

## АКТИВНОСТЬ ТРИПСИНА В МОЛОКЕ КОРОВ ПОВЫШАЕТСЯ ПРИ МАСТИТАХ ОДНОВРЕМЕННО С ЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНОВ ВОСПАЛЕНИЯ

В.Г. ВЕРТИПРАХОВ<sup>1</sup> ✉, М.И. СЕЛИОНОВА<sup>1</sup>, В.В. МАЛОРОДОВ<sup>1</sup>,  
Г.Ю. ЛАПТЕВ<sup>2</sup>, Л.А. ИЛЬИНА<sup>2</sup>

Мастит — одна из самых серьезных проблем в молочном животноводстве. Маститом часто страдают высокоудойные коровы, при этом их продуктивность снижается на 10-15 %, а нарушения функции молочной железы могут оказаться необратимыми. При клиническом течении патология имеет явные диагностические признаки. Основные известные способы диагностики суб-клинических форм мастита (маститные тесты) базируются на определении соматических клеток в молоке, число которых коррелирует с воспалением, но разработка методов ранней диагностики мастита и предмаститного состояния коров остается актуальной. При маститах также анализируют биохимические показатели и морфологические профили крови животных, экспрессию генов, ассоциированных с воспалением. Однако вопросы присутствия в молоке животных ферментов до конца не изучены. Трипсин рассматривают в качестве гормоноподобного вещества, способного влиять на метаболизм и быть маркером воспалительных процессов у животных и человека. Ранее мы изучили роль трипсина при экспериментальном токсикозе кур и изменении рационов. В представленном исследовании нами впервые выявлен трипсин в молоке коров, увеличение его активности при мастите установлено и сопоставлено с изменением других показателей, используемых для оценки состояния животных при патологии. Цель настоящей работы — выявить активность трипсина в молоке здоровых и больных маститом коров и определить количество соматических клеток в молоке, относительную экспрессию генов, ассоциированных с воспалениями, а также морфо-биохимические показатели крови. Результаты, полученные на 25 коровах (*Bos taurus*) Айрширской породы (10 лактирующих коров без клинических признаков мастита и 15 коров с клиническими признаками мастита, СГЦ «Смена» — филиал ФНЦ ВНИТИП РАН, Московская обл., 2022 год) показали, что активность трипсина в молоке изменялась в зависимости от состояния здоровья молочной железы: при мастите этот показатель возрастал по сравнению с нормой на 106,6 % ( $p \leq 0,05$ ), тогда как активность трипсина в сыворотке крови здоровых и больных маститом коров не имела существенных различий. Из биохимических показателей крови коров наиболее информативными оказалась концентрация глюкозы, кальция и фосфора. Мы обнаружили, что в сыворотке крови больных маститом коров количество глюкозы возрастает на 67,4% ( $p < 0,05$ ), кальция — на 38,8 % ( $p < 0,05$ ), содержание фосфора, наоборот, снижается на 23,8 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями у здоровых животных. В морфологическом профиле крови при маститах наблюдается лейкоцитоз, отмечается снижение иммунореактивности на 42,5 % ( $p < 0,05$ ), соотношения лимфоцитов и нейтрофилов — на 20,4 % ( $p < 0,05$ ), числа эозинофилов — на 57,4 % ( $p < 0,05$ ) и базофилов — на 33,3 % ( $p < 0,05$ ), при этом количество моноцитов увеличивается на 46,5 % по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ). У больных маститом коров по сравнению со здоровыми увеличилась экспрессия генов моноцитарного хемотаксического протеина 1 и моноцитарного хемотаксического протеина 2,0 в 5,5 раза, фактора некроза опухоли  $\alpha$  — в 3,9 раза, интерлейкина 4 и интерлейкина 8 соответственно в 2,9 раза и 14-кратно. Таким образом, мы установили, что коровье молоко содержит трипсин, который по активности ( $48,2 \pm 3,8$  ед/л) не уступает ферменту в сыворотке крови животных. При воспалении молочной железы, которое было подтверждено инструментальными и молекулярно-генетическими методами, активность трипсина в молоке возрастает, что может быть использовано при разработке методов диагностики предмаститных состояний и ранних стадий маститов.

Ключевые слова: коровы, мастит, трипсин в молоке, диагностика маститов.

Мастит (воспаление молочной железы) — одно из наиболее распространенных заболеваний молочного скота. Патология вызывает экономические потери из-за снижения надоев и плохого качества молока (1-3). Для борьбы с маститом коров и уменьшения ущерба, наносимого этим заболеванием, ведется поиск более совершенных и высокочувствительных методов диагностики и лечения болезни (4).

В проводимых исследованиях большое внимание закономерно уделяется морфологическому и биохимическому анализу крови (5, 6), но надежность получаемых показателей в качестве прогностических не доказана (6).

Еще одно современное направление — оценка экспрессии генов, ассоциированных с воспалением (7-9). Но и в этом случае результаты вне связи с другими показателями пока что не рассматриваются как однозначные (8).

Известно, что в крови животных и человека присутствуют активные пищеварительные ферменты (10-12). Возможность проникновения ферментов в кровь благодаря особенностям в строении клеток поджелудочной железы описана советскими учеными еще в 1973 году (13). Ферменты крови рассматривают в качестве возможных маркеров при диагностике маститов у коров (14). К таким индикаторам следует отнести N-ацетил-бета-D-глюкозаминидазу, лактозу, гаптоглобин и сывороточный амилоид А молока коров (15). Ранее было показано, что только тест на активность щелочной фосфатазы надежен при ранней диагностике субклинического мастита коров, но не тесты по лактатдегидрогеназе и аспаратаминотрансферазе (15).

Часть ферментов попадает в молоко в результате синтеза в клетках молочной железы, некоторые ферменты продуцируются различными микроорганизмами, находящимися в молоке, которые в процессе жизнедеятельности выделяют вещества, изменяющие состав и свойства молока. В женском молоке обнаружена липаза, лактаза, фосфатаза, редуктаза, пероксидаза, каталаза, трипсин, трипсиноген, лизоцим (14). В научной литературе имеются сведения по сравнительному анализу активности ферментов в грудном и коровьем молоке, а также показателей в человеческом молозиве и обычным молоке (15). Представлены доказательства в поддержку мнения о том, что липаза и рибонуклеаза, вероятно, попадают в молоко из крови; лизоцим выделяется из секреторных эпителиальных клеток; лактат и малатдегидрогеназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа и лактозосинтетаза синтезируются в молочной железе; липаза, диастаза, протеаза и лизоцим, стимулируемые солями желчных кислот, присутствуют в количествах, достаточных для расщепления субстратов молока (15). Изучается активность липазы в женском молоке (16).

Среди ферментов детального внимания, по нашему мнению, заслуживает трипсин, который рассматривают в качестве гормоноподобного вещества (17). Трипсин влияет на метаболизм и, как мы полагаем, способен быть маркером в диагностике воспалительных процессов в организме животных и человека (18). Ранее мы выявили изменения активности трипсина при экспериментальном токсикозе кур (19) и в зависимости от рационов (20). Несмотря на то, что транскриптомные ответы клеток молочной железы крупного рогатого скота на патогены, вызывающие мастит, были изучены (8), до сих пор неизвестна связь таких признаков мастита, как число соматических клеток в молоке и уровень экспрессии генов иммунитета, ассоциированных с воспалением молочной железы.

В настоящей работе впервые обнаружена активность трипсина в молоке коров, установлено ее изменение при мастите. Получены новые данные об экспрессии генов воспаления при мастите коров. Так, транскрипционная активность генов моноцитарного хемотаксического протеина 1 повышалась в 5,5 раза, моноцитарного хемотаксического протеина 2 — 9-кратно, фактора некроза опухоли — в 3,9 раза, генов интерлейкина 4 и интерлейкина 8 — в 2,9 раза и 14-кратно. Обсуждается возможность использовать активность трипсина как индикатора состояния молочной железы.

Целью работы было выявление активности трипсина в молоке здоровых и больных маститом коров и ее сопоставление с числом соматических клеток, относительной экспрессией генов воспаления, а также морфо-биохимическими показателями крови у животных.

*Методика.* Физиологические опыты проводили на 25 коровах (*Bos*

*taurus*) Айрширской породы на ферме СГЦ «Смена» — филиала ФНЦ ВНИ-ТИП РАН (Московская обл.) в 2022 году. Сформировали две группы животных — I (контроль), в которую входили здоровые лактирующие коровы ( $n = 10$ ) без клинических признаков мастита, и II группу ( $n = 15$ ) с клиническими признаками мастита, который подтверждали с помощью кенотеста, вискозиметрического исследования (анализатора молока Соматос-Мини, ООО ВПК «Сибагроприбор», Россия) и проточной цитометрии (автоматический анализатор CombiFoss 7 DC, «FOSS», Дания; определение общего количества соматических клеток, SCC — somatic cell count и доли лимфоцитов и полиморфноядерных нейтрофилов в общей сумме клеток, DSCC — differential somatic cell count) (21), выполненных в соответствии с рекомендациями компаний-производителей. Молоко собирали в утренние часы в стерильные пробирки объемом 15 мл и не позднее чем через 3 ч определяли активность ферментов. Пробоподготовка молока включала центрифугирование при 14000 об/мин в течение 5 мин в микропробирках на центрифуге Eppendorf 5430R («Eppendorf», Германия). После центрифугирования удаляли из микропробирки верхний слой, содержащий жир, для определения набирали материал из второго после жира слоя молока. Активность трипсина определяли на биохимическом анализаторе SINNOWA 3000M («SINNOWA Medical Science & Technology Co., Ltd», Китай) кинетическим методом с использованием в качестве субстрата Na-бензоил-DL-аргинин-п-нитроанилид (BAPNA, «ACROS ORGANICS», Швейцария) в соответствии с описанием (22).

Кровь брали из хвостовой вены в вакуумные пробирки для взятия венозной крови с активатором свертывания (наполнитель оксид кремния SiO<sub>2</sub>). Для получения сравнимых результатов активность трипсина в сыворотке крови определяли так же, как в молоке (биохимический анализатор SINNOWA 3000M, «SINNOWA Medical Science & Technology Co., Ltd», Китай) (22). Биохимические показатели крови исследовали с помощью автоматического биохимического анализатора BioChem FC-120 («High Technology, Inc.», США) с использованием наборов реактивов для определения общего белка, глюкозы, холестерина, кальция, фосфора, щелочной фосфатазы («High Technology, Inc.», США).

Морфологию крови изучали на автоматическом гематологическом анализаторе MicroCC-20Plus («High Technology, Inc.», США). Анализ крови выполняли у здоровых и больных маститом коров (у каждой не менее 2 раз).

Анализ экспрессии генов проводили с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР, reverse transcription polymerase chain reaction). Для этого отбирали образцы молока от 6 коров (№№ 1-3 — клинически здоровые животные, №№ 4-6 — животные с признаками мастита; отбирали по пробе из каждой доли вымени, всего 24 образца). Образцы стабилизировали в растворе IntactRNA (ЗАО «Евроген», Россия) согласно рекомендациям производителя и хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Образцы гомогенизировали (гомогенизатор Precellys Evolution, «Vertin Technologies», Франция). Тотальную РНК из образцов выделяли с помощью набора Aurum Total RNA («Bio-Rad», США) согласно инструкции производителя. При помощи набора iScript™ Reverse Transcription Supermix («Bio-Rad», США) осуществляли реакцию обратной транскрипции для получения кДНК на матрице РНК. Реакцию амплификации генов проводили с праймерами (23) при помощи набора SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix («BioRad», США) в соответствии с протоколом производителя (24) (амплификатор детектирующий ДТлайт, НПО «ДНК-Технология», Россия). Режим и условия амплификации при анализе были следующими:

5 мин при 95 °С (предварительная денатурация); 30 с при 95 °С, 30 с при 60 °С, 30 с при 70 °С (40 циклов) (25). Относительную экспрессию определяли методом  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (26). В качестве референсного гена был выбран ген домашнего хозяйства *RPL19*, кодирующий рибосомальный белок L19 (*RPL19*).

Статистическая обработка результатов включала расчет среднего значения ( $M$ ) и среднеквадратичного отклонения ( $\pm SD$ ) с помощью программы Microsoft Excel. Достоверность различий оценивали по  $t$ -критерию Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Корреляционный анализ выполняли по Пирсону с использованием компьютерной программы Microsoft Excel.

**Результаты.** Для исследования отобрали коров с клиническими признаками мастита, дополнительно подтвержденными кенотестом и вискозиметрией. Контролем служили здоровые животные без признаков мастита.

Значения SSC и DSSC используются в качестве биомаркеров при мониторинге состояния молочной железы. Мы определили эти показатели в молоке здоровых и больных маститом коров, используя метод проточной цитометрии.

**1. Общее число соматических клеток и доля лимфоцитов и полиморфноядерных нейтрофилов в молоке здоровых (I группа) и больных маститом (II группа) коров (*Bos taurus*) Айрширской породы (ферма СГЦ «Смена» — филиала ФНЦ ВНИТИП РАН, Московская обл., 2022 год)**

Показатель	I группа (n = 10)		II группа (n = 15)		td	p
	$M \pm SD$	Cv, %	$M \pm SD$	Cv, %		
Число соматических клеток, $\times 10^3$ /мл	176,6 $\pm$ 53,4	82,4	584,9 $\pm$ 122,7	286,9	3,05	0,0089
Доля лимфоцитов и полиморфноядерных нейтрофилов в общей сумме клеток, %	49,8 $\pm$ 2,8	11,3	76,8 $\pm$ 6,4	14,8	3,87	0,0046

Примечание. Общее число исследованных образцов в I группе не менее 20, во второй — не менее 30.

В нашем опыте в молоке здоровых коров число соматических клеток (SCC) составило  $176,6 \times 10^3$ /мл, что в 3,31 раза меньше ( $p < 0,01$ ), чем в молоке больных маститом животных. Размах фенотипической изменчивости (Cv, %) свидетельствует о значительно меньшей вариабельности этого показателя в молоке здоровых животных. Показатель DSSC в молоке здоровых животных составил 49,8 %, тогда как в молоке больных — 76,8 %, или в 1,54 раза больше. Разница между сравниваемыми группами была высокодостоверной ( $p < 0,01$ ). Обращает на себя внимание тот факт, что в сравниваемых группах размах фенотипической изменчивости по DSSC был близким. Следовательно, этот показатель более стабилен, чем общее число соматических клеток в молоке.

**2. Активность трипсина в сыворотке крови и молоке у здоровых (I группа) и больных маститом (II группа) коров (*Bos taurus*) Айрширской породы ( $M \pm SD$ ; ферма СГЦ «Смена» — филиала ФНЦ ВНИТИП РАН, Московская обл., 2022 год)**

Показатель	I группа (n = 10)				II группа (n = 15)			
	Молоко (по долям вымени)							
Активность, ед/л	ЛП	ЛЗ	ПЗ	ПП	ЛП	ЛЗ	ПЗ	ПП
	51,0 $\pm$ 10,3	51,0 $\pm$ 7,7	47,0 $\pm$ 6,2	44,0 $\pm$ 6,5	111,0 $\pm$ 18,3	76,0 $\pm$ 11,5	82,0 $\pm$ 12,1	130,0 $\pm$ 14,5
В среднем	48,2 $\pm$ 3,8				99,6 $\pm$ 7,3*			
Коэффициент ЗМЖ	1,1	1,1	1,2	1,3	0,5	0,7	0,6	0,4
В среднем	1,20				0,55			
	Сыворотка крови							
Активность, ед/л	57,9 $\pm$ 2,5				52,4 $\pm$ 3,1			

Примечание. ЗМЖ — коэффициент здоровья молочной железы, ЛП — левая передняя доля вымени, ЛЗ — левая задняя доля вымени, ПЗ — правая задняя доля вымени, ПП — правая передняя доля вымени. Образцы от каждого животного отбирали дважды.

\* Различия с I группой статистически значимы при  $p < 0,05$ .

Мы выявили активность трипсина как в сыворотке крови, так и в

молоке коров (табл. 1). В пределах выборки активность этого фермента оказалась стабильным показателем. Для оценки здоровья молочной железы мы предлагаем следующую формулу:  $ZMJ = TK/TM$ , где  $ZMJ$  — коэффициент здоровья молочной железы;  $TK$  — активность трипсина в крови, ед/л;  $TM$  — активность трипсина в молоке, ед/л. При  $ZMJ = 1,1$  и выше состояние молочной железы следует считать нормальным, при  $ZMJ < 1,1$  происходит отклонение от нормы, вызванное воспалительной реакцией в молочной железе.

Результаты показали, что по активности трипсина сыворотка крови здоровых и больных маститом коров не имела существенных различий. Активность трипсина в молоке четко соответствовала состоянию здоровья молочной железы, колебания значений от средней величины в выборке были обусловлены наличием в пробе молочного жира. Так, у больных маститом коров активность трипсина в молоке возросла на 106,6 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями у здоровых животных.

Анализ корреляции между показателями активности трипсина в молоке и сыворотке крови у коров показал, что у здоровых животных эта связь устойчивая средняя положительная ( $r = 0,43$ ;  $p < 0,05$ ), а при патологии молочной железы переходила в среднюю отрицательную ( $r = -0,45$ ;  $p < 0,05$ ). Поэтому в практике животноводства для диагностики ранней стадии мастита может быть предложен коэффициент оценки здоровья молочной железы ( $ZMJ$ ), состоящий из двух взаимосвязанных показателей, который рассчитывается, как отношение активности трипсина в сыворотке крови к активности трипсина в свежей пробе полученного от животного молока в соответствии с формулой, приведенной выше.

Для оценки общего состояния здоровья животных были выполнены биохимические исследования крови (табл. 3).

### 3. Биохимические показатели крови у здоровых (I группа) и больных маститом (II группа) коров (*Bos taurus*) Айрширской породы ( $M \pm SD$ ; ферма СГЦ «Смена» — филиала ФНЦ ВНИТИП РАН, Московская обл., 2022 год)

Показатель	I группа ( $n = 10$ )	II группа ( $n = 15$ )
Общий белок, г/л	102±5,2	92±1,9
Альбумины, г/л	52±4,2	62±3,2
Глюкоза, ммоль/л	2,2±0,14	3,7±0,12*
Холестерин, ммоль/л	3,6±0,65	4,0±0,28
Кальций, ммоль/л	2,2±0,06	2,5±0,07*
Фосфор, ммоль/л	2,1±0,18	1,6±0,13*
Щелочная фосфатаза, ед/л	249±12,7	180±30,9

Примечание. Общее число исследованных образцов в I группе не менее 20, во второй — не менее 30.  
\* Различия с I группой статистически значимы при  $p < 0,05$ .

Наиболее информативными в этом случае оказались показатели по содержанию глюкозы, кальция и фосфора в сыворотке крови. Результаты показали, что в сыворотке крови больных маститом коров возрастает количество глюкозы на 67,4 % ( $p < 0,05$ ), кальция — на 38,8 % ( $p < 0,05$ ), содержание фосфора, наоборот, снижается на 23,8 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению со здоровыми животными.

Для оценки иммунного статуса животных были выполнены исследования морфологических показателей крови (табл. 4).

### 4. Гематологические показатели у здоровых (I группа) и больных маститом (II группа) коров (*Bos taurus*) Айрширской породы ( $M \pm SD$ ; ферма СГЦ «Смена» — филиала ФНЦ ВНИТИП РАН, Московская обл., 2022 год)

Показатель	I группа ( $n = 10$ )	II группа ( $n = 15$ )
Лейкоциты (WBC), $\times 10^9$ /л	5,0±0,42	9,6±0,93*
Нейтрофилы (Neu), %	43,4±3,51	49,5±6,78

Лимфоциты (Lym), %	44,9±1,30	40,7±4,60
Моноциты (Mon), %	4,3±0,40	6,3±0,83*
Эозинофилы (Eos), %	6,8±0,53	2,9±0,18*
Базофилы (Bas), %	0,6±0,06	0,4±0,04*
Эритроциты (RBC), ×10 <sup>12</sup> /л	5,5±0,09	5,4±0,12
Концентрация гемоглобина (HGB), г/л	91,0±0,51	85,0±1,22*
Гематокрит (HCT), %	26,6±0,25	25,0±0,38*

Примечание. Общее число исследованных образцов в I группе не менее 20, во второй — не менее 30.

\* Различия с I группой статистически значимы при  $p < 0,05$ .

Данные таблицы показывают, что число лейкоцитов в крови коров при маститах увеличивается на 92,0 % ( $p < 0,05$ ). Для определения уровня стресса за основу использовали индекс Гаркави (27), рассчитанный, как отношение относительного содержания лимфоцитов к относительному содержанию нейтрофилов. Несмотря на то, что процентное содержание нейтрофилов и лимфоцитов находятся в пределах физиологических норм, рассчитанный индекс указывает на наличие стресса у животных. Так, у здоровых коров показатель равен 1,03, у коров с признаками мастита — 0,82. Снижение коэффициента связано с уменьшением числа лимфоцитов на 9,4 %. При расчете индекса иммунореактивности (ИИР) по Д.О. Иванову (2014) по формуле  $ИИР = (Л + Э)/М$ , где Л — лимфоциты, Э — эозинофилы, М — моноциты (28), установлено, что этот показатель при маститах снижается на 42,5 %. При воспалении молочной железы мы отмечали снижение числа эозинофилов (на 57,4 %;  $p < 0,05$ ), моноцитов (на 31,5 %;  $p < 0,05$ ) и базофилов (на 33,3 %;  $p < 0,05$ ).

Процессы окисления в организме коров при маститах происходят менее интенсивно за счет уменьшения количества гемоглобина, переносящего кислород клеткам, на 6,6 % ( $p < 0,05$ ). В группе больных маститом животных гематокрит снижался на 6,0 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению со здоровыми, что также негативно влияет на метаболизм.

##### 5. Относительная экспрессия генов в молоке здоровых (I группа) и больных маститом (II группа) коров (*Bos taurus*) Айрширской породы ( $M \pm SD$ ; ферма СГЦ «Смена» — филиала ФНЦ ВНИТИП РАН, Московская обл., 2022 год)

Группа	<i>MCP-1</i>	<i>MCP-2</i>	<i>TNF-α</i>	<i>INF-γ</i>	<i>IL2</i>	<i>IL4</i>	<i>IL8</i>	<i>Casp6</i>
I ( $n = 3$ )	1	1	1	1	—	1	1	—
II ( $n = 3$ )	5,48±0,68	9,17±0,67	3,85±0,51	0,72±0,33	—	2,85±0,26	14,17±1,60	—

Примечание. Отбирали по пробе молока из каждой доли вымени, всего 24 образца в эксперименте. Прочерки означают, что экспрессию генов не выявили.

При сравнении экспрессии генов *MCP-1*, *MCP-2*, *TNF-α*, *INF-γ*, *IL2*, *IL4*, *IL8*, *Casp6* у здоровых и больных маститом коров мы выявили повышение транскрипционной активности практически всех генов, связанных с развитием воспалений. Известно, что воспаление может быть результатом взаимодействия нескольких путей регуляции или биологических процессов (29). Однако в настоящее время знаний об экспрессии воспалительных и регуляторных цитокинов в клетках, содержащихся в молоке коров, недостаточно. Предыдущие исследования показали, что провоспалительные цитокины нередко рассматриваются в качестве перспективных биомаркеров мастита, в том числе специфичных для определения статуса и этиологии заболевания (8). В частности, сообщалось, что на ранних стадиях развития мастита уровень воспалительных цитокинов увеличивается быстрее, чем общее число соматических клеток в молоке (9). При этом продемонстрировано, что использование количества соматических клеток в молоке в качестве селекционного признака для повышения устойчивости к маститу у крупного рогатого скота дало ограниченные результаты (30), поэтому ин-

формация о молекулярных маркерах восприимчивости/резистентности к маститу считается перспективной для выявления генетически устойчивого к маститу крупного рогатого скота (31-33).

Этиологию маститов, помимо механических повреждений во время доения, довольно часто связывают с возникновением различных инфекций, которые влияют на организм хозяина на ранних стадиях заболевания, вызывая, в частности, секрецию цитокинов. При этом продукция разных цитокинов в ответ на различные инфекции неодинакова, что может служить дифференцирующим фактором этиологии маститов (34-36). Так, наиболее часто развитие маститов связывают с бактериальными инфекциями, однако в качестве возбудителей могут выступать вирусы, микроскопические водоросли и грибы (37-40). В частности, сообщалось, что водоросли рода *Prototheca* являются третьим по распространенности возбудителем мастита после представителей родов *Streptococcus* и *Staphylococcus* (41).

Эпителиальные клетки внутренних протоков молочной железы играют ключевую роль в распознавании патогенов, вызывающих мастит, благодаря toll-подобным рецепторам (TLR2 и TLR4) (42, 43). TLR оказывают влияние на транскрипционный фактор NF-κB, который контролирует экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла, в частности генов фактора некроза опухоли α (TNF-α) и интерлейкинов IL1β, IL6 и IL8 (44-46). Хорошо известно, что цитокины сыворотки крови, такие как интерферон, фактор некроза опухоли α, IL17, IL6 и IL4, играют ключевую роль в воспалительных процессах, что предполагает их возможное участие в патологическом процессе при маститах у крупного рогатого скота (47, 48).

Цитокины имеют важное значение для межклеточной коммуникации. Среди известных процессов, которые стимулируются или ингибируются цитокинами, — клеточная дифференцировка, пролиферация, ремоделирование, дегенерация, регенерация и даже гибель клеток. Сообщалось, что при мастите наряду с увеличением количества соматических клеток повышается уровень секретируемых цитокинов (интерлейкинов IL1, IL2, IL4, IL5, IL6, IL8, IL10 и IL12) в молоке (49).

В нашем исследовании (см. табл. 5) у коров, больных маститом, произошло увеличение экспрессии моноцитарного хемотаксического протеина 1 и моноцитарного хемотаксического протеина 2. Это цитокины, относящиеся к группе CC-хемокинов. Экспрессия *MCP-1* увеличилась у больных коров в 5,5 раза, *MCP-2* — в 9 раз. Моноцитам принадлежит ведущая роль в процессах воспаления. Накопление моноцитов обусловлено их адгезией и миграцией под влиянием хемоаттрактантов, в частности недавно описанных хемотаксических цитокинов (хемокинов) (50, 51). Специфический для моноцитов хемокин *MCP-1* (monocyte chemoattractant protein 1) синтезируется активированными моноцитами/макрофагами и клетками сосудистой стенки и, связываясь со своим рецептором *CCR2*, регулирует адгезию и миграцию моноцитов на матриксных белках и эндотелии. *MCP-2* обладает уникальными функциональными свойствами по сравнению с другими хемокинами, в том числе с *MCP-1*. Другие научные группы при моделировании мастита *in vitro* показали, что эпителиальные клетки молочной железы крупного рогатого скота могут экспрессировать хемокины *CXCL6* (также называемый *GCP2*) и *CCL8* (также называемый *MCP2*) в ответ на определенные компоненты бактериальных клеток (52, 53). В целом же экспрессия моноцитарного хемотаксического протеина 1 и моноцитарного хемотаксического протеина 2 при маститах мало изучена, поэтому полученные нами данные представляют значительный интерес в связи с обсуждаемой проблематикой.

Экспрессия фактора некроза опухоли α у больных маститом коров

по сравнению со здоровыми возросла в 3,9 раза (см. табл. 5). Фактор некроза опухоли TNF- $\alpha$  представляет собой провоспалительный цитокин, вырабатываемый преимущественно макрофагами. В зависимости от локализации его высвобождения и рецептора, с которым он будет связываться, TNF- $\alpha$  может выполнять различные функции, например стимулировать синтез других цитокинов и вызывать воспалительные реакции, контролировать жизненно важные процессы в клетке и поддерживать тканевой гомеостаз (54, 55). В связи с этим в сочетании с другими цитокинами TNF- $\alpha$  играет важную клиническую роль у крупного рогатого скота, опосредуя иммунные воспалительные реакции (мастит, эндотоксический шок, эндометрит). Сообщалось, что цитокины, в частности TNF- $\alpha$ , участвуют в развитии метаболических заболеваний, например ацидоза (56). TNF- $\alpha$  вовлечен в возникновение воспалительного процесса (57), также регулирует ряд физиологических функций, включая аппетит, лихорадку, энергетический обмен и эндокринную активность (58). Такие агенты, как вирусы, паразиты, бактерии и эндотоксины, индуцируют продукцию TNF- $\alpha$  (59).

Также мы выявили, что уровень экспрессии интерлейкинов 4 и 8 у больных маститом коров повысился — соответственно в 2,9 раза и 14-кратно (см. табл. 5). Интерлейкины представляют собой полипептиды, продуцируемые клетками, участвующими в иммунных и воспалительных реакциях (60).

Главными продуцентами IL4 в молочных железах крупного рогатого скота служат Т- и В-лимфоциты, эозинофилы и базофилы, тучные клетки, плазматические клетки (60, 61), а также эпителиальные клетки, которые в совокупности составляют основу иммунного ответа II типа (62). Сообщалось, что IL4 регулирует врожденный иммунитет и оказывает ингибирующее действие на интерферон IFN- $\gamma$  у молочных коров (60). В нашем исследовании вместе с повышением экспрессии IL4 мы отметили тенденцию к повышению экспрессии IFN- $\gamma$  — цитокина, секретируемого различными клетками, участвующими в реакциях врожденного и адаптивного иммунитета (63), а также антигенпрезентирующими клетками, вовлеченными в элиминацию возбудителей (64, 65). Интересно, что в других исследованиях содержание IL4 в молоке при маститах, напротив, снижалось (66), следовательно, этот вопрос требует дальнейшего изучения.

Интерлейкин 8 (IL8) (67) представляет собой воспалительный цитокин, который продуцируется различными типами клеток — лимфоцитами, нейтрофилами, моноцитами, макрофагами и эпителиальными клетками (68), включая эпителиальные клетки молочной железы крупного рогатого скота (69). В месте воспаления IL8 участвует в привлечении и активации нейтрофилов (70). Во время острой фазы колиформного мастита концентрация IL8 в молоке коров значительно увеличивается (71). Хемотаксическая активность IL8 обнаружена в секрете молочной железы коров с маститами при интрамаммарной инфекции *Staphylococcus aureus*, но не обнаружена у здоровых коров (72). В связи с этим считается, что интерлейкин 8 участвует в инфильтрации нейтрофилов в секрет молочной железы во время мастита. Также предполагают, что интерлейкин 8 участвует в изменениях белкового состава молока посредством подавления секреции специфического для молока белка и притока сывороточных белков (72). В целом, IL8 считается мощным медиатором воспаления, а также участвует в привлечении лейкоцитов к местам инфекции (73). В связи с развитием мастита изучаются полиморфизмы гена *IL8* (74, 75). При этом сообщалось, что один из полиморфизмов — +472 A>G в *IL8* связан с высоким числом соматических клеток в молоке коров, инфицированных *S. aureus* (76)

Поскольку активность трипсина в крови связана с содержанием

метаболитов оксида азота (77), есть вероятность участия трипсина в воспалительной реакции в ткани молочной железы. Тем более, что существует способ диагностики мастита по содержанию нитрита ( $\text{NO}^{2-}$ ) и нитрозотиолов (RSNO) в молоке (4). Метод определения этих соединений в биологических объектах широко представлен в литературе (78). Полученные данные позволяют заключить, что трипсин в организме является не только ферментом поджелудочной железы, но и сигнальной молекулой, которая вовлечена в процессы метаболизма и поддержания здоровья органов и тканей.

Долгое время считалось, что трипсин синтезируется только в поджелудочной железе. Результаты изучения образцов непанкреатических тканей человека и мыши показали (79), что ген трипсина экспрессируется на высоком уровне в поджелудочной железе, селезенке и значительно в тонком кишечнике. Гибридизация *in situ* и иммуногистохимический анализ выявили экспрессию трипсина в эпителиальных клетках кожи, пищевода, желудка, тонкой кишки, легких, почек, печени и внепеченочных желчных протоков, а также в клетках селезенки и нейронах. В селезенке трипсин обнаружен в макрофагах, моноцитах и лимфоцитах в белой пульпе, в головном мозге — в нервных клетках гиппокампа и коры (79). Такое широкое распределение трипсина предполагает его общую роль в поддержании нормальных функций эпителиальных клеток, системы иммунной защиты и центральной нервной системы (79).

Также открыты рецепторы (PAR2), которые активируются трипсином (80). Трипсин является основной протеазой, активирующей PAR2, которая инициирует передачу сигналов при воспалении (81). Рецептор PAR2 локализуется на апикальной и базолатеральной мембранах клеток эпителия кишечника (82, 83) и может стимулироваться трипсином, триптазой и бактериальными протеазами (84). PAR2 также присутствует в мембране клеток иммунной системы, стромальных и эндотелиальных клеток. Системно стимуляция PAR2 способствует свертыванию крови, адгезии и экстравазации лейкоцитов (85). Таким образом, можно предположить, что повышение активности трипсина в молоке и крови больных маститом коров связано с активацией рецепторов PAR2 в эпителиальных клетках молочной железы и лейкоцитах крови.

В представленной работе нами впервые выявлена активность трипсина в молоке здоровых коров и отмечено ее значительное повышение при мастите, что указывает на связь трипсина с воспалительной реакцией в молочной железе. Ранее мы изучили роль трипсина при экспериментальном токсикозе кур (19) и изменении рационов (20). В специальной литературе отмечается множественность локализации (80) и функций трипсина (84, 85), в том числе как элемента сигнальной системы (17). Таким образом, активность трипсина можно рассматривать в качестве маркера нарушений гомеостаза. Связь активности трипсина в молоке с маститом и его физиолого-биохимическими проявлениями ранее не исследовалась.

Мы дополнительно выполнили биохимический и морфологический анализ крови и определили в пробах молока SCC, DSCC и уровень экспрессии основных генов иммунитета. Оказалось, что у больных маститом коров, наряду с 2-кратным повышением активности трипсина, кратно возросли показатели SCC, DSCC и экспрессия генов *MCP-1*, *MCP-2*, *TNF- $\alpha$* , *IL4* и *IL8*. Выявленные кратные увеличения активности трипсина и генной экспрессии дают основания полагать, что, сочетая эти показатели, можно разработать тест, чувствительность которого будет достаточной для ранней диагностики субклинических форм мастита и предмаститных состояний. Сравнение этих показателей в динамике, начиная с предмаститных со-

стояний, и при маститах разной этиологии даст новые знания о механизмах развития и течения этой патологии. На следующем этапе исследований мы также планируем определить экспрессию гена трипсина у коров в норме и при маститах.

Итак, результаты выполненного нами исследования позволяют сделать следующие выводы. У здоровых коров в молоке впервые обнаружен фермент трипсин, активность которого составляет  $48,2 \pm 3,8$  ед/л, что сопоставимо с показателем в сыворотке крови. При воспалении молочной железы, которое сопровождалось увеличением числа соматических клеток (somatic cell count, SCC) в молоке в 3,3 раза ( $p < 0,01$ ) по сравнению с молоком здоровых животных, активность трипсина повышалась в 2,0 раза. В крови коров, больных маститом, количество глюкозы было выше на 67,4 % ( $p < 0,05$ ), общего кальция — на 38,8 % ( $p < 0,05$ ), содержание фосфора — наоборот, ниже на 23,8 % ( $p < 0,05$ ), чем у здоровых животных, то есть по этим биохимическим показателям крови реакция организма на развитие патологии оказалась существенно ниже, чем по SCC и трипсину в молоке. Соотношение лимфоцитов и нейтрофилов у маститных коров снижалось на 20,4 %, иммунореактивность — на 42,5 %, количество эозинофилов — на 57,4 %, базофилов — на 33,3 %, количество моноцитов увеличивалось на 46,5 %, что также значительно ниже кратных изменений SCC и активности трипсина в молоке. У больных маститом коров по сравнению со здоровыми повысилась экспрессия связанных с воспалением генов моноцитарного хемотаксического протеина 1 (monocyte chemoattractant protein 1) в 5,5 раза, моноцитарного хемотаксического протеина 2 — 9-кратно, фактора некроза опухоли — в 3,9 раза, генов интерлейкина 4 и интерлейкина 8 — соответственно в 2,9 раза и 14-кратно. Выявленные большие различия по активности трипсина в молоке и экспрессии генов, ассоциированных с воспалениями, в норме и при мастите создают перспективу для разработки на этой основе диагностического теста, чувствительность которого будет достаточной для раннего выявления субклинических форм мастита и предмаститных состояний.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Cheng W.N., Han S.G. Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments — a review. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.*, 2020, 33(11): 1699-1713 (doi: 10.5713/ajas.20.0156).
2. Belay N., Mohammed N., Seyoum W. Bovine mastitis: prevalence, risk factors, and bacterial pathogens isolated in lactating cows in Gamo Zone, Southern Ethiopia. *Vet. Med. (Auckl.)*, 2022, 13: 9-19 (doi: 10.2147/VMRR.S344024).
3. Mukhamadieva N., Julianov M., Zainettinova D., Stefanik V., Nurzhumanova Z., Mukataev A., Suychinov A. Prevalence, diagnosis and improving the effectiveness of therapy of mastitis in cows of dairy farms in East Kazakhstan. *Vet. Sci.*, 2022, 9(8): 398 (doi: 10.3390/vetsci9080398).
4. Титов В.Ю., Фисинин В.И. *Способ ранней диагностики маститов у коров. Патент RU 2 371 717 C1. ГНУ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства (РУ). Заявл. 2008.02.04. Оpubл. 2009.10.27.*
5. Saleem H.D., Razooqi M.A., Gharban H.A.J. Cumulative effect of sub-clinical mastitis on immunological and biochemical parameters in cow milk. *Arch. Razi. Inst.*, 2021, 76(6): 1629-1638 (doi: 10.22092/ari.2021.356311.1819).
6. Braun U., Gerspach C., Riond B., Oschlies C., Corti S., Bleul U. Haematological findings in 158 cows with acute toxic mastitis with a focus on the leukogram. *Acta Vet. Scand.*, 2021, 63(1): 11 (doi: 10.1186/s13028-021-00576-0).
7. Watanabe A., Yagi Y., Shiono H., Yokomizo Y., Inumaru S. Effects of intramammary infusions of interleukin-8 on milk protein composition and induction of acute-phase protein in cows during mammary involution. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 2008, 72(3): 291-296.
8. Vitenberga-Verza Z., Pilmane M., Šerštopva K., Melderis I., Gontar Ł., Kochański M., Dru-towska A., Maryti G., Prieto-Simyn B. Identification of inflammatory and regulatory cytokines IL-1-, IL-4-, IL-6-, IL-12-, IL-13-, IL-17A-, TNF- $\alpha$ -, and IFN- $\gamma$ -producing cells in the milk of dairy cows with subclinical and clinical mastitis. *Pathogens*, 2022, 11(3): 372 (doi:

- 10.3390/pathogens11030372).
9. Pilla R., Schwarz D., König S., Piccinini R. Microscopic differential cell counting to identify inflammatory reactions in dairy cow quarter milk samples. *Journal of Dairy Science*, 2012, 95(8): 4410–4420 (doi: 10.3168/jds.2012-5331).
  10. Rothman S., Leibow C., Isenman L. Conservation of digestive enzymes. *Physiological Reviews*, 2002, 82(1): 1–18 (doi: 10.1152/physrev.00022.2001).
  11. Коротыко Г.Ф. Формирование ферментного компонента секретов пищеварительных желез (обзор). *Физическая культура, спорт — наука и практика*, 2013, 1: 51–57.
  12. Вертипрахов В.Г., Грозина А.А., Долгорукова А.М. Активность ферментов поджелудочной железы у цыплят-бройлеров на разных этапах пищеварения. *Сельскохозяйственная биология*, 2016, 51(4): 509–515 (doi: 10.15389/agrobiology.2016.4.509rus).
  13. Пермяков Н.К., Подольский А.Е., Титова Г.П. *Ультроструктурный анализ секреторного цикла поджелудочной железы*. М., 1973.
  14. Каримова Ш.Ф., Юлдашев Н.М., Исмаилова Г.О., Нишантаев М.К. Биохимия молока. *Успехи современного естествознания*, 2015, 9–3: 422–428.
  15. Shahani K.M., Kwan A.J., Friend B.A. Role and significance of enzymes in human milk. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1980, 33(8): 1861–1868 (doi: 10.1093/ajcn/33.8.1861).
  16. Freed L.M., Berkow S.E., Hamosh P., York C.M., Mehta N.R., Hamosh M. Lipases in human milk: effect of gestational age and length of lactation on enzyme activity. *J. Am. Coll. Nutr.*, 1989, 8(2): 143–150 (doi: 10.1080/07315724.1989.10720289).
  17. Ramachandran R., Hollenberg M.D. Proteinases and signalling: pathophysiological and therapeutic implications via PARs and more. *Br. J. Pharmacol.*, 2008, 153: 263–282 (doi: 10.1038/sj.bjp.0707507).
  18. Вертипрахов В.Г., Гогина Н.Н., Овчинникова Н.В. Новый подход к оценке здоровья кишечника у птиц. *Ветеринария*, 2020, 7: 56–59.
  19. Вертипрахов В.Г., Грозина А.А., Гогина Н.Н., Кислова И.В., Овчинникова Н.В., Кошеева М.В. Содержание Т-2 и НТ-2 токсинов, активность ферментов в кишечнике и гематологический статус цыплят-бройлеров (*Gallus gallus* L.) при экспериментальном Т-2 токсикозе. *Сельскохозяйственная биология*, 2021, 56(4): 682–694 (doi: 10.15389/agrobiology.2021.4.682rus).
  20. Вертипрахов В.Г., Грозина А.А., Фисинин В.И. Внешнесекреторная функция поджелудочной железы кур-несушек (*Gallus gallus* L.) при добавлении в корм различных растительных масел. *Сельскохозяйственная биология*, 2020, 5(4): 726–737 (doi: 10.15389/agrobiology.2020.4.726rus).
  21. Сермягин А.А., Лашнева И.А., Косицин А.А., Игнатъева Л.П., Артемьева О.А., Sölkner J., Зиновьева Н.А. Морфологический состав соматических клеток в молоке коров как критерий оценки здоровья молочной железы в связи с продуктивностью и компонентами молока. *Сельскохозяйственная биология*, 2021, 56(6): 1183–1198 (doi: 10.15389/agrobiology.2021.6.1183rus).
  22. Вертипрахов, В.Г., Грозина, А.А. Оценка состояния поджелудочной железы методом определения активности трипсина в крови птицы. *Ветеринария*, 2018, 6: 51–54 (doi: 10.30896/0042-4846.2018.21.12.51-54).
  23. Zaros L.G., Bricarello P.A., Amarante A.F.T., Coutinho L.L. Quantification of bovine cytokine gene expression using real-time RT-PCR methodology. *Genetics and Molecular Biology*, 2007, 30(3): 575–579 (doi: 10.1590/s1415-47572007000400012).
  24. Meza Cerda M.-I., Gray R., Higgins D.P. Cytokine RT-qPCR and ddPCR for immunological investigations of the endangered Australian sea lion (*Neophoca cinerea*) and other mammals. *PeerJ*, 2020, 8: e10306 (doi: 10.7717/peerj.10306).
  25. Laptsev G.Y., Filippova V.A., Kochish I.I., Yildirim E.A., Ilina L.A., Dubrovin A. V., Brazhnik E.A., Novikova N.I., Novikova O.B., Dmitrieva M.E., Smolensky V.I., Surai P.F., Griffin D.K., Romanov M.N. Examination of the expression of immunity genes and bacterial profiles in the caecum of growing chickens infected with *Salmonella enteritidis* and fed a phytobiotic. *Animals*, 2019, 9(9): 615 (doi: 10.3390/ani9090615).
  26. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408 (doi: 10.1006/meth.2001.1262).
  27. Овчинникова Н.В., Кислова И.В., Толпыго С.М. Анализ иммунологических показателей крови у крыс при воздействии физиологических стрессорных факторов (голод, жажда). *Сб. тезисов конференции с международным участием, посвящённой 100-летию МГМСУ им. А.И. Евдокимова «Медицинская физика, физиология и смежные дисциплины в академической и вузовской науке»*. М., 2022: 373–376.
  28. Вертипрахов В.Г., Борисенко К.В., Овчинникова Н.В., Сирухи М.Н. Влияние кормовой добавки СИНКРА™ на биохимические и морфологические показатели крови цыплят-бройлеров. *Птица и птицепродукты*, 2020, 3: 42–45 (doi: 10.30975/2073-4999-2020-22-3-42-45).
  29. Zhang R., Zhu W., Mao S. High-concentrate feeding upregulates the expression of inflammation-related genes in the ruminal epithelium of dairy cattle. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2016, 7: 42 (<https://doi.org/10.1186/s40104-016-0100-1>).
  30. Karthikeyan A., Radhika G., Aravindhakshan T.V., Anilkumar K. Expression profiling of innate immune genes in milk somatic cells during subclinical mastitis in crossbred dairy cows. *Animal Biotechnology*, 2016, 27(4): 303–309 (doi: 10.1080/10495398.2016.1184676).
  31. Khan M.Z., Khan A., Xiao J., Ma J., Ma Y., Chen T., Shao D., Cao Z. Overview of research

- development on the role of NF- $\kappa$ B signaling in mastitis. *Animals*, 2020, 10(9): 1625 (doi: 10.3390/ani10091625).
32. Khan M.Z., Khan A., Xiao J., Ma Y., Ma J., Gao J., Cao Z. Role of the JAK-STAT pathway in bovine mastitis and milk production. *Animals*, 2020, 10(11): 2107 (doi: 10.3390/ani10112107).
  33. Wiggins G.R., Sonstegard T.S., VanRaden P.M., Matukumalli L.K., Schnabel R.D., Taylor J.F., Schenkel F.S., Van Tassell C.P. Selection of single-nucleotide polymorphisms and quality of genotypes used in genomic evaluation of dairy cattle in the united states and Canada. *Journal of Dairy Science*, 2009, 92: 3431-3436 (doi: 10.3168/jds.2008-1758).
  34. Alluwaimi A.M. The cytokines of bovine mammary gland: prospects for diagnosis and therapy. *Research in Veterinary Science*, 2004, 77: 211-222 (doi: 10.1016/j.rvsc.2004.04.006).
  35. Shah K.N., Valand P., Nauriyal D.S., Joshi C.G. Immunomodulation of IL-1, IL-6 and IL-8 cytokines by *Prosopis juliflora* alkaloids during bovine sub-clinical mastitis. *3 Biotech.*, 2018, 8: 409 (doi: 10.1007/s13205-018-1438-1).
  36. Murphy M.P., Niedziela D.A., Leonard F.C., Keane O.M. The in vitro host cell immune response to bovine-adapted *Staphylococcus aureus* varies according to bacterial lineage. *Scientific Reports*, 2019, 9: 6134 (doi: 10.1038/s41598-019-42424-2).
  37. Krukowski H., Lassa H., Zastempowska E., Smulski S., Bis-Wencel H. Etiological agents of bovine mastitis in Poland. *Medycyna Weterynaryjna*, 2020, 76: 221-225 (doi: 10.21521/mw.6339).
  38. Sztachańska M., Barański W., Janowski T., Pogorzelska J., Zduńczyk S. Prevalence and etiological agents of subclinical mastitis at the end of lactation in nine dairy herds in North-East Poland. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 2016, 19: 119-124 (doi: 10.1515/pjvs-2016-0015).
  39. Jagielski T., Roeske K., Bakula Z., Piech T., Wlazlo Ł., Bochniarz M., Woch P., Krukowski H. A survey on the incidence of *Prototheca* mastitis in dairy herds in Lublin Province. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 2019, 102: 619-628 (doi: 10.3168/jds.2018-15495).
  40. Watts J.L. Etiological agents of bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 1988, 16: 41-66 (doi: 10.1016/0378-1135(88)90126-5).
  41. Jagielski T., Krukowski H., Bochniarz M., Piech T., Roeske K., Bakula Z., Wlazlo Ł., Woch P. Prevalence of *Prototheca* spp. on dairy farms in Poland — a cross-country study. *Microbial Biotechnology*, 2019, 12: 556-566 (doi: 10.1111/1751-7915.13394).
  42. Rainard P., Riollet C. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Veterinary Research*, 2006, 37: 369-400 (doi: 10.1051/vetres:2006007).
  43. Moyes K.M., Drackley J.K., Morin D.E., Loor J.J. Greater expression of TLR2, TLR4, and IL6 due to negative energy balance is associated with lower expression of HLA-DRA and HLA-a in bovine blood neutrophils after intramammary mastitis challenge with *Streptococcus uberis*. *Functional and Integrative Genomics*, 2010, 10: 53-61 (doi: 10.1007/s10142-009-0154-7).
  44. Rainard P., Riollet C. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Veterinary Research*, 2006, 37: 369-400 (doi: 10.1051/vetres:2006007).
  45. Zhang Y., Lu Y., Ma L., Cao X., Xiao J., Chen J., Jiao S., Gao Y., Liu C., Duan Z., Li D., He Y., Wei B., Wang H. Activation of vascular endothelial growth factor receptor-3 in macrophages restrains TLR4-NF- $\kappa$ B signaling and protects against endotoxin shock. *Immunity*, 2014, 40(4): 501-514 (doi: 10.1016/j.immuni.2014.01.013).
  46. Schukken Y.H., Gunther J., Fitzpatrick J., Fontaine M.C., Goetze L., Holst O., Leigh J., Petzl W., Schuberth H.J., Sipka A., Smith D.G., Quesnell R., Watts J., Yancey R., Zerbe H., Gurjar A., Zadoks R.N., Seyfert H.M.; members of the Pfizer mastitis research consortium. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2011, 144: 270-289 (doi: 10.1016/j.vetimm.2011.08.022).
  47. Liu Y., Zhang J., Zhou Y.H., Zhang H.M., Wang K., Ren Y., Jiang Y.N., Han S.P., He J.J., Tang X.J. Activation of the IL-6/JAK2/STAT3 pathway induces plasma cell mastitis in mice. *Cytokine*, 2018, 110: 150-158 (doi: 10.1016/j.cyto.2018.05.002).
  48. Khan M.Z., Dari G., Khan A., Yu Y. Genetic polymorphisms of *TRAPPC9* and *CD4* genes and their association with milk production and mastitis resistance phenotypic traits in Chinese Holstein. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, 23: 9 (doi: 10.3389/fvets.2022.1008497).
  49. Bannerman D.D. Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. *Journal of Animal Science*, 2009, 87: 10-25 (doi: 10.2527/jas.2008-1187).
  50. Kawabata A., Matsunami M., Sekiguchi F. Gastrointestinal roles for proteinase-activated receptors in health and disease. Review. *British Journal of Pharmacology*, 2008, 153: 230-240 (doi: 10.1038/sj.bjpp.0707491).
  51. Kirsanova E., Heringstad B., Lewandowska-Sabat A., Olsaker I. Identification of candidate genes affecting chronic subclinical mastitis in Norwegian Red cattle: combining genome-wide association study, topologically associated domains and pathway enrichment analysis. *Animal Genetics*, 2020, 51(1): 22-31 (doi: 10.1111/age.12886).
  52. Mount J.A., Karrow N.A., Caswell J.L., Boermans H.J., Leslie K.E. Assessment of bovine mammary chemokine gene expression in response to lipopolysaccharide, lipoteichoic acid + peptidoglycan, and CpG oligodeoxynucleotide 2135. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 2009, 73: 49-57.

53. Yu C., Shi Z.R., Chu C.Y., Lee K.H., Zhao X., Lee J.W. Expression of bovine granulocyte chemotactic protein-2 (GCP-2) in neutrophils and a mammary epithelial cell line (MAC-T) in response to various bacterial cell wall components. *The Veterinary Journal*, 2010, 186: 89-95 (doi: 10.1016/j.tvjl.2009.07.012).
54. Kalliolias G.D., Ivashkiv L.B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nature Reviews Rheumatology*, 2016, 12: 49-62 (doi: 10.1038/nrrheum.2015.169).
55. Ahmad S., Azid N.A., Boer J.C., Lim J., Chen X., Plebanski M., Mohamud R. The key role of TNF-TNFR2 interactions in the modulation of allergic inflammation: a review. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 2572 (doi: 10.3389/fimmu.2018.02572).
56. Zhao C., Liu G., Li X., Guan Y., Wang Y., Yuan X., Sun G., Wang Z., Li X. Inflammatory mechanism of Rumenitis in dairy cows with subacute ruminal acidosis. *BMC Veterinary Research*, 2018, 14(1): 135 (doi: 10.1186/s12917-018-1463-7).
57. Cai Z., Guldbandsen B., Lund M.S., Sahana G. Prioritizing candidate genes post-GWAS using multiple sources of data for mastitis resistance in dairy cattle. *BMC Genomics*, 2018, 19: 656 (doi: 10.1186/s12864-018-5050-x).
58. Blum J.W., Dosogne H., Hoeben D., Vangroenweghe F., Hammon H.M., Bruckmaier R.M., Burvenich C. Tumor necrosis factor-alpha and nitrite/nitrate responses during acute mastitis induced by *Escherichia coli* infection and endotoxin in dairy cows. *Domestic Animal Endocrinology*, 2000, 19(4): 223-235 (doi: 10.1016/s0739-7240(00)00079-5).
59. Li X., Kurner H., Liu X. Susceptibility to intracellular infections: contributions of TNF to immune defense. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1643 (doi: 10.3389/fmicb.2020.01643).
60. Ezzat Alnakip M., Quintela-Baluja M., Böhme K., Fernández-No I., Caamaco-Antelo S., Calomata P., Barros-Velázquez J. The Immunology of mammary gland of dairy ruminants between healthy and inflammatory conditions. *Journal of Veterinary Medicine*, 2014, 2014: 659801 (doi: 10.1155/2014/659801).
61. Karo-Atar D., Bitton A., Benhar I., Munitz A. Therapeutic targeting of the interleukin-4/interleukin-13 signaling pathway: in allergy and beyond. *BioDrugs*, 2018, 32: 201-220 (doi: 10.1007/s40259-018-0280-7).
62. Heeb L.E.M., Egholm C., Impellizzeri D., Ridder F., Boyman O. Regulation of neutrophils in type 2 immune responses. *Current Opinion in Immunology*, 2018, 54: 115-122 (doi: 10.1016/j.coi.2018.06.009).
63. Fonseca I., Silva P.V., Lange C.C., Guimarães M.F.M., Weller M.M.D.C.A., Sousa K.R.S., Lopes P.S., Guimarães J.D., Guimarães S.E.F. Expression profile of genes associated with mastitis in dairy cattle. *Genetics and Molecular Biology*, 2009, 32: 776-781 (doi: 10.1590/S1415-47572009005000074).
64. Ivashkiv L.B. IFN $\gamma$  signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* 2018, 18: 545-558 (doi: 10.1038/s41577-018-0029-z).
65. Kak G., Raza M., Tiwari B.K. Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ): exploring its implications in infectious diseases. *Biomolecular Concepts*, 2018, 9: 64-79 (doi: 10.1515/bmc-2018-0007).
66. Bochniarz M., Zdzisińska B., Wawron W., Szczubiał M., Dąbrowski R. Milk and serum IL-4, IL-6, IL-10, and amyloid A concentrations in cows with subclinical mastitis caused by coagulase-negative Staphylococci. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100: 9674-9680 (doi: 10.3168/jds.2017-13552).
67. Baggolini M., Dewald B., Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. *Advances in Immunology*, 1994, 55: 97-179 (doi: 10.1016/S0065-2776(08)60509-X).
68. Barber M.R., Pantschenko A.G., Hinckley L.S., Yang T.J. Inducible and constitutive in vitro neutrophil chemokine expression by mammary epithelial and myoepithelial cells. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 1999, 6: 791-798 (doi: 10.1128/CDLI.6.6.791-798.1999).
69. Boudjellab N., Chan-Tang H.S., Li X., Zhao X. Interleukin 8 response by bovine mammary epithelial cells to lipopolysaccharide stimulation. *American Journal of Veterinary Research*, 1998, 59: 1563-1567.
70. Caswell J.L., Middleton D.M., Gordon J.R. Production and functional characterization of recombinant bovine interleukin-8 as a specific neutrophil activator and chemoattractant. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1999, 67: 327-340 (doi: 10.1016/s0165-2427(99)00007-0).
71. Bannerman D.D., Paape M.J., Lee J.-W., Zhao X., Hope J.C., Rainard P. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2004, 11: 463-472 (doi: 10.1128/CDLI.11.3.463-472.2004).
72. Barber M.R., Yang T.J. Chemotactic activities in nonmastitic and mastitic mammary secretions: Presence of interleukin-8 in mastitic but not nonmastitic secretions. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 1998, 5: 82-86 (doi: 10.1128/CDLI.5.1.82-86.1998).
73. Stojkovic B., McLoughlin R.M., Meade K.G. In vivo relevance of polymorphic interleukin 8 promoter haplotype for the systemic immune response to LPS in Holstein-Friesian calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2016, 182: 1-10 (doi: 10.1016/j.vetimm.2016.09.006).
74. De Matteis G., Scata M.C., Grandoni F., Crisa A., O'Brien M.B., Meade K.G., Catillo G. Effect of IL8 haplotype on immunological traits in periparturient dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2021, 238: 110288 (doi: 10.1016/j.vetimm.2021.110288).

75. De Matteis G., Scata M.C., Catillo G., Grandoni F., Rossi E., Zilio D.M., Crisa A., Lopreiato V., Trevisi E., Barile V.L. Comparison of metabolic, oxidative and inflammatory status of Simmental×Holstein crossbred with parental breeds during the peripartal and early lactation periods. *Journal of Dairy Research*, 2021, 88(3): 253-260 (doi: 10.1017/S0022029921000650).
76. Pawlik A., Sender G., Kapera M., Korwin-Kossakowska A. Association between interleukin 8 receptor  $\alpha$  gene (CXCR1) and mastitis in dairy cattle. *Central European Journal of Immunology*, 2015, 40(2): 153-158 (doi: 10.5114/ceji.2015.52828).
77. Vertiprakhov V.G., Ovchinnikova N.V. The activity of trypsin in the pancreatic juice and blood of poultry increases simultaneously in the postprandial period. *Frontiers in Physiology*, 2022, 13: 874664 (doi: 10.3389/fphys.2022.874664).
78. Титов В.Ю., Петренко Ю.М., Ванин А.Ф. Механизм ингибирования каталазы нитро- и нитрозосоединениями. *Биохимия*, 2008, 73: 113-118.
79. Koshikawa N., Hasegawa S., Nagashima Y., Mitsuhashi K., Tsubota Y., Miyata S., Miyagi Y., Yasumitsu H., Miyazaki K. Expression of trypsin by epithelial cells of various tissues, leukocytes, and neurons in human and mouse. *Am. J. Pathol.*, 1998, 153(3): 937-944 (doi: 10.1016/S0002-9440(10)65635-0).
80. Guenther F., Melzig M.F. Protease-activated receptors and their biological role — focused on skin inflammation. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2015, 67(12): 1623-1633 (doi: 10.1111/jphp.12447).
81. Mihara K., Ramachandran R., Saifeddine M., Hansen K., Renaux B., Polley D., Gibson S., Vanderboor C., Hollenberg M.D. Thrombin-mediated direct activation of proteinase-activated receptor-2: another target for thrombin signaling. *Mol. Pharmacol.*, 2016, 89(5): 606-614 (doi: 10.1124/mol.115.102723).
82. Cenac N., Coelho A.-M., Nguyen C., Compton S., Andrade-Gordon P., MacNaughton W.K., Wallace J.L., Hollenberg M.D., Bunnett N.W., Garcia-Villar R., Bueno L., Vergnolle N. Induction of intestinal inflammation in mouse by activation of proteinase-activated receptor-2. *Am. J. Pathol.*, 2002, 161(5): 1903-1915 (doi: 10.1016/S0002-9440(10)64466-5).
83. Cuffe J.E., Bertog M., Velázquez-Rocha S., Dery O., Bunnett N., Korbmacher C. Basolateral PAR-2 receptors mediate KCl secretion and inhibition of Na<sup>+</sup> absorption in the mouse distal colon. *J. Physiol.*, 2002, 539(Pt 1): 209-222 (doi: 10.1113/jphysiol.2001.013159).
84. Holzhausen M., Spolidorio L.C., Ellen R.P., Jobin M.C., Steinhoff M., Andrade-Gordon P., Vergnolle N. Protease-activated receptor-2 activation: a major role in the pathogenesis of *Porphyromonas gingivalis* infection. *Am. J. Pathol.*, 2006, 168(4): 1189-1199 (doi: 10.2353/ajpath.2006.050658).
85. Vergnolle N. Proteinase-activated receptor-2-activating peptides induce leukocyte rolling, adhesion, and extravasation in vivo. *J. Immunol.*, 1999, 163(9): 5064-5069.

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО Российский государственный аграрный университет—МСХА им. К.А. Тимирязева, 127550 Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49, e-mail: Vertiprakhov63@mail.ru ✉, m\_selin@mail.ru, malorodov56@gmail.com;

Поступила в редакцию  
30 марта 2023 года

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный аграрный университет, 196601 Россия, г. Санкт-Петербург, Петербургское ш., 2, e-mail: georg-laptev@rambler.ru, ilina@spbgaу

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2023, V. 58, № 4, pp. 685-699

## MILK TRYPSIN CLEAR INCREASES UNDER BOVINE MASTITIS SIMULTANEOUSLY WITH INFLAMMATION GENE EXPRESSION

V.G. Vertiprakhov<sup>1</sup> ✉, M.I. Selionova<sup>1</sup>, V.V. Malorodov<sup>1</sup>, G.Yu. Laptev<sup>2</sup>, L.A. Ilyina<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Russian State Agrarian University — Timiryazev Moscow Agricultural Academy, 49, ul. Timiryazevskaya, Moscow, 127550 Russia, e-mail Vertiprakhov63@mail.ru (✉ corresponding author), m\_selin@mail.ru, malorodov56@gmail.com;

<sup>2</sup>Saint-Petersburg State Agrarian University, 2, Peterburgskoe sh., St. Petersburg—Pushkin, 196601 Russia, e-mail georg-laptev@rambler.ru, ilina@biotrof.ru

ORCID:

Vertiprakhov V.G. orcid.org/0000-0002-3240-7636

Laptev G.Yu. orcid.org/0000-0002-8795-6659

Selionova M.I. orcid.org/0000-0002-9501-8080

Ilyina L.A. orcid.org/0000-0003-2789-4844

Malorodov V.V. orcid.org/0000-0001-9033-7552

The authors declare no conflict of interests

Final revision received March 30, 2023

doi: 10.15389/agrobiologia.2023.4.685eng

Accepted June 9, 2023

### Abstract

Mastitis is one of the most serious problems in dairy farming. Mastitis often affects high-

yielding cows, with a 10-15 % reduction in productivity and irreversible mammary gland dysfunction. In clinical course pathology has clear diagnostic signs. The main known methods of diagnostics of subclinical forms of mastitis (mastitis tests) are based on the determination of somatic cells in milk, the number of which correlates with inflammation, but the development of methods for early diagnosis of mastitis and pre-mastitis state of cows remains relevant. Biochemical parameters and morphological profiles of animal blood, expression of genes associated with inflammation are also examined in mastitis. However, the presence of enzymes in animal milk has not been fully studied. Trypsin is considered as a hormone-like substance capable of influencing metabolism and being a marker of inflammatory processes in animals and humans. Previously, we have shown the role of trypsin in experimental toxicosis of chickens and dietary changes. In the presented study we have for the first time revealed trypsin in the milk of cows, the increase in its activity in mastitis was established and compared with changes in other indicators used to assess the state of animals in pathology. The aim of the present work is to detect trypsin activity in milk of healthy and mastitis-affected cows and to determine the number of somatic cells in milk, relative expression of genes associated with inflammation, as well as morpho-biochemical blood parameters. The results obtained on Ayrshire cows (*Bos taurus*), 10 lactating cows without clinical signs of mastitis and 15 cows with clinical signs of mastitis (SGC Smena — a branch of the FSC VNITIP RAS, Moscow Province, 2022), showed that in the milk, the activity of genes associated with inflammation and the trypsin activity varied depending on the mammary gland health. In mastitis this index increased compared to the norm by 106.6 % ( $p \leq 0.05$ ), whereas trypsin activity in blood serum of healthy and mastitis cows had no significant differences. Of the biochemical parameters of cow blood, the most informative were the concentration of glucose, calcium and phosphorus. We found that in blood serum of mastitic cows the amount of glucose increases by 67.4% ( $p < 0.05$ ), calcium by 38.8% ( $p < 0.05$ ), the concentration of phosphorus, on the contrary, decreases by 23.8 % ( $p < 0.05$ ) compared to healthy animals. In the blood morphological profile at mastitis leukocytosis is observed, there is a decrease in immunoreactivity by 42,5 % ( $p < 0.05$ ), the ratio of lymphocytes and neutrophils by 20.4 % ( $p < 0.05$ ), the number of eosinophils by 57.4 % ( $p < 0.05$ ) and basophils by 33.3 % ( $p < 0.05$ ), while the number of monocytes increases by 46.5 % compared to the control ( $p < 0.05$ ). The expression of genes of monocyte chemotactic protein 1 and monocyte chemotactic protein 2 increased 5.5-fold, tumor necrosis factor alpha 3.9-fold, interleukin 4 and interleukin 8 2.9-fold and 14-fold, respectively, in cows with mastitis compared to healthy cows. Thus, we found that cow's milk contains trypsin, which is not inferior to the enzyme in the blood serum of animals in terms of activity ( $48.2 \pm 3.8$  units/l). In inflammation of the mammary gland confirmed by instrumental and molecular genetic methods, trypsin activity in milk increases, which can be used in the development of diagnostic methods for pre-mastitis and early stages of mastitis.

Keywords: cows, mastitis, milk trypsin, mastitis diagnostic methods.