

АНАЛИЗ ВЗАИМОСВЯЗЕЙ ЭКСПРЕССИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ микроРНК miR-767, miR-335-3р И miR-106b-5р И МЕТАБОЛИТОВ МОЛОКА И СЫВОРОТКИ КРОВИ КОЗ (*Capra hircus*)

© 2025 г. М. В. Позовникова^{1,*}, В. Б. Лейбова¹

¹Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального исследовательского центра животноводства – ВИЖ им. академика Л. К. Эрнста, Санкт-Петербург, пос. Тярлево, 196625 Россия

*e-mail: pozovnikova@gmail.com

Поступила в редакцию 07.08.2024 г.

После доработки 16.09.2024 г.

Принята к публикации 23.09.2024 г.

В представленной работе охарактеризован профиль экспрессии микроРНК miR-767, miR-335-3р и miR-106b-5р в пробах молока и сыворотки крови коз с первой по 23-ю неделю лактации с учетом динамики некоторых белковых и липидных метаболитов молока и крови. Экспрессия микроРНК в молоке была ассоциирована с некоторыми изменениями анализируемых метаболитов. MiR-767 положительно коррелировала с молочным белком, казеином, жирными кислотами (C18:0, СЦЖК и МНЖК). Для miR-335-3р была установлена отрицательная связь с содержанием общего холестерина и триглицеридов крови, но положительная с содержанием молочного жира и СЦЖК, КЦЖК, ТЖК и НЖК, в том числе C14:0, C16:0 и C18:0. Экспрессия miR-106b-5р показала одностороннюю связь с общим холестерином крови. Среди всех трех анализируемых микроРНК сыворотки крови только экспрессия miR-106b-5р была положительно ассоциирована с содержанием молочного белка, казеина, ДЦЖК и МНЖК. Высокий прогностический эффект ($R^2 > 0.800$, $p < 0.001$) предполагает значимую роль микроРНК, синтезируемых молочной железой (miR-767 и miR-335-3р), для белково-жировых компонентов молока, и miR-106b-5р, циркулирующей в крови, для молочного белка и казеина. Результаты нашего исследования позволяют предположить, что повышение уровня экспрессии miR-767, miR-335-3р в молоке и miR-106b-5р в сыворотке крови приводит к активации транскрипции и трансляции их генов-мишеней, что фенотипически выражается в увеличении значений ряда белково-жировых компонентов молока коз. Изучение роли микроРНК в регуляции лактации является перспективным направлением современной молекулярной биологии, которое имеет большой потенциал для повышения эффективности молочного производства, улучшения качества продукции и в программах разработки прогностических биомаркеров.

Ключевые слова: триглицериды, холестерин, казеин, жирные кислоты, лактация.

DOI: 10.31857/S0016675825020087 **EDN:** UVGAZS

Образование молока в молочной железе рассматривают как сложный комплекс биологических процессов, происходящих в секреторных клетках органа. Субстратом для синтеза основных компонентов молока, определяющих его пищевые, технологические и вкусовые характеристики, служат вещества, приносимые к молочной железе кровью, которые не просто переходят в молоко, а предварительно претерпевают сложные химико-биологические превращения на клеточном уровне. При этом может использоваться до 80% циркулирующих в крови метаболитов [1]. Основными путями синтеза молочного жира являются синтез жирных кислот

(ЖК) *de novo* и поглощение длинноцепочечных ЖК (ДЦЖК) из крови, их транспорт и десатурация, синтез триацилглицеридов (ТАГ) и капельная секреция липидов [2, 3]. Для образования белков молока молочная железа способна сама синтезировать аминокислоты, а также использовать свободные аминокислоты плазмы крови и некоторое количество (до 10%) пептидов [4]. Вариации субстратного фонда крови и нейроэндокринные влияния в основном определяют активность клеток молочной железы и их адаптационную способность к параптическим факторам [5]. Гармонизация процессов регуляции определяется изменением

транскриптома молочной железы, а комплексный анализ экспрессии генов в настоящее время рассматривают как окончательный подход в вопросах функционирования клетки или продуктивности железы в определенный период онтогенеза самки [6]. Так, например, у коз, начиная с первых дней лактации до ее окончания и поздней беременности, транскриптом молочной железы динамично изменяется, демонстрируя вариабельность паттернов экспрессии различных генов, участвующих в десятках метаболических путей [7]. Взаимодействия генов на посттранскрипционном уровне и их регуляция контролируются эпигенетическими механизмами, в конечном счете определяющими молекулярные модификации, ответственные за активность генома и экспрессию генов, которые приводят к фенотипическим различиям без изменений базовой последовательности ДНК. Сложная взаимосвязь между генетическими вариациями и внешними факторами определяет пластичность эпигенома, что в конечном итоге детерминирует степень выраженности признака [8].

Эпигенетическая регуляция может быть достигнута с помощью малых молекул – микроРНК. Путем спаривания оснований с мРНК они регулируют экспрессию генов в организме животных посредством ингибирования инициации трансляции и/или элонгации трансляции, котрансляционной деградации белка и преждевременного прекращения трансляции, в результате чего изменяется уровень клеточного белка в клетках различных типов тканей [9]. МикроРНК вырабатываются всеми органами и тканями в организме. Эти молекулы опосредуют межклеточные взаимодействия, циркулируя в кровеносном русле в составе белковых или липидных комплексов, и детектируются во всех биологических жидкостях организма. Различают специфические микроРНК, которые детектируются в большинстве тканей и органов, и циркулирующие микроРНК, которые сбалансированы по всему телу и могут быть свободными или заключенными в везикулы [10]. Среди всех коротких РНК сыворотка крови коров содержит более 80% микроРНК, экспрессия которых изменяется при различных рационах питания [11]. Недавние исследования показали, что микроРНК участвуют в процессах развития молочной железы, лактогенеза и лактопоэза и соответственно имеют решающее значение для регуляции генов, участвующих в развитии молочных желез и лактации [12]. При этом профиль экспрессии микроРНК в тканях молочной железы коз изменяется в зависимости от стадии лактации и в сухостойный период [13], от условий содержания и окружающей среды, рациона кормления [14]. Принимая во внимание значимую биологическую роль микроРНК, их рассматривают как эффективные биомаркеры, связанные с различными фенотипическими признаками и

заболеваниями как у человека, так и у животных, в том числе сельскохозяйственных [15]. Тем не менее универсальность микроРНК из разных жидкостей организма как биомаркера остается до конца неизученной.

В этой связи актуальными являются исследования, направленные на детальное изучение некоторых ключевых микроРНК, выявляемых как в молоке, так и в сыворотке крови, и их использование в качестве универсальных эпигенетических регуляторов синтеза компонентов молока у коз. Предположительно, микроРНК miR-767 (chrX; MIMAT0036293), miR-335-3p (chr4; MIMAT0036148) и chi-miR-106b-5p (chr25; MIMAT0035908) участвуют в процессах регуляции синтеза белково-жировых компонентов в молоке коз. В исследовании [13] данные микроРНК были определены как наиболее значимые из числа микроРНК, экспрессирующихся в тканях вымени коз во время лактации. Так, на основе биоинформационного анализа авторы предположили, что miR-767 участвует в процессах пролиферации и дифференцировки тканей, miR-335-3p – в регуляции морфогенеза и развития молочной железы, дифференцировке клеток, а miR-106b-5p предположительно ингибит апоптоз и имеет целевую регуляторную связь с *MAP3K5*, *BCL2L11* и *BID*. Более ранние исследования по сравнению геномов коз и крупного рогатого скота показали, что консервативные предшественники miR-335 и miR-106b экспрессировались в лактирующей молочной железе обоих видов и были локализованы в регионах QTL, ассоциированных с удоем и выходом молочного белка (для miR-106b) и процентным содержанием жира в молоке (для miR-335) [16].

Таким образом, существует необходимость более детального изучения вариативности экспрессии молекул miR-767, miR-335-3p и miR-106b-5p в сыворотке крови и молоке коз для определения их потенциального вклада в регуляцию сложных процессов синтеза белково-жировых компонентов молока в процессе лактации с учетом изменения биохимического профиля.

Цель настоящего исследования – сравнительный анализ относительной экспрессии miR-767, miR-335-3p и miR-106b-5p в молоке и сыворотке крови у коз в лактационный период и выявление связи с некоторыми биохимическими показателями сыворотки и белково-жировыми компонентами молока.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования была сформирована группа первородящих коз зааненской породы. Средний возраст животных составил 444 ± 12 дней. На протяжении всего периода исследований животные содержались при идентичных условиях и получали

сбалансированный рацион в соответствии с их физиологическим статусом.

Сбор проб молока осуществляли во время утренней дойки в следующие временные периоды лактации: первая неделя, 10–11-я, 13–14-я, 18–19-я, 22–23-я недели. Для анализа состава молока пробы консервировали Broad Spectrum Microtabs II, хранили при +4°C и доставляли в лабораторию не позднее двух дней от момента взятия образцов. Лабораторные исследования были выполнены на базе ЦКП ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста на инфракрасном анализаторе CombiFoss 7 DC (FOSS, Дания) по следующим показателям: массовая доля жира (**МДЖ**, %), массовая доля белка (**МДБ**, %), казеин (%), основные жирные кислоты (г/100 г молока): насыщенные (**НЖК**), в том числе миристиновая (C14:0), пальмитиновая (C16:0), стеариновая (C18:0), мононасыщенные (**МНЖК**), в том числе олеиновая (C18:1), длинноцепочечные (**ДЦЖК**), среднеподцепочечные (**СПЖК**), короткоцепочечные (**КЦЖК**), полиненасыщенные (**ПНЖК**), транс-жирные кислоты (**ТЖК**).

Для экстракции микроРНК молоко собирали в отдельные чистые пробирки без консерванта, немедленно охлаждали (+4...+6°C) и доставляли в лабораторию, где их замораживали при –80°C и хранили до использования.

Отбор проб крови проводили после утреннего доения в пробирки с активатором свертывания и гелем (PAG8, Китай), промежуток времени между кормлением и взятием крови составлял не менее двух часов. Образцы сыворотки крови были получены в течение полутора часов (не менее двух аликвот для каждого животного) и заморожены при –80°C. В сыворотке крови определяли содержание общего белка, триглицеридов (ТГ) и общего холестерина на спектрофотометре UNICO 1200/1201 (UNICO, США) коммерческими наборами фирмы АО “Витал Девелопмент Корпорэйшн” (Россия).

Для получения препаратов микроРНК использовали 2 мл молока и 500 мкл сыворотки крови и Коммерческий набор для выделения суммарной РНК и микроРНК из реагента “Лира” (ООО “Биолабмикс”, Россия). Концентрацию и чистоту полученных образцов (соотношение A260/280) оценивали на спектрофотометре NanoDrop2000c (Thermo Fisher Scientific). Концентрация образцов РНК из молока варьировалась в интервале 120–752 нг/мкл из сыворотки крови – 100–120 нг/мкл. Оценку уровня относительной экспрессии микроРНК проводили методом ОТ-ПЦР-РВ [17] с некоторыми модификациями [18]. На всех этапах работ использовали реагенты фирмы ООО “Биолабмикс”, все реакции ОТ-РВ-ПЦР осуществляли на приборе QuantStudio™ 5 Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, США). Реакции ПЦР-РВ

для каждого образца проводили в трех повторах. В качестве референсных образцов использовали синтетические микроРНК (ИХБФМ СО РАН, Россия, Новосибирск), для которых готовили серию разведений 10^{-1} – 10^{-8} нг/мкл для построения калибровочного графика. Праймеры были подобраны в программе “miRNA Primer Design Tool” (<http://genomics.dote.hu:8080/mirnadesigntool/process>) и синтезированы в ИХБФМ СО РАН (Россия, Новосибирск).

Полученные цифровые данные обрабатывали в программе GraphPad Prism 12.0. Статистическую значимость разницы исследуемых параметров между группами оценивали с помощью критерия Краскела–Уоллиса при множественных групповых сравнениях и критерия Манна–Уитни при сравнении двух групп. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$.

При построении графиков экспрессионных изменений микроРНК для улучшения распределения значений признаков применяли функцию логарифмирования шкалы для оси “у” (\log_{10}). Корреляционный анализ и построение тепловых матриц проводили с использованием коэффициента Спирмена в программе R-Studio. В качестве критического уровня значимости использовали $p < 0.05$. Анализ главных компонент (РСС – Principal Components & Classification), основанный на корреляционной матрице, был проведен на нормализованных данных с использованием программного обеспечения Statistica.10 (StatSoft, Inc., США). Расчет изменений экспрессии отдельных молекул микроРНК выполняли методом $-2^{-\Delta C_t}$ (delta Cycle threshold) [19]. Данные представлены в виде Mean ± Sem. Для регрессионного анализа использовали метод нелинейной регрессии с предварительной сплайн-нормализацией исходных данных, вид графика – “логарифмическая кривая”. Адекватность модели считали значимой при $p < 0.05$. Прогностическую ценность считали высокой при $R^2 > 0.800$ [20]. Поиск генов-мишеней и построение графика “Network” осуществляли в miRNet 2.0 [21]. Аннотацию сигнальных путей выявленных генов-мишеней проводили с помощью геномного браузера KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ фенотипических данных состава молока коз

Состав молока коз динамично изменялся ($p < 0.01$ – 0.001), демонстрируя высокие значения белково-жировых компонентов в первую неделю лактации. Для МДЖ и жирных кислот наблюдалось снижение средних значений к 10–11-й неделям лактации с последующей относительной стабилизацией. Для МДБ и казеина показатели снижались от первой недели к 13–14-й нед с последующим

ростом к 18–19-й и 22–23-й (табл. 1). Фактор “неделя лактации” значимо влиял на изменение компонентного состава молока ($p < 0.01$ – 0.001) (табл. 2).

Таблица 1. Динамика анализируемых компонентов молока коз зааненской породы первой лактации

Показатель	Недели лактации					p
	1	10–11	13–14	18–19	22–23	
МДЖ, %	7.36 ± 0.72	3.52 ± 0.33	4.15 ± 0.72	4.57 ± 0.32	4.26 ± 0.20	0.0048
МДБ, %	3.77 ± 0.09	2.67 ± 0.07	2.58 ± 0.26	2.97 ± 0.10	3.30 ± 0.13	0.0001
Казеин, %	3.19 ± 0.10	2.19 ± 0.06	2.11 ± 0.23	2.44 ± 0.09	2.70 ± 0.12	0.0002
C14:0	0.791 ± 0.087	0.369 ± 0.040	0.410 ± 0.078	0.500 ± 0.049	0.451 ± 0.019	0.0085
C16:0	1.762 ± 0.208	0.774 ± 0.077	0.934 ± 0.163	1.061 ± 0.085	0.914 ± 0.044	0.0043
C18:0	0.449 ± 0.059	0.178 ± 0.015	0.273 ± 0.038	0.232 ± 0.018	0.219 ± 0.023	0.0044
C18:1	1.743 ± 0.206	0.825 ± 0.066	1.034 ± 0.134	0.988 ± 0.053	1.048 ± 0.070	0.0042
ДЦЖК	1.996 ± 0.238	1.024 ± 0.084	1.291 ± 0.183	1.257 ± 0.064	1.305 ± 0.083	0.0113
СЦЖК	2.631 ± 0.293	1.232 ± 0.120	1.382 ± 0.266	1.777 ± 0.155	1.625 ± 0.080	0.0062
МНЖК	1.667 ± 0.208	0.742 ± 0.060	0.943 ± 0.125	0.906 ± 0.047	0.963 ± 0.063	0.0036
ПНЖК	0.282 ± 0.020	0.146 ± 0.008	0.167 ± 0.020	0.157 ± 0.006	0.148 ± 0.007	0.0029
НЖК	5.618 ± 0.543	2.493 ± 0.255	2.919 ± 0.542	3.297 ± 0.270	2.936 ± 0.136	0.0390
КЦЖК	1.643 ± 0.123	0.761 ± 0.070	0.846 ± 0.152	0.933 ± 0.075	0.824 ± 0.035	0.0024
ТЖК	0.098 ± 0.014	0.087 ± 0.008	0.091 ± 0.016	0.064 ± 0.007	0.046 ± 0.005	0.0098

Примечание. Для табл. 1, 2 содержание доли жирных кислот дано в г/100 г молока.

Таблица 2. Анализ влияния фактора “неделя лактации” на состав молока коз

Показатель	Средние значения за период наблюдения	R^2	F	p
МДЖ, %	4.77 ± 0.31	0.537	8.712	0.0001
МДБ, %	3.05 ± 0.09	0.602	11.345	0.0000
Казеин, %	2.52 ± 0.08	0.599	11.203	0.0000
C14:0	0.504 ± 0.036	0.508	7.750	0.0002
C16:0	1.089 ± 0.081	0.545	8.970	0.0001
C18:0	0.270 ± 0.220	0.550	9.177	0.0001
C18:1	1.128 ± 0.074	0.537	8.701	0.0001
ДЦЖК	1.375 ± 0.083	0.452	6.179	0.0009
СЦЖК	1.730 ± 0.119	0.497	7.408	0.0003
МНЖК	1.044 ± 0.074	0.556	9.375	0.0000
ПНЖК	0.180 ± 0.011	0.697	17.214	0.0000
НЖК	3.452 ± 0.250	0.581	10.383	0.0000
КЦЖК	1.002 ± 0.070	0.639	13.276	0.0000
ТЖК	0.077 ± 0.006	0.349	4.017	0.0100

Примечание. R^2 – коэффициент детерминации, F – критерий Фишера; p – уровень достоверности.

что в целом подтверждалось ассоциативными исследованиями (рис. 1, *a*), которые демонстрировали присутствие сильных корреляционных взаимосвязей между массовой долей жира в молоке и его жирнокислотным составом ($p < 0.001$). Также наблюдалась односторонняя связь между белковыми и жировыми компонентами молока коз ($p < 0.05$ – 0.001) и только группы “белок–ТЖК” и “казеин–ТЖК” показали низкую отрицательную корреляционную связь, близкую к нулевым значениям (-0.102 и -0.041 соответственно).

Анализ содержания триглицеридов, холестерина и общего белка в сыворотке крови коз

В нашем исследовании установлено, что концентрация триглицеридов (рис. 2, *a*) в сыворотке крови первородящих коз имела наименьшие

величины в первую и 10–11-ю недели после окота, а к 13–14-й, по сравнению с 10–11-й, проявляла тенденцию к повышению ($p < 0.1$). Наибольшая концентрация триглицеридов в крови за период наблюдений обнаружена на 18–19-й неделях лактации ($p = 0.054$). При этом процентное содержание жира в молоке было выше в первую неделю лактации, по сравнению с остальными периодами наблюдения ($p < 0.05$ – 0.001).

Содержание общего холестерина в крови (рис. 2, *b*) в первую неделю после окота было ниже, чем в последующие периоды лактации ($p < 0.05$ – 0.001).

Концентрация общего белка в сыворотке крови (рис. 2, *c*), как и триглицеридов, была наименьшей в 10–11-ю недели после окота, по сравнению с 13–14-й и 22–23-й неделями лактации ($p < 0.05$), а с 18–19-й достоверных различий не выявлено

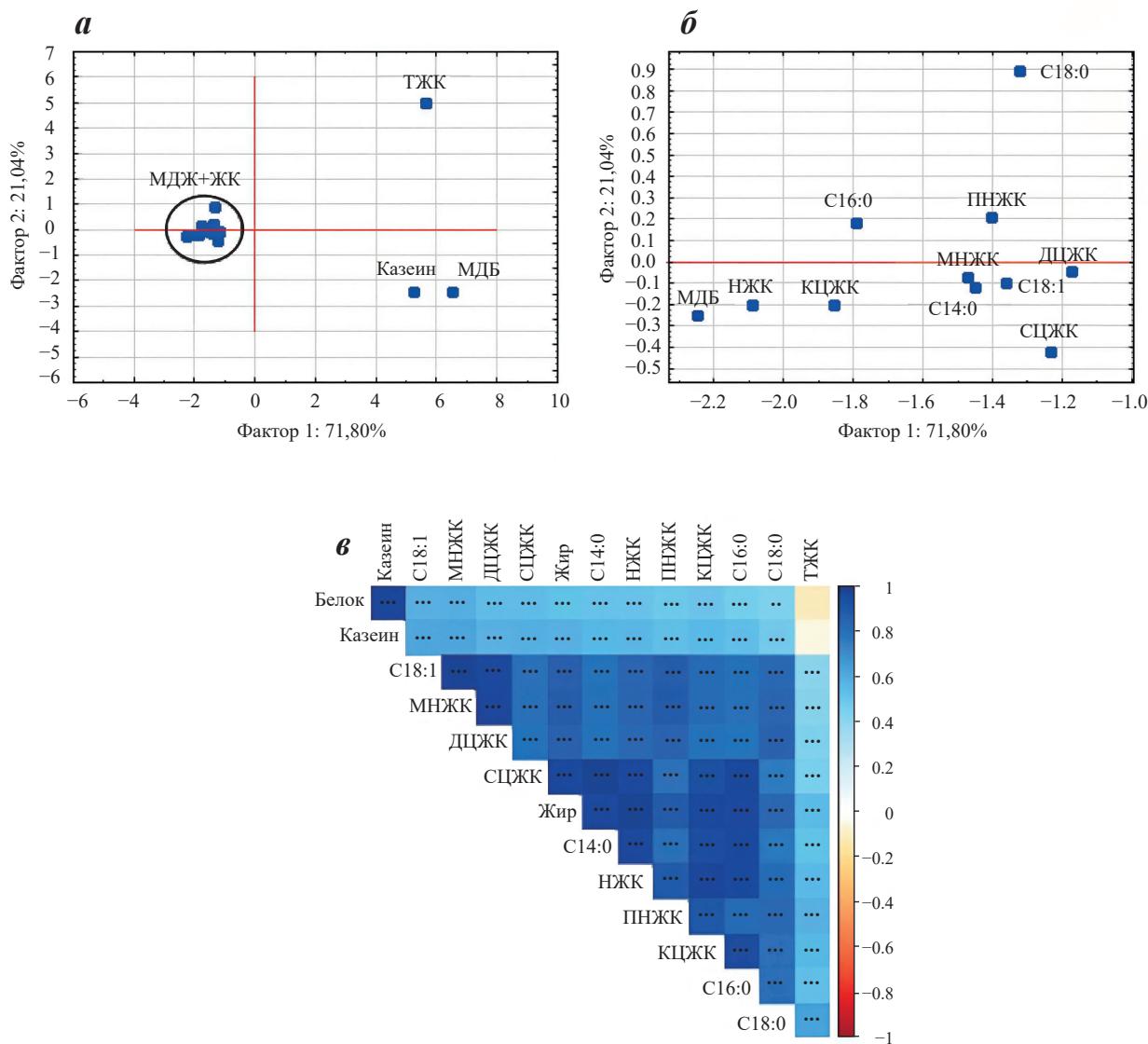


Рис. 1. График РСС для всех анализируемых компонентов молока коз (*a*), для кластера, включающего в себя МДЖ и ЖКК (*б*), и корреляционная матрица компонентов молока коз (*в*); в клеточках: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

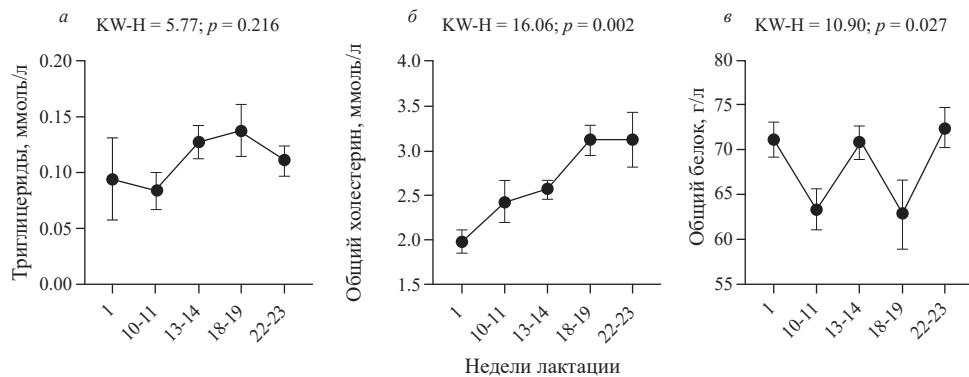


Рис. 2. Динамические изменения триглицеридов (а), общего холестерина (б) и общего белка (в) в сыворотке крови коз.

ввиду высокой вариабельности данного показателя. Массовая доля белка молока (табл. 1) в 10–11-ю недели также была ниже, чем в первую, 18–19-ю и в 22–23-ю недели лактации ($p < 0.05$ – 0.01).

Анализ уровня экспрессии miR-767, miR-335-3р и miR-106b-5р в молоке и в сыворотке крови коз

На протяжении всего периода эксперимента относительная экспрессия miR-767 в сыворотке крови по сравнению с молоком была значительно ниже ($p \leq 0.001$) и не изменялась по месяцам лактации (рис. 3, а). Уровень экспрессии miR-767 в молоке, напротив, показал значительную вариабельность: наименьшая величина относительной экспрессии была установлена для 10–11-й и 13–14-й недель при сопоставлении с 18–19-й и 22–23-й неделями лактации ($p < 0.05$ – 0.001).

Динамика относительной экспрессии miR-335-3р в молоке и сыворотке крови имела схожий характер (рис. 3, б), но отличалась степенью выраженности процесса. Так, если в сыворотке крови наблюдалось снижение уровня экспрессии от первой недели к 13–14-й и 22–23-й неделям лактации

($p < 0.05$ – 0.001), то в молоке установлено различие между первой неделей и 13–14-й, 18–19-й и 22–23-й неделями лактации ($p < 0.05$ – 0.001).

Анализ экспрессии miR-106b-5р показал, что ее уровень в первую неделю после окота в сыворотке крови был выше, а на 18–19-й неделях лактации ниже, чем в молоке ($p < 0.05$) (рис. 3, в). При этом изменение относительной экспрессии miR-106b-5р в сыворотке крови носило волнобразный характер: на 10–11-й и 18–19-й неделях лактации выявлено снижение уровня экспрессии по отношению к первой неделе ($p < 0.05$), а к 13–14-й и 22–23-й неделям – подъем в сравнении с 10–11-й ($p < 0.05$ – 0.01).

Уровень экспрессии miR-106b-5р в молоке был увеличен к 13–23-й неделям лактации в сравнении с первой неделей после окота ($p < 0.05$ – 0.001); с 10–11-й неделями достоверных различий не выявлено ввиду высокой вариабельности показателя в этот период.

В целом недели лактации, когда были зафиксированы наибольшие величины массовой доли жира и белка молока, совпадали с проявлением высокой относительной экспрессии miR-767 в молоке,

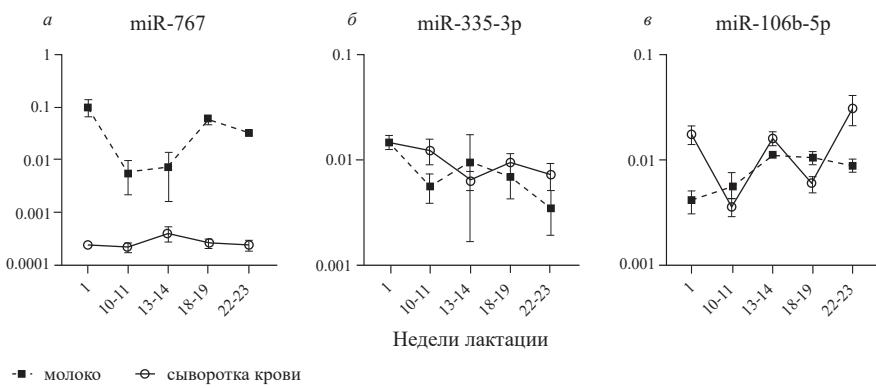


Рис. 3. Уровень относительной экспрессии ($-2^{-\Delta Ct}$) miR-767 (а), miR-335-3р (б) и miR-106b-5р (в) в молоке и сыворотке крови коз в различные периоды первой лактации.

miR-335-3р в молоке и сыворотке крови и miR-106b-5р в крови.

Таким образом, из трех анализируемых микроРНК только относительная экспрессия miR-335-3р на протяжении анализируемого периода лактации демонстрировала сходный характер изменений как в сыворотке крови, так и в молоке.

Корреляционный и регрессионный анализ микроРНК молока и сыворотки крови с фенотипическими показателями

Корреляционный анализ (табл. 3) выявил одностороннюю взаимосвязь уровня экспрессии молекул miR-335-3р сыворотки крови с уровнем экспрессии miR-335-3р молока ($p < 0.05$)

Таблица 3. Корреляционная связь между уровнями экспрессии микроРНК молока и сыворотки крови и компонентным составом молока

Показатель	Уровень экспрессии микроРНК в молоке			Уровень экспрессии микроРНК в сыворотке крови		
	miR-767 (м)	miR-335-3р (м)	miR-106b-5р (м)	miR-767 (с)	miR-335-3р (с)	miR-106b-5р (с)
miR-767 (м)	1.000	0.107	0.067	-0.205	0.066	0.260
miR-335-3р (м)	0.107	1.000	-0.277	0.087	0.412*	0.075
miR-106b-5р (м)	0.067	-0.277	1.000	0.154	-0.344*	0.060
miR-767 (с)	-0.205	0.087	0.154	1.000	0.146	0.126
miR-335-3р (с)	0.066	0.412*	-0.344*	0.146	1.000	0.013
miR-106b-5р (с)	0.260	0.075	0.060	0.126	0.013	1.000
Общий холестерин	0.279	-0.343*	0.341*	-0.183	-0.275	-0.054
Триглицериды	0.104	-0.390*	0.107	-0.117	-0.160	0.225
Общий белок	0.051	-0.342	0.103	0.088	-0.163	0.346*
МДЖ	0.337*	0.407*	-0.240	-0.035	0.105	0.171
МДБ	0.470*	0.080	-0.233	-0.016	0.212	0.366*
Казеин	0.474*	0.076	-0.223	-0.005	0.220	0.351*
C14:0	0.311	0.423*	-0.276	-0.124	0.104	0.118
C16:0	0.332	0.452*	-0.255	-0.125	0.105	0.090
C18:0	0.257	0.372*	-0.150	0.065	0.170	0.315
C18:1	0.334*	0.264	-0.156	-0.015	0.180	0.344*
ДЦЖК	0.303	0.229	-0.116	-0.005	0.187	0.345*
СЦЖК	0.334*	0.379*	-0.248	-0.152	0.040	0.131
МНЖК	0.346*	0.261	-0.144	0.028	0.161	0.339*
ПНЖК	0.262	0.306	-0.216	0.008	0.050	0.194
НЖК	0.330	0.426*	-0.245	-0.075	0.093	0.145
КЦЖК	0.323	0.458*	-0.283	-0.053	0.108	0.162
ТЖК	-0.199	0.372*	-0.255	0.004	0.173	-0.098

Примечание. * $p < 0.05$; (м) – микроРНК молока; (с) – микроРНК сыворотки крови.

экспрессии молочной miR-767 был положительно взаимосвязан с массовой долей жира и белка в молоке, казеином, а также С18:1, СЦЖК, МНЖК ($p < 0.05$).

Наибольшее количество корреляционных связей обнаружено для miR-335-3р молока. Так, относительная экспрессия молочной miR-335-3р демонстрировала отрицательную связь с концентрацией общего холестерина и триглицеридов в крови ($p < 0.05$) и положительную – с массовой долей жира и жирными кислотами молока (С14:0, С16:0, С18:0, СЦЖК, НЖК, КЦЖК, ТЖК) ($p < 0.05–0.01$).

Результаты регрессионного анализа показали (рис. 4), что из трех микроРНК крови статистически значимая доля объясненной дисперсии с отдельными показателями крови и компонентами молока установлена только для miR-106b-5р. Высокие коэффициенты детерминации получены для общего белка крови, МДБ и казеина ($R^2 = 0.762, 0.922$ и 0.886 соответственно, $p < 0.001$). Несколько ниже оказалась доля объясненной дисперсии по С18:1, СЦЖК, МНЖК ($R^2 = 0.579–0.664$,

$p < 0.001$). В свою очередь, miR-106b-5р молока обнаружила высокий коэффициент детерминации для холестерина крови ($R^2 = 0.890$, $p < 0.001$).

Две другие микроРНК молока также показали коэффициенты детерминации выше 80% ($p < 0.001$) для компонентного состава молока (рис. 5). У miR-767 они установлены для МДБ и казеина, МДЖ и отдельных жирных кислот: С18:1, СЦЖК, МНЖК ($R^2 = 0.938–0.995$, $p < 0.001$), а у miR-335-3р – только с МДЖ и большинством жирных кислот молока: С14:0, С16:0, С18:0, СЦЖК, НЖК, КЦЖК, ТЖК ($R^2 = 0.839–0.995$, $p < 0.001$).

Таким образом, вариации компонентного состава молока частично могут быть обусловлены спецификой экспрессии представленных микроРНК. При этом относительная экспрессия miR-106b-5р крови предположительно влияет на белковый состав молока, miR-767 молока – на белково-жировой, а miR-335-3р молока обуславливает изменение жирнокислотного состава молока.

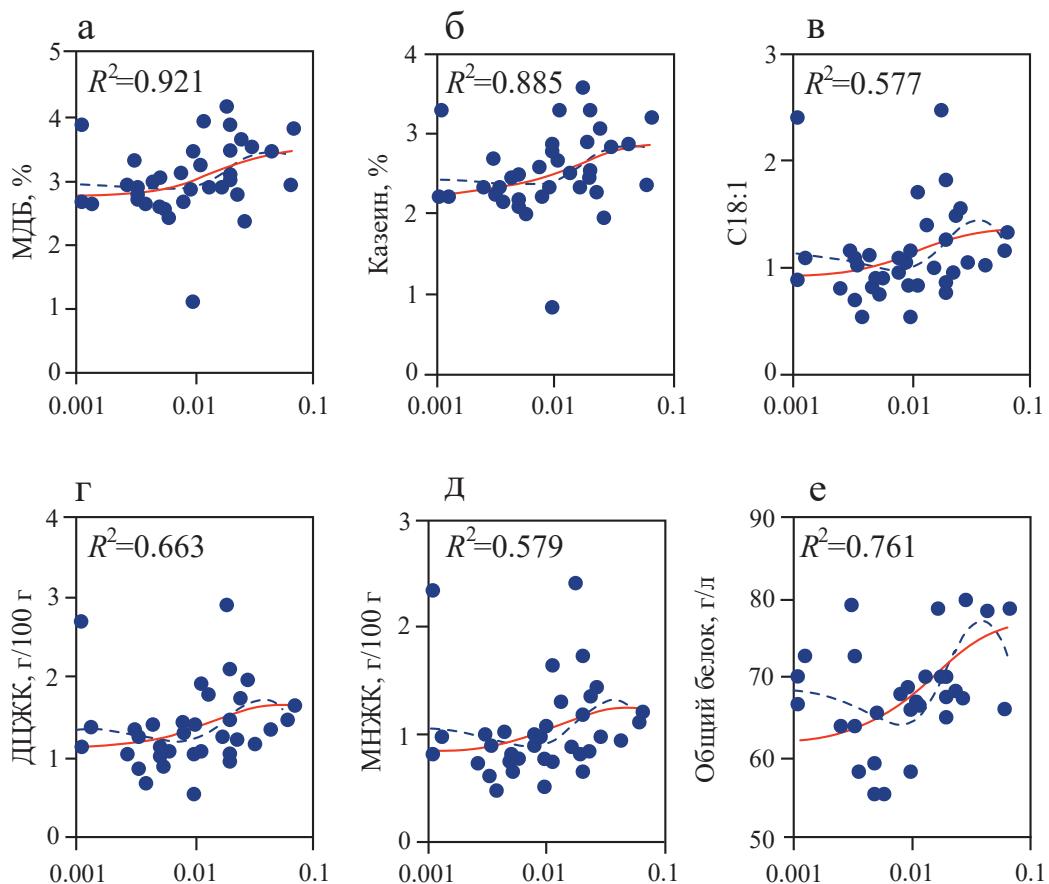


Рис. 4. График прогностической способности miR-106b-5р крови на основе логистической нелинейной регрессионной модели прогноза содержания МДБ (а), казеина (б), С18:1 (в), ДЦЖК (г), МНЖК (д) и общего белка сыворотки крови (е).

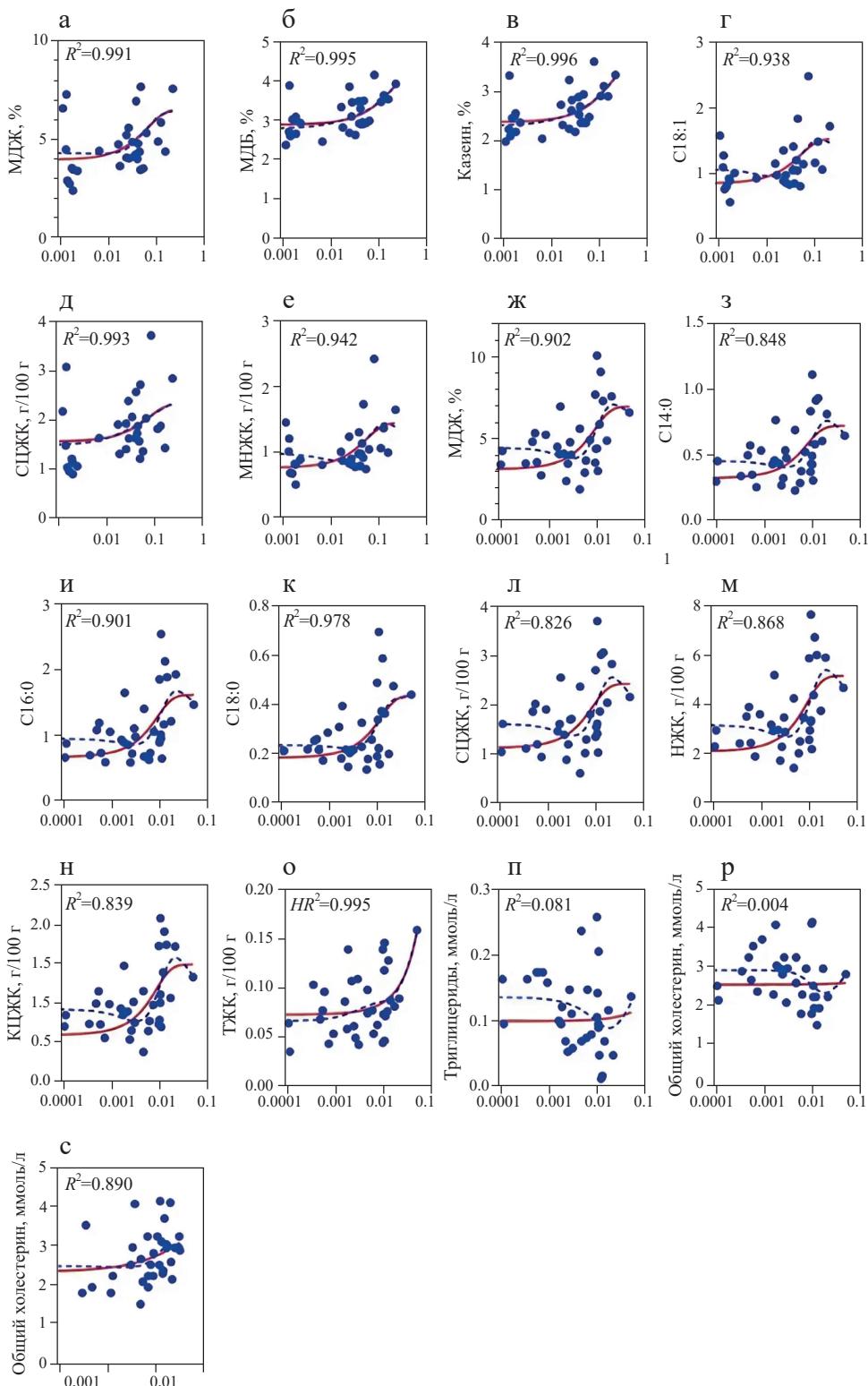


Рис. 5. График прогностической способности микроРНК молока на основе логистической нелинейной регрессионной модели прогноза содержания метаболитов молока и сыворотки крови: miR-767 – МДЖ (а), МДБ (б), казеин (в), С18:1 (г); miR-335-3р – МДЖ (ж), С14:0 (з), С16:0 (и), С18:0 (к), СЦЖК (л), НЖК (м), КЦЖК (н), ТЖК (о), триглицериды крови (п), общий холестерин крови (р); miR-106b-5р – общий холестерин крови (с).

Биоинформационный анализ целевых генов-кандидатов и их функциональная аннотация

Для исследуемых микроРНК мы провели поиск целевых генов-мишней в онлайн-приложении miRNet [21] на основе данных, полученных с miRTarBase [22]. Ввиду высокой консервативности микроРНК и отсутствия информации в доступных онлайн-ресурсах по виду *Capra hircus* поиск был выполнен для микроРНК человеческих гомологов (hsa-miR-767-5p, hsa-miR-335-5p и hsa-miR-106b-5p). Всего было предсказано 3905 генов, из которых целевыми для miR-767-5p определено 187, для miR-106b-5p – 2627 и для miR-106b-5p – 1091.

Построение графика на основе алгоритма “сеть лесов Штайнера” (вид Backbone) выявило четыре модуля, содержащих общие целевые гены (рис. 6). Для miR-767-5p и miR-335-5p общий модуль включал 29 генов, для miR-106b-5p и miR-335-5p – 148 генов, а для miR-767-5p и miR-106b-5p – 30 генов. В центральном модуле сети расположились 14 генов, являющихся целевыми для всех трех анализируемых микроРНК (*ABCG8, INSIG1, KDM6B, KLHL15, LCOR, MDM2, MORF4L1, MMP2, OTUD4, PARD6B, RUFY2, TET2, UGDH, HMGCS1*) и соответственно представляющих особый научный интерес в рамках нашего исследования (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ

Вариативность компонентного состава молока на протяжении лактации является физиологическим процессом, который контролируется рядом генов [23] и зависит от множества патофизиологических факторов. Последние исследования в данной области на основе метаанализа 82 научных работ выявили, что состав молока коз зависит от местоположения (страна, регион разведения), стадии лактации, сезона года, породы и от года публикации [24]. Полученные нами данные показали, что неделя лактации значительно влияет на изменение белково-жировых элементов молока (табл. 2) ($p < 0.01–0.001$), при этом максимальные значения зафиксированы в начале лактации, что согласуется с результатами других авторов [25, 26]. Некоторые исследования, напротив, показывают рост абсолютных значений белковых и жировых составляющих молока коз к концу [27] или в середине лактации [28]. В целом такая вариативность допустима и зачастую является отражением генетической архитектуры конкретной выборки животных.

Метаболические адаптации как молочной железы, так и всего организма в целом характерны для всего периода лактации самки. Так, после окота наблюдается активизация работы клеток молочной железы, увеличивается секреция молока и происходит активное поглощение циркулирующих

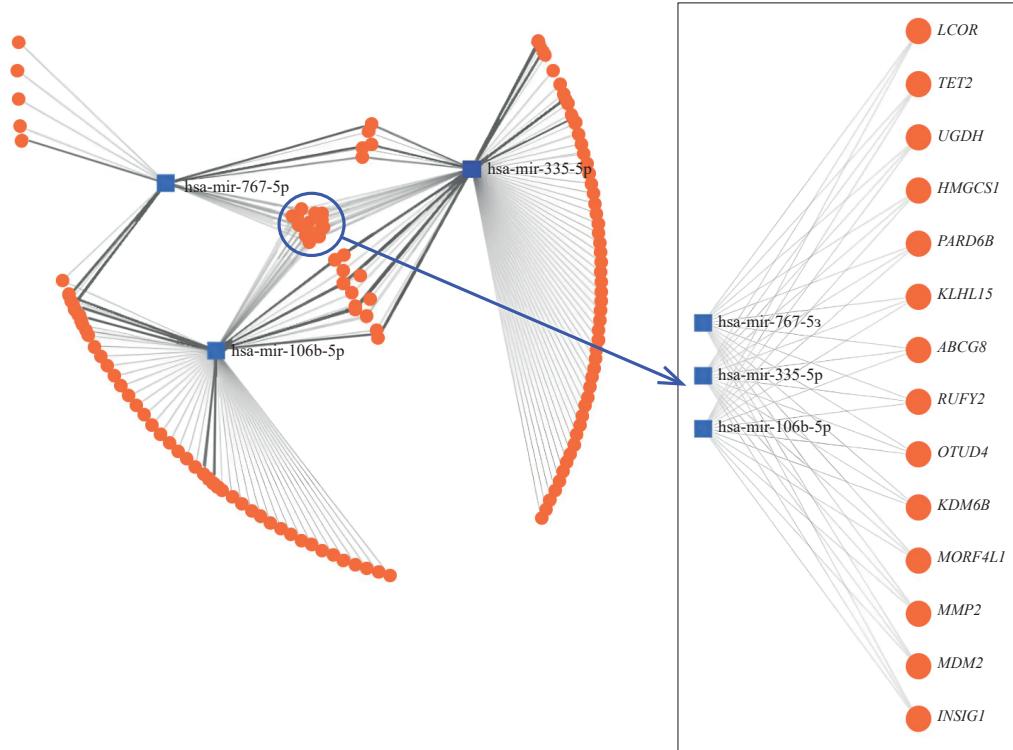


Рис. 6. МикроРНК и все их гены-мишени, включая гены “центрального модуля”.

метаболитов из крови. При этом используются и внутренние “резервы” организма. Анализ результатов биохимического исследования сыворотки не выявил четкой зависимости между концентрацией триглицеридов и МДЖ в молоке первородящих коз. Значения триглицеридов крови были максимальными в 18–19-ю недели, а уровень МДЖ – на первой неделе лактации. Подобное изменение концентрации триглицеридов в крови при данной динамике массовой доли жира в молоке могло быть обусловлено двумя факторами: повышенной потребностью молочной железы в синтезе молочного жира в первые месяцы лактации [29] и интенсивной аккумуляцией триглицеридов печенью во время негативного энергетического баланса [30]. Триглицериды попадают в кровь в составе липопротеинов, для образования которых нужен холестерин, однако динамика триглицеридов и общего холестерина крови в период лактации имеет различия [31].

Уровень холестерина крови достоверно увеличивался от первой к 22–23-й неделям лактации, что соответствует результатам, полученным ранее на молочных козах [32, 33].

Был установленcanoобразный характер изменения общего белка в сыворотке крови при максимальных значениях в начале (первая неделя), середине (13–14) и конце (22–23) периода наблюдения. Достоверно низкие значения были зафиксированы на 10–11-й неделях лактации. Подобный уровень содержания общего белка на 10–11-й неделях лактации ранее был выявлен на козах, по предположению активно использующих мышечные резервы организма на пике лактации [33]. В этот же период значения МДБ были ниже по сравнению с другими точками наблюдения ($p < 0.05–0.01$), что может свидетельствовать о недостаточной сбалансированности рациона по белку. Однако данный вопрос не рассматривался в рамках нашего исследования.

В целом профиль метаболитов крови у первородящих молочных коз зааненской породы, определенный в настоящем исследовании, соответствовал данным, полученным нами ранее [34].

Настоящие данные показали, что уровни экспрессии идентичных микроРНК в молоке и сыворотке крови имели разный профиль, что, вероятно, обусловлено различным происхождением этих молекул [35].

Уровни экспрессии miR-767 в молоке и сыворотке крови были различны и не имели между собой корреляционных связей ($r = -0.205$), при этом значимые ассоциации были установлены с некоторыми белково-жировыми компонентами молока только для молочной микроРНК ($p < 0.05$).

Схожесть динамики экспрессионных изменений miR-335-3р в молоке и сыворотке крови ($r = 0.412$, $p < 0.05$) может быть обусловлена ее значимой ролью в биологических процессах организма

самки, происходящих во время лактации. При этом молочная miR-335-3р была ассоциирована с липидными компонентами крови и молока (табл. 3) ($p < 0.05$). Исходя из полученных результатов, можно предположить, что miR-335-3р молока участвует во встраивании метаболитов крови в процесс синтеза молочного жира.

Для молекулы miR-106b-5р не установлено корреляционных связей между ее экспрессией в молоке и сыворотке крови ($r = 0.060$). Динамика экспрессии сывороточной miR-106b-5р соответствовала характеру изменений концентрации общего белка в крови ($r = 0.366$, $p < 0.05$).

Результаты нашего исследования показали положительную связь отдельных молекул микроРНК и компонентов крови и молока коз, следовательно, повышение экспрессии микроРНК может приводить к активации транскрипции и трансляции их генов-мишеней. Ранее подобные данные были получены на молочном скоте [18, 36]. Другими авторами было продемонстрировано, что взаимодействие отдельных микроРНК и мРНК молока приводило к изменению жирнокислотного состава молока и уровня неэтерифицированных жирных кислот и триацилглицеридов в сыворотке крови [37].

Изучение жирнокислотного состава молока коз важно в вопросах питания человека. Потребление молока с высоким содержанием ДЦЖК, СЦЖК, ПНЖК и КЦЖК благоприятно оказывается на здоровье человека, улучшая состояние кишечника при воспалительных заболеваниях за счет повышения иммунологических и антимикробных функций эпителия [38]. Жирные кислоты с цепочками от 4 до 12 атомов углерода придают уникальный вкус козьему молоку и облегчают усвоение жиров. В питании людей рекомендуется обращать внимание на содержание в рационе НЖК для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний. Жирные кислоты C14:0 и C16:0 считаются атерогенными и могут способствовать развитию атеросклероза при избыточном потреблении. В исследованиях на мышиных моделях было установлено, что диета с высоким содержанием C18:0/C16:0 приводила к серьезным нарушениям в липидном и углеводном обмене, изменяя экспрессию длинной РНК, микроРНК и мРНК [39].

Исследование уровней экспрессии микроРНК может использоваться в разработках будущих стратегий прогнозирования компонентного состава и качества молока. Оценка прогностического эффекта на основе результатов регрессионного анализа выявила значительные связи уровня экспрессии молочной miR-335-3р как с суммарным значением НЖК, так и с отдельными ЖК этой группы – C14:0, C16:0 и C18:0, СЦЖК, КЦЖК, ТЖК и МДЖ ($R^2 > 0.800$, $p < 0.001$), а для

Таблица 4. Избыточная представленность в основных сигнальных путях целевых генов-мишеней анализируемых микроРНК “центрального модуля”

Ген	Идентификационный № (ID)	Биологический процесс (онтология генов)
<i>ABCG8</i>	ENSCHIG00000022042	Регуляция абсорбции холестерина в кишечнике (GO:0030300)
		Негативная регуляция транспорта холестерина (GO:0032375)
		Процесс катаболизма холестерина (GO:0006707)
		Отрицательная регуляция транспорта липидов (GO:0032369)
		Регуляция накопления холестерина (GO:0010885)
		Отток холестерина (GO:0033344)
		Гомеостаз холестерина (GO:0042632)
		Транспорт холестерина (GO:0030301)
		Регуляция транспорта холестерина (GO:0032374)
		Процесс метаболизма холестерина (GO:0008203)
		Регуляция локализации липидов (GO:1905952)
		Регуляция процесса биосинтеза липидов (GO:0046890)
		Сигнальный путь SREBP (GO:0032933)
<i>INSIG1</i>	ENSCHIG00000023323	Регуляция сигнального пути SREBP (GO:2000638)
		Положительная регуляция процесса биосинтеза холестерина (GO:0045542)
		Процесс биосинтеза холестерина (GO:0006695)
		Процесс метаболизма холестерина (GO:0008203)
		Регуляция процесса биосинтеза жирных кислот (GO:0042304)
		Положительная регуляция транскрипции микроРНК (GO:1902895)
		Регуляция процесса метаболизма жирных кислот (GO:0019217)
		Липидный гомеостаз (GO:0055088)
		Процесс биосинтеза липидов (GO:0008610)
		Процесс метаболизма клеточных липидов (GO:0044255)
		Процесс метаболизма липидов (GO:0006629)
		Отрицательная регуляция секреции белка (GO:0050709)
		Отрицательная регуляция транспорта белков (GO:0051224)
<i>MDM2</i>	ENSCHIG00000019939	Регуляция бета-окисления жирных кислот (GO:0031998)
		Сигнальный путь рецептора инсулина (GO:0008286)
		Клеточный ответ на стимуляцию инсулином (GO:0032869)
		Внутриклеточный транспорт белков (GO:0006886)
		Отрицательная регуляция процесса метаболизма белков (GO:0051248)
		Регуляция процесса модификации белков (GO:0031399)
		Регуляция процесса обмена белков (GO:0051246)
		Процесс метаболизма белков (GO:0019538)

Таблица 4. Окончание

Ген	Идентификационный № (ID)	Биологический процесс (онтология генов)
<i>MORF4L1</i>	ENSCHIG00000008923	Позитивная регуляция метаболического процесса соединений, содержащих азотистые основания (GO:0045935)
		Позитивная регуляция процесса метаболизма макромолекул (GO:0010604)
<i>MMP2</i>	ENSCHIG00000016293	Отрицательная регуляция процесса метаболизма белков (GO:0051248)
		Регуляция процесса обмена белков (GO:0051246)
		Позитивная регуляция клеточного процесса (GO:0048522)
<i>OTUD4</i>	ENSCHIG00000016816	Модификация белка путем конъюгации или удаления небольшого белка (GO:0070647)
		Протеолиз (GO:0006508)
<i>KDM6B</i>	ENSCHIG00000017251	Процесс модификации белка (GO:0036211)
		Процесс метаболизма азоторганических соединений (GO:1901564)
<i>KLHL15</i>	ENSCHIP00000024458	Контроль качества ядерного белка с помощью убиквитин-протеасомной системы (GO:0071630)
<i>PARD6B</i>	ENSCHIG00000024844	Позитивное регулирование транспорта (GO:0051050)
<i>TET2</i>	ENSCHIG00000019979	Модификация макромолекул (GO:0043412)
		Отрицательная регуляция процесса метаболизма азотистых соединений (GO:0051172)
		Негативная регуляция процесса метаболизма макромолекул (GO:0010605)
		Процесс метаболизма клеточных макромолекул (GO:0044260)
<i>UGDH</i>	ENSCHIG00000024923	Процесс метаболизма липидов (GO:0006629)
		Процесс метаболизма нуклеотидов и сахаров (GO:0009225)
		Процесс биосинтеза нуклеотидов и сахаров (GO:0009226)
<i>HMGCS1</i>	ENSCHIG00000015096	Катаболический процесс аминокислот с разветвленной цепью (GO:0009083)
		Процесс биосинтеза холестерина (GO:0006695)
		Бета-окисление жирных кислот (GO:0006635)
		Метаболический процесс ацетил-КоА (GO:0006084)
		Процесс метаболизма холестерина (GO:0008203)
		Процесс биосинтеза липидов (GO:0008610)
		Процесс метаболизма липидов (GO:0006629)
		Процесс метаболизма клеточных липидов (GO:0044255)
<i>LCOR</i>	ENSCHIG00000008908	Активность регулятора транскрипции (GO:0140110)
<i>RUFY2</i>	ENSCHIG00000010345	Связывание белков (GO:0005515)

молочной miR-767 – с белковыми фракциями, МДЖ и С18:1, СЦЖК и МНЖК ($R^2 > 0.800, p < 0.001$). Таким образом, молекулы miR-335-3р и miR-767, синтезируемые молочной железой, можно рассматривать как перспективные биомаркеры в прогнозировании белково-жирового состава молока коз.

Прогностический эффект был также установлен в отношении miR-106b-5р крови для МДБ и казеина молока ($R^2 > 0.800, p < 0.001$), что предполагает участие циркулирующих микроРНК в процессах регуляции синтеза молочного белка.

Механизм регуляции компонентного состава молока сложен и все еще до конца не изучен. Доступные базы данных содержат информацию о биологической значимости генов “центрального модуля”, аннотированных нами с помощью биоинформационного анализа. В общей сложности эти гены имеют разнообразные функции, связанные с регуляцией клеток, вовлечены в процессы метаболизма липидов и/или белков (табл. 4), что подтверждает идею сложной многоуровневой генетической регуляции процесса лактации. Хотя конкретная роль этих генов в метаболизме жирных кислот и молочного белка на разных этапах лактации коз еще до конца не изучена, они могут рассматриваться как потенциальные гены-кандидаты, которые, как ожидается, помогут лучше понять процесс синтеза белково-жировых компонентов молока. Мы приводим доступную информацию, имеющуюся на сегодняшний день по генам “центрального модуля”, их предполагаемой роли в процессах лактогенеза и галактопоэза.

Ген *ABCG8* высококонсервативен у млекопитающих, активно экспрессируется в тканях молочной железы [40] и определен как значимый ген-кандидат, ассоциированный с жирнокислотным составом молока коров [41]. В ряде исследований было показано, что ген *INSIG1* вовлечен в регуляцию липогенеза у коз и является мишенью также для микроРНК miR-145 [42], miR-26a и miR-26b [43]. По данным [44], ген *MMP2* участвует в биологических механизмах препубертатного маммогенеза у коз. Так, овариэктомия у козочек в возрасте одного-двух и девяти месяцев приводила к снижению экспрессии гена *MMP2* в тканях молочных желез. Ген *KDM6B* (*JMJD3*) был определен как один из ключевых генов раннего эмбрионального развития у крупного рогатого скота [45]. Однако недавние исследования показывают, что он участвует в эпигенетической регуляции воспаления при мастите бактериальной природы [46]. По данным [47], ген *UGDH* предположительно вовлечен в генетическую изменчивость, лежащую в основе QTL для признания молочной продуктивности коров.

Функция отдельных генов была описана в ряде исследований на мышиных моделях. Так, у мышей мутация гена *MDM2*^{C305F} способствует накоплению

жира при нормальных условиях кормления и гепатостеатозу при остром голодании [48]. Ген *MORF4* участвует в активации генов липидного метаболизма в печени мыши [49]. Ген *KLHL15* необходим для развития нервной системы млекопитающих [50]. Ген *TET2* действует как эпигенетический регулятор сенсибилизации к инсулину, опосредованной Rosi, и регуляции транскрипции в адипоцитах [51]. *HMGCS2* – ген, регулирующий выработку кетоновых тел, может вызывать β-окисление жирных кислот (FAO) и кетогенез [52]. Ген *LCoR* определен как транскрипционный корепрессор адипогенеза за счет его негативной регуляции раннего адипогенеза [53]. Ген *RUFY2* предположительно участвует в жизненно важных процессах клеток за счет контроля путей мембранных транспорта и клеточной полярности [54].

Таким образом, впервые было установлено, что в молоке и сыворотке крови у коз с первой по 23-ю неделю лактации экспрессия miR-767, miR-335-3р и miR-106b-5р имела различный характер изменений. Анализ корреляционных связей позволяет предположить, что miR-767 и miR-335-3р, синтезируемые молочной железой, участвуют в регуляции процессов лактогенеза и галактопоэза и могут рассматриваться как перспективные биомаркеры жирнокислотного состава молока. Активизация miR-767 способствует увеличению уровня “полезных” жирных кислот (СЦЖК и МНЖК) в молоке, в то время как miR-335-3р может негативно повлиять на жирнокислотный состав молока, приводя к повышению содержания НЖК. Также значимая ассоциативная связь miR-106b-5р крови с МДБ и казеином предполагает участие этой молекулы в процессах регуляции синтеза белка клетками молочной железы. Анализ относительной экспрессии микроРНК в молоке и сыворотке крови коз позволяет глубже понять эпигенетические аспекты, влияющие на метаболитный состав молока и крови, расширяя наши знания о сложных процессах в организме самки во время лактации.

Исследования проведены при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. Регистрационный номер темы Государственного задания FGNN-2024-0015 (124020200114-7).

Исследование одобрено Этическим комитетом Федерального научного центра животноводства им. Л.К. Эрнста 26.09.2023 г. (Протокол № 1) и Законом Российской Федерации о ветеринарной медицине от 14 мая 1993 г. (№ 4979-1).

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Assan N. Influence of stage of lactation on quantitative and qualitative milk production parameters in goats // *Scientific J. Animal Sci.* 2014. V. 3. № 12. P. 291–300. <https://doi.org/10.14196/sjas.v3i12.1775>
2. Osorio J.S., Lohakare J., Bionaz M. Biosynthesis of milk fat, protein, and lactose: Roles of transcriptional and posttranscriptional regulation // *Physiol. Genomics.* 2016. V. 48. № 4. 231–256. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00016.2015>
3. Valencia-Magaña F., Prado-Rebolledo O., Hernández-Rivera J. et al. The goat udder: mechanism of milk secretion, and protein/fat synthesis // *Abanico Veterinario.* 2023. V. 13. <https://doi.org/10.21929/abavet2023.10>
4. Zhang J., Deng L., Zhang X. et al. Multiple essential amino acids regulate mammary metabolism and milk protein synthesis in lactating dairy cows // *Animal Feed Science and Technology.* 2023 V. 296. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115557>
5. Черепанов Г.Г., Макар З.Н. Сопряженная регуляция органического кровотока и метаболизма секреторных клеток молочной железы: анализ проблемы // Успехи физиол. наук. 2007. Т. 38. № 1. С. 74–85.
6. Michailidou S., Gelasakis A., Banos G. et al. Comparative transcriptome analysis of milk somatic cells during lactation between two intensively reared dairy sheep breeds // *Frontiers in Genetics.* 2021. V. 12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.700489>
7. Xuan R., Wang J., Zhao X. et al. Transcriptome analysis of goat mammary gland tissue reveals the adaptive strategies and molecular mechanisms of lactation and involution // *Intern. J. Mol. Sciences.* 2022. V. 23. № 22. <https://doi.org/10.3390/ijms232214424>
8. Wang M., Ibeagha-Awemu E.M. Impacts of epigenetic processes on the health and productivity of livestock // *Frontiers in Genet.* 2021. V. 11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.613636>
9. Huntzinger E., Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: Contributions of translational repression and mRNA decay // *Nat. Reviews Genet.* 2011. V. 12. № 2. P. 99–110. <https://doi.org/10.1038/nrg2936>
10. Rani P., Yenuganti V.R., Shandilya S. et al. miRNAs: The hidden bioactive component of milk // *Trends in food science & technology.* 2017. V. 65. P. 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.05.007>
11. Quan S., Nan X., Wang K. et al. Different diets change the expression of bovine serum extracellular vesicle-miRNAs // *Animals.* 2019. V. 9. № 12. <https://doi.org/10.3390/ani9121137>
12. Dysin A.P., Barkova O.Y., Pozovnikova M.V. The role of microRNAs in the mammary gland development, health, and function of cattle, goats, and sheep // *Non-coding RNA.* 2021. V. 7. № 4. <https://doi.org/10.3390/ncrna7040078>
13. Xuan R., Chao T., Wang A. Characterization of microRNA profiles in the mammary gland tissue of dairy goats at the late lactation, dry period and late gestation stages // *PLoS One.* 2020. V. 15. № 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234427>
14. Tudisco R., Morittu V.M., Addi L. et al. Influence of pasture on stearoyl-coa desaturase and mirna 103 expression in goat milk: Preliminary results // *Animals.* 2019. V. 9. № 9. <https://doi.org/10.3390/ani9090606>
15. Wang Y., Lin Y., Wu S. et al. BioKA: A curated and integrated biomarker knowledgebase for animals // *Nucl. Acids Res.* 2024. V. 52. № D1. P. D1121–D1130. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad873>
16. Mobuchon L., Marthey S., Boussaha M. et al. Annotation of the goat genome using next generation sequencing of microRNA expressed by the lactating mammary gland: comparison of three approaches // *BMC Genomics.* 2015. V. 16. P. 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1471-y>
17. Varkonyi-Gasic E., Wu R., Wood M. et al. Protocol: A highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs // *Plant Methods.* 2007. V. 3. № 1. P. 1–12. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-3-12>
18. Pozovnikova M.V., Leibova V.B., Tulinova O.V. et al. Comparison of miR-106b, miR-191, and miR-30d expression dynamics in milk with regard to its composition in Holstein and Ayrshire cows // *Animal Bioscience.* 2024. V. 37. № 6. P. 965. <https://doi.org/10.5713/ab.23.0427>
19. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method // *Methods.* 2001. V. 25. № 4. P. 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
20. Zhao X., Song Y., Zhang Y. et al. Predictions of milk fatty acid contents by mid-infrared spectroscopy in Chinese Holstein cows // *Molecules.* 2023. V. 28. № 2. <https://doi.org/10.3390/molecules28020666>
21. Chang L., Xia J. MicroRNA regulatory network analysis using miRNet 2.0 // *Methods in Mol. Biology.* 2023. V. 2594. P. 185–204. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2815-7_14
22. Huang H.Y., Lin Y.C.D., Cui S. et al. miRTarBase update 2022: An informative resource for experimentally validated miRNA–target interactions // *Nucl. Acids Res.* 2022. V. 50. № D1. P. D222–D230. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1079>
23. Selionova M., Trukhachev V., Aibazov M. et al. Genome-wide association study of milk composition in Karachai goats // *Animals.* 2024. V. 14. № 2. <https://doi.org/10.3390/ani14020327>

24. Akshit F.N., Mao T., Kaushik R. et al. Global comprehensive review and meta-analysis of goat milk composition by location, publication year and lactation stage // *J. Food Composition and Analysis*. 2024. V. 127. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.105973>
25. Presti V.L., Tudisco R., Di Rosa A.R. et al. Influence of season on milk fatty acid profile and sensory characteristics of grazing goats in a Mediterranean environment: A sustainable agro-food system // *Animal Production Sci.* 2023. V. 63. № 7. P. 689–703. <https://doi.org/10.1071/AN21538>
26. Kováčová M., Výrostková J., Dudriková E. et al. Assessment of quality and safety of farm level produced cheeses from sheep and goat milk // *Applied Sciences*. 2021. V. 11. № 7. <https://doi.org/10.3390/app11073196>
27. Kljajevic N.V., Tomasevic I.B., Miloradovic Z.N. et al. Seasonal variations of Saanen goat milk composition and the impact of climatic conditions // *J. Food Science and Technology*. 2018. V. 55. P. 299–303. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2938-4>
28. Ibrahim N.S., Tajuddin F.H.A. Evaluation of milk production and milk composition at different stages of Saanen dairy goats // *J. Agrobiotechnology*. 2021. V. 12. № 1S. P. 204–211. <https://doi.org/10.37231/jab.2021.12.1S.286>
29. Bernard L., Leroux C., Chilliard Y. Expression and nutritional regulation of lipogenic genes in the ruminant lactating mammary gland // *Bioactive Components of Milk*. 2008. P. 67–108. https://doi.org/10.1007/978-0-387-74087-4_2
30. Batista C.P., Castro S.M., Correa H.J. et al. Relation between liver lipid content and plasma bio-chemical indicators in dairy cows // *Acta Scientiae Veterinariae*. 2020. № 48. P. 122–124. <http://hdl.handle.net/10183/211802>
31. Лебедева И.Ю., Лейбова В.Б., Соломахин А.А. и др. Репродуктивный статус коров с разной молочной продуктивностью в связи с динамикой липидного обмена в послеотельный период // С.-хоз. биология. 2018. Т. 53. № 6. С. 1180–1189. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.6.1180rus>
32. Antunovic Z., Speranda M., Novoselec J. et al. Blood metabolic profile and acid-base balance of dairy goats and their kids during lactation // *Veterinarski Arhiv*. 2017. V. 87. № 1. P. 43–55.
33. Лейбова В.Б., Позовникова М.В. Изменчивость метаболических маркеров в крови у молочных коз с разной динамикой удоя в первой половине лактации // Аграрная наука. 2024. № 2. С. 44–47. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2024-379-2-44-47>
34. Лейбова В.Б., Позовникова М.В. Вариативность биохимических показателей крови у коз зааненской породы в первые месяцы лактации // Пермский аграрный вестник. 2022. № 3 (39). С. 103–109. https://doi.org/10.47737/2307-2873_2022_39_102
35. Modepalli V., Kumar A., Hinds L.A. et al. Differential temporal expression of milk miRNA during the lactation cycle of the marsupial tammar wallaby (*Macropus eugenii*) // *BMC Genomics*. 2014. V. 15. P. 1–18. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1012>
36. Lin X., Luo J., Zhang L. et al. MicroRNAs synergistically regulate milk fat synthesis in mammary gland epithelial cells of dairy goats // *Gene Expression*. 2013. V. 16. № 1. P. 1–13. <https://doi.org/10.3727/105221613X13776146743262>
37. Ammah A.A., Do D.N., Bissonnette N. et al. Co-expression network analysis identifies miRNA–mRNA networks potentially regulating milk traits and blood metabolites // *Intern. J. Mol. Sciences*. 2018. V. 19. № 9. <https://doi.org/10.3390/ijms19092500>
38. Xu E., Chen C., Fu J. et al. Dietary fatty acids in gut health: Absorption, metabolism and function // *Animal Nutrition*. 2021. V. 7. № 4. P. 1337–1344. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.09.010>
39. Wang L., Xu F., Song Z. et al. A high fat diet with a high C18:0/C16:0 ratio induced worse metabolic and transcriptomic profiles in C57BL/6 mice // *Lipids in Health and Disease*. 2020. V. 19. P. 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12944-020-01346-z>
40. Viturro E., Farke C., Meyer H.H.D. et al. Identification, sequence analysis and mRNA tissue distribution of the bovine sterol transporters ABCG5 and ABCG8 // *J. Dairy Science*. 2006. V. 89. № 2. P. 553–561. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72118-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72118-X)
41. Gebreyesus G., Buitenhuis A.J., Poulsen N.A. et al. Multi-population GWAS and enrichment analyses reveal novel genomic regions and promising candidate genes underlying bovine milk fatty acid composition // *BMC Genomics*. 2019. V. 20. P. 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5573-9>
42. Wang H., Shi H., Luo J. et al. MiR-145 regulates lipogenesis in goat mammary cells via targeting INSIG1 and epigenetic regulation of lipid-related genes // *J. Cell. Physiology*. 2017. V. 232. № 5. P. 1030–1040. <https://doi.org/10.1002/jcp.25499>
43. Zhu L., Jiao H., Gao W. et al. Fatty acid desaturation is suppressed in mir-26a/b knockout goat mammary epithelial cells by upregulating INSIG1 // *Intern. J. Mol. Sciences*. 2023. V. 24. № 12. <https://doi.org/10.3390/ijms241210028>
44. Yart L., Finot L., Marnet P.G. et al. Suppression of ovarian secretions before puberty strongly affects mammogenesis in the goat // *J. Dairy Research*. 2012. V. 79. № 2. P. 157–167. <https://doi.org/10.1017/S0022029912000106>
45. Chung N., Bogliotti Y.S., Ding W. et al. Active H3K27me3 demethylation by KDM6B is required for normal development of bovine preimplantation embryos //

- Epigenetics. 2017. V. 12. № 12. P. 1048–1056.
<https://doi.org/10.1080/15592294.2017.1403693>
46. Wang J.J., Wang X., Xian Y.E. et al. The JMJD3 histone demethylase inhibitor GSK-J1 ameliorates lipopolysaccharide-induced inflammation in a mastitis model // J. Biol. Chemistry. 2022. V. 298. № 6. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102017>
47. Xu Q., Mei G., Sun D. et al. Detection of genetic association and functional polymorphisms of UGDH affecting milk production trait in Chinese Holstein cattle // BMC Genomics. 2012. V. 13. P. 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-590>
48. Liu Y., He Y., Jin A. et al. Ribosomal protein–Mdm2–p53 pathway coordinates nutrient stress with lipid metabolism by regulating MCD and promoting fatty acid oxidation // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2014. V. 111. № 23. P. E2414–E2422. <https://doi.org/10.1073/pnas.1315605111>
49. Wei Y., Tian C., Zhao Y. et al. MRG15 orchestrates rhythmic epigenomic remodelling and controls hepatic lipid metabolism // Nat. Metabolism. 2020. V. 2. № 5. P. 447–460. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0203-z>
50. Song J., Merrill R.A., Usachev A.Y. et al. The X-linked intellectual disability gene product and E3 ubiquitin ligase KLHL15 degrades doublecortin proteins to constrain neuronal dendritogenesis // J. Biol. Chemistry. 2021. V. 296. P. 100082. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.016210>
51. Bian F., Ma X., Villivalam S.D. et al. TET2 facilitates PPAR γ agonist-mediated gene regulation and insulin sensitization in adipocytes // Metabolism. 2018. V. 89. P. 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.08.006>
52. Vilà-Brau A., De Sousa-Coelho A.L., Mayordomo C. et al. Human HMGCS2 regulates mitochondrial fatty acid oxidation and FGF21 expression in HepG2 cell line // J. Biol. Chemistry. 2011. V. 286. № 23. P. 20423–20430. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.235044>
53. Cao H., Zhang S., Shan S. Ligand-dependent corepressor (LCoR) represses the transcription factor C/EBP β during early adipocyte differentiation // J. Biol. Chemistry. 2017. V. 292. № 46. P. 18973–18987. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.793984>
54. Kitagishi Y., Matsuda S. RUFY, Rab and Rap family proteins involved in a regulation of cell polarity and membrane trafficking // Intern. J. Mol. Sciences. 2013. V. 14. № 3. P. 6487–6498. <https://doi.org/10.3390/ijms14036487>

**Analysis of Associations Between Expression Patterns of miRNA miR-767,
miR-335-3p and miR-106b-5p and Metabolites
of Milk and Serum of Goats (*Capra hircus*)**

M. V. Pozovnikova^{1,*} and V. B. Leibova¹

¹Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding – Branch of the Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Saint Petersburg, Tyarlevo, 196625 Russia
 *e-mail: pozovnikova@gmail.com

The presented work characterised the expression profile of microRNAs miR-767, miR-335-3p and miR-106b-5p in milk and blood serum samples of goats from week 1 to week 23 of lactation, taking into account the dynamics of some protein and lipid metabolites of milk and blood. The expression of microRNAs in milk was associated with some changes in the analysed metabolites. MiR-767 was positively correlated with milk protein, casein, and fatty acids (C18:0, MCFA and MUFA). For miR-335-3p, it was negatively correlated with cholesterol and triglycerides of blood, but positively correlated with milk fat and MCFA, SCFA, TFA, and SFA including C14:0, C16:0 and C18:0. Expression of miR-106b-5p showed a unidirectional association with total blood cholesterol. Among all three serum microRNAs analysed, only miR-106b-5p expression was positively associated with milk protein, casein, LCFA and MUFA content. The high predictive effect ($R^2 > 0.800, p < 0.001$) suggests a significant role of microRNAs synthesized by the mammary gland (miR-767 and miR-335-3p) for milk protein and fat components and miR-106b-5p circulating in the blood for milk protein and casein. The results of our study suggest that an increase in the expression level of miR-767, miR-335-3p in milk and miR-106b-5p in blood serum leads to activation of transcription and translation of their target genes, which is phenotypically expressed by an increase in the values of a range of protein and fat components of goat milk. The study of the role of miRNAs in the regulation of lactation is a promising area of modern molecular biology, which has great potential for increasing the efficiency of dairy production, improving product quality and in programs for the development of predictive biomarkers.

Keywords: triglycerides, cholesterol, casein, fatty acids, lactation.