References

1. Dikareva L. V. Giperplasticheskie processy v matki: kliniko-dagnosticheskoe znachenie markerov biologicheskikh zhidkostej. Volgograd; 2009.
2. Dubinina E. E., Morozova M. G., Leonova N. V. *Voprosy meditsinskiy khimii. – Questions of medical chemistry.* 2000;(4):52-57.
3. Radzinskij V. E., Dimitrova V. I., Majskova I. J. *Nerazvivajushhajasja beremennost'.* M.: «GEOTAR-Media»; 2009.
4. Tishkova O. G., Dikareva L. V., Teplyj D. L., Ayupova A. K. *Nerazvivayushchayasja beremennost': Uchebnoe posobie.* Astrakhan; 2016.
5. Shabalin V. N., Shatovina S. N. *Morfologiya biologicheskikh zhidkostej.* M.: «Xrizostom»; 2001.
6. Alijotas-Reig J., Garrido-Gimenez C. *Obstet. Gynecol. Surv.* 2013;68:445-466. doi: 10.1097/OGX.0b013e31828aca19
7. Coccia M., Rizzello F. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2017;295(1):261-262. doi: 10.1007/s00404-016-4213-8
8. Fei H., Hou J., Wu Z., Zhang L., Zhao H., Dong X. *Bio-med. Chromatog.* 2013;30(12):1942-1952. doi: 10.1002/bmc.3770
9. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertility and sterility.* 2012;98:1103-111. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.06.048

Сведения об авторах:

Тишкова Ольга Геннадьевна, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры акушерства и гинекологии; тел.: 89896839585; e-mail: tishkov2003@mail.ru

Дикарева Людмила Васильевна, доктор медицинских наук, зав. кафедрой; e-mail: dikarevalv@mail.ru

Аюпова Адилья Камильевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник совместной лаборатории физики конденсированного состояния и новых методов исследования в материаловедении; e-mail: adilya_ayupova@mail.ru

Теплый Давид Львович, доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой физиологии и морфологии человека и животных; e-mail: dima.teplyj@yandex.ru

© Коллектив авторов, 2018

УДК 618.141-076.1

DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2018.13008>

ISSN – 2073-8137

К ВОПРОСУ О КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКЕ ЭКСПРЕССИИ α -SMA ПРИ АДЕНОМИОЗЕ

Г. М. Могильная, А. Н. Симовоник, И. С. Гуменюк, А. С. Сотниченко,
Е. В. Кувейда, Е. А. Губарева

Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

TO QUESTION OF QUANTITATIVE EVALUATION OF α -SMA EXPRESSION IN ADENOMYOSIS

Mogilnaja G. M., Simovonik A. N., Gumenjuk I. S., Sotnichenko A. S.,
Kuevda E. V., Gubareva E. A.

Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia

Работа посвящена сравнительной оценке содержания гладкомышечного актина (α -SMA) в «переходной зоне» матки и в наружном миометрии у пациенток с аденомиозом. Материалом для исследования послужили образцы маток, удаленных у больных с аденомиозом (47 женщин), в качестве контроля использовался материал после гистерэктомии по поводу миомы матки. Обзорные срезы окрашивали по Маллори, иммуногистохимическое выявление α -SMA проводили по стандартному протоколу с использованием моноклональных антител anti-Actin antibody (Abcam, Англия). Количественная оценка экспрессии α -SMA проведена по разработанной методике с оценкой площади позитивных участков в узкой спектральной зоне с оптической плотностью выше пороговой. Сравнительный анализ выполнен с помощью программы «DAP analyzer», в основе которой лежит алгоритм цветовой деконволюции. Изучение содержания α -SMA показало, что в гладкомышечных клетках наружного миометрия экспрессия его выше, чем в одноименных клетках внутреннего миометрия. При оценке уровня коллагена в полихромных микропрепаратах, окрашенных по Маллори, оказалось, что при аденомиозе имеют место изменения объема экстрацеллюлярного фибриллярного компонента в «переходной зоне», тогда как в зоне наружного миометрия он практически не меняется.

Ключевые слова: переходная зона, аденомиоз, матка, иммуногистохимия, морфометрия

The study was devoted to a comparative assessment of the level of smooth muscle actin (α -SMA) in the «junctional zone» and in the outer myometrium of patients with adenomyosis. Material for the study – uterine samples removed from patients with adenomyosis (47 women). Control material – uterine samples removed from patients with leiomyoma. In the main group, the expression of α -SMA was higher in smooth muscle cells of the outer myometrium than

in the same cells of the inner myometrium. When assessing the level of collagen in polychromic micropreparations, stained by Mallory, it turned out that with adenomyosis there is a change in the volume of the extracellular fibrillar component in the «junctional zone», while in the zone of the outer myometrium it does not actually change.

Keywords: junctional zone, adenomyosis, uterus, immunohistochemistry, morphometry

Изучение стенки матки при аденомиозе с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ), а затем и методом ультразвуковой диагностики привело к обнаружению в ней особой топографической зоны, обозначаемой как Junctional Zone (переходная зона). Интерес к этой зоне связан с тем, что она играет важную роль в развитии аденомиоза, в процессах репродукции и акушерских исходах [5, 10], при этом толщина «переходной зоны» связана с эффектом гиперплазии и гипертрофии гладкомышечных клеток (ГМК) внутреннего миометрия [8]. Предполагается, что гиперплазия этой зоны служит ранним предиктором аденомиоза [2].

Целью настоящего исследования является сравнительная количественная оценка уровня содержания гладкомышечного актина (α -SMA) в «переходной зоне» (зона внутреннего миометрия) и в наружном миометрии у пациентов с аденомиозом.

Материал и методы. Исследованы образцы маток, удаленных во время операции по поводу аденомиоза (47 женщин, средний возраст $52,03 \pm 0,51$ года). Включение пациенток в клиническое исследование проводилось после получения информированного согласия и протоколировалось по стандартам этического комитета Российской Федерации.

Все пациентки были разделены на 2 клинические группы. В первую группу вошли больные с гистологически подтвержденным диагнозом аденомиоза I стадии, а во вторую – с наличием аденомиоза II стадии. В качестве контроля был использован аутопсийный материал, полученный от женщин, у которых гистерэктомия проводилась по поводу миомы матки. Полученные образцы фиксировали в 10 % забуференном формалине, дегидратировали и заключали в парафин по стандартной методике. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону, анилиновым синим по Маллори, трихромом по Массону. Иммуногистохимическое исследование осуществляли по стандартному протоколу с использованием моноклональных антител. Обнаружение α -SMA проведено с помощью антител anti-Actin antibody (1:200, ab3280, Abcam, Англия).

Был проведен количественный морфометрический анализ результатов иммуногистохимического выявления гладкомышечного актина с использованием метода оценки площади позитивных участков в узкой спектральной области с оптической плотностью выше пороговой. Срезы фотографировали с помощью микроскопа Olympus IX 51 камерой Olympus XC30 (охлаждение элементом Пелетье, CCD матрица с разрешением 2080×1544 , 12 бит на канал). Все изображения имели одинаковое

разрешение и степень увеличения ($\times 200$). Результат сохраняли в виде отдельных файлов изображений в 16-битном tiff-формате. С помощью свободного программного обеспечения (Rawtherapee) проводили нормализацию изображений по экспозиции и балансу белого. Нормализованные изображения сохраняли в 8-битном tiff-формате. Количественный морфометрический анализ образцов выполняли с помощью специально разработанной программы для ЭВМ «DAB analyzer» (свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2016660185 от 08.09.2016). В ее основе лежит разработанный А. С. Руифрок и Д. А. Джонстон [11] алгоритм цветовой деконволюции, которая позволяет сегментировать из исходного изображения каналы отдельных цветовых меток и строить карту распределения их оптической плотности на микрофотографии. Данный метод применим при выделении как двух красителей – пары гематоксилин-эозин, гематоксилин-DAB хромоген, так и трех – окраска трихромом по Массону, окраска по Маллори. Алгоритм был в дальнейшем портирован на язык Java и доработан G. Landini [3, 6, 7]. Программа для автоматизированного морфометрического анализа была написана на языке Python. Исходный код программы опубликован на Github под открытой лицензией GPL 3.0 [4].

Сущность разработанного алгоритма состоит в следующем:

1. При запуске программа получает необходимые параметры – пороговые значения сегментации, путь к каталогу с изображениями и другие. После чего файлы в целевом каталоге подвергаются многопоточной параллельной обработке (рис. 1).

Рис. 1. Композитное изображение для контроля корректности пороговых коэффициентов, формируемое программой

2. Каждый файл подвергается обработке с помощью алгоритма цветовой деконволюции, позволяющей получить карту распределения оптической плотности каждого красителя в исходном изображении.

3. Карты распределения пигмента бинаризируются путем попиксельного сравнения каждой точки изображения с заданным исследователем порогом. Таким образом, только области с оптической плотностью выше заданной считаются положительно окрашенными.

4. Для каждого изображения производится подсчет относительной площади положительного окрашивания.

5. После обработки изображений из заданной серии результаты морфометрического анализа сохраняются в отдельном файле.

Данный алгоритм применяли для всей серии изображений, результаты измерений в виде csv-файла сохранили для последующего анализа и интерпретации. Коэффициент пропорциональности $\text{мкм}^2/\text{пиксель}$ составил 0,03. Это позволило вычислить площади структур с привязкой к абсолютным значениям.

Результаты. Изучение уровня экспрессии α -SMA у пациентов с аденомиозом в условиях стандартного микроскопирования показало, что положительную реакцию различной степени интенсивности обнаруживают ГМК стенки матки. При этом ориентированные циркулярно ГМК дают реакцию от слабой до умеренной интенсивности, а ГМК, выявляемые в поперечном сечении, обычно интенсивную. Однако среди ГМК последней группы удается типировать клетки с различной степенью интенсивности: одни окрашены интенсивно, другие умеренно, третьи слабо. Этот факт может служить показателем различной экспрессии α -SMA, но, с другой стороны, этот эффект может быть связан с уровнем среза ГМК в центре или на периферии, то есть на участках с различным уровнем содержания актина. Сравнение характера экспрессии α -SMA в топографических зонах матки показало, что в «переходной зоне» уровень его чаще умеренный, а в зоне наружного миометрия выявляются отдельные ГМК, окрашивающиеся интенсивно. Эти данные совпадают с результатами, полученными М. К. Mehasseb и соавт. [9], согласно которым различия в степени экспрессии α -SMA в клетках внутреннего и наружного миометрия отсутствуют или слабо выражены.

При изучении экспрессии α -SMA с помощью разработанной компьютерной программы оказалось, что в зоне внутреннего миометрия, соответствующего «переходной зоне», уровень экспрессии этого маркера в переходной зоне составил $35,01 \pm 6,03$. В зоне наружного миометрия показатель оказался равным $44 \pm 3,54$, но статистически эти различия были недостоверны.

У лиц первой группы (аденомиоз I стадии) характер экспрессии α -SMA в зоне внутреннего и наружного миометрия совпадал и составил $44 \pm 0,1$ и $40,75 \pm 4,25$ соответственно. У пациентов второй группы (аденомиоз II стадии) выявлены различия в характере экспрессии для «переходной зоны» и наружного миометрия. Так,

во внутреннем миометрии экспрессия α -SMA в среднем оказалась равной $28,52 \pm 6,35$, а во второй группе показатель был в 1,5 раза больше и составил в среднем $47,75 \pm 5,73$ (рис. 2). Не исключено, что выявленные различия уровня содержания α -SMA отражают особенности характера дифференцировки ГМК, ибо при аденомиозе имеет место эффект трансформации эндометриальных стромальных клеток в клетки миофибробласты, а затем в ГМК с накоплением в них контрактильных миофиламент, обеспечивающих экспрессию гладкомышечного актина. Полученные данные позволяют считать, что образующиеся ГМК отличаются более низкой экспрессией гладкомышечного актина в клетках внутреннего миометрия, но эти изменения регистрируются при аденомиозе II стадии.

Рис. 2. Выявление актина в гладких миоцитах (SMA):
А – переходная зона (внутренний миометрий). Об. $\times 10$; Ок. $\times 20$;
Б – наружный миометрий. Об. $\times 10$; Ок. $\times 20$

В аспекте изучения патогенеза аденомиоза особый интерес представляют данные о содержании в миометрии соединительной ткани, окружающей мышечные группы как в зоне внутреннего, так и наружного миометрия. Разработанную программу морфометрического анализа мы применили для оценки фибриллярного компонента в полихромных микропрепаратах, полученных в условиях окраски по Маллори [1].

У пациентов с аденомиозом в «переходной зоне» уровень соединительнотканного компонента был достаточно высокий и составил в среднем $2,52 \pm 1,31$, а в зоне наружного миометрия – $1,53 \pm 0,49$. При измерении объема коллагена оказалось, что в первой группе различия для зоны внутреннего и наружного миометрия нивелируются и составляют $1,64 \pm 0,94$ и $1,36 \pm 0,74$ соответственно. У второй группы пациентов выявляется более высокий уровень фибриллярного компонента в «переходной зоне», в количественном отношении он составил $3,1 \pm 2,24$ (рис. 3).

Рис. 3. Выявление фибриллярного компонента:
А – переходная зона (внутренний миометрий). Об. $\times 10$; Ок. $\times 20$;
Б – Наружный миометрий. Об. $\times 10$; Ок. $\times 20$

Заключение. Таким образом, полученные с помощью использованного метода данные показали, что характерным для «переходной зоны» матки является факт снижения уровня экспрессии гладкомышечного актина миоцитами внутреннего миометрия, но этот эффект реализуется в случае аденомиоза II стадии. Не исключено, что эти изменения могут приводить к нарушению двигательной активности

внутреннего миометрия с нарушением транспорта спермы и имплантации. Использованный метод позволил впервые провести оценку монохромного индекса в микропрепарате с многоцветной окраской (реакция Маллори), что позволило выявить тенденцию к изменению объема фибриллярного компонента экстрацеллюлярного матрикса матки при аденомиозе II стадии.

Литература

1. Лилли, Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия / Р. Лилли. – Москва : МИР, 1969. – С. 503–505.
2. Brosens, J. J. Uterine adenomyosis: a need for uniform terminology and consensus classification / J. J. Brosens, S. Gordts, L. Fusi [et al.] // *Reproductive Biomedicine Online*. – 2008. – Vol. 17, № 2. – P. 244–248.
3. Colour Deconvolution. – Режим доступа: <http://www.mecourse.com/landinig/software/cdeconv/cdeconv.html>.
4. DAB analyzer. – Режим доступа: https://github.com/meklon/DAB_analyzer/.
5. Kunz, G. Characterization of the uterine junctional zone prior to IVF/ICSI: an observational study / G. Kunz, D. Beil // *Arch. Gynecol. Obstet.* – 2010. – Vol. 281. – P. 945–953.
6. Landini, G. Digital enhancement of haematoxylin and eosin-stained histological images for red-green colour-blind observers / G. Landini, G. Perryer // *J. Microsc.* – 2009. – Vol. 234, № 3. – P. 293–301.

References

1. Lillie R. Histopathologic technic and practical histochemistry. Moscow: «MIR», 1969.
2. Brosens J. J., Gordts S., Fusi L., Benagiano G., Brosens I. *Reproductive Biomedicine Online*. 2008;17(2):244–248.
3. Colour Deconvolution. Available at: <http://www.mecourse.com/landinig/software/cdeconv/cdeconv.html>
4. DAB analyzer. Available at: https://github.com/meklon/DAB_analyzer/
5. Kunz G., Beil D. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2010;281:945–953.
6. Landini G., Perryer G. *J. Microsc.* 2009;234(3):293–301.

7. Landini, G. Estimation of tissue layer level by sequential morphological reconstruction / G. Landini, I. E. Othman // *J. Microsc.* – 2003. – Vol. 209, № 2. – P. 118–125.
8. Larsen, S. B. Adenomyosis and junctional zone changes in patients with endometriosis / S. B. Larsen, E. Lundorf, A. Forman, M. Dueholm // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* – 2011. – Vol. 157, № 2. – P. 206–211.
9. Mehaseb, M. K. Phenotypic Characterisation of the Inner and Outer Myometrium in Normal and Adenomyotic Uteri / M. K. Mehaseb, S. C. Bell, L. Brown, J. H. Pringle, M. Habiba // *Gynecol. Obstet. Invest.* – 2011. – Vol. 71, № 4. – P. 217–224.
10. Novellas, S. MRI characteristics of the uterine junctional zone: from normal to the diagnosis of adenomyosis / S. Novellas, M. Chassang, J. Delotte [et al.] // *Am. J. Roentgenology*. – 2011. – Vol. 196, № 5. – P. 1206–1213.
11. Ruifrok, A. C. Quantification of histochemical staining by color deconvolution / A. C. Ruifrok, D. A. Johnston // *Anal. Quant. Cytol. Histol.* – 2001. – Vol. 23, № 4. – P. 291–299.

7. Landini G., Othman I. E. *J. Microsc.* 2003;209(2):118–125.
8. Larsen S. B., Lundorf E., Forman A., Dueholm M. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2011;157(2): 206–211.
9. Mehaseb M. K., Bell S. C., Brown L., Pringle J. H., Habiba M. *Gynecol. Obstet. Invest.* 2011;71(4):217–224.
10. Novellas S., Chassang M., Delotte J., Toullalan O., Chevallier A., Bouaziz J., Chevallier P. *Am. J. Roentgenology*. 2011;196(5):1206–1213.
11. Ruifrok A. C., Johnston D. A. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 2001; 23(4):291–299.

Сведения об авторах:

Могильная Галина Мироновна, доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой гистологии с эмбриологией; тел.: 88612627271; e-mail: evglandr@mail.ru

Симовоник Анна Николаевна, аспирант кафедры акушерства, гинекологии и перинатологии; тел.: 89184427094; e-mail: anna.simovonik@gmail.com

Гуменюк Иван Сергеевич, научный сотрудник лаборатории фундаментальных исследований; тел.: 89183924111; e-mail: meklon@gmail.ru

Сотниченко Александр Сергеевич, научный сотрудник лаборатории фундаментальных исследований; тел.: 89628518237; e-mail: alex24.88@mail.ru

Куведва Елена Вячеславовна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории фундаментальных исследований, ассистент кафедры топографической анатомии с курсом оперативной хирургии; тел.: 89189351760; e-mail: elenakuevda@yandex.ru

Губарева Елена Александровна, кандидат медицинских наук, зав. лабораторией фундаментальных исследований, доцент кафедры общей и клинической патофизиологии; тел.: 89181327857; e-mail: g_lena82@list.ru