

УДК 577.112.854 : 618.36-007.2 : 636.2

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ МЕЖКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ВОРСИН АЛЛАНТОХОРИОНА КОТИЛЕДОНОВ И КРИПТ КАРУНКУЛОВ КОРОВ С ПЛАЦЕНТАРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

В. С. Авдеенко*, **М. Е. Горбаков**, **А. И. Мороз**

*Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины
(ул. Черниговская, 5, Санкт-Петербург, Россия, 196084), *avdeenko0106@mail.ru*

Анализировалось по 15 образцов плацентом размером 1×1 см², полученных от каждой из 10 коров голштинской породы, возраст которых колебался от 3 до 5 лет, с весом в диапазоне от 650 до 750 кг и удоем от 13 000 до 15 000 литров за лактацию. Плацентарные образцы были разделены на две категории: от 5 коров с физиологической беременностью (ФБ) и от 5 коров с осложненной беременностью, страдающих плацентарной недостаточностью (ПН). Диагностика ПН проводилась на основе лабораторных анализов крови и мочи, а также морфологического изучения плодных оболочек после родов. Выявлено, что в плаценте коров с ПН на поздних сроках беременности отмечаются структурные изменения в тканях карункулов, приводящие к деградации соединительного матрикса крипт, что связано с отсутствием упорядоченности межклеточного вещества. Транслокация матриксных металлопротеиназ MMP-1 и MMP-3 наблюдалась в пространстве между эпителием ворсин аллантохориона котиледона и эпителиоцитами крипт карункулов. В цитоплазме клеток синцитиотрофобластов располагались MMP-2 и MMP-9. Особенности структуры плаценты при ПН выражаются в образовании аллантохориональной организации с нарушением структуры ворсин котиледонов. Более того, если при ФБ MMP-9 с TIMP-1 и MMP-2 с TIMP-2 можно рассматривать как мембранные белки, то в случае ПН они обычно локализуются в цитоплазме. Это указывает на низкую экспрессию коллагена в центральной части плаценты и ее нестабильность. Коллаген III типа неравномерно распределен в плаценте от коров с ПН, особенно в парацентральных и краевых зонах, где его экспрессия полностью отсутствует.

Ключевые слова: плацента; коровы; ворсины аллантохориона котиледонов; крипты карункулов; межклеточный матрикс; иммуногистохимический и иммунофлуоресцентный методы; плацентарная недостаточность

Для цитирования: Авдеенко В. С., Горбаков М. Е., Мороз А. И. Распределение металлопротеиназ межклеточного матрикса ворсин аллантохориона котиледонов и крипт карункулов коров с плацентарной недостаточностью // Труды Карельского научного центра РАН. 2024. № 7. С. 37–46. doi: 10.17076/eb1970

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда 23-26-00284 (<https://rscf.ru/project/23-26-00284/>).

V. S. Avdeenko*, M. E. Gorbakov, A. I. Moroz. METALLOPROTEINASE DISTRIBUTION IN THE INTERCELLULAR MATRIX OF CHORIOALLANTOIC VILLI AND CARUNCULAR CRYPTS IN COWS WITH PLACENTAL INSUFFICIENCY

St. Petersburg State University of Veterinary Medicine (5 Chernigovskaya St., 196084 St. Petersburg, Russia), *avdeenko0106@mail.ru

Fifteen placental samples measuring 1.0×1.0 cm² were analyzed, obtained from each of 10 Holstein cows, whose age ranged from 3 to 5 years, with a weight in the range of 650 to 750 kg and a milk yield of 13,000 to 15,000 liters per lactation. Placental samples were divided into two categories: from 5 cows with physiological pregnancy (PP) and from 5 cows with complicated pregnancy, suffering from placental insufficiency (PI). The diagnosis of PI was based on laboratory blood and urine tests, as well as morphological examination of the fetal membranes after delivery. The placenta of cows with PI in late pregnancy exhibited structural changes in caruncular tissues, leading to degradation of the connective matrix of crypts, which is associated with a lack of interstitial substance structure. Translocation of matrix metalloproteinases MMP-1 and MMP-3 was observed in the space between the epithelium of chorioallantoic villi of the cotyledon and the epithelial cells of caruncular crypts. MMP-2 and MMP-9 were located in the cytoplasm of syncytiotrophoblast cells. A structural feature of the placenta in cows with PI is the formation of a chorioallantoic configuration with a disrupted structure of cotyledon villi. Moreover, where in the PP case MMP-9 with TIMP-1 and MMP-2 with TIMP-2 can be considered as membrane proteins, in the case of PI they are usually localized in the cytoplasm. This indicates collagen underexpression in the central part of the placenta and its instability. Type III collagen is unevenly distributed over the placenta in cows with PI, especially in the paracentral and marginal regions, where it is not expressed at all.

Keywords: placenta; cows; chorioallantoic villi of the cotyledon; caruncular crypts; intercellular matrix; immunohistochemical and immunofluorescence methods; placental insufficiency

For citation: Avdeenko V. S., Gorbakov M. E., Moroz A. I. Metalloproteinase distribution in the intercellular matrix of chorioallantoic villi and caruncular crypts in cows with placental insufficiency. *Trudy Karelskogo nauchnogo tsentra RAN = Transactions of the Karelian Research Centre RAS*. 2024. No. 7. P. 37–46. doi: 10.17076/eb1970

Funding. The research was funded by Russian Science Foundation grant #23-26-00284 (<https://rscf.ru/project/23-26-00284/>).

Введение

Важным профилактическим мероприятием для предупреждения развития осложнений стельности на последних сроках гестации высокопродуктивных молочных коров является точная и своевременная диагностика. Трудность диагностики ввиду отсутствия диагностических тест-систем и регламентированного алгоритма является проблемой практической ветеринарии. Ряд исследователей, а именно В. Д. Новиков с соавторами [1992], тридцать лет назад в результате работы «...по изучению строения плаценты предложили в качестве критерия прогноза репродуктивных патологий использовать морфологические особенности состояния последа» [Новиков и др., 1992]. Ввиду трудоемкости данной технологии и невозможности заранее предупредить состояние плацентарной недостаточности высокоценных коров молочные предприятия и ветеринарные

специалисты не смогли принять ее к практическому применению [Приходько и др., 2021]. Следовательно, более оптимальным способом диагностики, как показывают результаты работ [Черницкий и др., 2019; Кочарян и др., 2022], является определение специфических признаков – маркеров плацентарной недостаточности. В данном случае видят перспективность «...определения показателей эндогенной интоксикации в сыворотке крови и белка в моче у коров в период с 25 по 32 сутки до отела, что позволяет прогнозировать развитие репродуктивных патологий у животных-матерей и неонатальных заболеваний у телят» [Castro et al., 2020]. Некоторые исследователи утверждают, что «...маркером служит нарушение микроциркуляции в тканях плаценты, приводящее к диффузно-перфузионной недостаточности плаценты» [Farias et al., 2023]. В то же время другие [Folgueras et al., 2004; Johnson et al., 2023] выделяют реологический фактор,

то есть повышение агрегации эритроцитов и тромбоцитов, изменения коагуляционных свойств крови в системе «мать–плацента–плод». Кроме того, современные исследователи [Gaffney et al., 2015; Sarli et al., 2021] утверждают, что оптимальным диагностическим признаком служит определение иммунолокализации матриксных репродуктивных металлопротеиназ, обладающих предиктивной способностью, что позволит создать диагностические тест-системы для экспресс-диагностики. Из результатов исследований М. Tesi с соавторами [2020] следует, что «...вклад MMP в ремоделирование матрикса чрезвычайно сложен, так как данные эндопептидазы обладают широким набором функций» [Sanches et al., 2019]. MMP – цинк-зависимые ферменты, принадлежащие к подсемейству металлопептидаз M10A и являющиеся основными эффекторами деградации внеклеточного матрикса в плаценте, модулируют активность различных биологически активных медиаторов либо прямым расщеплением, либо разрушая их связь с внеклеточным матриксом, что обуславливает гистохимические процессы. В работе [Seo et al., 2024] была предложена «...серия изображений с помощью электронной микроскопии, подтверждающая классификацию плацентации у овец как син-эпителиохориальной, поскольку клетки эпителия просвета матки сохраняются на границе раздела матка-плацента за счет включения в синцитиальные бляшки трофобласта». Многочисленные исследования G. A. Johnson с соавторами [2023] показали, что «...активность MMP регулируется на нескольких уровнях, начиная с транскрипционной регуляции экспрессии генов через факторы роста, цитокины, гормоны, а также клеточно-внеклеточные и клеточно-клеточные взаимодействия» [Seo et al., 2024]. Исследования [Davenport et al., 2023] показывают, что «...после транскрипции активация зимогена различных MMP может происходить как внутриклеточно, так и на поверхности клетки или во внеклеточном пространстве» [Johnson et al., 2023]. Кроме того, активность MMP регулируется через ингибирование семейства белков TIMP (тканевые ингибиторы металлопротеиназ), α 2-макроглобулина и мембраносвязанного белка RECK (индуцирующий реверсию цистеин-обогащенный белок с мотивами Kazal). По наблюдениям М. Laskowska [2017], повышенный уровень MMP-1, известной как интерстициальная коллагеназа, является наиболее изучаемым при различных патологических состояниях различной этиологии [Davenport et al., 2023]. Это обусловлено тем, что MMP-1 синтезируется фибробластами, хон-

дроцитами, макрофагами, кератиноцитами, эндотелиальными клетками и, в свою очередь, может также расщеплять другие субстраты: казеин, желатин, энтактин и линкпротейн [Laskowska, 2017]. По результатам работы [Tesi et al., 2021] получены новые данные, свидетельствующие о высокой степени деградации многих компонентов соединительной ткани, включая протеогликаны, которые, возможно, являются маркерами процессов ремоделирования. Активность MMP ингибируется TIMP, который взаимодействует в стехиометрическом соотношении 1:1. Авторы работы [Pereira, Lourenço, 2022] полагают, что равновесие между MMP и TIMP является определяющим фактором в разрушении межклеточного матрикса. Экспрессия MMP-9 отмечалась «...при различных патологических состояниях, характеризующихся избыточным фиброзом» [Tesi et al., 2020]. Как показали исследования [Pereira, Lourenço, 2022; Seo et al., 2024], большинство MMP являются секретлируемыми ферментами, хотя существуют также MMP мембранного типа (MT-MMP), а некоторые виды, например MMP-2, были обнаружены во внутриклеточных органеллах, включая ядро, где они выступают в качестве факторов транскрипции. На сегодняшний день отсутствуют результаты исследований иммунолокализации MMP-2 в плаценте крупного рогатого скота в норме и патологии как важного диагностического признака.

Материалы и методы

Объектом исследования служила плацента 10 коров с нормальной беременностью (ФБ) и с беременностью, осложненной плацентарной недостаточностью (ПН). Проанализировано по 15 фрагментов размером $1 \times 1 \text{ см}^2$, полученных от каждой из 10 коров голштинской породы, возрастом от 3 до 5 лет и массой от 650 до 750 кг, с удоем от 11 000 до 15 000 литров за лактацию. Образцы плаценты были классифицированы на две группы – от 5 коров при ФБ и от 5 коров с осложненной ПН беременностью; диагностика ПН у коров проведена авторами статьи по функциональному состоянию новорожденных телят (шкала Апгар) и лабораторным данным крови и мочи у сухостойных коров и новорожденных телят. Изучение гистологических препаратов проводили с использованием светооптического микроскопа Микмед-5 ЛОМО во всю толщину плацентом от аллантохориона до эндометрия. Для обзорной микроскопии срезы окрашивали гематоксилином Карazzi с эозином по общепринятой методике.

Нейтральные гликозаминогликаны (ГАГ) выявляли с помощью ШИК-реакции, для изучения межклеточного матрикса, распределения элементов соединительной ткани в плаценте использовали окраску по Массону с анилиновым синим, кислые ГАГ определяли альциановым синим (рН 2,5). Полученные образцы плацентом толщиной 5 мм с общей площадью до 3 см² фиксировали в 10% растворе нейтрального забуференного формалина. Обезвоживали в батарее спиртов восходящей крепости, просветляли в хлороформе с использованием гистопроцессора Cytadel 2000 (Shendon, Великобритания). Уплотнение осуществляли в двух сериях гистологического парафина (Histomix, Биовитрум, РФ) по 60 минут. На ротационном микротоме «Ротмик-2» плацентомы от аллантохориона до эндометрия получали срезы толщиной 5 мкм и монтировали их на предметные стекла, обработанные поли-L-лизинном (Menzel). Использовали антитела к металлопротеиназам: Recombinant Bovine anti-MMP-1; Recombinant Bovine anti-MMP-2; Recombinant Anti-MMP-3 antibody; Recombinant Anti-MMP-9 antibody; Anti-TIMP-1 Recombinant Anti-TIMP-1 и Anti-TIMP-2 Recombinant Anti-TIMP-2. Постановку иммуногистохимических реакций проводили с помощью пероксидаза-полимерной системы согласно инструкции производителя (LabVision, Thermo, США). После процесса депарафинизации срезы подвергали инкубации в растворе глицина для снижения автофлуоресценции, а затем фиксировали и окрашивали антителами, конъюгированными с флуорохромом, для идентификации конкретных клеточных популяций. Из полученных блоков готовили серии срезов на ротационном микротоме «Ротмик-2» толщиной 4 мкм, которые впоследствии окрашивали гематоксилином Джилла с эозином по Маллори по общепринятым методикам. Срезы толщиной 5 мкм подвергли иммуногистохимическому анализу. Эти срезы были прикреплены к предметным стеклам, покрытым поли-L-лизинном (Menzel, Германия). После депарафинизации эндогенную пероксидазу ингибировали путем 20-минутной инкубации в 3% растворе перекиси водорода. Микрофотографирование выполняли при помощи цифровой камеры Touptek Photonic FMA050.

Результаты и обсуждение

В образцах плаценты, полученных от здоровых животных при ФБ, установлены вытянутые участки интерстиция, содержащего клеточные элементы рыхлой неоформленной соединительной ткани, идентифицируемые по

овальным ядрам и цитоплазматическим отросткам, что соответствует синэпителиохориальной плаценте крупного рогатого скота на последних сроках гестации перед родами в норме (рис. 1, А).

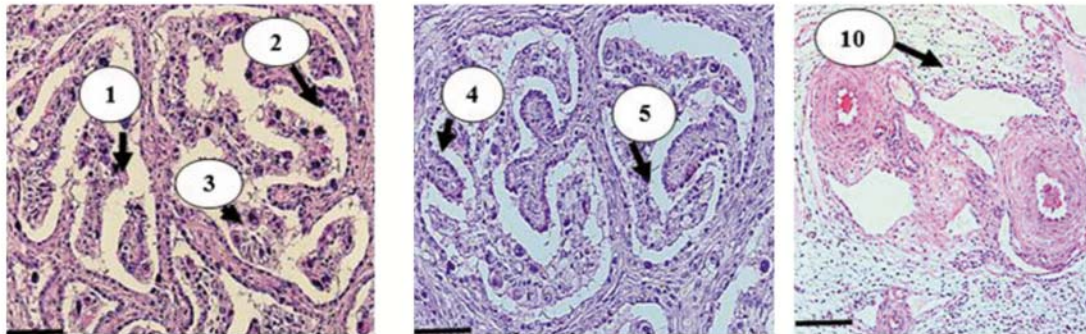
В гистопрепаратах (рис. 1, Б) карункулов и котиледонов плаценты, полученных от коров с ПН, идентифицируются относительно большие зоны дистрофически измененного эпителия ворсин аллантохориона. Среди них располагаются фибробласты, макрофагоподобные клетки с пенистой цитоплазмой и фестончатыми краями. На этом фоне происходит увеличение числа гигантских клеток Кащенко – Гофбауэра, располагающихся неравномерными скоплениями и топографически связанных с эпителием аллантохориона. При ФБ иммунолокализация MMP-1 отмечалась исключительно в строме крипт карункулов, гиперплазированные эпителиальные клетки которых активно продуцировали MMP-1 (рис. 2, а). Кроме того, иммунопозитивная реакция на MMP-1 также регистрировалась в околомембранном пространстве синцитиотрофобластов и в цитоплазме щеточной каемки. Локализация MMP-3 определялась в основном вокруг сосудов материнской части плаценты (рис. 2, а). Диффузное распределение матриксных металлопротеиназ типа MMP-3 (рис. 2, а) присутствовало в цитоплазме эпителиоцитов в перегородках крипт карункулов.

Значительная иммунопозитивная реакция MMP-3 регистрировалась в гибридных трехядерных клетках, локализованных в деградируемых ворсинах. При ПН происходила транслокация MMP-1 и MMP-3 в полость крипт, где ворсины аллантохориона в таких криптах были полностью редуцированными. В строме дефрагментированных крипт карункулов иммунопозитивные клетки MMP-1 определялись только вокруг сосудов, в то время как гиперплазированные эпителиальные клетки крипт активно продуцировали MMP-3.

Локализация MMP-2 и MMP-9 присутствовала в цитоплазме синцитиотрофобласта и трофобласта, за исключением гигантских двухядерных клеток. При этом наблюдается равномерное распределение MMP-2 и MMP-9 в ворсинах аллантохориона. В эпителиальных клетках крипт карункулов отмечается выраженная экспрессия MMP-2 и MMP-9 (рис. 2, а). Кроме того, слабовыраженная экспрессия MMP-2 и MMP-9 отмечалась в цитоплазме эпителиоцитов материнской части плаценты (рис. 2, б). Соотношение исследуемых типов металлопротеиназ в плацентарных структурах коровы при ПН смещалось в сторону MMP-1 и MMP-3.

Результатами изучения распределения MMP-2 и MMP-9 в плацентарной структуре у коров, больных ПН, установили ее значительное снижение (рис. 2), особенно в материнской части плаценты. Остаточное присутствие MMP-2 и MMP-9 наблюдали не только в деградируемых эпителиальных клетках крипт карункулов, а также вокруг сосудов (рис. 2).

Анализ содержания TIMP-1 и TIMP-2 исследуемых типов MMP-1, TIMP-2 – MMP-3 и MMP-9 в плаценте коров продемонстрировал отсутствие явно выраженных изменений в экспрессии данных металлопротеиназ в плацентарных структурах на последних сроках гестации в норме. Однако обращало на себя внимание снижение TIMP-1 в цитоплазме гибридных

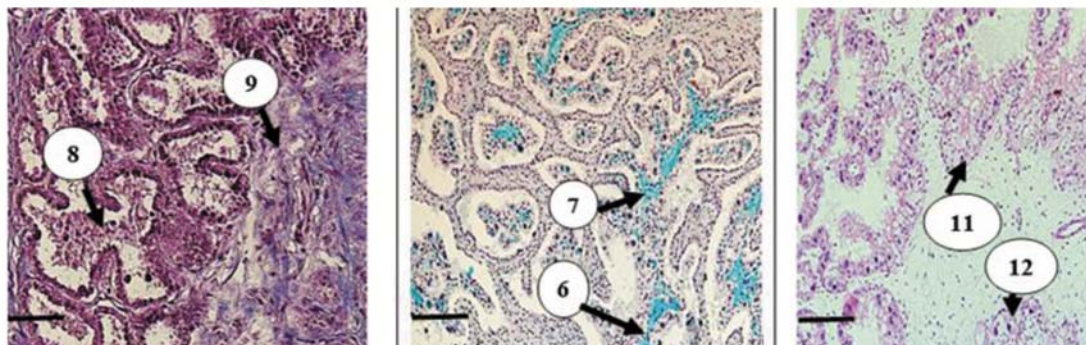


А – Плацентомы у коровы при физиологической беременности

ШИК-реакция. Доокраска гематоксилином.
Общее увеличение $\times 200$

Окраска гематоксилином и эозином.
Общее увеличение $\times 200$

Окраска альтиановым синим.
Общее увеличение $\times 200$



А – Плацентомы у коровы при патологии

Трихромная окраска по Masson.
Общее увеличение $\times 200$

Окраска альтиановым синим.
Общее увеличение $\times 200$

Окраска гематоксилином и эозином.
Общее увеличение $\times 200$

Рис. 1. Локализация эпителиальных и мезенхимальных элементов в плацентарных структурах крупного рогатого скота. Масштабная линейка 20 мкм.

1 – терминальные ворсины; 2 – ШИК-позитивные компоненты в строме маточных крипт; 3 – ШИК в цитоплазме клеток Кашченко – Гофбауэра; 4 – маточные крипты, разделяющие ворсины хориона; 5 – терминальные ворсинки расположены в криптах; 6 – набухание коллагеновых волокон крупной маточной септы; 7 – дезорганизация кислых ГАГ в центральной части стволовой ворсины. ШИК-реакция по Мак-Манусу; 8 – набухание и расплавление коллагеновых волокон фрагмента крупной маточной септы; 9 – аморфная структура промежуточного вещества, представленного нейтральными ГАГ; 10 – маточные септы; 11 – вакуолярная дистрофия ворсин хориона, расположенных в плодной части плаценты; 12 – фокальный колликвационный некроз клеток

Fig. 1. Localization of epithelial and mesenchymal elements in placental structures of cattle. Scale bars: 20 μm .

1 – terminal villi; 2 – PAS-positive components in the stroma of uterine crypts; 3 – PAS in the cytoplasm of Kashchenko – Hofbauer cells; 4 – uterine crypts separating chorionic villi; 5 – terminal villi located in the crypts; 6 – swelling of the collagen fibers of the large uterine septum; 7 – disorganization of acidic GAGs in the central part of the stem villi. A PAS reaction by McManus; 8 – swelling and straightening of collagen fibers of a fragment of a large uterine septum; 9 – amorphous structure of the intermediate substance, represented by neutral GAGs; 10 – uterine septa; 11 – vacuolar dystrophy of chorionic villi located in the fetal part of the placenta; 12 – focal colliquation necrosis of cells

трехядерных клеток в образцах плаценты, полученной от коров, больных ПН (рис. 2).

При изучении соотношения MMP-1/TIMP-1, MMP-2/TIMP-2, MMP-3/TIMP-1 и MMP-9/TIMP-1 в плаценте коров с помощью двойного иммунофлуоресцентного окрашивания выявлены

особенности распределения металлопротеиназ и их ингибитора (рис. 3).

Так, если в плаценте при ФБ исследуемые MMP-1 и -9 к TIMP-1 и MMP-2 к TIMP-2 можно было отнести к мембранно-связанным белкам, то при ПН они имели, как правило, цито-

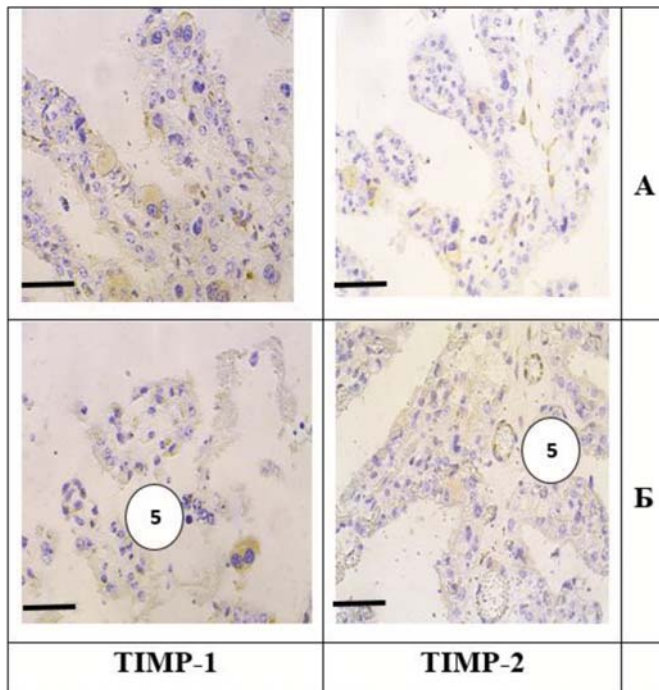
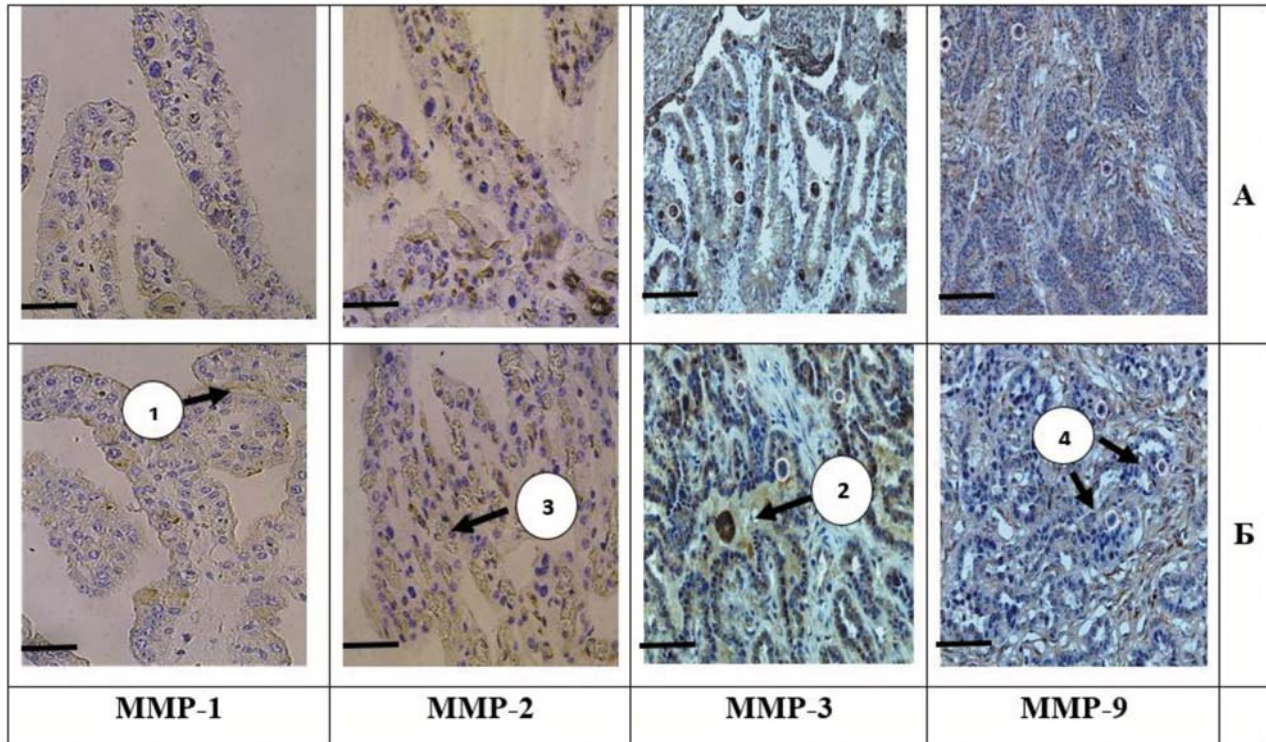


Рис. 2. Иммунолокализация матричных металлопротеиназ и их ингибиторов в плаценте крупного рогатого скота: А – ФБ; Б – ПН.

Антитела: Recombinant Bovine anti-MMP-1; Recombinant Bovine anti-MMP-2; Recombinant Anti-MMP-3 antibody; Recombinant Anti-MMP-9 antibody; Recombinant Anti-TIMP-1 и Recombinant Anti-TIMP-2. ПАП-метод. Доокраска гематоксилином Майера. Здесь и на рис. 3: общее увеличение $\times 200$; масштабная линейка 20 мкм.

1 – транслокация матричной MMP-1 в полость крипт; 2 – распределение MMP-3 в редуцированных ворсинах аллантахориона; 3 – диффузное распределение MMP-2; 4 – слабовыраженная экспрессия MMP-9 в цитоплазме эпителиоцитов плаценты; 5 – Ко-экспрессия TIMP-1 и TIMP-2 в ворсинах аллантахориона отсутствует

Fig. 2. Immunolocalization of matrix metalloproteinases and their inhibitors in the placenta of cattle: А – FB; В – PN.

Antibodies: Recombinant Bovine anti-MMP-1; Recombinant Bovine anti-MMP-2; Recombinant Anti-MMP-3 antibody; Recombinant Anti-MMP-9 antibody; Recombinant Anti-TIMP-1 и Recombinant Anti-TIMP-2. The PAP method. Before staining with Mayer's hematoxylin. Here and in Fig. 3: Total magnification $\times 200$; Scale bars: 20 μm .

1 – translocation of matrix MMP-1 into the crypt cavity; 2 – distribution of MMP-3 into reduced villi of allantochorion; 3 – diffuse distribution of MMP-2; 4 – weakly expressed expression of MMP-9 in the cytoplasm of placental epithelial cells; 5 – Co-expression of TIMP-1 and TIMP-2 in villi of allantochorion is absent

плазматическую локализацию. Все это свидетельствует о недостаточной экспрессии коллагена в центральной части плаценты и о нестабильности ее структуры в этом участке. Коллаген III типа распределен в участках плаценты, полученной от коров с ПН, крайне неравномерно как в парацентральных, так и в краевых зонах, где его экспрессия полностью отсутствовала. В научных исследованиях представлено множество аргументов о том, что для нормального внутриутробного развития плода необходим сбалансированный уровень матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов [Sanches et al., 2019]. Некоторые исследователи [Gaffney et al., 2015] отмечали повышенную активность MMP в плаценте собак, что свидетельствовало о распаде внутриклеточного матрикса материнской части плаценты. Это может косвенно указывать на возможные нарушения в целостности клеточных мембран как эпителиальных, так и мезенхимальных компонентов крипт карункулов. Как выяснили исследователи [Johnson и др., 2023], MMP-1, MMP-2, MMP-3 и MMP-9 имеют свою клеточно-специфическую экспрессию. В дополнение к этому MMP-1, известная как коллагеназа-1 и коллагеназа

фибробластов, имеет способность деградировать фибриллярные коллагены типов I и III, которые составляют основной компонент мезенхимального слоя материнских крипт [Davenport et al., 2023]. Полученные результаты [Tesi et al., 2021], которые во многом коррелируют с нашими находками, свидетельствуют о том, что распределение матриксных металлопротеиназ в плаценте коров различается как в нормальных условиях, так и при патологиях. Это распределение проявляется значительной неравномерностью в парацентральных и краевых зонах, где отметка их экспрессии отсутствовала. В исследовании [Pereira, Lourenço, 2022] подчеркивается, что матриксные металлопротеиназы (MMPs) и тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ (TIMPs) играют важную роль в процессе ремоделирования мезенхимальных клеток плаценты в эпителиальные. В тканях плаценты наблюдается распределение MMP-1, MMP-3 и MMP-9 к TIMP-1 и MMP-2 к TIMP-2, что было подтверждено с помощью иммуногистохимии и иммунофлуоресцентной микроскопии изменений в плаценте крупного рогатого скота и межплацентарной ткани. Исследования [Tesi et al., 2020]

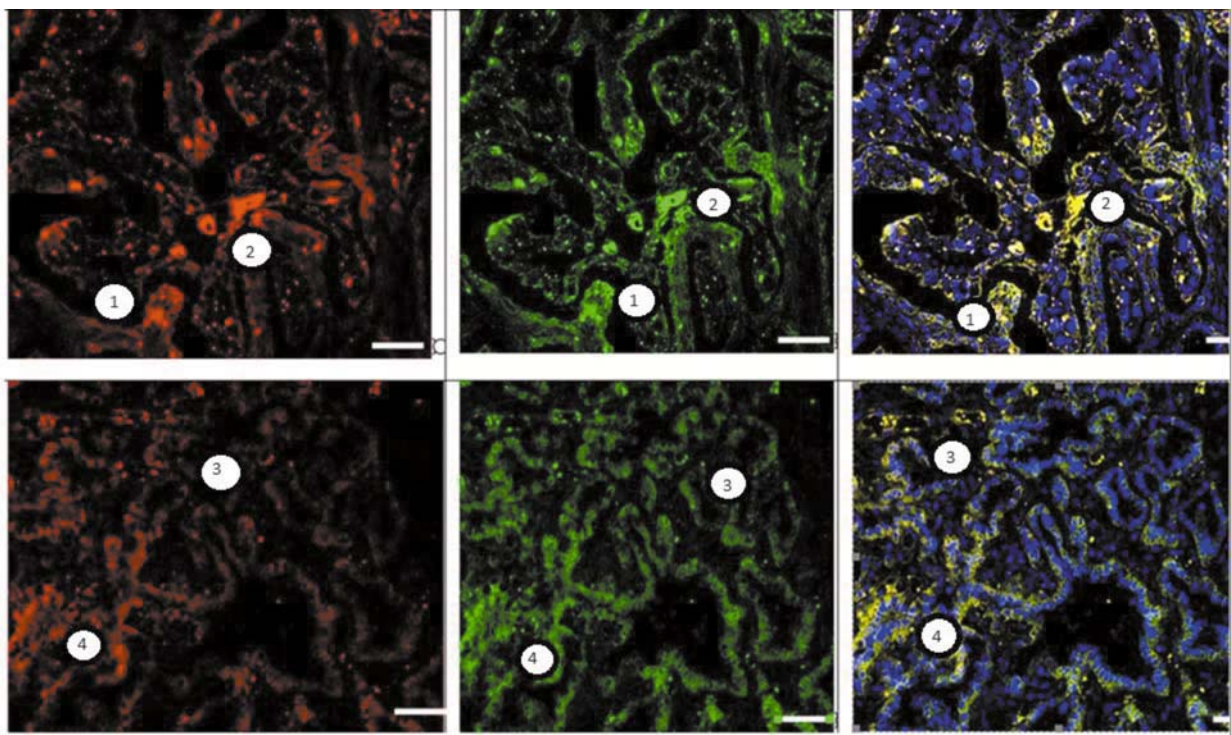


Рис. 3. Соотношение MMP-1/TIMP-1, MMP-2/TIMP-2 и MMP-9/TIMP-1 в плацентарных структурах крупного рогатого скота:

верхний ряд – ФБ; нижний ряд – ПН. Иммунофлуоресцентный метод. Ядра доокрашены DAPI

Fig. 3. The ratio of MMP-1/TIMP-1, MMP-2/TIMP-2, and MMP-9/TIMP-1 in placental structures of cattle: the upper row is FB; the lower row is PN. Immunofluorescence method. The nuclei are DAPI-colored

показали, что соотношение между протеоазами, их активаторами и ингибиторами играет ключевую роль для нормального функционирования плаценты, и это было подтверждено в ходе наших экспериментов вплоть до момента родов. Экспрессия TIMP-1 и TIMP-2 в трехядерных гибридных клетках подчеркивает значимую роль ингибирующих факторов в последние месяцы беременности и непосредственно перед родами. Наши наблюдения показывают, что экспрессия MMP-2 и MMP-9 выявлена в эпителии ворсин аллантохориона, за исключением гигантских двуядерных клеток. Кроме того, согласно данным [Pereira, Lourenço, 2022], материнский эпителий и строма карункула демонстрируют иммунореактивность к MMP-2 и MMP-9 в центральной области плаценты, что отображает ее неравномерное распределение и указывает на нестабильность структуры в данной зоне. Итак, результаты нашего исследования показали специфическую клеточную локализацию матриксных металлопротеиназ в плацентарных тканях коров. При этом уровень экспрессии MMP-2 и MMP-9 оказался заметно выше по сравнению с MMP-1 и MMP-3, в сравнении с ПН наблюдалось снижение содержания MMP-2 и MMP-9. Изменения в структуре плаценты у жвачных в поздние сроки беременности, согласно данным [Seo et al., 2024], основанным на результатах иммунофлуоресцентной микроскопии, дополняют и расширяют, а не заменяют понимание синцитиализации у овец, что подтверждается и нашими исследованиями. По нашему мнению, это обусловлено тем, что у коров на последних сроках гестации для установления более плотного контакта между фетальной и материнской частью плаценты необходима частичная деградация не только базальных, но и фибриллярных коллагеновых волокон, при этом тканевой ингибитор TIMP-2 в основном выполняет регуляторную роль через изменение соотношения MMP2/TIMP-2 в отношении матриксных металлопротеиназ. Таким образом, повышенная активность матриксных металлопротеиназ в карункулах и котиледонах у коров при ПН незадолго до родов способствует деградации внутриклеточного матрикса материнской части плаценты, что провоцирует репродуктивную патологию в последующем.

Выводы

В плаценте коров с ПН наблюдалось снижение активности иммунолокализации матриксных металлопротеиназ MMP-2 и MMP-9.

Остаточные количества этих металлопротеиназ фиксировались исключительно в деградирующих крипах материнской плаценты и межклеточном пространстве вокруг сосудов ворсин аллантохориона в фетальной части. В тканях маточной области плаценты коров, у которых развились осложнения беременности ПН, отмечена деградация соединительнотканного матрикса в крипах карункулов, что свидетельствует о потере структуры межклеточного вещества. В фетальной части плаценты здоровых коров MMP-2 и MMP-9 распределялись равномерно в цитоплазме синцитиотрофобластов и трофобласта, за исключением случаев с тремя ядрами в клетках.

Литература

- Кочарян О. К., Приходько С. А., Авдеенко В. С., Лощинин С. О., Высокородная Ю. И. Локализация эпителиальных и мезенхимальных элементов в плацентарных структурах коров в норме и при развитии состояния эклампсии // Ученые записки Витебской ордена «Знак Почета» государственной академии ветеринарной медицины. 2022. Т. 58, № 4. С. 47–52. doi: 10.52368/2078-0109-2022-58-4-47-52
- Новиков В. Д., Ясакова Н. Т., Авдеенко В. С., Машак С. В., Цыцорина Т. Н., Герасимова Ю. В. Эпителиостромальные взаимоотношения в котиледонной плаценте жвачных в нормальных и патологических условиях // Морфология. 1992. Т. 1. С. 97–103.
- Приходько С. А., Шаронов Д. С., Великородная Ю. И., Антонов В. А. Распределение металлопротеиназ 1 и 9 в плаценте коров при физиологической и осложненной преэклампсией беременности // Эпоха науки. 2021. Т. 25. С. 41–46. doi: 10.24412/2409-3203-2021-25-41-46
- Черницкий А. Е., Шабунин С. В., Сафонов В. А. Преэклампсия у коров: функциональные нарушения в системе мать-плацента-плод и их последствия для здоровья потомства // Сельскохозяйственная биология. 2019. Vol. 54, no. 2. P. 246–258. doi: 10.15389/agrobiology.2019.2.246rus
- Castro C., Diessler M., Barbeito C., Merkis C. Caracterización del vascular y estudio de la angiogenesis en la placenta de la gata // Investigación Joven. 2020. Vol. 7, no. 2. P. 453–454.
- Davenport K. M., Ortega M. S., Johnson G. A., Seo H., Spencer T. E. Review: Implantation and placentation in ruminants // Theriogenology. 2023. Vol. 1. P. 783–796. doi: 10.1016/j.animal.2023.100796
- Farias S. F. S. T., Barbosa H. T. S., Pinheiro B. Q., Xavier Júnior F. A. F., de Moraes G. B., Evangelista J. S. A. M., da Silva L. D. M. Macro and microscopic characteristics of the placenta and its relationship with the weight and the Apgar score of canine neonates // Theriogenology. 2023. Vol. 202. P. 21–27. doi: 10.1016/j.theriogenology.2023.02.018

Folgueras A. R., Pendas A. M., Sanchez L. M., Lopez-Otin C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies // *Int. J. Dev. Biol.* 2004. Vol. 48. P. 411–424.

Gaffney J., Solomonov I., Zehorai E., Sagi I. Multilevel regulation of matrix metalloproteinases in tissue homeostasis indicates their molecular specificity in vivo // *Matrix Biol.* 2015. Vol. 44, no. 46. P. 191–199. doi: 10.1016/j.matbio.2015.01.012

Johnson G. A., Bazer F. W., Seo H., Burghardt R. C., Wu G., Pohler K. G., Cain J. W. Understanding placentation in ruminants: a review focusing on cows and sheep // *Reprod. Fertil. Dev.* 2023. Vol. 36, no. 2. P. 93–111. doi: 10.1071/RD23119

Laskowska M. Altered maternal serum Matrix Metalloproteinases MMP-2, MMP-3, MMP-9, and MMP-13 in severe early- and late-onset preeclampsia // *BioMed Res. Int.* 2017. Vol. 3. P. 235–241. doi: 10.1155/2017/6432426

Pereira K. H. N. P., Lourenço M. L. Reanimação neonatal de cães e gatos ao nascimento // *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 2022. Vol. 46. P. 3–16. doi: 10.21451/1809-3000.RBRA2022.001

Sanches B. V., Zangirolamo A. F., Seneda M. M. Intensive use of IVF by large-scale dairy programs // *Anim. Reprod.* 2019. Vol. 16, no. 3. P. 394–401. doi: 10.21451/1984-3143-AR2019-0058

Sarli G., Castagnetti C., Bianco C., Ballotta G., Tura G., Caporaletti M., Zambelli F. Canine placenta histological findings and microvascular density: the histological basis of a negative neonatal outcome? // *Animals.* 2021. Vol. 11, no. 5. P. 1418–1400. doi: 10.3390/ani11051418

Seo H., Bazer F. W., Johnson G. A. Early syncytialization of the ovine placenta revisited // *Syncytia: Origin, Structure, and Functions.* 2024. Vol. 71. P. 127–142. doi: 10.1007/978-3-031-37936-9_7

Tesi M., Miragliotta V., Scala L., Aronica E., Lazzarini G., Fanelli D., Abramo F., Rota A. Gross and histological findings in the canine placenta and amnion at term: what's normal, abnormal or pathological? // *Reprod. Domest. Anim.* 2021. Vol. 56, no. 5. P. 691–702. doi: 10.1111/rda.13905

Tesi M., Miragliotta V., Scala L., Aronica E., Lazzarini G., Fanelli D., Abramo F., Rota A. Relationship between placental characteristics and puppies' birth weight in toy and small sized dog breeds // *Theriogenology.* 2020. Vol. 141. P. 1–8. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.08.017

References

Castro C., Diessler M., Barbeito C., Merkis C. Caracterización del vascular y estudio de la angiogénesis en la placenta de la gata. *Investigación Joven.* 2020;7(2):453–454. (In Span.)

Chernitskii A. E., Shabunin S. V., Safonov V. A. Multiple effects of preeclampsia in cows on postnatal growth and health of offspring. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya = Agricultural Biology.* 2019;54(2):246–258. (In Russ.). doi: 10.15389/agrobiol.2019.2.246rus

Davenport K. M., Ortega M. S., Johnson G. A., Seo H., Spencer T. E. Review: Implantation and placen-

tation in ruminants. *Theriogenology.* 2023;1:783–796. doi: 10.1016/j.animal.2023.100796

Farias S. F. S. T., Barbosa H. T. S., Pinheiro B. Q., Xavier Júnior F. A. F., de Moraes G. B., Evangelista J. S. A. M., da Silva L. D. M. Macro and microscopic characteristics of the placenta and its relationship with the weight and the Apgar score of canine neonates. *Theriogenology.* 2023;202:21–27. doi: 10.1016/j.theriogenology.2023.02.018

Folgueras A. R., Pendas A. M., Sanchez L. M., Lopez-Otin C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int. J. Dev. Biol.* 2004;48:411–424.

Gaffney J., Solomonov I., Zehorai E., Sagi I. Multilevel regulation of matrix metalloproteinases in tissue homeostasis indicates their molecular specificity in vivo. *Matrix Biol.* 2015;44(46):191–199. doi: 10.1016/j.matbio.2015.01.012

Johnson G. A., Bazer F. W., Seo H., Burghardt R. C., Wu G., Pohler K. G., Cain J. W. Understanding placentation in ruminants: a review focusing on cows and sheep. *Reprod. Fertil. Dev.* 2023;36(2):93–111. doi: 10.1071/RD23119

Kocharyan O. K., Prikhod'ko S. A., Avdeenko V. S., Loshchinin S. O., Vysokorodnaya Yu. I. Localization of epithelial and mesenchymal elements in cow placental structures under normal and eclamptic conditions. *Uchenye zapiski Vitebskoi ordena Znak Pocheta gosudarstvennoi akademii veterinarnoi meditsiny = Proceed. Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine.* 2022;58(4):47–52. (In Russ.). doi: 10.52368/2078-0109-2022-58-4-47-52

Laskowska M. Altered maternal serum Matrix Metalloproteinases MMP-2, MMP-3, MMP-9, and MMP-13 in severe early- and late-onset preeclampsia. *BioMed Res. Int.* 2017;3:235–241. doi: 10.1155/2017/6432426

Novikov V. D., Yasakova N. T., Avdeenko B. C., Mashak C. B., Tsytsorina T. N., Gerasimova Yu. V. Epithelial-stromal relationships in the cotyledonary placenta of ruminants under normal and pathological conditions. *Morfologiya = Morphology.* 1992;1:97–103. (In Russ.)

Pereira K. H. N. P., Lourenço M. L. Reanimação neonatal de cães e gatos ao nascimento. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 2022;46:3–16. (In Span.). doi: 10.21451/1809-3000.RBRA2022.001

Prikhod'ko S. A., Sharonov D. S., Velikorodnaya Yu. I., Antonov V. A. Distribution of metalloproteinases 1 and 9 in cow placenta during physiological and preeclamptic pregnancies. *Epokha nauki = The Age of Science.* 2021;25:41–46. (In Russ.). doi: 10.24412/2409-3203-2021-25-41-46

Sanches B. V., Zangirolamo A. F., Seneda M. M. Intensive use of IVF by large-scale dairy programs. *Anim. Reprod.* 2019;16(3):394–401. doi: 10.21451/1984-3143-AR2019-0058

Sarli G., Castagnetti C., Bianco C., Ballotta G., Tura G., Caporaletti M., Zambelli F. Canine placenta histological findings and microvascular density: the histological basis of a negative neonatal outcome? *Animals.* 2021;11(5):1418–1400. doi: 10.3390/ani11051418

Seo H., Baser F. W., Johnson G. A. Early syncytialization of the ovine placenta revisited. *Syncytia: Origin, Structure, and Functions*. 2024;71:127–142. doi: 10.1007/978-3-031-37936-9_7

Tesi M., Miragliotta V., Scala L., Aronica E., Lazzarini G., Fanelli D., Abramo F., Rota A. Gross and histological findings in the canine placenta and amnion at term: what's normal, abnormal or pathological? *Reprod.*

Domest. Anim. 2021;56(5):691–702. doi: 10.1111/rda.13905

Tesi M., Miragliotta V., Scala L., Aronica E., Lazzarini G., Fanelli D., Abramo F., Rota A. Relationship between placental characteristics and puppies' birth weight in toy and small sized dog breeds. *Theriogenology*. 2020;141:1–8. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.08.017

Поступила в редакцию / received: 14.10.2024; принята к публикации / accepted: 05.11.2024.
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов / The authors declare no conflict of interest.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Авдеенко Владимир Семенович

д-р вет. наук, профессор кафедры генетических и репродуктивных биотехнологий

e-mail: avdeenko0106@mail.ru

Горбаков Максим Евгеньевич

студент 4 курса факультета ветеринарной медицины

e-mail: maxgorbakov@gmail.com

Мороз Александра Игоревна

аспирант кафедры генетических и репродуктивных биотехнологий

e-mail: sashamoroz.shuramoroz@mail.ru

CONTRIBUTORS:

Avdeenko, Vladimir

Dr. Sci. (Vet.), Professor

Gorbakov, Maxim

Student

Moroz, Alexandra

Doctoral Student