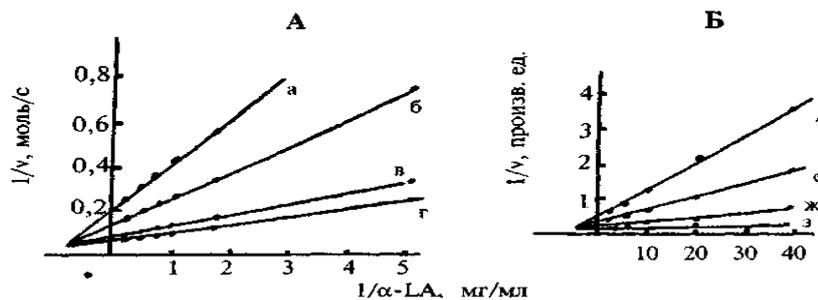


Рис. 6. Зависимость (в обратных величинах) скорости образования лактозы от концентрации α -лактальбумина при концентрации глюкозы от 0,05 мМ (а,д) до 20 мМ (г,з). А. Данные по модели при K_m для галактозилтрансферазы по глюкозе - 0,2 мМ. Б. Опытные данные для частично очищенного препарата синтетазы лактозы, выделенной из молока (Hill, Brew, 1975)

Однако результаты модельных расчетов показали, что сдвиги в продуктивных показателях нельзя объяснить только изменениями в составе крови и величине плазматока. Анализ данных измерений показал, что в период опытной инфузии увеличивалась активность транспорта аминокислот и глюкозы в клетки, а этот показатель обычно связан с числом молекул транспортеров в плазматической мембране клеток. При сопоставлении активности транспорта аминокислот со скоростью продукции молочного белка по объединенным данным была выявлена тесная корреляция активности транспорта с продукцией белка ($r = 0.8$, $P = 0.001$), тогда как эффективность извлечения аминокислот из крови не коррелировала с продукцией белка (рис. 7).

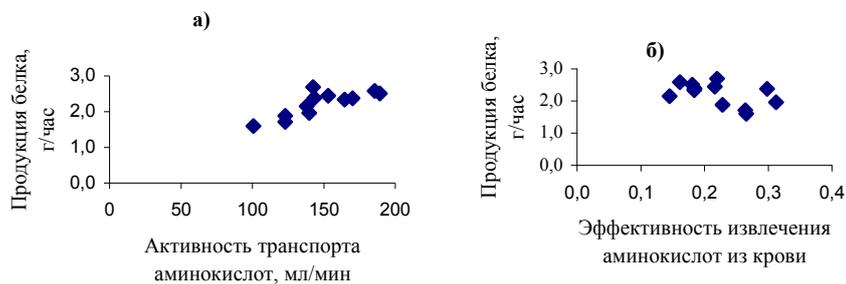


Рис. 7. Взаимосвязь скорости продукции молочного белка с активностью транспорта аминокислот в клетки молочной железы и эффективностью извлечения их из крови у коз (Макар и др., 2006)

Таким образом, помимо общих нейро-эндокринных влияний и вариаций субстратного фонда крови, при воздействии факторов питания на функциональную активность молочных желез существенное значение имеют адаптивные изменения метаболизма секреторных клеток, имеющие характер ауторегуляций, а также сдвиги в уровне кровоснабжения, зависящие от регионального сосудистого сопротивления. Местные факторы регуляции могут оказывать влияние на распределение субстратных потоков и эффективность процессов биосинтеза в самой секреторной клетке. Темпы использования разных субстратов в молочной железе не являются независимыми, так как они взаимосвязаны через скорость кровотока и общие кофакторы. Поэтому потребность в отдельных субстратах на молокообразование, по-видимому, не есть величина постоянная, но она может модифицироваться в зависимости от уровня и соотношения других нутриентов. Помимо средней тенденции, выраженной в потребности, вероятно, существует много «точек выброса», в которых можно получить продуктивный эффект при другом соотношении и уровне нутриентов.

В целом мы полагаем, что при исследовании процессов молокообразования и в более общем плане - вообще физиологической регуляции биосинтеза необходимо стимулировать развитие и применение современных методов интегративной количественной физиологии. В сочетании с техникой физиологического эксперимента они могут поднять решение проблем биосинтеза на качественно новый уровень как в плане развития теории, так и в прикладном аспекте.

ЛИТЕРАТУРА

1. Капилевич Л.В., Носарев А.В., Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Дьякова Е.Ю., Медведев М.А. Физиологические особенности гладких мышц сосудов малого круга кровообращения. Успехи физиол. наук. 2000, 37, 1: 17-49.
2. Макар З. Н., Черепанов Г. Г., Бояршинов И. А., Корнеева Р. И., Матюшенко 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: 951-959.
3. Макар З.Н., Черепанов Г.Г. Исследование механизмов, лимитирующих молокообразование у продуктивных жвачных животных при кратковременных сдвигах нутритивного статуса. Прошлое, настоящее и будущее зоотехнической науки. Мат. конф., Дубровицы, 2004, 3: 29-34.
4. 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, 45: 55-65.

5. Макара З. Н., Черепанов Г. Г., Сапунов М. И., Корнеева Р. И. Лактогенное действие нагрузки инсулином в условиях поддержания нормогликемии у коз. *Российский физиол. ж. им. И.М. Сеченова* (в печати)
6. Медведева Н.А., Гаврилова С.А., Графов М.А., Давыдова М.П., Петрухина В.А. Секреторная функция эндотелия как фактор регуляции сосудистого тонуса в норме и при патологии сердечно-сосудистой системы. *Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова*. 2001, 87, 7: 1518-1526.
7. Черепанов Г.Г., Медведев И.К., Мартынова А.С. Теоретическое и экспериментальное моделирование динамики поглощения субстратов из крови и синтеза компонентов молока в молочной железе коров. *Совр. проблемы биотехнологии и биологии продуктивных животных*. - Боровск, 1999: 384-394.
8. Черепанов Г.Г., Макара З.Н. Новая концепция о сопряженной регуляции органного кровотока и метаболизма секреторных клеток молочной железы. *Вестник РАСХН*, 2004, 6: 73-75.
9. Черепанов Г. Г., Макара 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.
10. Baldwin R.L., France J., Gill M. Metabolism of the lactating cow. 1. Animal elements of a mechanistic model. *J. Dairy Res.*, 1987, 54: 77-105.
11. 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.*, 1995, 62: 405-422.
12. 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.
13. Cherepanov, G.G., Danfaer, A., Cant J.P. Simulation analysis of substrate utilization in the mammary gland of lactating cows. *J. Dairy Res.* 2000, 67: 171-188.
14. Davis S.R., Collier R.J. Mammary blood flow and regulation of substrate supply for milk synthesis. *J. Dairy Sci.*, 1985, 68: 1041-1058.
15. Hanigan M.D., Bequette B.J., Crompton L.A., France J. Modeling mammary amino acid metabolism. *Livest. Prod. Sci.*, 2001, 70: 63-78.
16. 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.*, 2002, 217: 311-330.
17. Hill R.L., Brew K. Lactose synthesis. *Adv. Enzymol.*, 1975, 43: 411-490.
18. 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.
19. Tesseraud S., Grizard J., Makarski B., Debras E., Bayle G., Champredon C. Effect of insulin in conjunction with glucose, amino acids and potassium on net metabolism of glucose and amino acids in the goat mammary gland. *J. Dairy Res.*, 1992, 59: 135-149.
20. Tucker H. A. Hormones, mammary growth, and lactation: a 41-year perspective. *J. Dairy Sci.*, 2000, 83: 874-884.

**Substrate homeostasis and its role in limiting biosynthesis
in mammary secretory cells**

G.G. Cherepanov, Z.N. Makar

*Institute of Physiology, Biochemistry and Nutrition of Farm Animals,
Russian Agricultural Academy*

Substantial recent research efforts have been directed at representing mammary cell metabolism in frame of dynamic models. Using these models, the identification of metabolic parameters can be performed on the base of comparing the predicted and measured patterns of mammary blood flow, substrate removal from the blood and milk component yields in various physiological states, including functional loads of substrates. The series of experiments was conducted on lactating goats and cows aimed to verify the suggestions used in constructing dynamic model of mammary metabolism (Cherepanov et al., *J. Dairy Res.*, 2000, 67). The following deductions were formulated on the basis of results obtained. The utilization rates of various substrates in mammary cells are not independent, since they are interrelated through mammary blood flow and common cofactors. The effects of nutritional factors on functional activity of mammary gland can be mediated by adaptive (autoregulatory) metabolic shifts in secretory cells and by changes of blood supply owing to shifts in regional blood vessel resistance. Repartitioning of substrate flows in the cell and effectiveness of biosynthesis can be modified at the cellular level, e.g. by changes in the activity of individual essential amino acid transport into secretory cell. Therefore, the cellular requirements for individual substrates seem to be variable and can be modified by the level and ratios of other substrates.

Key words: lactation, mammary gland metabolism, substrate transport, regional blood flow, modeling

Prob. Prod. Anim. Biol., 2007, 1: 72-80