СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОЛОГИЯ, 2022, том 57, № 4, с. 706-717

Ветеринария, ветеринарные препараты

УДК 636.2.034:618.19-002:615.355:582.282.123.4 doi: 10.15389/agrobiology.2022.4.706rus

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ МИКРОМИЦЕТА *Aspergillus ochraceus* ПРИ КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ МАСТИТА У КОРОВ*

С.В. ШАБУНИН, Г.А. ВОСТРОИЛОВА✉, Н.А. ХОХЛОВА, Д.И. ШАБАНОВ, Г.Н. БЛИЗНЕЦОВА, Т.И. ЕРМАКОВА, И.Т. ШАПОШНИКОВ

Мастит коров, этиологическими агентами которого служат патогенные и условно-патогенные микроорганизмы, считают одним из заболеваний, наносящих значимый экономический ущерб молочному животноводству с риском для здоровья потребителей молочной продукции. При бактериальных инфекциях молочной железы у коров происходит формирование белковых экссудатов. Протеиназы, снижающие выраженность воспалительной реакции, включают в схемы лечения разных патологий в медицине, однако в ветеринарии такая практика ограничена. В этой работе мы доказали, что препарат на основе протеиназы *Aspergillus ochraceus* повышает результативность антибиотикотерапии при мастите коров. Цель исследования заключалась в экспериментально-клинической оценке возможности применения протеиназы микромицета *A. ochraceus* BKM F-4104D в ветеринарии. Исследования были выполнены на лактирующих коровах (*Bos taurus*) черно-пестрой породы с молочной продуктивностью за предыдущую лактацию 6900-7110 кг, которых распределили в две группы (*n* = 16 в каждой). Всем подопытным животным внутрицистернально вводили противомаститный препарат на основе бета-лактамного антибиотика амоксициллина, клавулоновой кислоты и преднизолона (АКП) в дозе 3,0 г (один шприц-дозатор) 1 раз в сутки на протяжения 3-4 сут до исчезновения клинических признаков мастита. Животным второй группы дополнительно за 12 ч до применения препарата АКП однократно интрацистернально вводили лекарственное средство с рабочим названием ПАО-1, представляющее собой масляную суспензию, содержащую в 4,0 г (шприц-дозатор) в качестве действующего вещества внеклеточную протеиназу микромицета *A. ochraceus* BKM F-4104D, которая способна расщеплять гетерогенные белковые субстраты в широком диапазоне условий окружающей среды, что может повысить эффективность лечения мастита коров этиотропными средствами. Состояние молочной железы, морфо-биохимический статус оценивали до лечения, после лечения и через 7-10 сут по окончании введения препаратов. Установлено, что комплексное применение антимикробного средства и препарата, полученного на основе протеиназы микромицета *A. ochraceus* BKM F-4104D, сопровождалось выздоровлением 93,8 % коров с клиническим маститом, что на 12,5 % выше ($p < 0,05$), чем при использовании только противомаститного препарата АКП. Выздоровление животных характеризовалось нормализацией показателей морфо-биохимического статуса. Количество β-глобулинов увеличивалось на 14,2 % ($p < 0,05$), триглицеридов — на 31,4 % ($p < 0,05$), креатинина — уменьшалось на 24,2 % ($p < 0,05$) относительно животных, к которым применяли терапию АКП. Эндогенная интоксикация и перекисное окисление липидов снижались: содержание малонового диальдегида уменьшалось на 40,4 % ($p < 0,00005$), молекул средней массы — на 46,3 % ($p < 0,00005$), NOx — в 3,6 раза ($p < 0,00005$), индекс эндогенной интоксикации — на 33,7 % ($p < 0,005$) относительно больных животных. Активность ферментативного и неферментативного звеньев антиоксидантной защиты повышалась: содержание витамина А увеличилось на 36,8 % ($p < 0,005$), витамина Е — на 32,8 % ($p < 0,05$), витамина С — на 39,2% ($p < 0,005$), активность каталазы возросла на 39,4 % ($p < 0,005$), глутатионпероксидазы — на 30,6 % ($p < 0,005$) относительно больных животных. Оптимизировался белковый, липидный и минеральный обмен. После окончания терапевтического курса в секрете вымени нормализовалось число соматических клеток, их состав и отсутствовала патогенная микрофлора, чем подтверждалось полное клиническое выздоровление коров. Полученные результаты свидетельствуют о том, что протеиназа микромицета *Aspergillus ochraceus* BKM F-4104D, обладая высокой антикоагулянтной и фибринолитической активностью, может оказаться весьма перспективной при разработке ферментных лекарственных препаратов отечественного производства для ветеринарии, конкурентных на мировом рынке.

Ключевые слова: *Aspergillus ochraceus* BKM F-4104D, протеиназы, препарат ПАО-1, мастит, крупный рогатый скот, ферментные препараты, комбинированная терапия.

Во многих странах мастит коров считают часто встречающейся па-

* Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-16-00085).

тологией, которая приводит к значительным экономическим потерям в молочном животноводстве (1-5). Среди основных причин мастита выделяют воздействие патогенных и условно-патогенных микроорганизмов (6-9).

Большинство препаратов для терапии мастита в качестве действующего компонента содержит антибиотики. Однако их применение привело к появлению лекарственно устойчивых штаммов микроорганизмов (5), персистенции биопленочной резистентности *Staphylococcus aureus* к антибиотикам (1) и выделению от больных клиническим маститом коров полирезистентных микробных изолятов (9, 10). Кроме того, антибиотики могут оказывать токсическое влияние на плод при беременности, вызывать аллергические реакции, дисбактериоз и иммунодефицитные состояния у молодняка животных (11). Поэтому снижение частоты и/или кратности применения антибиотиков — задача, которая требует все большего внимания. Ее можно решить, повысив эффективность антиботикотерапии (12, 13).

К последствиям бактериальных инфекций органов репродукции и молочной железы у коров относится формирование тромбов и белковых экссудатов, что играет значительную роль в развитии бесплодия и снижении молочной продуктивности (14, 15). Для решения проблемы в терапевтической практике успешно используются препараты, имеющие в составе протеиназы, которые снижают выраженность воспалительной реакции, что проявляется в нормализации микроциркуляции и уменьшения отека, улучшении трофики тканей (16). Это обусловлено доказанным наличием у протеиназ фибринолитического, иммуномодулирующего и других эффектов (16, 17).

Фибриллярные белки фибрин и коллаген относятся к трудногидролизуемым субстратам, для расщепления которых необходимы протеолитические ферменты со специфической активностью (18). В клинической практике препараты на основе таких протеиназ применяют для элиминации сгустков крови, гнойных масс и некротизированных тканей в зоне поражения (18). По данным ряда исследований, среди таких ферментов высокой активностью и эффективностью выделяются протеиназы микромицетов, в особенности представителей рода *Aspergillus*, продуцирующих несколько типов ферментов с направленным действием ограниченного протеолиза (18-20). В связи с этим протеазы мицелиальных грибов, способные эффективно расщеплять фибрин, коллаген, эластин, кератин и другие фибриллярные белки, могут иметь огромное практическое значение для ветеринарии.

Также известно, что многие процессы гомеостаза регулируются различными формами протеаз, активность которых, в свою очередь, находится в сложной взаимозависимости от действия оксидантной и антиоксидантной систем (17).

Протеолитические ферменты, обладая спектром биологических эффектов, могут повлиять на состояние животных при антибиотикотерапии мастита, в частности на их гематологический статус и санитарные характеристики секрета вымени. Однако подобные исследования в научной литературе представлены недостаточно.

В своей работе мы сравнили результаты морфо-биохимического анализа крови, определения маркеров активности системы пероксидного окисления липидов—антиоксидантной защиты, микробиологического и морфо-биохимического анализа секрета молочной железы при двух схемах лечения и доказали, что препарат на основе протеиназы *Aspergillus ochraceus*, способной расщеплять гетерогенные белковые субстраты в широком диапазоне условий окружающей среды, повышает результативность антибиоти-

котерапии при мастите коров.

Цель нашего исследования — экспериментально-клиническая оценка возможности применения протеиназы микромицета *Aspergillus ochraceus* ВКМ F-4104D для повышения эффективности лечения мастита коров в комплексе с этиотропными средствами.

Методика. Все выполняемые в исследовании процедуры были предварительно рассмотрены и одобрены на заседании биоэтической комиссии ФГБНУ ВНИВИПФиТ и соответствовали типу А (манипуляции с животными, не причиняющие им боли либо причиняющие минимальную боль и дискомфорт). Персонал, участвующий в эксперименте, был обучен правильному и гуманному обращению с животными в соответствии с правилами, принятыми European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123, Strasbourg, 1986 год); Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях; Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Washington (DC) (1996 год); Этическим кодексом ветеринарного врача Российской Федерации, рекомендованном на XIII Московском международном ветеринарном конгрессе Ассоциации практикующих ветеринарных врачей России (2005 год).

В эксперименте использовали лекарственное средство с предварительным названием ПАО-1 (разработано в ФГБНУ ВНИВИПФиТ), которое содержит в качестве действующего вещества рекомбинантную протеиназу микромицета *Aspergillus ochraceus* ВКМ F-4104D, обладающую антикоагулянтными и фибринолитическими свойствами. Протеиназа экспрессирована в штамме *Escherichia coli* BL 21 (DE3) в растворимой форме и телах включения и в дальнейшем с высоким выходом получена с использованием методов рефолдинга и аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе (21).

Лактирующих коров (*Bos taurus*) черно-пестрой породы привязного содержания (n = 32; ООО «Агротех-Гарант» Ростошинский, Эртильский р-н, Воронежская обл., февраль-март 2021 года) с молочной продуктивностью за предыдущую лактацию 6900-7110 кг разделили на две группы по 16 гол. в каждой для определения терапевтической эффективности препаратов. Всем коровам (I и II группы) внутрицистернально вводили противомаститный препарат на основе β-лактамного антибиотика амоксициллина, клавулоновой кислоты и преднизолона (АКП) в дозе 3,0 г (один шприц-дозатор) 1 раз в сутки на протяжения 3-4 сут до исчезновения клинических признаков мастита. Животным из II группы за 12 ч до применения препарата АКП дополнительно однократно интрацистернально вводили лекарственное средство ПАО-1 (масляная суспензия, 4,0 г, шприц-дозатор).

Клиническое состояние молочной железы оценивали до лечения, в процессе лечения (3-4-и сут) и через 7-10 сут после введения последней лечебной дозы АКП. Кроме того, от 5 коров из каждой группы брали кровь из яремной вены в вакуумные пробирки Green Vac-Tube («Green Cross», Южная Корея) для лабораторного исследования морфо-биохимических показателей (количество общего белка и его фракций, мочевины, креатинина, глюкозы, общих липидов, триглицеридов, холестерина, активность щелочной фосфатазы — ЩФ, аспартатаминтрансферазы — АсАТ, аланинаминотрансферазы — АлАТ, γ-глутамилтрансферазы — ГГТ, содержание общего кальция, неорганического фосфора, меди, цинка, марганца, магния, селена, связанного с белком йода — СБЙ) и маркеров активности системы пере-

кисного окисления липидов—антиоксидантной защиты (ПОЛ-АОЗ) (концентрация малонового диальдегида — МДА, активность глутатионпероксидазы — ГПО и каталазы — КА, содержание витаминов А, Е, С, молекул средней массы — МСМ, стабильных метаболитов оксида азота — NO_x) (22, 23). Морфологические исследования проводили на гематологическом анализаторе ABX Micros 60 («HORIBA ABX SAS», Франция), биохимические — на анализаторе Hitachi-902 («Hitachi», Япония).

Секрет вымени от больных катаральным маститом коров отбирали согласно наставлению (24, 25). Бактериологические исследования секрета вымени (у 5 животных в группе), изучение культурально-морфологических и биохимических свойств выделенных микроорганизмов проводили в соответствии с рекомендациями (25); количество соматических клеток определяли по ГОСТ 23453-2014 с помощью анализатора соматических клеток в молоке DCC («DeLaval», Швеция) в соответствии с инструкцией к прибору (26), состав популяции лейкоцитов — методом микроскопии препаратов секрета вымени, окрашенных по Романовскому-Гимзе (микроскоп Биоскоп-1, «ЛОМО», Россия). Содержание циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в секрете вымени определяли методом ПЭГ-преципитации с использованием спектрофотометра UV-1800 («Shimadzu», Япония) (27).

Статистическую обработку данных проводили в программе MedCalc 15.8 («MedCalc Software, Ltd.», Бельгия). Определяли средние значения (*M*) и стандартные ошибки средних (±SEM). Для оценки статистической достоверности использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. В I группе больных маститом коров при применении только антимикробного препарата АКП выздоровели 81,3 % животных (при учете по долям вымени этот показатель составил 83,3 %). Во II группе при совместном применении антимикробного и ферментного препаратов терапевтическая эффективность составила соответственно 93,8 и 94,7 %. Следовательно, дополнительное применение ферментного препарата достоверно ($p < 0,05$) повышает терапевтический эффект на 12,5 %.

Положительное влияние комплексного применения антимикробного и ферментного препаратов подтвердили полученные нами результаты исследования морфологических и биохимических характеристик крови животных. Выздоровление коров, подвергавшихся терапии с применением антимикробного средства АКП (табл. 1), сопровождалось снижением в крови содержания α-глобулинов на 31,4 % ($p < 0,005$), креатинина — на 9,9 %, активности ЩФ — на 37,7 % ($p \leq 0,00001$), АсАТ — на 17,6 % ($p < 0,05$), АлАТ — на 47,2 % ($p \leq 0,00002$), ГГТ — на 8,9 % при повышении содержания альбуминов на 24,1 % ($p < 0,05$), триглицеридов — в 1,5 раза ($p \leq 0,00001$), количества общего кальция — на 48,4 % ($p < 0,005$) относительно состояния до начала лечения. Совместное применение АКП и препарата ПАО-1 при лечении клинического мастита приводило к более выраженному увеличению альбуминовой фракции белка (на 25,5 %, $p < 0,05$), β-глобулинов — на 19,8 % ($p < 0,05$), количества триглицеридов — в 2 раза ($p \leq 0,00005$), холестерина — на 15,1 %, общего кальция — на 54,3 % ($p < 0,005$), меди — на 12,8 % ($p < 0,05$), цинка — на 13,2 % ($p < 0,05$) при уменьшении α-глобулиновой фракции белка на 38,0 % ($p < 0,005$), креатинина — на 31,7 % ($p < 0,005$), активности ЩФ — на 38,7 % ($p \leq 0,00005$), АсАТ — на 27,3 % ($p < 0,005$), АлАТ — на 53,1 % ($p < 0,00005$), ГГТ — на 19,8 % ($p < 0,05$). При этом в группе животных, которые получали антимикробный препарат в сочетании с ПАО-1, отмечали повышение количества β-глобулинов на 14,2 % ($p < 0,05$),

триглицеридов — на 31,4 % ($p < 0,05$) при снижении содержания креатинина на 24,2 % ($p < 0,05$) относительно показателей в группе животных, которым вводили только антибактериальный препарат.

1. Морфо-биохимические показатели крови у больных маститом коров (*Bos taurus*) черно-пестрой породы до и после лечения с применением антибиотика и ферментного препарата (*M*±SEM, ООО «Агротех-Гарант» Ростошинский, Эртильский р-н, Воронежская обл., февраль-март 2021 года)

Показатель	Референтные значения	До лечения (фон)	После лечения	
			I группа (n = 5)	II группа (n = 5)
Эритроциты, $\times 10^{12}$/л	4,8-7,0	5,72±0,37	5,81±0,41	5,79±0,45
Гемоглобин, г/л	90-140	116,3±6,1	115,6±7,2	120,4±7,9
Общий белок, г/л	72-86	78,4±4,00	80,3±4,80	82,4±4,11
Альбумины, %	38-50	37,7±2,30	46,8±3,12*	47,3±2,84*
α-Глобулины, %	12-20	24,5±1,92	16,8±0,81**	15,2±1,30**
β-Глобулины, %	10-16	10,1±0,41	10,6±0,31	12,1±0,38**▲
γ-Глобулины, %	25-40	27,7±1,11	25,8±0,90	25,4±1,13
Мочевина, ммоль/л	3,0-6,7	3,82±0,21	3,94±0,19	3,99±0,22
Креатинин, мкмоль/л	40-180	119,4±7,7	107,6±5,0	81,6±4,60**▲
Глюкоза, ммоль/л	2,1-3,8	3,12±0,12	3,45±0,22	3,51±0,13
Общие липиды, г/л	1,4-5,6	4,24±0,21	4,31±0,19	4,61±0,18
Триглицериды, ммоль/л	0,25-0,70	0,34±0,01	0,51±0,01***	0,67±0,02***▲
Холестерин, ммоль/л	1,3-5,5	3,45±0,22	3,56±0,19	3,97±0,22
ЩФ, Е/л	100-200	289,6±5,5	180,3±4,1***	177,5±3,9***
АсАТ, Е/л	10-50	85,4±4,11	70,4±3,90*	62,1±3,6**
АлАТ, Е/л	10-30	38,6±1,64	20,4±1,53***	18,1±1,42***
ГГТ, Е/л	7-15	19,2±1,1	17,5±1,34	15,4±1,09*
Кальций общий, ммоль/л	2,25-3,15	1,88±0,12	2,79±0,15**	2,90±0,19**
Фосфор неорганический, ммоль/л	1,45-2,3	1,72±0,11	1,80±0,17	1,74±0,11
Медь, мкмоль/л	12,6-30,0	14,8±0,58	15,1±0,71	16,7±0,44*
Цинк, мкмоль/л	46,2-77,0	44,7±3,1	48,6±3,9	50,6±1,15*
Марганец, мкмоль/л	2,7-4,6	2,82±0,21	2,99±0,17	3,19±0,16
Магний, ммоль/л	0,8-1,25	0,87±0,09	0,91±0,08	0,95±0,07
СБЙ, мкг%	4-8	5,36±0,31	5,41±0,37	5,65±0,29

Примечание. Описание групп см. в разделе «Методика». ЩФ, АсАТ, АлАТ и ГГТ — соответственно щелочная фосфатаза, аспартатаминтрансфераза, аланинаминотрансфераза, γ-глутамилтрансфераза, СБЙ — связанный с белком йод.
*, **, *** Различия с фоном статистически значимы соответственно при $p < 0,05$; $p < 0,005$; $p \leq 0,00005$.
▲ Различия с I группой статистически значимы при $p < 0,05$.

2. Состояние системы перекисного окисления липидов—антиоксидантной защиты и эндогенная интоксикация у больных маститом коров (*Bos taurus*) черно-пестрой породы до и после лечения с применением антибиотика и ферментного препарата (*M*±SEM, ООО «Агротех-Гарант» Ростошинский, Эртильский р-н, Воронежская обл., февраль-март 2021 года)

Показатель	Референтные значения	До лечения (фон)	После лечения	
			I группа (n = 5)	II группа (n = 5)
МДА, мкмоль/л	0,8-1,2	3,32±0,24	2,32±0,18*	1,98±0,07***
МСМ, ед. OD_{254}	< 0,3	0,41±0,01	0,29±0,01***	0,22±0,01***
ИЭИ, у.е.		16,9±1,24	13,7±0,91	11,2±0,63**
ГПО, мкмоль G-SH/(л · мин · 10^3)	20,0-35,0	14,3±1,24	16,2±1,41	18,8±1,23*
КА, мкмоль H_2O_2/(л · мин · 10^3)	30,0-40,0	41,1±3,37	48,1±3,84	57,7±4,21**▲
Витамин А, мкмоль/л	0,84-2,78	1,33±0,12	1,67±0,11*	1,82±0,09**
Витамин Е, мкмоль/л	15,0-30,0	12,3±1,12	14,1±1,33	16,2±1,23*
Витамин С, мкмоль/л	34,1-85,2	20,0±1,92	22,3±1,80	27,7±2,31*
Селен, мкмоль/л	1,0-1,5	1,02±0,05	1,24±0,07	1,35±0,06**
NO_x, мкмоль/л	40-120	128,6±6,66	52,8±2,56***	36,3±2,23***▲

Примечание. Описание групп см. в разделе «Методика». МДА, МСМ, ИЭИ, ГПО, КА — соответственно малоновый диальдегид, молекулы средней массы, индекс эндогенной интоксикации, глутатионпероксидаза, каталаза.
*, **, *** Различия с фоном статистически значимы соответственно при $p < 0,05$; $p < 0,005$; $p \leq 0,00005$.
▲ Различия с I группой статистически значимы при $p < 0,05$.

Анализ прооксидантно-антиоксиданого статуса коров показал, что заболевание маститом протекает на фоне интенсификации ПОЛ, что сви-

детельствует о наличии оксидативного стресса, также увеличивается эндогенная интоксикация и снижается АОЗ. На это указывали высокие концентрации МДА, МСМ, NO_x и величина индекса эндогенной интоксикации (ИЭИ) при низких показателях для ферментативного и неферментативного звеньев АОЗ (табл. 2).

После курса антибиотикотерапии с применением АКП выздоровление животных сопровождалось снижением в крови индекса эндогенной интоксикации на 16,0 %, содержания молекул средней массы — на 23,7 % ($p < 0,00005$), малонового диальдегида — на 25,4 % ($p < 0,05$), NO_x — на 57,7 % ($p < 0,00005$) при повышении содержания витамина Е на 14,6 %, витамина С — на 11,0 %, витамина А — на 23,7 % ($p < 0,05$), активности ГПО — на 14,9 %, КА — на 18,2 %.

В крови животных, которые дополнительно получали ПАО-1, происходили более выраженные изменения относительно показателей до лечения (фон). Так, содержание NO_x в крови снижалось в 3,6 раза ($p < 0,00005$), малонового диальдегида — на 40,4 % ($p < 0,00005$), молекул средней массы — на 46,3 % ($p < 0,0005$), индекс эндогенной интоксикации уменьшался на 33,7 % ($p < 0,005$) при повышении содержания витамина С на 39,2 % ($p < 0,05$), витамина А — на 36,8 % ($p < 0,005$), витамина Е — на 32,8 % ($p < 0,05$), селена — на 32,4 % ($p < 0,005$), активности глутатионпероксидазы — на 30,6 % ($p < 0,05$), каталазы — на 39,4 % ($p < 0,005$), что свидетельствует о снижении скорости перекисного окисления липидов и активации ферментативного и неферментативного звеньев антиоксидантной защиты (см. табл. 2). Во II группе по сравнению с I группой активность каталазы повышалась на 20,2 % ($p < 0,05$), а уровень NO_x снижался на 31,3 % ($p < 0,05$).

Комплексное применение препаратов АКП и ПАО-1 благоприятно сказалось на цитологическом составе клеток молока (табл. 3).

3. Некоторые иммунные и цитоморфологические показатели секрета вымени коров (*Bos taurus*) черно-пестрой породы до и после лечения с применением антибиотика и ферментного препарата (*M*±SEM, ООО «Агротех-Гарант» Ростошинский, Эртильский р-н, Воронежская обл., февраль-март 2021 года)

Показатель	Референтные значения	До лечения (фон)	После лечения	
			I группа (n = 5)	II группа (n = 5)
Соматические клетки, $\times 10^3$/мл	< 200	4620,2±718,1	351,4±56,8***	189,7±22,1***▲
Лимфоциты, %	20-30	5,1±0,35	25,1±4,9**	25,8±3,2**
Нейтрофилы, %	12-20	91,1±7,71	41,2±3,7**	19,1±2,7***▲
Макрофаги, %	55-65	3,8±0,25	33,7±3,1***	55,1±5,2***▲
Лизоцим, мкг/мл	0,5-1,8	2,01±0,03	0,71±0,07***	0,55±0,04***
Циркулирующие иммунные комплексы, г/л	0,05-1,0	0,253±0,04	0,099±0,01**	0,061±0,01**▲

Примечание. Описание групп см. в разделе «Методика».
*, **, *** Различия с фоном статистически значимы соответственно при $p < 0,05$; $p < 0,005$; $p < 0,00005$.
▲ Различия с I группой статистически значимы при $p < 0,05$.

Содержание соматических клеток в секрете молочной железы у животных I группы (АКП) в конце опыта снизилось в 13,0, во II группе (АКП + ПАО-1) — в 24,7 раза, и это снижение было выше практически в 1,9 раза при сравнении с I группой.

При цитоморфологическом анализе соматических клеток секрета из пораженных долей молочной железы больных маститом коров установлено, что преобладающими были нейтрофилы, содержание которых составило 89,7 и 92,5 % у животных соответственно I и II группы. По окончании лечения в молоке коров из II группы численность лимфоцитов была близка к норме (25,8 %), к оптимальному значению приближалось и количество

нейтрофилов (19,1 %) и макрофагов (55,1 %). В молоке коров, подвергнутых лечению только АКП, отмечали повышенное содержание нейтрофилов (41,2 %) и пониженное — макрофагов (33,7 %), содержание лимфоцитов приближалось к оптимальному (25,1 %). После лечения наблюдаемые изменения показателей относительно фона в обеих группах, а также во II группе относительно I группы (за исключением количества лимфоцитов и лизоцима) были статистически значимыми (см. табл. 3). Превышение в 1,62 раза концентрации ЦИК у животных I группы по сравнению с коровами, получавшими дополнительно ПАО-1, может свидетельствовать о возможном нарушении проницаемости стенки сосудов, усилении воспалительной реакции, выбросе лизосомальных ферментов и супрессии Т-лимфоцитов (27).

Бактериологические исследованиям секрета молочной железы коров показало, что по окончании лечения препаратом АКП в 60,0 % случаев микрофлора не выделялась, в 20,0 % случаев выявили *Staph. aureus* и в 20,0 % — *E. coli*. В молоке коров из II группы, подвергнутой комплексному лечению (АКП + ПАО-1), микрофлору не обнаружили.

Известно, что некоторые протеолитические энзимы реализуют терапевтический эффект через влияние на воспалительный процесс, васкулярно-тромбоцитарный гемостаз и иммунные реакции (17). Протеолитические ферменты улучшают трофику тканей за счет разрушения белковых образований и сгустков фибрина в зоне воспаления, а также снижения агрегации тромбоцитов, тем самым препятствуя переходу хронического воспалительного процесса в рецидивирующую стадию (28, 29). Так как энзимы способны проявлять себя природными высокоактивными модуляторами воспаления, они ускоряют процесс выздоровления (28).

В ряде исследований показана способность внеклеточных протеиназ микромицетов рода *Aspergillus* проявлять гидролитические свойства и активировать протеин С и фактор X плазмы крови (30). Получена протеиназа — активатор протеина С плазмы крови, выделенная из культуральной жидкости *A. ochraceus* ВКМ F4104D, которая представляет собой сериновую протеиназу (31), обладающую высокой биологической активностью и противовоспалительным действием (32).

Проведенные нами клинические испытания показали эффективность экспериментального препарата на основе протеиназы микромицета *A. ochraceus* в комплексном лечении мастита у коров. Дополнительное применение ПАО-1 повышало терапевтический эффект на 12,5 %, что подтвердили данные морфо-биохимических исследований. Изменения показателей гомеостаза в процессе выздоровления коров при сочетании антимикробного препарата АКП с ПАО-1 свидетельствуют, с одной стороны, о снижении воспалительной реакции и функциональной нагрузки на печень и почки за счет уменьшения эндогенной интоксикации, с другой — о нормализации белкового, липидного и минерального обмена.

Важным фактором метаболизма как в норме, так и при патологии служит перекисное окисление липидов (33). В основе патогенеза многих заболеваний животных лежит интенсификация процессов ПОЛ, что приводит к нарушению клеточного энергообмена, синтеза белка, к ингибированию мембранозависимых ферментов вследствие накопления ряда токсических продуктов (МДА, конъюгированные диены, кетодиены) (34, 35). Заболевание коров маститом протекало при оксидативном стрессе и увеличении эндогенной интоксикации, на что указывает выявленное нами повышение концентрации МДА и МСМ, высокий ИЭИ, низкие значения показателей,

характеризующих активность ферментативного (КА, ГПО) и неферментативного (витамины А, Е и С) звеньев АОЗ, высокое содержание NO_x. При анализе прооксидантно-антиоксиданого статуса выздоровевших животных установлено, что в крови коров, которые дополнительно получали ПАО-1, положительные изменения более выражены. Так, у этих животных снижалось содержание МДА, МСМ, уменьшался ИЭИ при повышении содержания витаминов А, Е, С и активности КА и ГПО, что свидетельствует о снижении интенсивности ПОЛ и активации ферментативного и неферментативного звеньев АОЗ.

Выздоровление животных после курса АКП в комплексе с ПАО-1 сопровождалось более значительным уменьшением содержания NO_x в крови (разница составила 31,3 %), что также свидетельствует об ослаблении оксидативного стресса, поскольку NO способен выступать как в роли мощного прооксиданта, так и участвовать в эндогенной антиоксидантной защите (36, 37).

Обнаруженные изменения могут быть связаны с тем, что ферментативная активность протеиназы способствовала улучшению микроциркуляции в очагах воспаления, уменьшению порозности сосудов, более полному удалению поврежденных тканей и сгустков гноя из молочных протоков и, следовательно, более быстрой элиминации патогенных микроорганизмов и бактериальных токсинов с молоком, при этом антибиотики быстрее достигали очага воспаления (28, 38).

Клиническое выздоровление коров после окончания терапевтического курса подтверждается нормализацией числа и состава соматических клеток, а также отсутствием патогенной микрофлоры в секрете вымени при дополнительном применении ПАО-1 в комплексе с этиотропным лечением.

Итак, полученные результаты экспериментально-клинических исследований позволяют сделать следующие выводы. Применение протеиназы микромицета *Aspergillus ochraceus* BKM F-4104D в комплексе с этиотропным лечением при мастите коров способствовало достоверному повышению эффективности антибиотикотерапии на 12,5 % ($p < 0,05$) и полному освобождению молочной железы от возбудителей мастита — *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*. Изменения морфо-биохимических показателей крови в процессе лечения отражают нормализацию обменных процессов, уменьшение токсического действия эндогенных метаболитов (содержание малонового диальдегида снижалось на 40,4 % при $p < 0,00005$, молекул средней массы — на 46,3 % при $p < 0,00005$) и стимуляцию ферментативного и неферментативного звеньев антиоксидантной системы (повышение содержания витамина А на 36,8 % при $p < 0,005$, витамина Е — на 32,8 % $p < 0,05$, витамина С — на 39,2 % при $p < 0,005$, активности каталазы — на 39,4 % при $p < 0,005$, глутатионпероксидазы — на 30,6 % при $p < 0,005$), что уменьшает метаболическую нагрузку на печень и почки животных. При этом комбинированная терапия индуцирует более выраженную модуляцию про- и антиоксидантного статуса по сравнению с этиотропным лечением, что в наибольшей степени проявляется в снижении содержания NOx в 3,6 раза ($p < 0,00005$). Вероятно, это обусловлено уменьшением воспаления в месте локализации инфекции, поскольку в секрете вымени коров отмечено значительное снижение числа соматических клеток (в наибольшей степени нейтрофилов — до 19,1 % при $p < 0,05$) и содержания циркулирующих иммунных комплексов (до 0,061 при $p < 0,05$). Отсутствие патогенных бактерий в секрете вымени при применении препарата протеиназы означает,

что уменьшение воспалительной реакции связано также со снижением действия продуцируемых бактериями эндотоксинов и патоген-ассоциированных молекулярных паттернов. Мы полагаем, что нормализации морфо-биохимических параметров может способствовать снижение эндо- и экзогенной интоксикации, а также активация репаративных процессов в очаге инфекции вследствие фибринолитического ремоделирования внеклеточного матрикса под действием протеиназы. Таким образом, в основе увеличения эффективности терапии, по всей видимости, лежат протеолитические функции исследуемого ферментного препарата. Протеиназа микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, обладающая антикоагулянтными и фибринолитическими свойствами, может оказаться весьма перспективной при разработке лекарственных препаратов для ветеринарии, поскольку ее применение усиливает эффект антибиотика и, возможно, позволит снизить количество собственно лекарственного средства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Babra C., Tiwari J.G., Pier G., Thein T.H., Sunagar R., Sundareshan S., Isloor S., Hegde N.R., de Wet S., Deighton M., Gibson J., Costantino P., Wetherall J., Mukkur T. The persistence of biofilm-associated antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical bovine mastitis cases in Australia. *Folia Microbiologica*, 2013, 58(6): 469-474 (doi: 10.1007/s12223-013-0232-z).
2. Marama A., Mamu G., Birhanu T. Prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* mastitis in Holeta area, Western Ethiopia. *Global Veterinaria*, 2016, 16(4): 365-370 (doi: 10.5829/idosi.gv.2016.16.04.10334).
3. Tanzin T., Nazir K.H.M.N.H., Zahan M.N., Parvej M.S., Zesmin K., Rahman M.T. Antibiotic resistance profile of bacteria isolated from raw milk samples of cattle and buffaloes. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 2016, 3(1): 62-67 (doi: 10.5455/javar.2016.c133).
4. El-Ashker M., Gwida M., Monecke S., El-Gohary F., Ehricht R., Elsayed M., Akinduti P., El-Fateh M., Maurischat S. Antimicrobial resistance pattern and virulence profile of *S. aureus* isolated from household cattle and buffalo with mastitis in Egypt. *Veterinary Microbiology*, 2020, 240: 108535 (doi: 10.1016/j.vetmic.2019.108535).
5. Sharun K., Dhama K., Tiwari R., Gugjoo M.B., Yatoo M.I., Patel S.K., Pathak M., Karthik K., Khurana S.K., Singh R., Puvvala B., Amarpal, Singh R., Singh K.P., Chaicumpa W. Advances in therapeutic and managemental approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. *The Veterinary Quarterly*, 2021, 41(1): 107-136 (doi: 10.1080/01652176.2021.1882713).
6. Brahmadathan N.K. Molecular biology of Group A Streptococcus and its implications in vaccine strategies. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 2017, 35(2): 176-183 (doi: 10.4103/ijmm.IJMM_17_16).
7. Frost H.R., Sanderson-Smith M., Walker M., Botteaux A., Smeesters P.R. Group A streptococcal M-like proteins: from pathogenesis to vaccine potential. *FEMS Microbiology Reviews*, 2018, 42(2): 193-204 (doi: 10.1093/femsre/fux057).
8. Wald R., Hess C., Urbantke V., Wittek T., Baumgartner M. Characterization of *Staphylococcus* species isolated from bovine quarter milk samples. *Animals*, 2019, 9(5): 200 (doi: 10.3390/ani9050200).
9. Su Y., Yu C.Y., Tsai Y., Wang S.H., Lee C., Chu C. Fluoroquinolone-resistant and extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* from the milk of cows with clinical mastitis in Southern Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection*, 2016, 49(6): 892-901 (doi: 10.1016/j.jmii.2014.10.003).
10. Shah M.S., Qureshi S., Kashoo Z., Farooq S., Wani S.A., Hussain M.I., Banday M.S., Khan A.A., Gull B., Habib B., Khan S.F., Dar B.A. Methicillin resistance genes and in vitro biofilm formation among *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in India. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2019, 64: 117-124 (doi: 10.1016/j.cimid.2019.02.009).
11. Neuman H., Forsythe P., Uzan A., Avni O., Koren O. Antibiotics in early life: dysbiosis and the damage done. *FEMS Microbiology Reviews*, 2018, 42(4): 489-499 (doi: 10.1093/femsre/fuy018).
12. Зырянов С.К., Байбулатова Е.А. Использование новых лекарственных форм антибиотиков как путь повышения эффективности и безопасности антибактериальной терапии. *Антибиотики и химиотерапия*, 2019, 64(3-4): 81-91 (doi: 10.24411/0235-2990-2019-10020).
13. Wierup M. The control of microbial diseases in animals: alternatives to the use of antibiotics. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2000, 14(4): 315-319 (doi: 10.1016/s0924-

8579(00)00143-6).
14. Reshi A.A, Husain I., Bhat S.A., Rehman M.U., Razak R., Bilal S., Manzoor R. Mir M.R., Bovine mastitis as an evolving disease and its impact on the dairy industry. *International Journal of Current Research and Review*, 2015, 7(15): 47-55.
15. Rosales E.B., Ametaj B.N. Reproductive tract infections in dairy cows: can probiotics curb down the incidence rate? *Dairy*, 2021, 2(1): 40-64 (doi: 10.3390/dairy2010004).
16. Wald M., Olejár T., Sebková V., Zadinová M., Boubelík M., Poucková P. Mixture of trypsin, chymotrypsin, and papain reduces formation of metastases and extends survival time of C57Bl6 mice with syngenic melanoma B16. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2001, 47: 16-22 (doi: 10.1007/s002800170004).
17. Petushkova A.I., Zamyatnin A.A. Redox-mediated post-translational modifications of proteolytic enzymes and their role in protease functioning. *Biomolecules*, 2020, 10(4): 650 (doi: 10.3390/biom10040650).
18. Zanoelo F.F., Giannesi G.C., Cabral H. *Proteolytic enzymes: biochemical properties, production and biotechnological application. Fungal enzymes* /M.L.T.M. Polizeli, M. Rai (eds.). Boca Raton, CRC Press, London, 2013.
19. De Souza P.M., Bittencourt M.L., Caprara C.C., de Freitas M., de Almeida R.P., Silveira D., Fonseca Y.M., Ferreira Filho E.X., Pessoa Junior A., Magalhres P.O. A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2015, 46(2): 337-346 (doi: 10.1590/S1517-838246220140359).
20. Осмоловский А.А., Звонарева Е.С., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Воздействие внеклеточных протеаз микромицетов рода *Aspergillus* на белки системы гемостаза. *Биоорганическая химия*, 2014, 40(6): 688-694 (doi: 10.7868/S0132342314060128).
21. Komarevtsev S.K., Evseev P.V., Shneider M.M., Popova E.A., Tupikin A.E., Stepanenko V.N., Kabilov M.R., Shabunin S.V., Osmolovskiy A.A., Miroshnikov K.A. Gene analysis, cloning, and heterologous expression of protease from a micromycete *Aspergillus ochraceus* capable of activating protein c of blood plasma. *Microorganisms*, 2021, 9(9): 1936 (doi: 10.3390/microorganisms9091936).
22. Смирнов А.М., Шабунин С.В., Рецкий М.И., Донник И.М., Скира В.Н., Суворов А.В., Бабышова Л.В. *Новые методы исследований по проблемам ветеринарной медицины. Часть III. Методы исследований по проблемам незаразной патологии у продуктивных животных.* М., 2007.
23. Рецкий М.И., Шабунин С.В., Близнецова Г.Н., Рогачева Т.Е., Ермолова Т.Г., Фоменко О.Ю., Братченко Э.В., Дубовцев В.Ю., Каверин Н.Н., Цебржинский О.И. *Методические положения по изучению процессов свободнорадикального окисления и системы антиоксидантной защиты организма.* Воронеж, 2010.
24. *EMEA VICH Topic GL9 (GCP) (2000). Step 7 Consensus Guideline*. CVMP/VICH/595/98-FINAL; https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/vich-gl9-good-clinical-practices-step-7_en.pdf.
25. *H2020-ISIB-2015-1/696367/4D4F. Data Driven Dairy Decisions For Farmers*/WP4 Tailored Standard Operating Procedures Deliverable 4.1 Standard Operating Procedures/Ref. Ares (2017) 4284365-01/09/2017.
26. *ГОСТ 23453-2014 «Молоко сырое. Методы определения соматических клеток (с Поправкой)»*. Дата введения 2016-01-01 [GOST 23453-2014 Raw milk. Methods for the determination of somatic cells (with Amendment). Introduction date 2016-01-01]. М., 2016.
27. Исакова М.Н., Ряпосова М.В., Опарина О.Ю. Изменения показателей иммунного статуса коров на фоне применения противомаститной вакцины. *Ветеринарный фармакологический вестник,* 2019, 1(6): 91-95 (doi: 10.17238/issn2541-8203.2019.1.91).
28. Akhtar N.M., Naseer R., Farooqi A.Z., Aziz W., Nazir M. Oral enzyme combination versus diclofenac in the treatment of osteoarthritis of the knee-a double-blind prospective randomized study. *Clinical Rheumatology*, 2004, 23(5): 410-415 (doi: 10.1007/s10067-004-0902-y).
29. Sinclair R.T., Ryan T.J. Proteolytic enzymes in wound healing: the role of enzymatic debridement. *Australasian Journal of Dermatology*, 1994, 35(1): 35-41 (doi: 10.1111/j.1440-0960.1994.tb01799.x).
30. Osmolovskiy, A.A., Kreier, V.G., Baranova, N.A., Egorov N.S. Properties of extracellular plasmin-like proteases of *Aspergillus ochraceus* micromycete. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2017, 53 (4): 429—-434 (doi: 10.1134/S000368381704010X).
31. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Кураков А.В., Егоров Н.С. Свойства внеклеточной протеиназы — активатора протеина с плазмы крови, образуемой микромицетом *Aspergillus ochraceus. Прикладная биохимия и микробиология*, 2015, 51(1): 86-92 (doi: 10.7868/S0555109915010122).
32. Shabunin S.V., Vostroilova G.A., Khokhlova N.A., Komarevtsev S.K., Mikhalev V.I. Biological activity of extracellular protease preparations of *Aspergillus ochraceus* micromycete on the *Para-*

mecium caudatum model. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, 2021, 699: 012009 (doi: 10.1088/1755-1315/699/1/012009).
33. Indo H.P., Yen H., Nakanishi I., Matsumoto K., Tamura M., Nagano Y., Matsui H., Gusev O., Cornette R., Okuda T., Minamiyama Y., Ichikawa H., Suenaga S., Oki M., Sato T., Ozawa T., Clair D.K.S., Majima H.J. A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 2015, 1(56): 1-7 (doi: 10.3164/jcbn.14-42).
34. Tovmasyan A., Reboucas J.S., Benov L. Simple biological systems for assessing the activity of superoxide dismutase mimics. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2014, 20(15): 2416-2436 (doi: 10.1089/ars.2013.5576).
35. Noctor G., Lelarge-Trouverie C., Mhamdi A. The metabolomics of oxidative stress. *Phytochemistry*, 2015, 112: 33-53 (doi: 10.1016/j.phytochem.2014.09.002).
36. Betteridge D. What is oxidative stress? *Metabolism*, 2000, 49(2 suppl 1): 3-8 (doi: 10.1016/s0026-0495(00)80077-3).
37. Guichard C., Pedruzzi E., Fay M., Mkaddem S.B., Coant N., Daniel F., Ogier-Denis E. The Nox/Duox family of ROS-generating NADPH oxidases. *Médecine Sciences*, 2006, 22(11): 953-959 (doi: 10.1051/medsci/20062211953) (in French).
38. Bolten W.W., Glade M.J., Raum S., Ritz B.W. The safety and efficacy of an enzyme combination in managing knee osteoarthritis pain in adults: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis*, 2015, 251521 (doi: 10.1155/2015/251521).

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии,
394087 Россия, г. Воронеж, ул. Ломоносова, 114-б,
e-mail: vnivipat@mail.ru, gvostroilova@mail.ru ✉, nina_xoxlova@mail.ru, am7d@mail.ru, gnbliznetsova@mail.ru, ermakova53@list.ru, 36011958@mail.ru

Поступила в редакцию 5 мая 2022 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [*Agricultural Biology*], 2022, V. 57, № 4, pp. 706-717

PROSPECTS FOR THE APPLICATION OF EXTRACELLULAR PROTEINASES OF MICROMYCETE *Aspergillus ochraceus* IN THE TREATMENT OF MASTITIS IN COWS

S.V. Shabunin, G.A. Vostroilova✉, N.A. Khokhlova, D.I. Shabanov, G.N. Bliznetsova, T.I. Ermakova, I.T. Shaposhnikov

All-Russian Research Veterinary Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy, 114-b, ul. Lomonosova, Voronezh, 394087 Russia, e-mail vnivipat@mail.ru, gvostroilova@mail.ru (✉ corresponding author), nina_xoxlova@mail.ru, am7d@mail.ru, gnbliznetsova@mail.ru, ermakova53@list.ru, 36011958@mail.ru
ORCID:
Shabunin S.V. orcid.org/0000-0002-2689-6998
Vostroilova G.A. orcid.org/0000-0002-2960-038X
Khokhlova N.A. orcid.org/0000-0001-6861-2554
Shabanov D.I. orcid.org/0000-0002-1574-1317
Bliznetsova G.N. orcid.org/0000-0002-1042-9279
Ermakova T.I. orcid.org/0000-0003-1069-1223
Shaposhnikov I.T. orcid.org/0000-0003-0190-9083
The authors declare no conflict of interests
Acknowledgements:
Supported financially from the Russian Science Foundation (project No. 20-16-00085)
Received May 5, 2022 doi: 10.15389/agrobiology.2022.4.706eng

Abstract

Cow mastitis, the etiological agents of which are pathogenic and opportunistic microorganisms, is considered one of the diseases that cause significant economic damage to dairy farming with a risk to the health of dairy consumers. With bacterial infections of the mammary gland in cows, the formation of protein exudates occurs. Proteinases that reduce the severity of the inflammatory response are included in the treatment regimens for various pathologies in medicine, but this practice is limited in veterinary medicine. In this work, we proved that a drug based on *Aspergillus ochraceus* proteinase increases the effectiveness of antibiotic therapy for cow mastitis. The aim of the study was to experimentally evaluate the possibility of using *A. ochraceus* BKM F-4104D micromycete proteinase in veterinary medicine. The studies were performed on lactating black-and-white cows (*Bos taurus*) with milk productivity for the previous lactation of 6900-7110 kg, which were divided into two groups (n = 16 each). All experimental animals were intracisternally injected with an anti-mastitis drug based on the beta-lactam antibiotic amoxicillin, clavulonic acid and prednisolone (ACP) at a dose of 3.0 g (one syringe dispenser) once per day for 3-4 days until the disappearance of clinical signs of mastitis. In the second group, 12 hours before the use of the ACP preparation, animals were additionally

intracisternally administered a drug with the working name PAO-1. PAO-1 is an oil suspension containing 4.0 g (syringe-dosing device) extracellular proteinase of the micromycete *A. ochraceus* BKM F-4104D as an active ingredient. This proteinase is able to degrade heterogeneous protein substrates in a wide range of environmental conditions, which can increase the effectiveness of the etiotropic therapy of bovine mastitis. The condition of the breast, morpho-biochemical status were evaluated before treatment, after treatment-and 7-10 days after the end of the administration of the drugs. It was found that the combined use of an antimicrobial agent and a preparation based on the proteinase of the micromycete *A. ochraceus* BKM F-4104D was accompanied by the recovery of 93.8 % of cows with clinical mastitis, which is 12.5 % higher ($p < 0.05$) than when using only the antimastitis drug ACP. Recovery of animals was characterized by normalization of morpho-biochemical status. The amount of β-globulins increased by 14.2 % ($p < 0.05$), triglycerides by 31.4 % ($p < 0.05$), creatinine decreased by 24.2 % ($p < 0.05$) compared to animals treated with ACP therapy. Endogenous intoxication and lipid peroxidation decreased, e.g., the concentration of malonic dialdehyde decreased by 40.4 % ($p < 0.00005$), medium-weight molecules by 46.3 % ($p < 0.00005$), NOx 3.6-fold ($p < 0.00005$), endogenous intoxication index was 33.7 % lower ($p < 0.005$) compared to sick animals. The activity of the enzymatic and non-enzymatic components of the antioxidant defense increased, the concentration of vitamin A increased by 36.8 % ($p < 0.005$), vitamin E by 32.8 % ($p < 0.05$), vitamin C by 39.2 % ($p < 0.005$), catalase activity increased by 39.4 % ($p < 0.005$), glutathione peroxidase activity increased by 30.6 % ($p < 0.005$) compared to sick animals. Optimization of protein, lipid and mineral metabolism occurred. After the end of the therapeutic course, the number of somatic cells and their composition in the secret of the udder was normalized and there was no pathogenic microflora, which confirmes the complete clinical recovery of the cows. Our findings indicate that *Aspergillus ochraceus* BKM F-4104D micromycete proteinase which has high anticoagulant and fibrinolytic activity, can be very promising for the creation of domestically produced enzymatic veterinary drugs competitive in the world market.

Keywords: proteinases, *Aspergillus ochraceus* BKM F-4104D, PAO-1 drug, mastitis, cattle, enzyme preparations, combination therapy.