УДК 916:615.273:618.36:636.1

АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ В ПЛАЦЕНТЕ КОРОВ В РОДАХ, ОСЛОЖНЕННЫХ РОДИЛЬНЫМ ПАРЕЗОМ

В. С. АВДЕЕНКО, С. Ю. КИЛЯОГЛО, С. Ю. БЫКОВА

Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, г. Санкт-Петербург, Россия, 196084
«Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-00284, https://rsct.ru/project/23-25-00284/»

(Поступила в редакцию 15.03.2024)

Материалом для исследований были взяты образцы плаценты, полученные от 10 коров в родах при завершении физиологически протекающих родов и осложненных родов родильным парезом. Полученные образцы карункулов и котиледонов фиксировали в нейтральном 10 % забуферном формалине толщиной не менее 5 мм с общей площадью до 3 см^2. На микротоме плацентомы от аллантохориона до эндометрия подвергали серии срезов. Вставка методов морфометрии и гистохимии На стекла, обработанные поли-L-лизином «Menzel», монтировали парафиновые срезы. Использовали антитела: Recombinant Bovine anti-MMP-3; Recombinant Anti-MMP-9 antibod; Anti-TIMP-1 Recombinant Anti-TIMP-1. Постановку иммуногистохимических реакций проводили с помощью пероксидаза-полимерной системы, согласно инструкции производителя (Lab Vision, Thermo). Влияние изменений содержания и локализации матриксных металлопротеиназ ведет к несвоевременному разрушению соединений ворсин хориона котиледонов в криптах карункулов после рождения теленка, что является ключевым звеном в механизме родильного пареза у крупного рогатого скота. Уровень металлопротеиназы типа ММР-3 фиксировался в строме дефрагментированных материнских крипт, а иммунопозитивные клетки определялись только вокруг сосудов, при активном продуцировании гиперплазированными эпителиальными клетками крипт. Снижение металлопротеиназы типа ММР-9 в плацентарных структурах коров отчетливо зафиксировано в образцах, полученных от коров с осложнением беременности и патологическими родами. Транслокация металлопротеиназ типов ММР-3 наблюдалась в пространстве между ворсинами хориона котиледона и эпителием крипт карункулов, особенно в местах, где ворсины, оказались полностью редуцированными. В фетальной части плаценты здоровых коров матриксная металлопротеиназа типа ММР-9 свободно располагалась в цитоплазме клеток синцитиотрофобластов, за исключением гигантских двуядерных клеток трофобласта. Одним из ключевых механизмов родильного пареза у крупного рогатого скота является несвоевременное разрушение соединения ворсин хориона котиледонов в криптах карункулов после рождения теленка, что регулируется содержанием и локализацией матриксных металлопротеиназ в плаценте коров.

***Ключевые слова**: матриксные металлопротеиназы, хорион, котиледоны, родильный парез, корова.*

The material for the research was placenta samples obtained from 10 cows in labor at the end of physiological labor and labor complicated by maternity paresis. The resulting samples of caruncles and cotyledons were fixed in neutral 10 % buffered formalin with a thickness of at least 5 mm with a total area of up to 3 cm^2. Using a microtome, placentomes from the allantochorion to the endometrium were subjected to a series of sections. There was insertion of morphometric and histochemical methods. Paraffin sections were mounted on slides treated with

Menzel poly-L-lysine. Antibodies used: Recombinant Bovine anti-MMP-3; Recombinant Anti-MMP-9 antibod; Anti-TIMP-1 Recombinant Anti-TIMP-1. Immunohistochemical reactions were performed using a peroxidase-polymer system according to the manufacturer's instructions (Lab Vision, Thermo). The influence of changes in the content and localization of matrix metalloproteinases leads to untimely destruction of cotyledon chorionic villi connections in the caruncle crypts after the birth of a calf, which is a key link in the mechanism of maternity paresis in cattle. The level of metalloproteinase of type MMP-3 was recorded in the stroma of defragmented maternal crypts, and immunopositive cells were detected only around the vessels, with active production by hyperplastic epithelial cells of the crypts. A decrease in metalloproteinase of type MMP-9 in the placental structures of cows was clearly recorded in samples obtained from cows with complications of pregnancy and pathological birth. Translocation of metalloproteinases of MMP-3 types was observed in the space between the chorionic villi of the cotyledon and the epithelium of the caruncle crypts, especially in places where the villi were completely reduced. In the fetal part of the placenta of healthy cows, matrix metalloproteinase of type MMP-9 was freely located in the cytoplasm of syncytiotrophoblast cells, with the exception of giant binucleate trophoblast cells. One of the key mechanisms of maternity paresis in cattle is the untimely destruction of the cotyledon chorionic villi junction in the caruncle crypts after the birth of a calf, which is regulated by the content and localization of matrix metalloproteinases in the placenta of cows.

***Key words**: matrix metalloproteinases, chorion, cotyledons, maternity paresis, cow.*

Введение. Наличие акушерских и гинекологических заболеваний является значимым фактором, существенно снижающим плодовитость у коров. Хотя некоторые методы, включая нагнетание воздуха в вымя, инъекции окситоцина, эстрадиола, простагландина F2α, средства для вывода коровы из коматозного состояния, однако они не продемонстрировали своей способности предотвращать осложнения в пуэрперальном периоде. На сегодняшний день практическая ветеринария не имеет на вооружении современные диагностические тесты, прогнозирующие получение жизнеспособного приплода и частоту репродуктивной патологии у родильницы. Поэтому крайне актуальны и важны работы, посвященные изучению иммунолокализации матриксных металлопротеиназ, обладающих предиктивной способностью для создания диагностирующих тест-систем.

Большая часть нарушений плодовитости связана с осложнениями в родах, включая такие проблемы, как родильный парез [3, с. 147–150]. Основой для этого как показал в своей статье [6, с. 21–27] служит нарушение микроциркуляции в тканях плаценты, приводящие к диффузно-перфузионной недостаточности плаценты. В то же время [7, с. 234] выделяют реологический фактор, это повышение агрегации эритроцитов и тромбоцитов, изменения коагуляционных свойств крови в системе «мать-плацента-плод».

По результатам исследований S.F.S. Bonnans C., Chou J., Werb Z. сообщают, что «…вклад ММР в ремоделирование матрикса чрезвычайно сложен, так как данные эндопептидазы обладают широким набором функций» [8, с.787]. ММР – цинк-зависимые ферменты,

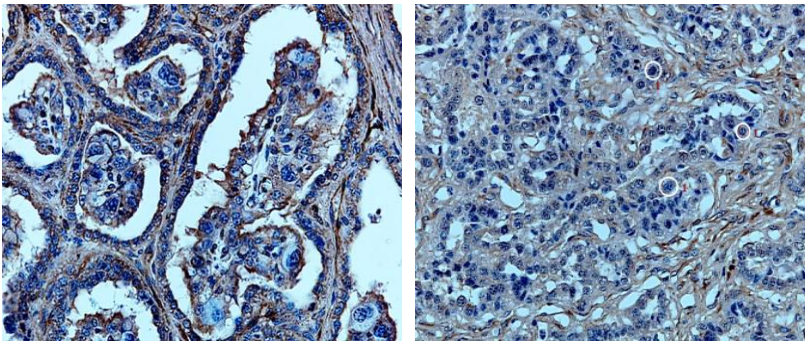
принадлежащих к подсемейству металлопептидаз М10А и являющихся основными эффекторами деградации внеклеточного матрикса в плаценте, модулируют активность различных биологически активных медиаторов, таких как факторы роста, цитокины и хемокины, либо прямым расщеплением, либо разрушая их связь с внеклеточным матриксом. Иммунологическое распознавание материнскими белками МНС класса I плода [4, с. 210–216] и [1, с. 403–412], которые экспрессируются клетками трофобласта, инициирует иммунный ответ, который, по мнению некоторых ученых, способствует профилактике акушерской патологии в родах [2, с. 98-102]. Также ММР участвуют в разрыве плодных оболочек, отслоении плаценты от материнской матки во время родов. Исследования [5, с. 500–518] показали, что матриксные металлопротеиназы (ММР) связаны с коллагеназой, выделяемой плацентой, что приводит к ослаблению связи и отхождению ворсинок хориона в крипте карункулов.

Цель исследования – провести анализ плаценты у коров и установить ключевое звено в механизме родильного пареза.

Основная часть. В формировании и реорганизации плаценты, а также в поддержании ее функций важную роль играет внеклеточный матрикс (ВКМ), регуляторными медиаторами которого являются матриксные металлопротеиназы (ММР). ММР – семейство энзимов, расщепляющих компоненты ВКМ и фиксированные во внеклеточном матриксе сигнальные молекулы и мембранные рецепторы. Для патоморфологического исследования образцы тканей плаценты помещали в 10 % нейтральный формалин. Время пребывания в фиксаторе составляло 4…5 суток при 4 ºС. Парафиновые блоки резали на ротационном микротоме (MICROM HM340E), получали срезы толщиной 5 мкм и монтировали их на предметные стекла. Для определения ключевых гистологических маркеров, использовали антитела ММР 3 и 9, кроличьи, поликлональные, Spring Bioscience, США и их ингибиторы TIMP 1 Мышиные моноклональные [C5], Cloude-clone, США. Парафиновые срезы образцов плаценты толщиной 5 мкм, подлежащих иммуногистохимическому исследованию, монтировали на стекла, обработанные поли-L-лизином («Menzel»). Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы после депарафинизации инкубировали 20 минут в 3 % перекиси водорода. Срезы кипятили при 100 ºС в цитратном буфере с pH=6,0 в течение 10 минут для демаскировки антител. Пероксидазу проявляли 3-3-диаминобензидином из набора протокола. На заключительном этапе реакции срезы докрашивали гематоксилином Майера.

В обработанных образцах плаценты коров, полученных от клинически здоровых животных в родах установлены в строме крипт карункулов иммунопозитивные клетки, которые фиксировались только вокруг

сосудов, в то время как гиперплазированные эпителиальные клетки крипт активно продуцировали ММР-3 (рис. 1).



1 2

Рис. 1. Иммунолокализация: 1) – ММР-3 и 2) – ММР-9 в плаценте коровы в родах при осложнении родильным парезом. (Антитела к ММР-3. ПАП-метод. Докраска гематоксилином Майера). Общее увеличение: 200

При родильном парезе в поле зрения гистопрепаратов отмечается транслокация матриксной металлопротеиназы типа ММР-1 в полость крипт, свободное пространство которых было критически снижено, а ворсины в таких криптах оказались практически полностью редуцированными. Диффузное распределение матриксных металлопротеиназ присутствовало в цитоплазме эпителиоцитов в материнских перегородках крипт карункулов. Значительная иммунопозитивная реакция матриксных металлопротеиназ типа ММР-3 регистрировалась в гигантских двуядерных клетках, локализованных в деградируемых ворсинах хориона. Результатами изучения иммунолокализации ММР-9 установили снижение матриксной металлопротеиназы в плацентарных структурах коров с осложнением родов родильным парезом, рис. 2, особенно в материнской части плаценты. Остаточное присутствие ММР-9 наблюдали только в деградируемых септах материнской части плаценты, а также вокруг сосудов. Кроме того, слабовыраженная экспрессия ММР-9 отмечалась в цитоплазме эпителиоцитов материнской части плаценты.

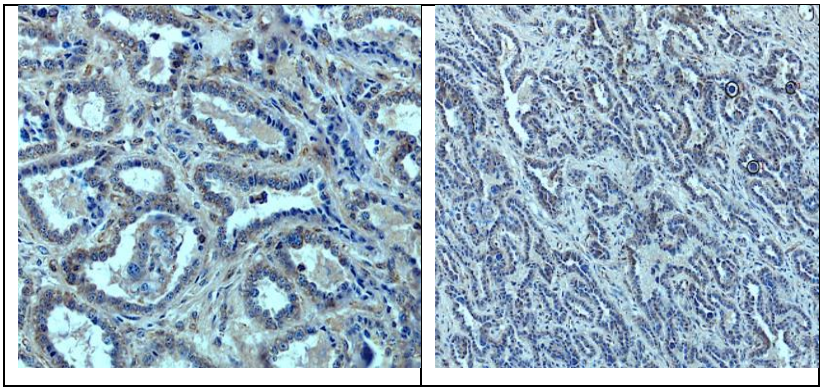
Соотношение исследуемых типов металлопротеиназ в плацентарных структурах коровы при осложнении беременности и патологических родах смещалось в сторону ММР-3. В гистопрепаратах полученных от коров с осложнением родов родильным парезом идентифицируются относительно большие зоны дистрофически измененного хориального эпителия.

В плаценте коров с родильным парезом фоновый уровень ММР-3 изменялся, и подвергался перераспределению, рис. 1.

Транслокация металлопротеиназ типов ММР-3 и ММР-9 наблюдалась в пространстве между ворсинами хориона котиледона и эпителием крипт карункулов, особенно в местах, где ворсины оказались полностью редуцированными. В фетальной части плаценты здоровых коров матриксная металлопротеиназа типа ММР-9 свободно располагалась в цитоплазме клеток синцитиотрофобластов, за исключением гигантских двуядерных клеток трофобласта. Так, в строме дефрагментированных крипт карункулов иммунопозитивные клетки определялись только вокруг сосудов, в то время как гиперплазированные эпителиальные клетки крипт активно продуцировали ММР-3.

Результатами изучения иммуннолокализации ММР-9 установили снижение матриксной металлопротеиназы в плацентарных структурах коров с родильным парезом, особенно в материнской части плаценты. Остаточное присутствие ММР-9 наблюдали только в деградируемых септах материнской части плаценты, а также вокруг сосудов. Кроме того, слабовыраженная экспрессия ММР-9 отмечалась в цитоплазме эпителиоцитов материнской части плаценты.

Анализ содержания тканевого ингибитора TIMP-1 в плаценте коров продемонстрировал отсутствие явно выраженных изменений в экспрессии белка в плацентарных структурах. Однако обращало на себя внимание снижение TIMP-1 в цитоплазме гигантских клеток, рис. 2.



1 2

Рис. 2. Иммунолокализация: 1) – TIMP-1/MMP-3 и 2) – TIMP-1/MMP-9 в плаценте коровы в родах, осложненных родильным парезом. (Антитела к TIMP-1. ПАП-метод. Докраска гематоксилином Майера Общее увеличение: 200)

В плаценте при физиологических родах исследуемых типов металлопротеиназ: ММР-3 и 9 можно было отнести к мембран-связанным белкам, то при осложнении родов родильным парезом они имели как правило цитоплазматическую 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 родильным парезом, крайне неравномерно как в парацентральных, так и в краевых зонах, где его экспрессия полностью отсутствовала.

Заключение. Распределение матриксных металлопротеиназ (ММР-3) в плацентарных тканях коров, подвергшихся осложненным родам родильным парезом, было проанализировано. Обнаружена локализация ММР-3 в строме материнских крипт и иммунопозитивная реакция на ММР-9 в мембранном пространстве синцитиотрофобластов и в цитоплазме щеточной каемки. В плаценте коров с осложнениями родов родильным парезом обнаружены иммунопозитивные клетки в строме дефрагментированных материнских крипт карункулов, расположенные вокруг сосудов. Остаточное присутствие металлопротеиназы ММР-9 наблюдалось только в деградируемых криптах материнской части плаценты, а также вокруг сосудов фетальной части плаценты. В тканях маточной части плаценты коровы при родильном парезе установлена деградация соединительно-тканного матрикса крипт карункулов, что указывает на бесструктурность межуточного вещества маточных крипт карункулов. Транслокация металлопротеиназ типов ММР-3 и ММР-9 наблюдалась в пространстве между ворсинками хориона котиледона и эпителием крипт карункулов, особенно в местах, где ворсины оказались полностью редуцированными. В фетальной части плаценты здоровых коров металлопротеиназы типа ММР-9 свободно располагалась по всей площади клеток хориона в цитоплазме синцитиотрофобластов и трофобласта, за исключением гигантских двуядерных клеток. Анализ содержания тканевого ингибитора TIMP-1 и ММР-3 в этих тканях не выявил явных изменений в экспрессии белков. Наблюдалась транслокация фермента TIMP-1 и ММР-9 в полость крипт, где ворсины, остались почти нередуцированными, что указывает на плацентарную недостаточность в эмбриогенезе. Одним из ключевых механизмов родильного пареза у крупного рогатого скота является несвоевременное разрушение соединения ворсин хориона котиледонов в криптах карункулов после рождения теленка, что регулируется содержанием и локализацией матриксных металлопротеиназ в плаценте коров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лабораторные методы для определения маркера пролиферативной активности ki-67 в плаценте коров при осложненной беременности и патологических родах / В. С. Авдеенко, С. А. Макавчик, Д. И. Сафронов и др. // Международный вестник ветеринарии. – 2023. – № 4. – С. 403–412.

2. Кочарян, О. К., Приходько С. А., Авдеенко В. С., Лошинин 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, вып. 4. – С. 47–52.

3. Лустов Е. Н. Воспроизводительная способность коров при акушерских заболеваниях в ОАО «Агросервис» Белыничского района // В сборнике: Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства: материалы XXVI Международной студенческой научной конференции / редкол.: А. И. Портной (гл. ред.) и др. – Горки: БГСХА, 2023. – С. 147–150.

4. Медведев Г. Ф. Свойство близости и распознавания состояния репродукции у коров // В сборнике: Проблемы репродуктивного здоровья животных и пути их решения: материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 95-летию кафедры акушерства, гинекологии и биотехнологии размножения животных и 45-летию ветеринарной и научно-практической деятельности профессора Р. Г. Кузьмича. – Витебск, 2022. – С. 65–69.

5. Lean I. J., LeBlanc S.J., Sheedy D. B., Duffield T., Santos J. E. P., Golder H. M. Associations of parity with health disorders and blood metabolite concentrations in Holstein cows in different production systems. // J Dairy Sci. 2023 Jan; 106 (1):500-518. doi: 10.3168/jds.2021-21673. Epub 2022 Oct 19. PMID: 36270869.

6. Tavares Farias S.F.S., Barbosa H.T.S., Xavier Júnior F.A.F., Monteiro Evangelista J.S.A., Machado da Silva L.D. Macro and microscopic characteristics of the placenta and its relationship with the weight and the Apgar score of canine neonates. // Theriogenology. V.202, 2023, p. 21–27.

7. Родин П. В., Авдеенко В. С. Гистологические изменения в плаценте крупного рогатого скота при гестозе // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии, 2015, 2: 233–235.

8. Bonnans C. Remodelling the extracellular matrix in development and disease / C. Bonnans, J. Chou, Z. Werb // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2014. – Vol. 15. – P. 786–801.