

УДК 577.216:637.12 [619:618.19-002+636.2.034]+636.2.082.12:577.21

МикроРНК экзосом молока как эпигенетический маркер метаболизма и мастита у коров

Баркова О.Ю.

ВНИИГРЖ — филиал ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста,
Санкт-Петербург, Россия

Аннотация. Молоко как важнейший источник питания содержит широко известные белки, минералы, витамины и менее известные сигнальные молекулы в виде коротких некодирующих РНК как в свободном виде, так и содержащихся в экзосомах. Состав экзосомального груза динамичен и зависит от физиологического состояния организма, включая стадию лактации и здоровье молочной железы. Данный обзор посвящен теме таких ключевых эпигенетических компонентов, как микроРНК молока, заключенных в экзосомах. В обзоре рассмотрены представления о роли экзосомных микроРНК молока как генетического маркера продуктивности и здоровья молочного скота. Затронута тема формирования экзосом и механизм сортировки экзосомных грузов, большое внимание уделяется этапам биосинтеза микроРНК у млекопитающих и механизма воздействия на геном как главного эпигенетического посттранскрипционного фактора. Описаны работы по изучению профиля микроРНК молока в зависимости от стадии лактации и состояния здоровья молочной железы крупного рогатого скота. Представленные данные будут полезны для понимания организации, регуляции и эпигенетики микроРНК в молоке жвачных животных и открывают возможности для разработки новых диагностических и селекционных инструментов в животноводстве.

Ключевые слова: микроРНК, экзосомы, молоко, жвачные, мастит.

Для цитирования: Баркова О.Ю. МикроРНК экзосом молока как эпигенетический маркер метаболизма и мастита у коров // Успехи наук о животных. 2026. № 1. С. 58—74. doi: 10.25687/3034-493X.2026.6.1.004

Milk exosomal microRNA as an epigenetic marker of metabolism and mastitis in cows

O.Yu. Barkova

All-Russian Research Institute of Genetics and Farm Animal Breeding,
Branch of L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry
Saint Petersburg, Russia

Abstract. Milk, a vital source of nutrition, contains well-known proteins, minerals, vitamins, and lesser-known signaling molecules in the form of short non-coding RNAs, both free and contained in exosomes. The composition of the exosomal load is dynamic and depends on the physiological state of the organism, including the stage of lactation and mammary gland health. This review focuses on key epigenetic components such as milk microRNAs contained in exosomes. This review examines the role of milk exosomal microRNAs as a genetic marker of productivity and health in dairy cattle. It addresses the formation of exosomes and the mechanism of exosomal cargo sorting, focusing on the stages of microRNA biosynthesis in mammals and the mechanism of their influence on the genome as the main epigenetic post-transcription factor. Studies on the profile of milk microRNAs depending on the stage of lactation and mammary gland health in cattle are described. The presented data will be useful for understanding the organization, regulation and epigenetics of microRNAs in ruminant milk and opens up opportunities for the development of new diagnostic and selection tools in animal husbandry.

Keywords: microRNA, exosomes, milk, ruminants, mastitis.

For citation: Barkova OYu. Milk exosomal microRNA as an epigenetic marker of metabolism and mastitis in cows. Ernst Journal of Animal Science. 2026. 1: 58—74. Russian. doi: 10.25687/3034-493X.2026.6.1.004

Молоко и молочные продукты являются важными элементами здорового и сбалансированного питания человека. Помимо питательных и минеральных веществ (натрий, калий, кальций, железо, цинк, медь, магний и селен), витаминов (А, В, D, Е и К), молоко как секреторный продукт эпителиальных клеток молочных желез (МЭК) содержит большое количество биологических компонентов, включая гормоны, цитокины и хемокины, а также сигнальные молекулы в виде коротких некодирующих РНК у человека [1-3], крупного рогатого скота [4], коз и овец [5]. Молоко содержит самое большое количество внеклеточных микроРНК [1] в сравнении с другими жидкостями организма, где они представлены в различных формах: в свободном виде, в составе липопротеинов высокой плотности, в виде комплексов с РНК-связывающими белками, а также упакованные в биологически активные экзосомы, которые раскрывают свои функции в зависимости состава микроРНК [1,6]. Некоторые из этих исследований показали, что микроРНК также содержатся в сыворотке [4-5] и в коммерческих молочных продуктах, таких как сухие детские смеси, которые прошли строгие промышленные процессы [4, 5]. На количество, состав и концентрацию микроРНК экзосом, полученных из молока (EXO), влияет множество факторов таких как состояние здоровья молочной железы, питание и период лактации самки, а также условие обработки молока [7]. Стресс, иммунодепрессия и мастит вызывают дифференциальную экспрессию определенных микроРНК и модуляцию местного иммунного клеточного ответа [8]. Следовательно, изменения в экспрессии микроРНК в МЭК и молоке можно использовать в качестве маркера статуса здоровья животного, например, для выявления мастита и других патологических состояний. В последнее время подобная оценка образцов экзосомных микроРНК молока стала доступным высокоинформативным молекулярным подходом в диагностике, что может быть использовано для дальнейшей максимизации надоев и улучшения его качества.

Данный обзор посвящен экзосомным микроРНК как ключевым эпигенетическим компонентам молока жвачных. Подробно описано формирование экзосом и механизм сортировки грузов в экзосомах, большое внимание уделяется описанию состава микроРНК, этапам ее биосинтеза у млекопитающих и механизмам воздействия на геном как важного эпигенетического посттранскрипционного фактора. Описаны работы по изучению профиля микроРНК экзосом молока в зависимости от вида и состояния здоровья жвачных животных, охарактеризована роль некоторых микроРНК молока как генетических маркеров продуктивности молочного скота. Представленные данные будут полезны для понимания организации и эпигенетической регуляции микроРНК в молоке жвачных

Формирование экзосом и механизм сортировки грузов. Клетки прокариотов и эукариот вырабатывают внеклеточные везикулы (EV) как в результате своей нормальной физиологии, так и вследствие приобретенных патологий организма [9]. Внеклеточные везикулы были впервые обнаружены в плазме крови как частицы, полученные из тромбоцитов прокагулянта в 1946 году [10], а в более поздние годы экзосомы стали называть «тромбоцитарной пылью» [11]. В 1983 году Пэнном и Джонстон сообщили, что высвобождение рецепторов трансферрина во внеклеточное пространство во время созревания ретикулоцитов овцы было связано с выявлением небольших пузырьков еще неизвестной до конца морфологии [12,13], а в 1989 г. Джонстон дал определение таким функциональным везикулам как экзосомы [14].

Экзосомы (EXO) представляют собой связанные с мембраной везикулы в диапазоне от 40 до 160 нм в диаметре (в среднем около 100 нм) [9] и присутствуют практически во всех биологических жидкостях, таких как кровь, плазма, слезы, сперма, слюна, моча, спинномозговая, эпидидимальная и амниотическая жидкости, а также в молоке [15,16]. Экзосомы отличаются от других везикулярных тел сферической формой, сравнительно меньшим размером и жестким билипидным слоем, называемый рафтом [17]. Экзосомы

очень устойчивы к разрушению и могут выдерживать суровые внешние условия, такие как низкий pH (1), температуры кипения и замерзания, резко кислые желудочно-кишечные условия. Вышеуказанное свойство экзосом может быть задействовано в качестве транспортного механизма для доставки их содержимого, включая микроРНК, по всему организму через кровеносную систему у млекопитающих [18]. Экзосомы как переносчики грузов играют важную роль во многих биологических процессах, таких как ангиогенез, коагуляция, пролиферация и дифференцировка клеток, апоптоз, а также выполняют ключевые регуляторные функции в иммунной системе, включая доставку антигена, подавление и активацию иммунитета [19]. Кроме того, грузы экзосом влияют на физиологические и патологические процессы при различных заболеваниях и позволяют обмениваться антигенами или пептидами главного комплекса гистосовместимости между антиген-несущими клетками и антиген-презентирующими клетками [20].

Процесс формирования экзосом можно разделить на четыре стадии: инициация, эндоцитоз, формирование мультивезикулярных телец и секреция. На первом этапе путем двойной инвагинации плазматической мембраны клетки формируются ранние эндосомы, которые называются мультивезикулярными тельцами (MVB). В процессе созревания мультивезикулярное тельце может либо разрушаться лизосомами, либо перерабатываться аппаратом Гольджи [21], либо секретироваться в виде экзосом во внеклеточное пространство. Формирование экзосом начинается с отрастания поздних эндосом внутри мембраны мультивезикулярных тел (MVB), где эндосомы формируются во внутрипросветную везикулу (ILV). Высвобождение ILV во внеклеточное пространство в виде зрелых экзосом происходит после слияния с плазматической мембраной. Важно, что включение экзосомального груза и цитозольных элементов в презексомные тела происходит во время образования ILVs внутри MVBs. В то время как некоторые ILV сливаются с плазматическими мембранами, чтобы альтернативно продуцировать экзосомы, остальные ILV проходят путь деградации внутри лизосом [22]. Существуют два предполагаемых механизма сортировки экзосомального груза внутри MVBs. Один из них – это комплекс эндосомной сортировки (ESCRT), необходимый для транспорта белкового аппарата и ремоделирования мембран, который включает четыре отдельных белка ESCRT (ESCRT-0 – ESCRT-3) [23]. Для образования ILV необходимы четыре комплекса, ESCRT-0, -I, -II и -III, при этом ESCRT-0, -I и -II предположительно участвуют в сортировке грузов, а ESCRT-III – в деформации и делении мембраны. Этот механизм участвует в формировании MVBs и экзосом, а также помогает совместно сортировать их груз [24]. Вторым механизмом сортировки содержимого экзосомальных грузов в молочной железе – керамидный – реализуется за счёт активности фермента nSMase2, который способствует образованию экзосом независимо от ESCRT. Процесс сортировки идет на микродоменах, расположенных на рафтах, которые разделяют груз латерально внутри эндосомальной мембраны [22]. Считается, что микродомены содержат в больших количествах сфингомиелиназы, которые продуцируют керамиды путем гидролитического удаления фосфохолиновой части из сфингомиелина. Повсеместная специализированная мембранная платформа, известная как микродомен, обогащенная тетраспанином (TEM), включает сортировку рецепторов и сигнальных белков по компартментам в плазматической мембране [24], и наряду с TEM тетраспанин CD81 участвует в транспорте рецепторов-мишеней в направлении экзосом [25]. Конечный груз экзосом создается последующими взаимодействиями с другими внутриклеточными везикулами и органеллами, что способствует их разнообразию. Обычно в качестве клеточных коммуникаторов для целевой передачи сигнала используются щелевые соединения, взаимодействия белок / белок на поверхности клетки, растворимые секреторируемые факторы, такие как гормоны или цитокины. Кроме того, нуклеотиды, липиды или короткие белки участвуют в качестве электрических и химических средств

распространения сигналов от клетки к клетке. В зависимости от клеточного происхождения экзосомы могут содержать множество компонентов клетки, включая нуклеиновые кислоты, такие как матричная РНК (мРНК), микроРНК (микроРНК), рибосомная РНК (рРНК), длинная некодирующая РНК (lncRNA), транспортная РНК (tRNA), а также, в различной степени ДНК, липиды, метаболиты и белки [21]. Как и в других клетках, в эпителиальных клетках молочной железы (MECs) ключевую роль в сортировке играют специфические белки-«челноки» или РНК-связывающие белки (RBPs) такие как hnRNPA2B1. Этот белок распознает мкРНК с мотивами GGAG (EXOmotifs). Применительно к молоку он обеспечивает высокую концентрацию определенных иммуномодулирующих микроРНК. [26]. Другой белок-SYNCRIP (hnRNP Q) участвует в упаковке мкРНК через распознавание мотива GGCU для формирования специфического «профиля выживания» мкРНК в молоке [27], белок YBX1 необходим для упаковки таких мкРНК, как miR-223, которая в избытке встречается в молозиве и молоке и играет роль в развитии иммунной системы новорожденного [28]. Секретция уже нагруженных экзосом в просвет альвеол молочной железы контролируется белками семейства Rab. Эти белки Rab27a и Rab27b отвечают за транспорт MVB к апикальной мембране эпителиальных клеток и их последующее слияние для выброса экзосом в молоко [29].

Экзосомы успешно доставляют генетический материал к клеткам-мишеням и эффективно изменяют биологический ответ в клетке-реципиенту посредством трех механизмов взаимодействия: соединяются с поверхностно связанными лигандами для непосредственной стимуляции клеток-мишеней, переносят свой груз к клеткам-реципиентам через активированные рецепторы и через микроРНК эпигенетически репрограммируют липиды и функциональные белки. Активность экзосом и экзосомного груза различается в зависимости от типа исходной клетки и ее текущего состояния (т.е. дифференцированной, стимулированной, трансформированной или подвергнутой стрессу) [21]. Данное свойство экзосом может быть использовано для сбора диагностической информации о различных заболеваниях.

Биогенез и механизм работы микроРНК. МикроРНК представляют собой класс одноцепочечных коротких некодирующих молекул РНК длиной около 22 нуклеотидов, выявленных во многих клетках растений и животных, что указывает на их критическую клеточную регуляторную функцию [30]. Будучи важнейшими эпигенетическими компонентами, микроРНК участвуют в фундаментальных процессах, таких как пролиферация, эмбриональное развитие или дифференциация тканей, апоптоз, а также влияют на накопление жира, кроветворение и иммунитет [31]. МикроРНК могут регулировать до 60% экспрессии генов на посттранскрипционном уровне путем связывания с комплементарными молекулами РНК, что приводит к репрессии трансляции или деградации мРНК и изменению уровня клеточного белка в клетках различных типов тканей [30,31].

Биогенез зрелой микроРНК – сложный процесс, который начинается с транскрипции генов длинной молекулы РНК, расположенной внутри ядра клетки с помощью РНКазы II или РНКазы III [32]. Первичная микроРНК (при-микроРНК) характеризуется одной или несколькими шпильчатыми структурами «стебель-петля» размером несколько сотен нуклеотидов. В ходе процессинга с помощью фермента Дроша (Drosha) первичная микроРНК разрезается на отдельные двухцепочечные участки (шпильки). Полученные пре-микроРНК затем экспортируются из ядра в цитоплазму при помощи нуклеоцитоплазматических переносчиков — белка экспортина-5 (Exportin-5) и Ran-GTP [33]. В дальнейшем в работу включается эндорибонуклеаза Дайсер (Dicer), которая взаимодействует с 3'-концом шпильки, вырезает области петли и образует дуплекс, состоящий из двух цепей микроРНК ~ 22 п.н. [32]. Одна из этих двух цепей (обозначаемая

как 5p- и 3p-микроРНК) обычно разрушается, в то время как другая вовлекается в РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC) посредством частичного спаривания оснований, а РНК-геликаза управляет дальнейшим этапом созревания путем образования единственной цепи микроРНК. Ведущую роль в работе RISC играют белки семейства Argonaute (Ago). Эти белки необходимы для микроРНК-индуцированного выключения мРНК с помощью домена PAZ, взаимодействующего с участком на 3'-конце микроРНК и доменом PIWI, связывающего 5'-конец микроРНК [34]. Важную роль в процессинге и созревании микроРНК играют РНК-связывающие белки (RBPs), влияя на активность фермента Дроша, ядерный экспорт пре-К, расщепление пре-микроРНК ферментом (Dicer) и включение зрелой микроРНК в комплекс RISC (AGO) [34]. (Рисунок 1).

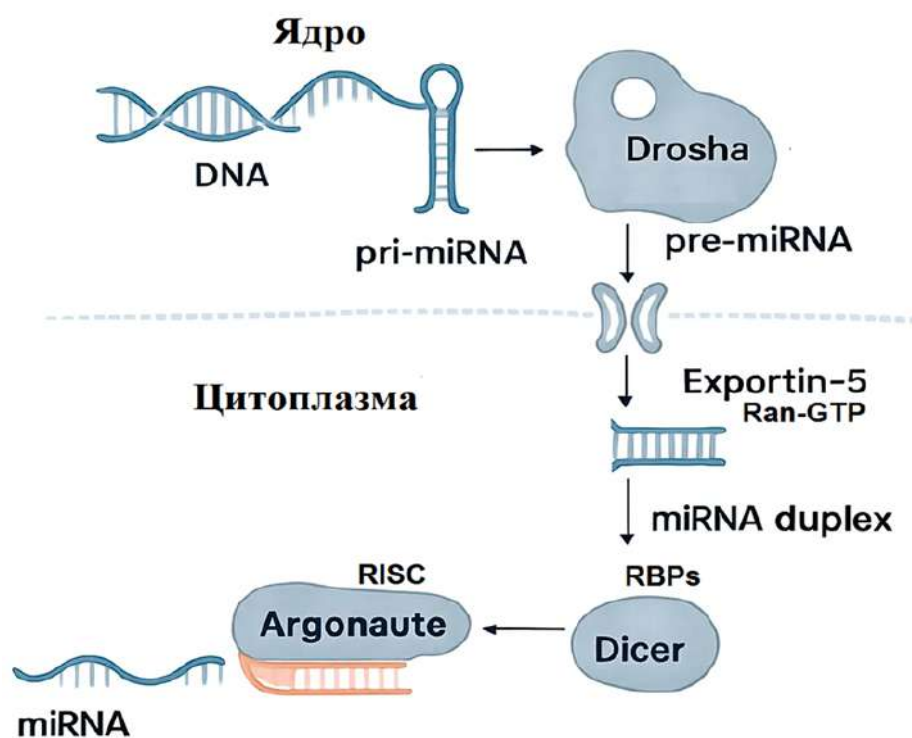


Рисунок 1. Схематическое изображение биогенеза микроРНК

Примечание: Pri-miRNA (при-микроРНК) — первичная длинная молекула-предшественник, синтезируемая в ядре; pre-miRNA (пре-микроРНК) — укороченная «шпилька» микроРНК, готовая к выходу из ядра; Drosha — фермент в ядре, который делает первый «разрез» при созревании микроРНК; Exportin-5 — белок-перевозчик, доставляющий микроРНК из ядра в цитоплазму; Dicer (Дайсер) — фермент в цитоплазме, который окончательно формирует зрелую микроРНК; miRNA duplex — промежуточная двухцепочечная форма микроРНК перед загрузкой в рабочий комплекс; RISC комплекс — многобелковую «машину», которая использует микроРНК для поиска и выключения генов-мишеней; Argonaute — главный рабочий белок комплекса RISC, который непосредственно блокирует или разрушает мРНК.

МикроРНК регулируются механизмами, аналогичными другим РНК, такими как активация или ингибирование транскрипции, эпигенетическая репрессия и контролируемая скорость деградации. Зрелая микроРНК снижает экспрессию генов-мишеней за счет связывания с комплементарными последовательностями в основном в 3' нетранслируемых областях (3' UTR) мРНК-мишени. Образование связи в 5' нетранслируемой области и кодирующей последовательности встречаются редко, но они существуют [31]. Для связывания микроРНК с мишенью часто достаточно ~7-8 комплементарных оснований, хотя более длинные участки комплементарности могут усиливать связывание. Концептуально и механически влияя на процесс РНК интерференции, микроРНК могут вызывать прямую

репрессию целевых генов. Существуют разнообразные механизмы, с помощью которых микроРНК снижают экспрессию родственных им белков-мишеней. Механизм деградации РНК может проходить путем индуцированного декапирования и деаденилирования, изменения связывания с белком-активатором катаболизма (CAP), снижения занятости рибосом, секвестрации мРНК из трансляционного аппарата. Эти механизмы не исключают друг друга и, как правило, приводят к снижению уровня мРНК, но иногда связывание микроРНК с промотором может увеличить экспрессию гена мишени [31]. В некоторых случаях микроРНК связывается с комплементарной областью в затравочной области (нуклеотиды 2–8 микроРНК), а также спариванием оснований в центральной области (основания ~ 9–12), вызывая расщепление мРНК и последующую деградацию. Эта специфическая для последовательности деградация зависит от гидролиза РНК, приводящего к устойчивому подавлению сайленсинга [35]. Поскольку процесс эндонуклеазного расщепления происходит при помощи фосфоэфирной связи, соединяющей нуклеотиды-мишени с 10–11 комплементарными основаниями микроРНК, несовпадения в этой области приводят к слабому расщеплению мишени за счет репрессии трансляции [36]. Однако есть данные, показывающие, что микроРНК могут вызывать деградацию мишени без полного расщепления мишени и многие мишени микроРНК деградируют, даже если им не хватает полной комплементарности [37]. Такие термины, как сайленсинг и даже нацеливание, предполагают, что репрессия цели микроРНК либо «включена», либо «выключена». Как правило, микроРНК не действуют, чтобы полностью выключить гены-мишени, а скорее снижают экспрессию генов. Относительный вклад деградации мРНК и репрессии трансляции был протестирован с использованием микрочипов и анализов профилирования рибосом. В результате было обнаружено, что основной механизм действия заключается в снижении уровней экспрессии целевой мРНК [38].

Однако не все функциональные взаимодействия микроРНК вызывают снижение экспрессии целевого гена. Например, miR-373 имеет последовательность, комплементарную промоторной последовательности как E-кадгерина (*E-cadherin*), так и белка C2, содержащего домен холодного шока (*CSDC2*). Трансфекция miR-373 вызвала повышенную экспрессию мРНК данных генов за счет воздействия на промотор РНК Pol II [39]. Некоторые микроРНК экспрессируются повсеместно в разных тканях, в то время как другие экспрессируются тканеспецифическим образом, например miR-122 специфичные для печени, а miR-124 для мозга [40]. Имеются также примеры сильной индукции микроРНК в определенное время развития. Например, РНК let-7 не была обнаружена на эмбриональных стадиях развития *C.elegans* L1 или L2; низкий уровень экспрессии был обнаружен на ранней стадии L3; а высокий уровень экспрессии был обнаружен на ранней стадии L4 и взрослой стадии. [41]. Однако чаще микроРНК экспрессируются в нескольких типах клеток и тканей и имеют разные уровни экспрессии, но редко соответствуют дихотомической схеме «включено или выключено». МикроРНК обладают потенциалом нацеливаться на сотни мРНК из-за несовершенной комплементарности, необходимой для связывания. Действительно, секвенирование РНК для мишеней микроРНК выявило сотни мишеней для одной микроРНК [42]. Это создает проблему для определения функциональной роли микроРНК. Один из способов определить функцию микроРНК или семейства микроРНК – выявить путь или клеточную функцию, которые она скорее всего изменяет с помощью методов прогнозирования основанных на идентификации регуляторных модулей микроРНК-мРНК (MRMs) и современных вычислительных подходов [31].

МикроРНК экзосом как эпигенетический маркер секреции молока. Экзосомные микроРНК молока участвуют в метаболических, деградационных и сигнальных путях [43,

44], а также влияют на важные физиологические и иммунологические функции клеток человека и животных *in vitro* [45]. Экзосомная микроРНК играет жизненно важную роль в передаче сигналов на межклеточном и межорганизменном уровнях. Помимо упаковки в экзосомы или микровезикулы, внеклеточные микроРНК могут быть загружены в липопротеины высокой плотности [45,46] или связаны белком AGO2 вне экзосом [47]. Все три режима упаковки защищают микроРНК от деградации и гарантируют их стабильность. О стабильности экзосомальных микроРНК молока свидетельствует выход неповрежденной общей РНК после скисания коровьего молока [48] и микроволнового нагрева, уменьшающее только на 40% микроРНК-29b, но не влияющего на выход микроРНК-200с [49]. Обработка ультразвуком экзосом коровьего молозива приводит к ингибированию иммунорегулирующей функции, что позволяет предположить, что целостность экзосомальной мембраны жизненно важна для модуляции функции экзосомальной микроРНК [50]. Более того, сообщается, что микроРНК остается стабильной в тканях при фиксации формалином и парафином [51, 52]. Другие методы обработки коровьего обезжиренного молока приводили к изменениям количества микроРНК, например, пастеризация и гомогенизация приводило к резкой потере микроРНК и количества экзосом [53].

МикроРНК молока продуцируются исключительно эпителиальными клетками молочной железы. Изменения микроРНК в молочной железе отражают изменения в экспрессии микроРНК в составе молока. Следовательно, анализ микроРНК молока рассматривается как эффективный способ проследить изменения в экспрессии микроРНК в молочной железе под влиянием различных факторов, а уникальные паттерны экспрессии микроРНК в молоке могут быть неинвазивными биомаркерами качества молока и молочных продуктов. [54,55]. Идентификация микроРНК как качественных показателей молока имеют отличный потенциал для всей молочной промышленности в области контроля качества молока. Для работы с микроРНК жвачных исследователи, как правило, используют общую базу данных miRBase (<https://www.mirbase.org/>) и базу данных RumimiR (<https://rumimir.sigena.org/>), созданную Bourdon и соавт. Она содержит набор микроРНК трех видов молочных жвачных (крупный рогатый скот, козы и овцы), полученные из разных тканей в зависимости от состояния здоровья животных и сообщает о различиях в уровне экспрессии микроРНК не только между видами, но и между породами одного вида [56].

Сообщалось о нескольких исследованиях, связанных с профилированием экспрессии микроРНК в молочной железе крупного рогатого скота. Z. Li и соавт. [57] сообщили о 283 известных микроРНК и 74 новых микроРНК в молочной железе коров голштинской породы, среди которых 56 микроРНК, имеют различия в экспрессии у лактирующих и нелактирующих коров, что свидетельствует об их участии в регуляции лактации, 9 из которых могут быть использованы как биомаркеры лактации (miR-100, miR-10a, miR-133a, miR-1, miR-146b, miR-148a, miR-221, miR-30f и miR-339b). B. Shen и соавт. идентифицировали 292 известных микроРНК и 116 новых микроРНК в эпителиальных клетках молочной железы крупного рогатого скота, и три из них (bta-miR-33a, bta-miR-152 и bta-miR-224) могут участвовать в метаболизме молочного жира [58]. R. Li и соавт. обнаружили 370 известных и 341 новую микроРНК в молочной железе крупного рогатого скота, инфицированной *Staphylococcus aureus*, 358 известных и 232 новых микроРНК в контрольной группе, 77 из которых по-разному экспрессировались между инфицированными и здоровыми коровами голштинской породы [59]. Исследование X. Cui и соавт. является первым сравнительным профилем транскриптома мРНК и микроРНК в эпителии молочной железы дойных коров [60]. В этом исследовании получен обширный профиль экспрессии микроРНК в молочных железах от лактирующих коров с чрезвычайно высоким и низким содержанием белка и жира в молоке. В результате было идентифицировано в общей сложности 497 известных

микроРНК и 49 новых микроРНК коровы. Одной из наиболее значимой и изученной микроРНК, идентифицированной в данном исследовании, была miR-15a, которая, как сообщается, имеет решающее значение для развития клеток [61], клеточного цикла [62] и апоптоза [63,64]. Н. Li и соавт. [65] обнаружили, что miR-15a может ингибировать жизнеспособность эпителиальных клеток молочных желез, а также экспрессию мРНК и белка GHR (рецептор гормона роста), который является основным геном, определяющим особенности состава молока [61]. miR-15a воздействует на гены-кандидаты содержания жира и белка в молоке, включая фактор активации транскрипции 3 (*ATF3*), фактор роста эндотелия сосудов (*VEGFA*), гормон, подобный паратироидному гормону (*PTH1H*), гомолог регулятора транспорта катионов 1 (*CHAC1*) и ядерный рецептор 4A1 (*NR4A1*). В текущем исследовании X. Cui и соавт. было выявлено, что miR-miR-2454-3p, miR-496, miR-503-3p, miR-6520 регулируют работу гена *STAT5B*, который, как известно, участвует в передаче сигналов TGF- β и генов, которые влияют на характеристики молока такие как *CSN3*, *CSN2*, *LALBA*, *DGAT2*, *STAT5B* и *SCD*, что подразумевает, что они могут играть критическую регуляторную роль в развитии молочных желез и состава молока [60]. В исследовании X. Cui и соавт. обнаружены дифференциально экспрессируемые микроРНК в группах с высоким и низким процентом жира и молока. Они нацелены на четыре дифференциально экспрессируемых гена (*TRIB3*, *PTH1H*, *VEGFA* и *M-SAA3.2*). Экспрессия гена *M-SAA3.2* (амилоид молочной сыворотки A3.2) регулируется miR-146b, miR-125a и miR-125b; *VEGFA* регулируется miR-125a, miR-125b, miR-106b и miR-2904; и *RPL23A* (рибосомный белок L23a), трибл-гомолог 3 (*TRIB3*) и *PTH1H* регулировались miR-378c, miR-2904 и miR-106b соответственно [66]. P. Villa и соавт. [67] выявили 11 микроРНК с разным уровнем экспрессии, предполагая их ассоциацию с выходом молока, белка, лактозы и жира у голштинской породы коров. Шесть наиболее дифференциально экспрессируемых микроРНК miR-100, miR-146b, miR-186, miR-30e-5p, miR-25 и miR-16a нацелены на метаболизм молочной железы через сигнальный путь mTOR, который играет фундаментальную роль в адипогенезе [68], и их дифференциальная экспрессия была связана с удоем. MiR-100 вместе с miR-30e-5p, miR-25 и miR-16a нацелены на метаболизм липидов, способствуя синтезу молочного жира, а miR-186 регулирует захват глюкозы. Семь микроРНК, ассоциированных с молоком, miR-26a, miR-26b, miR-200c, miR-21, miR-30d, miR-99a и miR-148a, были определены как потенциальные биомаркеры качества контроля сырого молока и других продуктов, связанных с молоком, таких как сухое молоко для детского питания и т. д. [67].

МикроРНК осуществляют эпигенетический контроль секреции молока, посредством усиления экспрессии ДНК-метилтрансферазы (*DNMT*), которая контролирует транскрипцию и структуру хроматина и является важным стабилизатором генома. Деметилирование ДНК генов, специфичных для лактации, является важным регуляторным механизмом, который увеличивает экспрессию генов молока, путем повышения в нем синтеза белков и липидов [69]. У лактирующих коров специфичное для молочных желез гипометилирование гена α S1-казеина увеличивает экспрессию казеина. Соответственно, микроРНК, специфичные для лактации ДНК-метилтрансфераз (*DNMT*) участвуют в активации связанных с лактацией биосинтетических путей. Одними из таких микроРНК являются: miR -148a, miR -148b и miR -152 – три члена семейства микроРНК -148/152, которые имеют существенную гомологию нуклеотидной последовательности. Самая распространенная микроРНК в молоке – это miR-148a, которая нацелена на *DNMT1*, благодаря чему усиливает экспрессию генов развития, таких как *FOXP3*, *INS*, *IGF1*, *FTO* и *NRF2*, соответственно [69]. J. Wang и соавт. [70] обнаружили, что при повышенной экспрессии микроРНК-152 в тканях молочной железы дойные коровы продуцировали молоко более высокого качества. Индуцированная экспрессия miR-152 в клетках молочной

железы дойной коровы привела к заметному снижению *DNMT1* и соответственно уровня белка. Это, в свою очередь, привело к снижению глобального метилирования ДНК и увеличению экспрессии двух генов, связанных с лактацией: серин/треониновой протеинкиназы (STK) и пероксисомы рецептор- γ , активируемый пролифератором (*PPARG*), тогда как ингибирование микроРНК-152 показало противоположные результаты. Кроме того, многие микроРНК увеличивают жизнеспособность и способность к пролиферации клеток молочной железы у лактирующих коров [70]. Лактогенные гормоны, такие как пролактин, вызывают клеточную и внеклеточную экспрессию miR -148a в эпителиальных клетках молочной железы [69]. D. Do и соавт. [71] подтвердили, что микроРНК-148 относится к наиболее экспрессируемой микроРНК коровьего молока, поскольку на нее приходится более 10% считываний на каждой стадии лактации дойных коров. Важно отметить, что *DNMT1* является прямой мишенью для miR-148a [72]. Экспрессия *DNMT1* обратно пропорциональна экспрессии miR -148a и miR -152 [70]. Более того, микроРНК -148a непосредственно подавляет экспрессию *DNMT3B* и нацелена на мРНК генов *ABCA1*, *LDLR* и *CPT1A*, участвующих в жировом обмене, таким образом ослабляя отток холестерина, поглощение липопротеинов низкой плотности (LDL) печенью и β -окисление митохондриальных жирных кислот [73]. Golan-Gerstl и соавт. показали, что miR -29 регулируют уровень метилирования ДНК путем обратного нацеливания как на *DNMT3A*, так и на *DNMT3B*, влияя на количество молочного жира. Ингибирование микроРНК -29 вызывает глобальное гиперметилирование ДНК и повышение уровня метилирования промоторов важных генов, связанных с лактацией, включая казеин- α s1 (*CSN1S1*), E74-подобный фактор 5 (*ELF5*), *PPAR γ* (*PPARG*), стерол белок, связывающий регуляторный элемент-1 (*SREBP1*), и однонаправленный белок переносчик глюкозы-1 (*GLUT1*). Ингибирование микроРНК -29 снижает секрецию лактопротеина, триацилглицеринов и лактозы в молоке коров [74]. Сверхэкспрессия miR -145 увеличивает транскрипцию генов, связанных с синтезом молочного жира, что приводит к расширению компартмента липидных капель, увеличению накопления триацилглицерина и увеличению доли ненасыщенных жирных кислот в молоке. Напротив, подавление микроРНК -145 нарушает синтез жирных кислот miR -145-и опосредованно подавляет *INSIG1*, таким образом способствует биосинтезу холестерина [75]. MiR -21 – еще одна распространенная микроРНК коровьего молока, которая косвенно ингибирует экспрессию *DNMT1*. Генерация микроРНК, нацеленных на *DNMT* (miR -152, miR -148a, – miR 29, miR -21), составляет фундаментальный эпигенетический механизм увеличивающий транскрипцию генов, специфичных для лактации, тем самым повышая лактацию, а также надои у жвачных животных. Генетический отбор домашних коров с повышенной активностью микроРНК, нацеленной на *DNMT*, может повышать уровень молочного белка и выход липидов [76]. Однако молекулярная сеть микроРНК лактации у молочных коров практически не охарактеризована. Следовательно, анализ синергетических регуляций между множественными микроРНК в молочной железе молочного скота важен для понимания функции микроРНК. Идентификация синергических микроРНК является важным шагом для дальнейшего понимания синтеза жира и белка молока на общесистемном молекулярном уровне.

МикроРНК экзосом как эпигенетический маркер мастита. Многочисленные исследования выявили роль микроРНК в регуляции и развитии иммунных клеток и их влияния на врожденный и адаптивный иммунный ответ. Некоторые конкретные примеры включают роль miR-150 в ингибировании синтеза транскрипционного фактора c-Myb для регуляции дифференцировки В-клеток [77], а также роль miR-126 в мишени транскриптов регуляторной субъединицы-1 инсулина для положительного контроля судьбы В-клеток [78]. Аналогично: miR-146a функционирует как негативный регулятор транскриптов фактора 6, ассоциированного с рецептором TNF, и киназы 1, ассоциированной с рецептором

интерлейкина-1, во время и/или после реакции врожденной иммунной системы на бактериальную инфекцию [79]. Эти примеры демонстрируют, как микроРНК могут оказывать некоторое регуляторное воздействие на иммунную систему внутри клетки. Следовательно, присутствие специфических микроРНК в экзосомах может указывать на различные патологические состояния и служить биомаркерами для выявления определенных заболеваний [80]. N. Kosaka с соавторами (2010) выдвинули гипотезу о наличии специфических микроРНК в экзосомах молока, присутствие или отсутствие которых может служить биомаркером для раннего выявления бактериальной инфекции, которая может привести к маститу [1]. В связи с этим был проведен ряд интересных исследований, в одном из которых Sun и соавторы (2015) с помощью глубокого секвенирования и анализа прочтений последовательностей из неконъюгированных библиотек микроРНК провели сравнительный анализ профилей экспрессии микроРНК в молочных экзосомах четырех коров голштинской породы, полученных в середине лактации до и после заражения молочной железы золотистым стафилококком (*Staphylococcus aureus*), и идентифицировали шесть микроРНК, значительно отличающихся представленными в экзосомах в ответ на бактериальную инфекцию молочной железы: miR-101, miR-142-5p, miR-183, miR-2285g-3p, miR-223 и miR-99a-5p. Они наблюдали повышенные уровни miR-142-5p и miR-223 в экзосомах молока через 48 часов после заражения miR-183, miR-2285g-3p [81]. В других исследованиях также было выявлено, что miR-142 в большом количестве присутствует в Т-клетках, что подразумевает его роль как иммунорелевантной микроРНК [82], а miR-223, играет важную роль в балансировании метаболизма и иммунного ответа во время инфекции [59] и более высокие уровни miR-223 в молозиве способствовали усилению иммунитета у младенцев [5].

В исследовании по изучению эпигенетических механизмов развития мастита Y. Lai и другими соавторами было идентифицировано более 400 уникальных микроРНК с помощью секвенирования следующего поколения малых РНК в контрастных группах здоровых и больных маститом коров. В молоке группы больных маститом животных двадцать три микроРНК имели высокий уровень экспрессии, среди этих микроРНК выявлены miR-146a, miR-222 и miR-21-5p как наиболее достоверные биомаркеры мастита [83]. При индуцировании мастита у коров голштинской породы с помощью *Streptococcus agalactiae* трехкратное увеличение экспрессии продемонстрировали miR-223 и miR-142-5p, тогда как miR-26a проявляла более чем 2-кратное снижение экспрессии. В результате исследования сделан вывод, что miR-223 и miR-142-5p могут рассматриваться как потенциальные маркеры мастита, вызванного *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. Результаты научной работы Y. Lai и соавт. [84] отчасти подтверждают результаты исследования профилей транскриптомной микроРНК в молочных железах крупного рогатого скота, инфицированных *Staphylococcus aureus*, проведенного R. Li и соавторами [85], где среди значительно дифференциально экспрессируемых микроРНК, выявленных в этих исследованиях, 44% совпадали. В их число вошли: miR-1246, miR-223, miR-142-3p, miR-142-5p, miR-21-3p, miR-6529, miR-2284aa, miR-2284w, miR-132, miR-130b, miR-23b-3p и miR-874. Исследование L. Fang и соавт. также подтверждает, что miR-223 и miR-21-3p, инфицированные высокой концентрацией *Staphylococcus aureus* [86], значительно повышают свою экспрессию в четверти вымени и регулируют экспрессию генов *CXCL14* и *KIT*, связанных с иммунитетом. В молоке крупного рогатого скота были также выявлены miR-10a, miR-146a, miR-146b, miR-221 и miR-223, имеющие связь с регуляцией врожденного иммунитета и осуществляющие функции эпителиальных клеток молочной железы в тканях, зараженных *Streptococcus uberis* [87]. MiR-146b, miR-223 и miR-338 были высоко экспрессированы в молоке после перенесенной инфекции *Streptococcus uberis*, а miR-222 значительно коррелировала с количеством соматических клеток, что свидетельствует о роли miR-222 в качестве

индикатора мастита в образцах молока без центрифугирования, содержащих жир и соматические клетки [88]. В исследовании S. Ngo и соавторов 7 микроРНК были идентифицированы как маркеры индикатора ранних стадий мастита – miR-27b, miR-152, miR-194, miR-200b, miR-222, miR-379 and miR-1839. Уровни экспрессии воспалительных miR, включая miR-21, miR-146a, miR-155, miR-222 и miR-383, были значительно повышены в молоке коров с положительным тестом на мастит [89]. Использование miR-92a в качестве гена домашнего хозяйства (референтного) было рекомендовано для изучения экспрессии микроРНК в образцах коровьего молока, пораженных маститом [83].

X. Wang с соавторами (2021) создали модель мастита у крупного рогатого скота и провели интегративный анализ микроРНК для коров, инфицированных *Staphylococcus aureus* и контрольной здоровой группы. Они выявили 77 дифференциально экспрессируемых микроРНК и обнаружили, что miR-19b, miR-23b-3p, miR-331-5p, miR-664b и miR-2431-3p являются потенциальными факторами, регулирующими уровни экспрессии генов, которые обычно связаны с воспалением и иммунитетом: кальций-связывающим белком S100A9 (S100A9), альфа-1 цепью коллагена IV типа (COL4A1), членом семейства онкогенов RAS (RAP1B), регулятором сигнала NFKB LDOC1 (LDOC1), субъединицы гамма-2 G-белка (GNG2), членом 2 семейства белков RP/EB, ассоциированного с микротрубочками (MAPRE2), молекулы CD14 (CD14), интерлейкина 17A (IL17A), и рецептора липопротеинов низкой плотности (LDLR) [90].

Исследование, проведенное Z. Luoreng и др. (2018), позволило выявить дифференциально экспрессируемые микроРНК путем попарного сравнения коров, инфицированных *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, [91]. Хотя ранее сообщалось о дифференциально экспрессируемых микроРНК в тканях молочной железы, инфицированных высокой дозой *Staphylococcus aureus* [86], результаты несколько различаются по количеству и типам микроРНК, что предполагает, что доза бактериального инокулята или продолжительность инфекции могут влиять на экспрессию микроРНК в молочных железах. Анализ паттернов экспрессии микроРНК в контрольной группе и группе, инфицированной *Staphylococcus aureus*, проводился на основе анализа 279 микроРНК, включая 186 активированных и 93 подавленных микроРНК. Кроме того, в образцах, инфицированных *E. coli*, было выявлено 305 микроРНК, включая 243, имеющих высокую экспрессию и 62 с низкой экспрессией. Среди этих микроРНК, по-видимому, miR-7863 может быть специфическим биомаркером для двух типов мастита, изученных в данном исследовании, поскольку ее экспрессия в группах, инфицированных *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* была повышена в 24 раза по сравнению с контрольной группой. Потенциальные гены-мишени, предсказанные с помощью биоинформатического анализа, показали, что miR-7863 может регулировать несколько иммунных генов, включая членов семейства интерлейкинов, IRAK1, TLR7 и LBP, которые являются ключевыми молекулами иммунной системы многих животных. Более того, микроРНК с высокой экспрессией в контрольной группе и в группе, инфицированной *Staphylococcus aureus*, включая miR-223, miR-146a, miR-184, miR-155, miR-214, miR-147 и miR-378, также имели дифференциальную экспрессию [91]. Уровни экспрессии многих микроРНК, охарактеризованных в этом исследовании, соответствуют уровням, описанным в других ранних исследованиях.

Таблица 1. Краткое описание некоторых маркерных микроРНК мастита крупного рогатого скота

МикроРНК	Гены-мишени	Функция в ответ на возбудитель инфекции	Авторы
miR-101, miR-142-5p, miR-183, miR-2285g-3p, miR-223, miR-99a-5p	<i>A2M, MAT2A, GNB1, ADH5, LBP4, CD14.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> Увеличение синтеза иммуносупрессивного цитокина интерлейкина-10, регулирует селекцию Т-клеток	[81]
miR-146a и miR-222 miR-21-5p	<i>LPS, CD14, COMMD1</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i> и <i>Staphylococcus aureus</i> Адгезия и инфильтрация воспалительных клеток в эндотелиальное пространство, а также иммунный ответ на воспаление	[83]
bta-miR-144, bta-miR-451, bta-miR-7863, miR-223, miR-184, miR-155, miR-214, miR-147 и miR-378	<i>TLR, MAPK, TGF-β EZH2, NKRF</i>	<i>Escherichia coli</i> и <i>Staphylococcus aureus</i> Участие во сигнальных путях иммунной системы, взаимодействие цитокинов с рецепторами цитокинов и сигнальные пути хемокинов	[93]
miR-1246, miR-223, miR-142-3p, miR-142-5p, miR-21-3p, miR-6529, miR-2284aa, miR-2284w, miR-132 и miR-130b, miR-23b-3p, miR-874	<i>FOXO, PI3K-AKT, ERBB, MAPK</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> и <i>Streptococcus agalactiae</i> преимущественно связаны с раком и механизмами функционирования иммунной системы	[84]
miR-223 и miR-21-3p	<i>CXCL14, KIT GZMB, STAT3 RC3H1,</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> Отрицательно регулирует пролиферацию и дифференцировку нейтрофильных гранулоцитов, ограничивая прогрессию и, стимуляцию Т-клеток	[87]
miR-10a, -15b, -16a, -17, -21, -31, -145, -146a, -146b, -155, -181a, -205, -221, -223	<i>SCD, CD36, GPAM, FASN, TNF, IL6, IL10, SOD2, LYZ, TLR4, FOS, CASP4.</i>	<i>Streptococcus uberis</i> Регуляция врожденного иммунитета и функции эпителиальных клеток молочной железы в тканях, подвергшихся воздействию иммунного и окислительного стресса и клеточной пролиферации/дифференцировки	[88]
bta-let-7d, bta-let-7b, bta-miR-29b-2, bta-mir-98, bta-miR-100, bta-mir-130a, bta-miR-193a, bta-miR-210, bta-miR-494, bta-miR-652	<i>MAPK, JAK-STAT, MTOR</i>	<i>Streptococcus uberis</i> Полисахарид-индуцированный иммунный ответ	[96]
miR-19b, miR-23b-3p, miR-331-5p, miR-664b, miR-2431-3p	<i>GNG2, MAPRE2, CD14, IL17A, S100A9, COL4A1, RAP1B, LDOC1, LDLR</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> Положительная регуляция путей активности гидролаз, миграции лейкоцитов, хемотаксиса нейтрофилов и пути воспалительного ответа	[91]
miR-1246, miR-223, miR-142-3p, miR-142-5p, miR-21-3p, miR-6529, miR-2284aa, miR-2284w, miR-132 и miR-130b, miR-23b-3p, miR-874.	<i>ATP2B4, MAP3K1, ADCK3, PSD2, SLC5A1, HSPA1L, SLC25A15,</i>	<i>Staphylococcus aureus.</i> Связаны с каталитической активностью, иммунными процессами и микробным метаболизмом, эндоцитозом и сигнальными путями обонятельной трансдукции	[59]
miR-27b, miR-152, miR-194, miR-200b, miR-222, miR-379 and miR-1839	<i>LALBA, GALE, AKT1, NOD2, Hsc70</i>	<i>Staphylococcus aureus.</i> роль в иммунитете, клеточной дифференциации и участие в сигнальном пути АКТ/mTOR	[90]

Например, предыдущее исследование X Wang и Z. Luoreng (2016) показали, что экспрессия miR-146a в тканях молочной железы при субклиническом, клиническом и экспериментальном мастите крупного рогатого скота значительно увеличивалась [92], подтверждая идею о том, что miR-146a регулирует секрецию воспалительных цитокинов, таких как TNF- α , IL-6 и IL-8 в bMEC у крупного рогатого скота. Более того, они отметили, что изменения в экспрессии miR-144 и miR-451 в двух группах были противоположными друг другу (повышение экспрессии в молочной железе, инфицированной *Staphylococcus aureus*, и снижение экспрессии в молочной железе, инфицированной *Escherichia coli*), что предполагает, что они играют разные роли в механизмах, регулирующих два типа мастита, которые они исследовали. Для изучения их ролей с помощью биоинформатического анализа были предсказаны потенциальные гены-мишени, показавшие, что miR-451 может регулировать *ATF2*, который, в свою очередь, контролирует уровни цитокинов и генов *CDKN2D*, *MEF2D*, которые участвуют в регуляции воспалительных реакций [93]. Для miR-144 было предсказано в общей сложности 31 потенциальный ген-мишень, участвующих в иммунитете, включая *EZH2* и *NKRF*, роль которых заключается в регуляции дифференцировки и функции Т-клеток, а также в негативной регуляции иммунных ответов [94]. Кроме того, в их исследовании предполагаемые гены-мишени микроРНК были аннотированы как участвующие в различных классах сигнальных путей иммунной системы, сигнальном пути TLR, сигнальном пути TGF- β , взаимодействиях цитокин-цитоклин-рецептор, сигнальном пути MAPK, молекулах клеточной адгезии, трансэндотелиальной миграции лейкоцитов и сигнальных путях хемокинов. Ранее сообщалось, что все эти сигнальные пути могут быть связаны с развитием мастита [91].

В исследовании Lawless [95] выявлено 9 микроРНК имеющих дифференциальную экспрессию в ответ на воздействие грамположительной бактерии *Streptococcus uberis* (bta-let-7d, bta-let-7b, bta-miR-29b-2, bta-mir-98, bta-miR-100, bta-mir-130a, bta-miR-193a, bta-miR-210, bta-miR-494, bta-miR-652). Анализ сигнальных путей предсказанных мишеней микроРНК, экспрессия которых повышена, также выявил статистическое преобладание нескольких путей, ранее связанных с реакцией организма на мастит, таких как MAPK, JAK-STAT и другие сигнальные пути цитокинов. Кроме того, было показано, что некоторые из дифференциально экспрессируемых микроРНК играют роль в иммунных системах других видов. Например, экспрессия микроРНК bta-let-7 была повышена как через 4, так и через 6 часов после заражения *Streptococcus uberis*. Семейство let-7 широко представлено в литературе в качестве регулятора, участвующего в иммунных процессах. Например, было показано, что снижение экспрессии членов семейства let-7 способствует экспрессии IL-10 и IL-6 в клетках HeLa, инфицированных *Salmonella enterica* серовар *Typhimurium* [66], а повышение экспрессии микроРНК let-7 может привести к подавлению противовоспалительных цитокинов для усиления врожденного иммунитета. Bta-miR-29b-2 и bta-miR-130a играют известную роль в иммунном ответе на инфекцию и снижение экспрессии; miR-29a/miR-29b способствует повышению экспрессии IFN- γ в NK-клетках и TH1-клетках [96]. IFN- γ хорошо известен как врожденный воспалительный медиатор, и его секреция способствует устойчивости хозяина к вирусным и внутриклеточным бактериям. В совокупности полученные данные убедительно свидетельствуют о том, что выявленные в данном исследовании микроРНК с дифференциальной экспрессией, вероятно, являются центральными регуляторами врожденного иммунного ответа на *Streptococcus uberis* и следовательно, представляют собой потенциальные терапевтические мишени или новые биомаркеры инфекции и воспаления.

Таким образом, идентификация специфических генов, связанных с восприимчивостью или устойчивостью к маститу, может обеспечить новый способ борьбы с маститом посредством генетической селекции [1, 92]. Следует отметить, что некоторые

микроРНК могут служить универсальными биомаркерами мастита, независимо от причинного агента, например, miR-223, miR-142-5p и miR-146, перечисленные в этом разделе, а также семейства let-7. Результаты вышеперечисленных исследований показали, что выявленные микроРНК могут быть использованы в качестве биомаркеров мастита для ранней диагностики и прогноза использования данного животного в дальнейшем.

Заключение. Молоко как продукт эволюции млекопитающих обеспечивает передачу генетической информации через высококонсервативные микроРНК, которые модифицируют транскрипцию и эпигенетическое регулирование, способные изменять экспрессию генов рецепторных клеток. Благодаря своим свойствам микроРНК занимают важное, возможно центральное, место в эпигенетике РНК, иначе известной как эпитранскриптомика. МикроРНК экзосом представляют интересную регуляторную систему, участвующую в биологии молочной железы, особенно в отношении иммунных реакций и метаболических процессов. Отбор особей по специфичным микроРНК, увеличивающим транскрипцию генов, специфичных для лактации можно использовать в селекции молочного скота, тем самым повышая надои у данных животных. Результаты предыдущих исследований указывают на перспективность использования микроРНК экзосом в качестве прогностических биомаркеров продуктивности и инфекционных заболеваний у лактирующих жвачных животных для улучшения качества молока и диагностики маститов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке программы государственного задания Российской Федерации № FGGN-2024-0015.

Литература

1. Kosaka N. et al. MicroRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk // *Silence*. 2010b. Vol. 251. P. 7. doi:10.1186/1758-907X-1-7.
2. Zhou Q. et al. Immune-related microRNAs are abundant in breast milk exosomes // *Int. J. Biol. Sci.* 2012. Vol. 8. P. 118 – 123. doi.org/10.7150/ijbs.8.118.
3. Munch E.M. et al. Transcriptome profiling of microRNA by next-gen deep sequencing reveals known and novel microRNAs species in the lipid fraction of human breast milk // *PLoS ONE*. 2013. Vol. 8. P. 50564. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050564>.
4. Izumi H. et al. Bovine milk contains microRNA and messenger RNA that are stable under degradative conditions // *J. Dairy Sci.* 2012. Vol. 9. P. 4831 – 4841. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5489>.
5. Cendron F. et al. Analysis of miRNAs in milk of four livestock species // *BMC genomics*. 2024. Vol. 25. № 1. P. 859. <https://doi.org/10.1186/s12864-024-10783-4>.
6. Lässer C. et al. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: Uptake by macrophages // *J. Transl. Med.* 2011. Vol. 9. P. 9. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-9>.
7. Chen X. et al. Identification and characterization of microRNAs in raw milk during different periods of lactation, commercial fluid, and powdered milk products // *Cell Res.* 2010. Vol. 20. P. 1128 – 1137. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.80>.
8. Doyle L.M., Wang M.Z. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis // *Cells*. 2019. Vol. 8. № 7. P. 727. <https://doi.org/10.3390/cells8070727>.
9. Zhang J. et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function // *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2015. Vol. 13. № 1. P. 17 – 24. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.02.001>.
10. Charga E.; West R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood // *J. Biol. Chem.* 1946. Vol. 166. P. 189 – 197.
11. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma // *Br. J. Haematol.* 1967. Vol. 13. P. 269 – 288.
12. Pan B.T., Johnstone R. Selective externalization of the transferrin receptor by sheep reticulocytes in vitro. Response to ligands and inhibitors of endocytosis // *J. Biol. Chem.* 1984. Vol. 259. P. 9776 – 9782.
13. Pan B.T., Johnstone R.M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor // *Cell*. 1983. Vol. 33. P. 967 – 978. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90040-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90040-5).
14. Johnstone R.M., Bianchini A., Teng K. Reticulocyte maturation and exosome release: transferrin receptor containing exosomes shows multiple plasma membrane functions // *Blood*. 1989. Vol. 74. P. 1844 – 1851.
15. Mathivanan S., Ji H. Simpson R.J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication // *J. Proteomics*. 2010. Vol. 73. P. 1907 – 1920. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.06.006>.

16. Gross J.C. et al. Active Wnt proteins are secreted on exosomes // *Nat Cell Biol.* 2012. Vol. 14. P. 1036 – 1045. <https://doi.org/10.1038/ncb2574>.
17. Pieters B.C. et al. Commercial cow milk contains physically stable extracellular vesicles expressing immunoregulatory TGF-beta // *PLoS ONE.* 2015. Vol. 10. P. 121 – 123. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121123>.
18. Melnik B.C. et al. Milk микроПНК: Simple nutrients or systemic functional regulators? // *Nutr. Metab.* 2016. Vol. 13. № 42. <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0101-2>.
19. Almughliq F.B. et al. Circulating exosomes may identify biomarkers for cows at risk for metabolic dysfunction // *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9. № 1. P. 13879. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50244-7>.
20. Mitchell M.D. et al. Plasma exosome profiles from dairy cows with divergent fertility phenotypes // *J. Dairy Sci.* 2016. Vol. 99. P. 7590 – 7601. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11060>.
21. Zhang Y. et al. Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential // *Cell Biosci.* 2019. Vol. 9. P. 19. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0282-2>.
22. Henne W.M., Buchkovich N.J., Emr S.D. The ESCRT pathway // *Dev. Cell.* 2011. Vol. 21. P. 77 – 91. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.05.015>.
23. Hurley J.H. ESCRTs are everywhere // *EMBO J.* 2015. Vol. 34. P. 2398 – 2407. <https://doi.org/10.15252/embj.201592484>.
24. Perez-Hernandez D. et al. The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes // *J. Biol Chem.* 2013. Vol. 288. P. 11649 – 11661. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.445304>.
25. Van den Boorn J.G. et al. Exosomes as nucleic acid nanocarriers // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013. Vol. 65. P. 331 – 335. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.06.011>.
26. Villarroya-Beltri C. et al. Sumoylated hnRNP A2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs // *Nature communications.* 2013. № 4. P. 2980. <https://doi.org/10.1038/ncomms3980>.
27. Santangelo L. et al. The RNA-Binding Protein SYNCRIP Is a Component of the Hepatocyte Exosomal Machinery Controlling MicroRNA Sorting // *Cell reports.* 2016. Vol. 17. № 3. P. 799 – 808. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.031>.
28. Shurtleff M.J. et al. Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction // *Elife.* 2016. Vol. 25. № 5. P. e19276. <https://doi.org/10.7554/eLife.19276>.
29. Ostrowski M. et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway // *Nat Cell Biol.* 2010. Vol. 12. № 1. P. 19 – 30. <https://doi.org/10.1038/ncb2000>.
30. Michlewski G., Cáceres J.F. Post-transcriptional control of microRNA biogenesis // *RNA.* 2019. Vol. 25. № 1. P. 1 – 16. <https://doi.org/10.1261/rna.068692.118>.
31. Mohr A.M., Mott J.L. Overview of microRNA biology // *Semin Liver Dis.* 2015. Vol. 35. № 1. P. 3 – 11. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1397344>.
32. Lee Y. et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing // *Nature.* 2003. Vol. 425. P. 415 – 419. <https://doi.org/10.1038/nature01957>.
33. Ketting R.F. et al. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans* // *Genes Dev.* 2001. Vol. 15. P. 2654 – 2659. <https://doi.org/10.1101/gad.927801>.
34. Kobayashi H., Tomari Y. RISC assembly: coordination between small RNAs and Argonaute proteins // *Biochim Biophys Acta.* 2016. Vol. 1859. P. 71 – 81. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.08.007>.
35. Bartel D.P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions // *Cell.* 2009. Vol. 136. № 2. P. 215 – 233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>.
36. Vasudevan S., Tong Y., Steitz J.A. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation // *Science.* 2007. Vol. 318. № 5858. P. 1931 – 1934. <https://doi.org/10.1126/science.1149460>.
37. Dykxhoorn D.M., Novina C.D., Sharp P.A. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression // *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003. Vol. 4. № 6. P. 457 – 467. <https://doi.org/10.1038/nrm1129>.
38. Baek D. et al. The impact of microRNAs on protein output // *Nature.* 2008. Vol. 455. № 7209. P. 64 – 71. <https://doi.org/10.1038/nature07242>.
39. Selbach M. et al. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs // *Nature.* 2008. Vol. 455. № 7209. P. 58 – 63. <https://doi.org/10.1038/nature07228>.
40. Guo H. et al. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels // *Nature.* 2010. Vol. 466. № 7308. P. 835 – 840. <https://doi.org/10.1038/nature09267>.
41. Reinhart B.J. et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* // *Nature.* 2000. Vol. 403. № 6772. P. 901 – 906. <https://doi.org/10.1038/35002607>.
42. Place R.F. et al. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008. Vol. 105. № 5. P. 1608 – 1613. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707594105>.
43. Ishikawa H. et al. mRNA profile in milk extracellular vesicles from bovine leukemia virus-infected cattle // *Viruses.* 2020. Vol. 12. P. 669. <https://doi.org/10.3390/v12060669>.
44. Chen T. et al. Revelation of mRNAs and proteins in porcine milk exosomes by transcriptomic and proteomic analysis // *BMC Vet. Res.* 2017. Vol. 13. P. 101. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1021-8>.
45. Izumi H. et al. Bovine milk exosomes contain microRNA and mRNA and are taken up by human macrophages // *J. Dairy Sci.* 2015. Vol. 98. P. 2920 – 2933. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9076>.

46. Tabet F. et al. HDL-transferred microRNA-223 regulates ICAM-1 expression in endothelial cells // *Nat Commun.* 2014. Vol. 5. P.3292. <https://doi.org/10.1038/ncomms4292>.
47. Vickers K.C. et al. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins // *Nat Cell Biol.* 2011. Vol. 13. P. 423 – 33. <https://doi.org/10.1038/ncb2210>.
48. Arroyo J.D. et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011. Vol. 108. P. 5003 – 5008. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019055108>.
49. Hata T. et al. Isolation of bovine milk-derived microvesicles carrying mRNAs and microRNAs // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010. Vol. 396. P. 528 – 533. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.04.135>.
50. Howard K.M. et al. Loss of microRNAs during processing and storage of cow's (*Bos taurus*) milk // *J. Agric. Food Chem.* 2015. Vol. 63. P. 588 – 592. <https://doi.org/10.1021/jf505526w>.
51. Sun Q. et al. Immune modulatory function of abundant immune-related microRNAs in microvesicles from bovine colostrum // *Protein Cell.* 2013. Vol. 4. P. 197 – 210. <https://doi.org/10.1007/s13238-013-2119-9>.
52. Klopffleisch R., Weiss A.T., Gruber A.D. Excavation of a buried treasure—DNA, mRNA, microRNA and protein analysis in formalin fixed, paraffin embedded tissues // *Histol. Histopathol.* 2011. Vol. 26. P. 797 – 810. <https://doi.org/10.14670/HH-26.797>.
53. Streichert T., Otto B., Lehmann U. MicroRNA expression profiling in archival tissue specimens: Methods and data processing // *Mol. Biotechnol.* 2012. Vol. 50. P. 159 – 169. <https://doi.org/10.1007/s12033-011-9427-1>.
54. Srikok S. et al. Potential role of MicroRNA as a diagnostic tool in the detection of bovine mastitis // *Prev. Vet. Med.* 2020. Vol. 182. P. 101 – 105. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105101>.
55. Bu D.P. et al. Identification and characterization of microRNA sequences from bovine mammary epithelial cells // *J. Dairy Sci.* 2015. Vol. 98. № 3. P. 1696 – 705. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8217>.
56. Bourdon C. et al. RumimiR: A detailed microRNA database focused on ruminant species // *Database.* 2019. baz099. <https://10.1093/database/baz099>.
57. Li Z. et al. Expression profiles of microRNAs from lactating and non-lactating bovine mammary glands and identification of microRNA related to lactation // *BMC Genomics.* 2012b. Vol. 13. P. 731. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-731>.
58. Shen B., Zhang L., Lian C. Deep Sequencing and Screening of Differentially Expressed MicroRNAs Related to Milk Fat Metabolism in Bovine Primary Mammary Epithelial Cells // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. Vol. 17. P. 200. <https://doi.org/10.3390/ijms17020200>.
59. Li R. et al. Transcriptome microRNA profiling of bovine mammary glands infected with *Staphylococcus aureus* // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. Vol. 16. P. 4997 – 5013. <https://doi.org/10.3390/ijms16034997>.
60. Cui X. et al. Comprehensive MicroRNA Expression Profile of the Mammary Gland in Lactating Dairy Cows With Extremely Different Milk Protein and Fat Percentages // *Front Genet.* 2020. Vol. 3. № 11. P. 548268. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.548268>.
61. Bonci D. et al. The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities // *Nat. Med.* 2008. Vol. 14. P. 1271 – 1277. <https://doi.org/10.1038/nm.1880>.
62. Bandi N. et al. miR-15a and miR-16 are implicated in cell cycle regulation in a Rb-dependent manner and are frequently deleted or downregulated in non-small cell lung cancer // *Cancer Res.* 2009. № 69. P. 5553 – 5559. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-08-4277>.
63. Cimmino A. et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2 // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2005. Vol. 102. P. 13944 – 13949. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506654102>.
64. Aqeilan R.I., Calin G.A., Croce C.M. miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives // *Cell Death Differ.* 2010. Vol. 17. P. 215 – 220. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.69>.
65. Li H.M., Wang C.M., Li Q.Z., Gao X.J. MiR-15a decreases bovine mammary epithelial cell viability and lactation and regulates growth hormone receptor expression // *Molecules.* 2012a. Vol. 17. P. 12037 – 12048. <https://doi.org/10.3390/molecules171012037>.
66. Cui X. et al. Transcriptional profiling of mammary gland in Holstein cows with extremely different milk protein and fat percentage using RNA sequencing // *BMC Genomics.* 2014. Vol. 15. P. 226. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-226>.
67. Billa P.A. et al. Deep RNA-Seq reveals miRNome differences in mammary tissue of lactating Holstein and Montbéliarde cows // *BMC Genomics.* 2019. Vol. 20. P. 621. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5987-4>.
68. Laplante M., Sabatini D.M. An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis // *Curr. Biol.* 2009. Vol. 19. P. 1046 – 1052. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.09.058>.
69. Melnik B.C., Schmitz G. MicroRNAs: Milk's epigenetic regulators. // *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2017. Vol. 31. № 4. P. 427 – 442. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2017.10.003>.
70. Wang J. et al. MicroRNA-152 regulates DNA methyltransferase 1 and is involved in the development and lactation of mammary glands in dairy cows // *PLoS One.* 2014. Vol. 9. P. 101358. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101358>.
71. Do D.N. et al. MicroRNA roles in signalling during lactation: an insight from differential expression, time course and pathway analyses of deep sequence data // *Sci Rep.* 2017. Vol. 7. P. 44605. <https://doi.org/10.1038/srep44605>.

72. Pan W. et al. MicroRNA-21 and microRNA-148a contribute to DNA hypomethylation in lupus CD4+ T cells by directly and indirectly targeting DNA methyltransferase 1 // *J. Immunol.* 2010. Vol. 184. P. 6773 – 81. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0904060>.
73. Wagschal A. et al. Genome-wide identification of microRNAs regulating cholesterol and triglyceride homeostasis // *Nat Med.* 2015. Vol. 21. P. 1290 – 7. <https://doi.org/10.1038/nm.3980>.
74. Golan-Gerstl R. et al. Characterization and biological function of milk-derived microRNAs // *Mol. Nutr. Food Res.* 2017. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700009>.
75. Chen Z. et al. MicroRNA-145 regulates immune cytokines via targeting FSCN1 in *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in dairy cows // *Reprod. Domest. Anim.* 2019. Vol. 54. № 6. P. 882 – 891. <https://doi.org/10.1111/rda.13438>.
76. Braud M. et al. Genome-wide microRNA binding site variation between extinct wild aurochs and modern cattle identifies candidate microRNA regulated domestication genes // *Front Genet.* 2017. Vol. 8. № 3. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00003>.
77. Xiao C. et al. MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb // *Cell.* 2007. Vol. 131. P. 146 – 159. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.021>.
78. Okuyama K. et al. MicroRNA-126-mediated control of cell fate in B-cell myeloid progenitors as a potential alternative to transcriptional factors // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2013. Vol. 110. P. 13410 – 13415. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220710110>.
79. Williams A.E. et al. Role of miRNA-146a in the regulation of the innate immune response and cancer // *Biochem Soc Trans.* 2008. Vol. 36. P. 1211 – 1215. <https://doi.org/10.1042/BST0361211>.
80. Weber J.A. et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids // *Clin Chem.* 2010. Vol. 56. P. 1733 – 1741. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147405>.
81. Sun J. et al. MicroRNA expression profiles of bovine milk exosomes in response to *Staphylococcus aureus* infection // *BMC Genomics.* 2015. Vol. 16. № 16. P. 806. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2044-9>.
82. Wu H. et al. miRNA Profiling of naïve, effector and memory CD8 T cells // *PLoS ONE.* 2007. Vol. 2: e1020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001020.241>.
83. Lai Y.C. et al. Inflammation-related microRNA expression level in the bovine milk is affected by mastitis // *PLoS One.* 2017. Vol. 12. P. 0177 – 182. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177182>.
84. Lai Y.C. et al. Bovine milk transcriptome analysis reveals microRNAs and RNU2 involved in mastitis // *FEBS J.* 2020. Vol. 287. № 9. P. 1899 – 1918. <https://doi.org/10.1111/febs.15114>.
85. Li R. et al. Comparative analysis of the miRNome of bovine milk fat, whey and cells // *PLoS One.* 2016. Vol. 11. e0154129. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154129>.
86. Fang L. et al. Genome-Wide Transcriptional and Post-transcriptional Regulation of Innate Immune and Defense Responses of Bovine Mammary Gland to *Staphylococcus aureus* // *Front Cell Infect Microbiol.* 2016. Vol. 6. P. 193. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00193>.
87. Naeem A. et al. Bioinformatics analysis of microRNA and putative target genes in bovine mammary tissue infected with *Streptococcus uberis* // *J. Dairy Sci.* 2012. № 95. – P. 6397 – 408. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5173>.
88. Lawless N. et al. MicroRNA regulation of bovine monocyte inflammatory and metabolic networks in an in vivo infection model // *G3 (Bethesda).* 2014. Vol. 4. P. 957 – 71. <https://doi.org/10.1534/g3.113.009936>.
89. Ngo S., Moloney S., Xiaoling L. Distinct MicroRNA signatures for mastitis measured in milk following natural exposure in dairy herds // *Int. J. Anim. Sci.* 2017. Vol. 1. P. 1001. <https://doi.org/10.36876/ijas.1001>.
90. Wang X. et al. Integrative Analysis of miRNA and mRNA Expression Profiles in Mammary Glands of Holstein Cows Artificially Infected with *Staphylococcus Aureus* // *Pathogens.* 2021. Vol. 10. P. 506.
91. Luoreng Z.M. et al. Comparison of microRNA Profiles between Bovine Mammary Glands Infected with *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* // *Int. J. Biol. Sci.* 2018. Vol. 11. № 14 (1). P. 87 – 99. <https://doi.org/10.7150/ijbs.22498>.
92. Wang X.P. et al. Expression patterns of miR-146a and miR-146b in mastitis infected dairy cattle // *Molecular and cellular probes.* 2016. Vol. 30. № 5. P. 342 – 344. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2016.08.004>.
93. Wang Z.C. et al. MiR-451 Inhibits synovial fibroblasts proliferation and inflammatory cytokines secretion in rheumatoid arthritis through mediating P38MAPK signaling pathway // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015. Vol. 8. P. 14562.
94. Chen S. et al. Enhancer of Zeste Homolog 2 Is a Negative Regulator of Mitochondria-Mediated Innate Immune Responses // *J. Immunol.* 2013. Vol. 191. P. 2614 – 2623. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203143>.
95. Lawless N. et al. Next generation sequencing reveals the expression of a unique miRNA profile in response to a gram-positive bacterial infection // *PLoS ONE.* 2013. Vol. 8. e57543.
96. Wang H. et al. MiR-145 regulates lipogenesis in goat mammary cells via targeting INSIG1 and epigenetic regulation of lipid-related genes // *J. Cell. Physiol.* 2017. Vol. 232. P. 1030–1040. <https://doi.org/10.1002/jcp.25499>.