

<https://doi.org/10.30766/2072-9081.2023.24.6.1038-1048>

УДК 636.2.034+636.08



Оценка содержания церулоплазмينا, меди и координирующих медь аминокислот в молоке коров на разных сроках лактации

© 2023. О. А. Воронина[✉], С. Ю. Зайцев, А. А. Савина, Н. С. Колесник

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста», Дубровицы, Российская Федерация

Цель исследования – изучение содержания церулоплазмينا, меди и координирующих медь аминокислот (в молекуле изучаемого белка) в молоке коров черно-пестрой породы на разных сроках лактации. Методы исследования: модифицированный метод определения церулоплазмينا по Ревину; определение меди на атомно-адсорбционном спектрометре ZEEnit 650 P (Analytik Jena AG, Германия), аминокислотный анализ с помощью высокоэффективной системы жидкостной хроматографии LC-20 Prominence (Shimadzu, Токио, Япония), оснащенной реакционным модулем постколоночной дериватизации нингидрином ARM-1000 (Sevko & Co., Москва, Россия). Группы для исследования сформированы в зависимости от сроков лактации: 1-2 месяц – 1 группа; 3-5 месяц – 2 группа; 6-7 месяц – 3 группа; 8-9 месяц – 4 группа. В каждую группу вошло по 8 животных. Для статистической обработки полученных результатов применяли U-критерий Манна-Уитни и корреляции Пирсона. Средние значения уровня церулоплазмينا в группах составили 0,44-0,49 мг/мл, меди 71-83 мкг/л, гистидина 0,11-0,13 г/100г, цистеина 0,03 г/100 г и метионина 0,09-0,11 г/100 г. В изучаемых 4 группах обнаружены небольшие различия в содержании церулоплазмينا, меди и трех аминокислот, однако только у 2 и 4 групп по гистидину эти различия являются достоверными. Таким образом, указанные интервалы содержания церулоплазмينا и меди могут служить важными ориентирами при определении «референтных интервалов» для молока здоровых коров в целом, при этом не обязательно учитывать разные сроки лактации.

Ключевые слова: лабораторная диагностика, белки теплового шока с антиоксидантной активностью, гистидин, метионин, цистеин

Благодарности: Работа выполнялась при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках выполнения государственного задания ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста» (FGGN 0445-2021-0002), регистрационный номер ЕГИСУ темы НИР ГЗ 2021-2023-121052600314-1.

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Воронина О. А., Савина А. А., Колесник Н. С., Зайцев С. Ю. Оценка содержания церулоплазмينا, меди и координирующих медь аминокислот в молоке коров на разных сроках лактации. Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2023;24(6):1038-1048. DOI: <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2023.24.6.1038-1048>

Поступила: 05.06.2023

Принята к публикации: 23.11.2023 Опубликовано онлайн: 20.12.2023

Evaluation of the content of ceruloplasmin, copper and copper-coordinating amino acids in cow milk at different lactation periods

© 2023. Oksana A. Voronina[✉], Sergey Yu. Zaitsev, Anastasia A. Savina, Nikita S. Kolesnik

Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L. K. Ernst, Dubrovitsy, Russian Federation

The purpose of the research was to study the content of ceruloplasmin, copper and copper-coordinating amino acids (in the molecule of the studied protein) in the milk of white-and- black cows at different periods of lactation. The research methods were: modified method for determining ceruloplasmin by Revin; copper was determined using a ZEEnit 650 P atomic adsorption spectrometer (Analytik Jena AG, Germany), amino acid analysis was performed using a highly efficient LC-20 Prominence liquid chromatography system (Shimadzu, Tokyo, Japan) equipped with a reaction module for post-column derivatization with ninhydrin ARM-1000 (Sevko & Co., Moscow, Russia). The study groups were formed depending on the timing of lactation: 1-2 months – group 1; 3-5 months – group 2; 6-7 months – group 3; 8-9 months – group 4. Each group included 8 animals. The Mann-Whitney U criterion and Pearson correlations were used for statistical processing of the obtained results. The average values of ceruloplasmin levels in the groups were 0.44-0.49 mg/ml, copper 71-83 mcg/l, histidine 0.11-0.13 g/100g, cysteine 0.03 g/100g and methionine 0.09-0.11 g/100g. In these 4 groups, small differences were found in the content of ceruloplasmin, copper and three amino acids, but only for the second and fourth groups of histidine, these differ-

ences were significant. Thus, the indicated intervals of ceruloplasmin and copper content can serve as important guidelines for determining the "reference intervals" for cow milk in general, while it is not necessary to take into account different lactation periods.

Keywords: laboratory diagnostics, heat shock proteins with antioxidant activity, histidine, methionine, cysteine

Acknowledgements: the work was financially supported by fundamental scientific research of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the state assignment of the Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L. K. Ernst (FGGN 0445-2021-0002), the registration number of the EGISU of the research topic GZ 2021-2023 is 121052600314-1.

The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work.

Conflict of interest: the authors stated that there was no conflict of interest.

For citation: Voronina O. A., Savina A. A., Kolesnik N. S., Zaitsev S. Yu. Evaluation of the content of ceruloplasmin, copper and copper-coordinating amino acids in cow milk at different lactation periods. *Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka = Agricultural Science Euro-North-East*. 2023;24(6):1038-1048. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2023.24.6.1038-1048>

Received: 05.06.2023

Accepted for publication: 23.11.2023

Published online: 20.12.2023

Церулоплазмин (ЦП) один из консервативных белков крупного «семейства» металлопротеинов, обладающих ферментативными свойствами. Ключевая функция ЦП состоит в регуляции транспорта железа для включения в клетки и основные железосодержащие белки [1]. Совместно с другими «мультимедными феррооксидазами» – гефестином и циклопеном ЦП поддерживает гомеостаз железа в организме млекопитающих. Каждый из этих ферментов содержит не менее шести атомов меди и действует как промежуточный акцептор электронов [1, 2, 3]. Церулоплазмин синтезируется клетками печени, молочной железы и другими, причем ЦП встречается как в секретированной, так и в связанной с мембраной клеток форме [2]. Подробная структура церулоплазмина и его роль в метаболизме железа показана в ряде фундаментальных работ [2, 3, 4]. Например, в работах G. Vashchenko [3] и К. А. Мошков [4] отмечена особая роль в медь-связывающих центрах белков данного семейства двух остатков гистидина (HIS) и по одному – метионина (MET) и цистеина (CYS). При этом наиболее значительная роль по координации ионов меди (Cu^{2+}), которых на одну молекулу приходится не менее шести, отводится остаткам гистидина [4]. Церулоплазмин содержится в сыворотке крови, молоке, спинномозговой жидкости и других внеклеточных секретах [5]. У кормящих млекопитающих до 30 % усваиваемой меди обходит печень и всасывается клетками молочной железы, где повышен уровень экспрессии гена церулоплазмина. Для новорожденных церулоплазмин является источником меди, а их молекулярно-генетические механизмы, ответственные за гомеостаз меди, высокоадаптированы к ЦП молока [5]. По данным работы [6], в молоке содержится от 65,37 до 89,85 мкг/л меди. В работе [7] количество церулоплазмина в

молоке, полученном от здоровых коров группы контроля, установлено на уровне 0,73-2,11 ед./г белка, тогда как у животных с различного рода бактериальной обсемененностью молока уровень ЦП составлял от 3,35 до 8,02 ед./г белка [7].

Для промышленного производства молочной продукции важно не только оценить качество сырьевого молока, но и сохранить его, предотвратив процессы преждевременного окисления молочного жира. В этой связи церулоплазмин интересен как белок-индикатор острой фазы воспаления, а также как звено системы антиоксидантной защиты. Эти свойства церулоплазмина могут быть полезными для сохранения надлежащего качества продукта. Выше описана роль церулоплазмина в координации меди, а как известно, избыток меди в молоке сопряжен с риском развития окислительных процессов, появлением специфического привкуса и повышенным риском порчи продукта [8]. Очевидно, речь идет об избытке меди, поступающей в свободном виде. Поскольку именно неуправляемые окислительно-восстановительные циклы $[\text{Cu(I)}/\text{Cu(II)}]$ индуцируют образование свободных радикалов, воздействующих на клетку как ионизирующее облучение [9]. Поэтому важно, чтобы ионы меди находились в составе функциональных групп белков, куда она интегрирована за счет координации с определенными аминокислотами.

В мировой практике основное внимание приковано к роли ЦП как индикатора патологии мастита. Содержание церулоплазмина и ионов меди (в крови) подвергается физиологическому повышению сразу после отела, что легко объяснить его функцией белка теплового шока, который повышается в острой фазе воспаления [10]. В работах М. Щубяль (M. Szczubial) [9, 11] и Н. Салех (N. Saleh) [12] показано, что увеличение уровня активности церулоплазмина в молоке коров совпадает с проявле-

ниями как клинического мастита (различной степени тяжести), так и субклинического, на это обращено внимание в работе А. Садат (A. Sadat) [13]. Настоящее же исследование сконцентрировано на исследовании ЦП, уровне меди и координирующих медь аминокислот в молоке здоровых коров на разных стадиях лактации.

Цель исследования – изучение активности церулоплазмينا, содержания меди и ряда координирующих медь аминокислот в молоке здоровых коров на разных стадиях лактации.

Научная новизна исследования связана с анализом уровня ЦП в комплексе с медью и координирующими медь аминокислотами в зависимости от сроков лактации у клинически здоровых животных.

Материал и методы. Исследования выполнены в мае-июле 2022 г. на базе племенного завода «Ладожский» и лаборатории ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л. К. Эрнста (отдел физиологии и биохимии сельскохозяйственных животных). Молоко получали от коров черно-пестрой породы один раз в месяц, все измерения выполнены в трех повторениях. Группы формировали выборочным методом из генеральной совокупности лактирующих коров в зависимости от сроков отела и числа дойных дней. В первую группу вошли животные 1-2 месяца лактации, во вторую – 3-5 месяца, третью – 6-7 месяца и четвертую – 8-9 месяца лактации. Данные об удоях учитывали во время контрольной дойки в хозяйстве.

Измерение ЦП молока проводили по модифицированному методу Ревина, который основан на участии ЦП в окислении р-фенилендиамина. Ферментативная реакция останавливается добавлением фторида натрия. По оптической плотности образующихся продуктов рассчитывали концентрацию ЦП [14].

В качестве реактивов использовали 0,5%-ный водный раствор солянокислого р-фенилендиамина, 0,4 М ацетатный буфер (рН = 5,5), который готовили на ацетате натрия (54,44 г на 1 литр дистиллированной воды) и ледяной уксусной кислоте (22,6 мл до 1 литра дистиллированной воды) в отношении 9:1. Раствор фтористого натрия в концентрации 3 % готовили на дистиллированной воде. В пробирки вносили по 8 мл ацетатного буфера и 0,1 мл молока. Молоко предварительно центрифугировали для отделения жировой фракции. В контрольную пробирку добавляли 2 мл раствора фтористого натрия (для инактивации ферментативной активности ЦП). Затем во все

пробирки вливали по 1 мл раствора р-фенилендиамина (используемого в качестве субстрата). Пробирки встряхивали, помещали в термостат и инкубировали в течение часа при температуре 37 °С. После инкубации во все пробирки (за исключением контрольной) добавляли по 2 мл раствора фтористого натрия. Содержимое пробирок перемешивали, затем их переносили в холодильник, где выдерживали 30 мин при 4 °С. Пробы колориметрировали против контроля (бледно-розовой окраски) в кюветах с толщиной слоя 1,0 см при длине волны 530 нм. Полученное значение оптической плотности умножали на коэффициент пересчета 875 и получали величину концентрации ЦП в мг/л.

Биохимический анализ проб молока выполняли на анализаторе MilkoScan 7 RM. Принцип работы прибора основан на инфракрасной спектрофотометрии с преобразованием Фурье (ИКСФ). Устройство работает в среднем ИК-диапазоне спектра от 2-11 мкм, что соответствует 1000-5000 см⁻¹. ИКСФ-интерферометр сканирует весь ИК-спектр в указанном диапазоне [15]. Подсчет соматических клеток проведен в системе Fossomatic 7 на базе метода проточной цитометрии.

Определение уровня меди. Для подготовки образцов молока к анализу проводили минерализацию пробы в системе микроволновой подготовки проб MILESTONE ETHOS UP / ETHOS EASY (Италия). К 0,5 мл молока добавляли 1,0 мл 30 %-ной перекиси водорода и 5,0 мл азотной кислоты. Режим системы микроволновой подготовки – 20 мин нагревание до 195 °С, 15 минут удержание при температуре 195 °С и 30 минут охлаждение до 30 °С. Контроль за нагреванием образцов осуществляли по графику подъема температуры. Непосредственный анализ содержания меди выполнен методом атомно-абсорбционной спектроскопии на высокотехнологичном электротермическом атомно-абсорбционном спектрометре с дейтериевой и Зеемановской коррекцией ZEE nit650P (Analytik Jena). Режим определения однолучевой оптический при длине волны 324,8 нм, лампа – МЛПКЛ, ток – 10 мА, усиление – 6 мА, щель – 0,8 нм, без модификатора. Для подачи пробы в графитовую печь использовали автосемплер.

Для анализа аминокислот в гидролизатах белков использовали систему ВЭЖК LC-20 AD Prominence (Shimadzu, Япония) с реакционным модулем для постколоночной дериватизации APM-1000 (Sevko&Co, Россия), как описано в работе [16].

Обработку полученных результатов проводили в программе MS Excel. Статистический критерий для оценки различий между выборками – U-критерий Манна-Уитни, при условии, что $U_{\text{эсп.}} \leq U_{\text{эмп.}}$ (15 для $n = 8$), то установленные различия статистически значимы. Поскольку в каждой группе было по 8 животных и распределение рангов приближается к стандартному нормальному Z-распределению, рассчитывали дополнительно величину Z-статистики и достигнутый уровень статистической значимости p , как описано в работе [17]. Корреляции рассчитаны по Пирсону [18].

Результаты и их обсуждение. В период проведения работы мы наблюдали за уровнем суточного удоя (рис. 1) лактирующих коров, установили массовую долю белка (рис. 2), церулоплазмينا (рис. 3), меди (рис. 4) и аминокислот (рис. 5), участвующих в координации иона меди в молекуле церулоплазмينا, а именно,

гистидина, метионина и цистеина. Кроме того, рассмотрели корреляции между изучаемыми показателями.

При оценке полученного результата установлено планомерное и закономерное снижение уровня удоя (рис. 1) от начала лактационного периода к запуску, без подтверждения достоверности. Это естественно, так как известно [19], что после отёла секреция молока постепенно нарастает, пик лактации приходится на первый-третий месяцы после отёла, затем происходит снижение удоя. В 3 и 4 группах снижение удоев на 11,2 и 20,8 % сопровождается достоверным увеличением массовой доли белка на 17,9 и 25 % соответственно (рис. 2). В части наблюдения за динамикой изменения удоя и содержания белка в молоке наши результаты сопоставимы с данными, полученными Л. Г. Хромовой с соавторами [19].

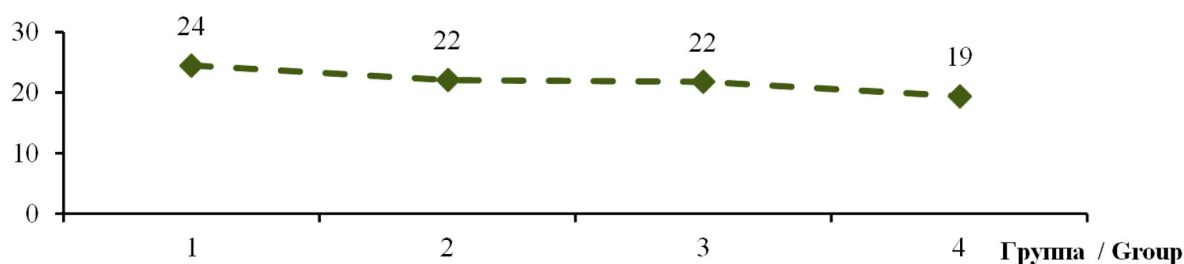


Рис. 1. Уровень суточного удоя лактирующих коров в исследуемых группах, л /
Fig. 1. The level of daily milk yield of lactation cows in the studied groups, l

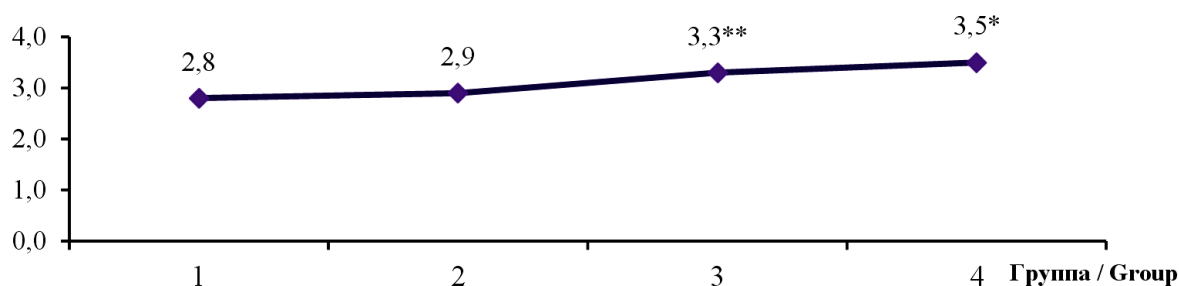


Рис. 2. Уровень массовой доли белка в молоке коров исследуемых групп, %.

* $U_{\text{эсп.}} = 7$, $Z = 2,68$, $p = 0.01$; ** $U_{\text{эсп.}} = 14$, $Z = 1,94$, $p = 0.06$ (по отношению к первой группе) /

Fig. 2. The level of the mass fraction of protein in the milk of cows from the studied groups, %.

* $U_{\text{эсп.}} = 7$, $Z = 2.68$, $p = 0.01$; ** $U_{\text{эсп.}} = 14$, $Z = 1.94$, $p = 0.06$ (in relation to the first group)

При изучении уровня ЦП и меди на протяжении всего периода лактации наблюдается постоянство, достоверных различий между группами не установлено. Самый низкий результат по ЦП получили во 2 группе, который на 0,04 мг/мл ниже, чем в 1 и 3 группах и на 0,05 мг/мл ниже значений группы (рис. 3). Самые высокие средние показатели ЦП отмечены в 4 группе. При этом самые низкие

значения уровня меди установлены также во второй группе (рис. 4).

При изучении уровня аминокислот (рис. 5) на протяжении всего периода лактации уровень цистеина не изменялся. Уровень метионина изменялся незначительно, без достоверных различий, уровень гистидина во 2 и 4 группах в сравнении с 1 достоверно выше на 15 %.

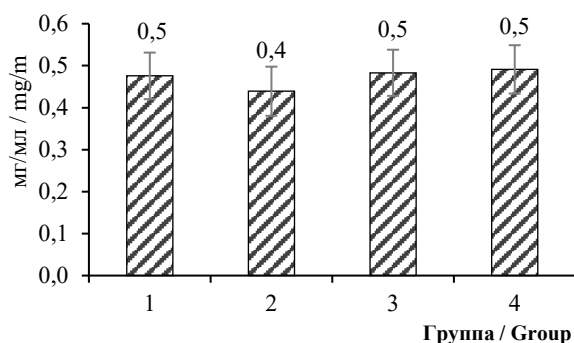


Рис. 3. Уровень церулоплазмينا в молоке коров исследуемых групп в зависимости от срока лактации /
Fig. 3. The level of ceruloplasmin in the milk of cows of the studied groups, depending on the lactation period

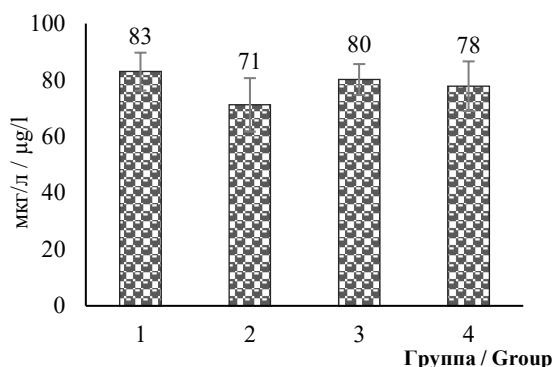


Рис. 4. Уровень меди в молоке коров исследуемых групп в зависимости от срока лактации /
Fig. 4. The level of copper in the milk of cows of the studied groups depending on the lactation period

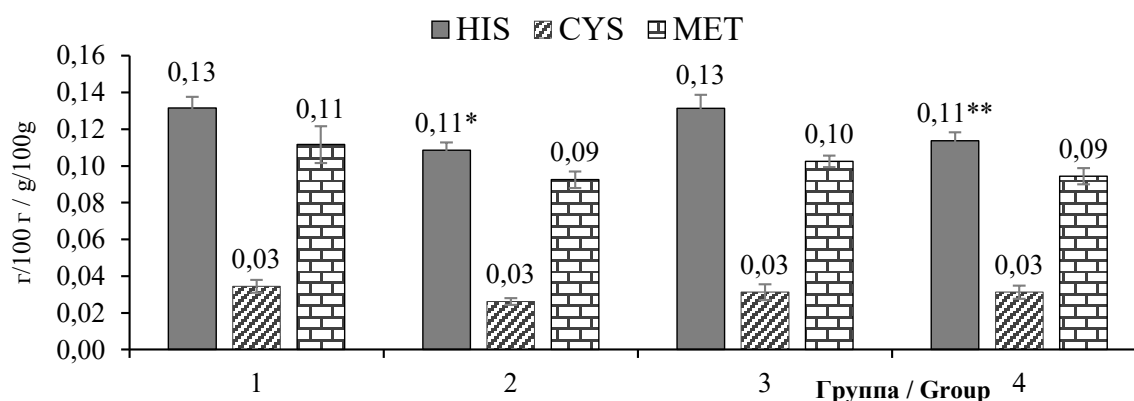


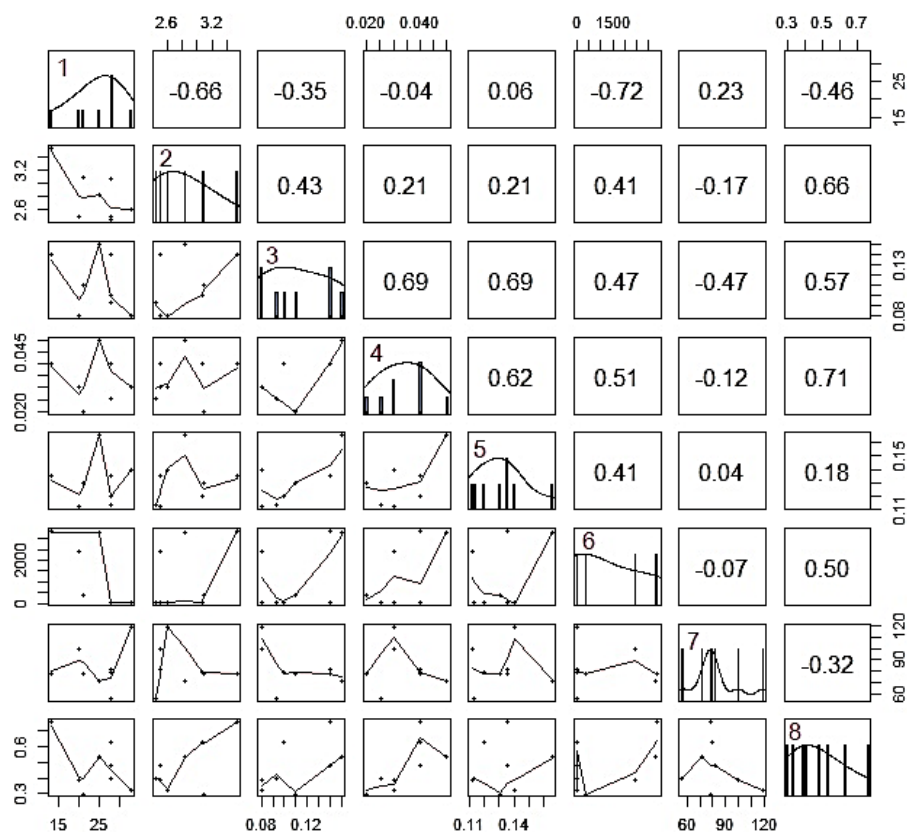
Рис. 5. Уровень гистидина (HIS), метионина (MET) и цистеина (CYS) в молоке коров исследуемых групп, в зависимости от срока лактации. * $U_{\text{эсп.}} = 7$, $Z = 2.68$, $p = 0.01$; ** $U_{\text{эсп.}} = 13$, $Z = 1.05$, $p = 0.049$ (по отношению к первой группе) /

Fig. 5. The level of histidine (HIS), methionine (MET) and cysteine (CYS) in the milk of cows of the studied groups, depending on the lactation period. * $U_{\text{эсп.}} = 7$, $Z = 2.68$, $p = 0.01$; ** $U_{\text{эсп.}} = 13$, $Z = 1.05$, $p = 0.049$ (in relation to the first group)

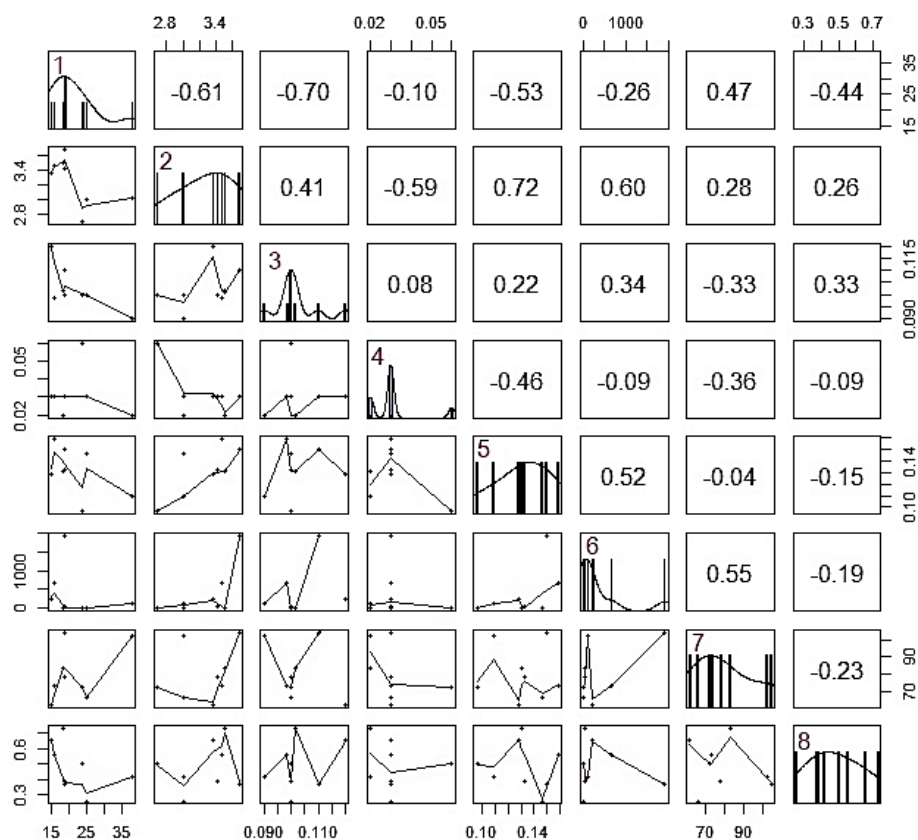
Корреляционные матрицы (рис. 6) представлены для каждой изучаемой группы. Сильная и умеренная отрицательная взаимосвязь установлена между суточным удоем и массовой долей белка: для 1 группы $r = -0.66$ ($r^2 = 0.44$, $p = 0.001$); 2 группы – $r = -0.58$ ($r^2 = 0.34$, $p = 0.001$); 3 группы – $r = -0.61$ ($r^2 = 0.37$, $p = 0.001$); 4 группы – $r = -0.83$ ($r^2 = 0.69$, $p = 0.001$). Умеренная отрицательная корреляционная связь установлена между суточным удоем и ЦП: для 1 группы $r = -0.46$ ($r^2 = 0.21$, $p = 0.05$); 2 группы – $r = -0.47$ ($r^2 = 0.22$, $p = 0.05$); 3 группы – $r = -0.44$ ($r^2 = 0.19$, $p = 0.05$). В 4 группе значение ЦП сохраняет отрицательное направление корреляционной взаимосвязи, однако, сила этого взаимодействия стремится к нулю. Возможно, это связано с увеличением массовой доли белка и снижением доли ЦП к общей доле белка в молоке, поскольку уровень ЦП, по нашим данным, остается прежним. В работе [9] авторы отмечают, что основная функция ЦП молока –

пищевая, и контроль над поступлением пищевой меди осуществляется на уровне регуляции активности синтеза ЦП молочной железой. Это позволяет выдерживать постоянство поступающей меди с ЦП при увеличении объема молока [9]. В свою очередь, стоит помнить, что церулоплазмин лишь один представитель группы белков, образующих в организме метаболическую систему меди.

У коров в группах 2 и 4, в молоке которых меди содержится в среднем меньше, корреляции этого элемента с ЦП положительные: $r = 0.32$ ($r^2 = 0.10$) и $r = 0.45$ ($r^2 = 0.20$, $p = 0.05$) соответственно. В группах 1 и 3, где меди в молоке в среднем больше, корреляции с ЦП отрицательные: $r = -0.32$ ($r^2 = 0.10$) и $r = -0.23$ ($r^2 = 0.05$) соответственно. Таким образом, мы можем предположить, что сила и направление взаимосвязи между ЦП и медью могут меняться в зависимости от количества меди в молоке.



a / a



6 / b

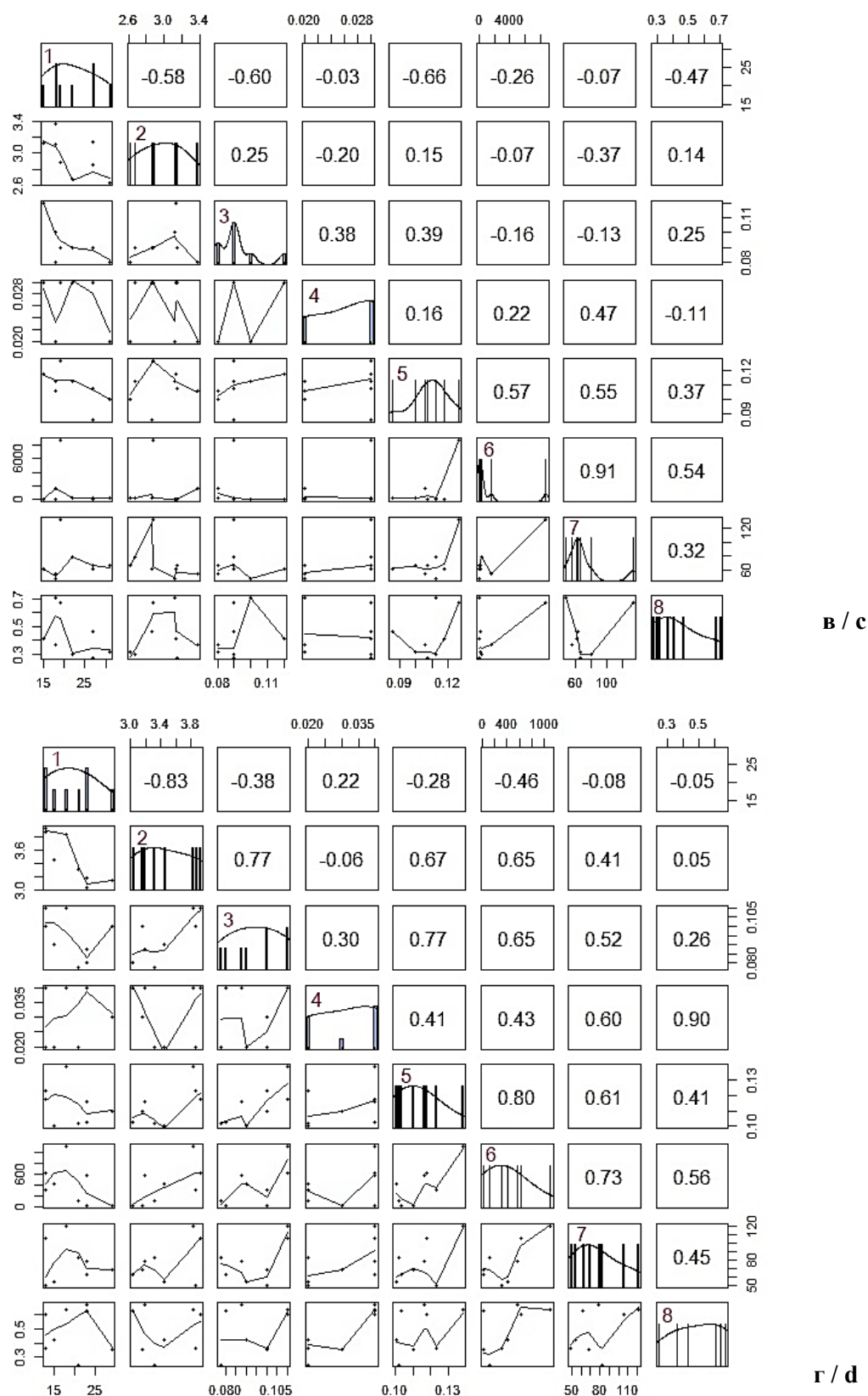


Рис. 6. Корреляционная матрица между изучаемыми параметрами для 1 (а), 2 (б), 3 (в) и 4 (г) групп. Сверху вниз по диагонали ряды: 1 – суточный удой, 2 – массовая доля белка, 3 – метионин, 4 – цистеин, 5 – гистидин, 6 – количество соматических клеток, 7 – медь, 8 – церулоплазмин /

Fig. 6. Correlation matrix between the studied parameters for groups 1 (a), 2 (b), 3 (c) and 4 (d). From top to bottom diagonally: 1 row – daily milk yield, 2 row – mass fraction of protein, 3 row – methionine, 4 row – cysteine, 5 row – histidine, 6 row – the number of somatic cells, 7 row – copper, 8 row – ceruloplasmin

В нашем исследовании направление взаимосвязи положительное в группах, где в среднем содержание меди в молоке меньше 80 мкг/л и отрицательное – больше 80 мкг/л. Это наблюдение требует дальнейшего исследования, поскольку различия между группами по уровню меди не подтверждаются достоверно. В работе М. В. Петухова с соавторами обнаружено, что при избытке меди ЦП подвержен олигомеризации [20], возможно, это сказывается на направлении коэффициента корреляции. Стоит при этом уточнить, что в данной работе речь идет о ЦП, который выделен и дополнительно очищен из плазмы крови. Данных о подобных экспериментах с ЦП молока в очищенном виде или в многокомпонентной коллоидной системе молока нет. Помимо прочего, кроме перечисленных аминокислот, медь может связываться лейцином, фенилаланином, глутаминовой кислотой [3, 4]. Это справедливо для медьпротеидов, где упомянутые аминокислоты замещают метионин. По нашим данным, из трех изучаемых аминокислот для метионина во всех группах установлена положительная корреляционная связь: для 1 – $r = 0,57$ ($r^2 = 0,32$, $p = 0,05$); 2 – $r = 0,25$ ($r^2 = 0,06$); 3 – $r = 0,33$ ($r^2 = 0,11$) и 4 – $r = 0,26$ ($r^2 = 0,07$). Для гистидина и ЦП установлена положительная корреляционная взаимосвязь во 2 и 4 группах: $r = 0,37$ ($r^2 = 0,14$) и $r = 0,41$ ($r^2 = 0,17$, $p = 0,05$) соответственно. Для цистеина сильная положительная взаимосвязь установлена в 1 и 4 группах: $r = 0,71$ ($r^2 = 0,50$, $p = 0,001$) и $r = 0,90$ ($r^2 = 0,81$, $p = 0,001$) соответственно. Поскольку все белки молока состоят из аминокислот, а регуляция синтеза ЦП обусловлена сложностью и индивидуальностью в функциональной активности регуляторного участка гена ЦП, достаточно трудно, опираясь лишь на коэффициент корреляции, установить зависимость между наблюдаемым нами количеством изучаемых аминокислот и содержанием в молоке ЦП. Для надежной опоры и существенных выводов необходимо больше наблюдений. Процесс синтеза ЦП в молочной железе очень консервативен на межвидовом уровне. Регуляция поступления ЦП в молоко осуществляется путем подавления его синтеза во время созревания молока. Это необходимо, поскольку в подсосный период у млекопитающих отсутствует механизм, ограничивающий всасывание меди в кишечнике и её выведение из организма. С возрастом от общего объема поступающей меди всасывается порядка 30 %, а усваивается и включается в метаболизм ещё меньше [9].

Что касается противовоспалительного действия ЦП молока, оно проявляется за счет уменьшения адгезии нейтрофилов к эндотелиальным клеткам и нейтрализации свободных радикалов [7], поэтому уровень его повышается на самых ранних стадиях субклинического мастита у коров. В работе [7] показано, что в зависимости от выявленной патогенной микрофлоры (развившейся на фоне мастита или послужившей причиной его возникновения) уровень ЦП достоверно различается. Поскольку нашей основной задачей стояла оценка уровня ЦП у клинически здоровых коров на разных стадиях лактации, мы помимо анамнеза и клинического осмотра провели оценку коэффициента корреляции между ЦП и числом соматических клеток в молоке коров, вошедших в группы для исследования. Из 8 наблюдаемых животных у 2-3 коров в каждой группе число соматических клеток установлено на уровне, близком к 500 тыс. в 1 см³. В 1, 2 и 4 группах обнаружены сильные положительные корреляции между числом соматических клеток и ЦП: $r = 0,50$ ($r^2 = 0,25$, $p = 0,05$); $r = 0,54$ ($r^2 = 0,29$, $p = 0,01$); $r = 0,56$ ($r^2 = 0,31$, $p = 0,01$) соответственно. Таким образом, исследования в данном направлении необходимо продолжать

Заключение. Влияние срока лактации на уровень содержания церулоплазмينا, меди, метионина и цистеина в молоке коров слабое, различия, полученные нами, по данной выборке достоверно не подтверждаются. При этом, постепенно происходит достоверное увеличение массовой доли белка в молоке коров 3 и 4 групп на 18 и 25 % и недостоверное снижение суточного удоя на 12 и 26 % соответственно. Изменение суточного удоя и массовой доли белка в молоке не влияет на уровень ЦП, меди, метионина и цистеина. Таким образом, при решении задачи определения уровня «референтных интервалов» церулоплазмينا в молоке можно устанавливать их для дойного стада в целом, не разбивая коров на группы по срокам лактации (вне зависимости от суточного удоя и массовой доли белка), и использовать полученные данные для дальнейшего изучения воспалительных процессов в вымени.

Исследование по определению уровня меди и координирующих медь аминокислот в молоке на протяжении лактационного периода необходимо продолжить. В контексте взаимосвязи с ЦП установлен ряд корреляций, описанных выше, которые могут представлять

научный интерес для планирования дальнейших исследований.

Установленные сила и направление корреляционной взаимосвязи между медью и ЦП могут быть как отрицательными (меди больше

80 мкг/л), так и положительными (меди меньше 80 мкг/л). Поскольку различия между группами по уровню меди не подтверждаются достоверно, необходимы дальнейшие исследования, в том числе на большей выборке дойных коров.

Список литературы

1. Harris Z. L. Chapter 9 – Ceruloplasmin. Clinical and Translational Perspectives on Wilson Disease. Academic Press. 2019. pp. 77-84. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810532-0.00009-4>
2. Helman S. L., Zhou J., Fuqua B. K., Lu Y., Collins J. F., Chen H., Vulpe C. D., Anderson G. J., Frazer D. M. The biology of mammalian multi-copper ferroxidases. BioMetals. 2022;36:263-281. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10534-022-00370-z>
3. Vashchenko G., MacGillivray R. T. A. Multi-copper oxidases and human iron metabolism. Nutrients. 2013;5(7):2289-2313. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu5072289>
4. Мошков К. А., Зайцев В. Н., Романовская Е. В., Стефанов В. Е. Церулоплазмин: внутримолекулярный перенос электронов и ферроксидазная активность. Фундаментальные исследования. 2014;(3-1):104-108. Режим доступа: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=21291815> EDN: RXYDRP
5. Puchkova L. V., Babich P. S., Zatulovskaia Y. A., Ilyechova E. Y., Di Sole F. Copper metabolism of newborns is adapted to milk ceruloplasmin as a nutritive source of copper: Overview of the current data. Nutrients. 2018;10(11):1591. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu10111591>
6. Dobrzanski Z., Kolacz R., Górecka H., Chojnacka K., Bartkowiak A. The content of microelements and trace elements in raw milk from cows in the Silesian region. Polish Journal of Environmental Studies. 2005;14(5):685-689.
7. Szczubial M., Dabrowski R., Kankofer M., Bochniarz M., Komar M. Concentration of serum amyloid A and ceruloplasmin activity in milk from cows with subclinical mastitis caused by different pathogens. Polish Journal of Veterinary Sciences. 2012;15(2):291-296. DOI: <https://doi.org/10.2478/v10181-011-0149-x>
8. Воронина О. А., Боголюбова Н. В., Зайцев С. Ю. Минеральные элементы в составе молока коров-мини-обзор. Сельскохозяйственная биология. 2022;57(4):681-693. DOI: <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2022.4.681rus> EDN: BMBZXD
9. Цымбаленко Н. В., Гюлиханганова Н. Е., Платонова Н. А., Бабич В. С., Евсюкова И. И., Пучкова Л. В. Регуляция активности гена церулоплазмينا в клетках молочной железы. Генетика. 2009;45(3):390-400. Режим доступа: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=11713826> EDN: JWIRLR
10. Hussein H. A., Staufienbiel R. Variations in copper concentration and ceruloplasmin activity of dairy cows in relation to lactation stages with regard to ceruloplasmin to copper ratios. Biological trace element research. 2012;146:47-52. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12011-011-9226-3>
11. Szczubial M., Dabrowski R., Kankofer M., Bochniarz M., Albera E. Concentration of serum amyloid A and activity of ceruloplasmin in milk from cows with clinical and subclinical mastitis. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy. 2008;3(52):391-395.
12. Saleh N., Allam T. S., Omran A., Abdelfattah A. M. Evaluation of Changes in Hemato-Biochemical, Inflammatory, and Oxidative Stress Indices as Reliable Diagnostic Biomarkers for Subclinical Mastitis in Cows. Alexandria Journal for Veterinary Sciences. 2022;(72)2:23-34. DOI: <https://doi.org/10.5455/ajvs.140786>
13. Sadat A., Farag A. M., Elhanafi D., Awad A., Elmahallawy E. K., Alsowayeh N., El-khadragy M. F., Elshopakey G. E. Immunological and Oxidative Biomarkers in Bovine Serum from Healthy, Clinical, and Sub-Clinical Mastitis Caused by Escherichia coli and Staphylococcus aureus Infection. Animals. 2023;13(5):892. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani13050892>
14. Зыков А. А., Головнев Б. А., Зыкова А. А., Белкина О. М. Соотношение функционально активных белков в сыворотке крови и центральной лимфе в раннем периоде синдрома длительного сдавления. Здоровоохранение Кыргызстана. 2012;(2):36-38. Режим доступа: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=30682570> EDN: XGHJTP
15. Сермягин А., Зиновьева Н., Ермилов А., Янчуков И. Инфракрасная спектроскопия молока. Животноводство России. 2019;(S1):65-68. DOI: <https://doi.org/10.25701/ZZR.2019.17.64.008> EDN: KUBFOZ
16. Воронина О. А. Уровень меди в молоке коров племенного хозяйства в зимний и весенний период. Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2022;(12-1):112-116. DOI: <https://doi.org/10.36871/vet.zoo.bio.202212114> EDN: YWWCSA
17. Фадейкина О. В., Волкова Р. А., Карпова Е. В. Статистическая обработка результатов аттестации биологических стандартных образцов: применение критерия Манна-Уитни. Химико-фармацевтический журнал. 2019;53(7):54-58. DOI: <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2019-53-7-54-58> EDN: HQTGTD

18. Саадалов Т., Мырзаibraимов Р., Абдуллаева Ж. Д. Методика расчета коэффициента корреляции Фехнера и Пирсона, и их области применения. Бюллетень науки и практики. 2021;7(10):270-276. DOI: <https://doi.org/10.33619/2414-2948/71/31> EDN: GNMYZT
19. Хромова Л. Г., Аристов А. В., Байлова Н. В., Мусенко И. В. Особенности лактационной функции коров молочных пород в условиях беспривязной технологии содержания. Вестник Воронежского государственного аграрного университета. 2017;(4):79-88. DOI: <https://doi.org/10.17238/issn2071-2243.2017.4.79> EDN: YWLHVR
20. Петухов М. В., Соколов А. В., Костевич В. А., Самыгина В. Р. Олигомеризация церулоплазмينا под действием ионов меди. Кристаллография. 2021;66(5):802-806. DOI: <https://doi.org/10.31857/S0023476121050179> EDN: FPRMZJ

References

1. Harris Z. L. Chapter 9 – Ceruloplasmin. Clinical and Translational Perspectives on Wilson Disease. Academic Press. 2019. pp. 77-84. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810532-0.00009-4>
2. Helman S. L., Zhou J., Fuqua B. K., Lu Y., Collins J. F., Chen H., Vulpe C. D., Anderson G. J., Frazer D. M. The biology of mammalian multi-copper ferroxidases. BioMetals. 2022;36:263-281. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10534-022-00370-z>
3. Vashchenko G., MacGillivray R. T. A. Multi-copper oxidases and human iron metabolism. Nutrients. 2013;5(7):2289-2313. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu5072289>
4. Moshkov K. A., Zajcev V. N., Romanovskaja E. V., Stefanov V. E. Ceruloplasmin: intramolecular electron transfer and ferroxidase activity. *Fundamental'nye issledovaniya* = Fundamental research. 2014;(3-1):104-108. (In Russ.). URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=21291815>
5. Puchkova L. V., Babich P. S., Zatulovskaja Y. A., Ilyechova E. Y., Di Sole F. Copper metabolism of newborns is adapted to milk ceruloplasmin as a nutritive source of copper: Overview of the current data. Nutrients. 2018;10(11):1591. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu10111591>
6. Dobrzanski Z., Kolacz R., Górecka H., Chojnacka K., Bartkowiak A. The content of microelements and trace elements in raw milk from cows in the Silesian region. Polish Journal of Environmental Studies. 2005;14(5):685-689.
7. Szczubial M., Dabrowski R., Kankofer M., Bochniarz M., Komar M. Concentration of serum amyloid A and ceruloplasmin activity in milk from cows with subclinical mastitis caused by different pathogens. Polish Journal of Veterinary Sciences. 2012;15(2):291-296. DOI: <https://doi.org/10.2478/v10181-011-0149-x>
8. Voronina O. A., Bogolyubova N. V., Zaytsev S. Yu. Mineral composition of cow milk – a mini review. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya* = Agricultural Biology. 2022;57(4):681-693. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2022.4.681rus>
9. Tsymbalenko N. V., Gyulikhandanova N. E., Platonova N. A., Babich V. S., Evsyukova I. I., Puchkova L. V. Regulation of ceruloplasmin gene activity in mammary gland cells. *Genetika* = Russian Journal of Genetics. 2009;45(3):390-400. (In Russ.). URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=11713826>
10. Hussein H. A., Staufienbiel R. Variations in copper concentration and ceruloplasmin activity of dairy cows in relation to lactation stages with regard to ceruloplasmin to copper ratios. Biological trace element research. 2012;146:47-52. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12011-011-9226-3>
11. Szczubial M., Dabrowski R., Kankofer M., Bochniarz M., Albera E. Concentration of serum amyloid A and activity of ceruloplasmin in milk from cows with clinical and subclinical mastitis. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy. 2008;3(52):391-395.
12. Saleh N., Allam T. S., Omran A., Abdelfattah A. M. Evaluation of Changes in Hemato-Biochemical, Inflammatory, and Oxidative Stress Indices as Reliable Diagnostic Biomarkers for Subclinical Mastitis in Cows. Alexandria Journal for Veterinary Sciences. 2022;(72)2:23-34. DOI: <https://doi.org/10.5455/ajvs.140786>
13. Sadat A., Farag A. M., Elhanafi D., Awad A., Elmahallawy E. K., Alsowayeh N., El-khadragy M. F., Elshopakey G. E. Immunological and Oxidative Biomarkers in Bovine Serum from Healthy, Clinical, and Sub-Clinical Mastitis Caused by Escherichia coli and Staphylococcus aureus Infection. Animals. 2023;13(5):892. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani13050892>
14. Zykova A. A., Golovnev B. A., Zykova A. A., Belkina O. M. Correlation of functionally active proteins in serum and central lymph during early crush syndrome. *Zdravookhraneniye Kyrgyzstana* = Health care of Kyrgyzstan. 2012;(2):36-38. (In Kyrgyzstan). URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=30682570>
15. Sermyagin A., Zinov'yeva N., Ermilov A., Yanchukov I. Infrared spectroscopy of milk. *Zhivotnovodstvo Rossii*. 2019;(S1):65-68. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.25701/ZZR.2019.17.64.008>
16. Voronina O. A. The level of copper in the milk of breeding cows in winter and spring. *Veterinariya, zootekhnika i biotekhnologiya* = Veterinary Medicine, Zootechnics and Biotechnology. 2022;(12-1):112-116. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36871/vet.zoo.bio.202212114>

17. Fadeikina O. V., Volkova R. A., Karpova E. V. Statistical analysis of results from the attestation of biological standard samples: use of the Mann-Whitney test. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal* = Pharmaceutical Chemistry Journal. 2019;53(7):54-58. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2019-53-7-54-58>
18. Saadalov T., Myrzaibraimov R., Abdullaeva Zh. D. Calculating procedure for the correlation coefficient of Fechner and Pearson and their application areas. *Byulleten' nauki i praktiki* = Bulletin of Science and Practice. 2021;7(10):270-276. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.33619/2414-2948/71/31>
19. Khromova L. G., Aristov A. V., Baylova N. V., Musenko I. V. Peculiarities of lactogenous function in dairy cows in the conditions of loose housing. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* = Vestnik of Voronezh state agrarian university. 2017;(4):79-88. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17238/issn2071-2243.2017.4.79>
20. Petukhov M. V., Samygina V. R., Sokolov A. V., Kostevich V. A. Copper-induced oligomerization of ceruloplasmin. *Kristallografiya* = Crystallography Reports. 2021;66(5):802-806. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.31857/S0023476121050179>

Сведения об авторах

✉ **Воронина Оксана Александровна**, кандидат биол. наук, старший научный сотрудник отдела физиологии и биохимии сельскохозяйственных животных, ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста», п. Дубровицы, д. 60, г. о. Подольск, Московская область, Российская Федерация, 142132, e-mail: vijinfo@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6774-4288>, e-mail: voroninaok-senia@inbox.ru

Зайцев Сергей Юрьевич, доктор биол. наук, доктор хим. наук, профессор, ведущий научный сотрудник отдела физиологии и биохимии сельскохозяйственных животных, ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста», п. Дубровицы, д. 60, г. о. Подольск, Московская область, Российская Федерация, 142132, e-mail: vijinfo@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1533-8680>

Савина Анастасия Анатольевна, младший научный сотрудник отдела физиологии и биохимии сельскохозяйственных животных, ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста», п. Дубровицы, д. 60, г. о. Подольск, Московская область, Российская Федерация, 142132, e-mail: vijinfo@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0257-1643>

Колесник Никита Сергеевич, младший научный сотрудник отдела физиологии и биохимии сельскохозяйственных животных, ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста», п. Дубровицы, д. 60, г. о. Подольск, Московская область, Российская Федерация, 142132, e-mail: vijinfo@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4267-5300>

Information about the authors

✉ **Oksana A. Voronina**, PhD in Biological Science, senior researcher, the Department of Physiology and Biochemistry of Agricultural Animals, Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L. K. Ernst, Dubrovitsy 60, Podolsk Municipal District, Moscow Region, Russian Federation, 142132, e-mail: vijinfo@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6774-4288>, e-mail: voroninaok-senia@inbox.ru

Sergey Yu. Zaitsev, DSc in Biological Science, DSc in Chemical Science, professor, leading researcher, the Department of Physiology and Biochemistry of Agricultural Animals, Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L. K. Ernst, Dubrovitsy 60, Podolsk Municipal District, Moscow Region, Russian Federation, 142132, e-mail: vijinfo@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1533-8680>

Anastasia A. Savina, junior researcher, the Department of Physiology and Biochemistry of Agricultural Animals, Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L. K. Ernst, Dubrovitsy 60, Podolsk Municipal District, Moscow Region, Russian Federation, 142132, e-mail: vijinfo@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0257-1643>

Nikita S. Kolesnik, junior researcher, the Department of Physiology and Biochemistry of Agricultural Animals, Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L. K. Ernst, Dubrovitsy 60, Podolsk Municipal District, Moscow Region, Russian Federation, 142132, e-mail: vijinfo@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4267-5300>

✉ – Для контактов / Corresponding author