

---

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА И БИОЛОГИЯ**

---

УДК 616.65-006.6-008.94

**ОЦЕНКА ВЗАИМОСВЯЗИ СОДЕРЖАНИЯ ЯДРЫШЕК  
В КЛЕТКАХ МЕЛАНОМЫ КОЖИ С ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТЬЮ,  
МОРФОЛОГИЕЙ И ПРОГНОЗОМ ОПУХОЛИ***В. С. Алексинский, В. А. Басинский***Гродненский государственный медицинский университет**

Изучена взаимосвязь количества ядрышек в меланоме кожи с исходом заболевания, пролиферативной активностью и морфологией опухоли. Установлено, что содержание ядрышек в меланоме является самостоятельным прогностическим показателем, а его повышение ассоциировано с неблагоприятным исходом заболевания.

Ключевые слова: меланома кожи, ядрышки, морфология, Ki67(MIB-1), прогноз.

**THE ASSESSMENT OF THE CONNECTION BETWEEN THE CONTENT  
OF NUCLEOLI IN SKIN MELANOMA CELLS AND THE PROLIFERATIVE ACTIVITY,  
MORPHOLOGY, AND PROGNOSIS OF TUMOR***V. S. Aleksinsky, V. A. Basinsky***Grodno State Medical University**

We have studied the connection between the number of nucleoli in skin melanoma and the disease outcomes, proliferative activity and morphology of the tumor. We have found that the number of nucleoli in melanoma is an independent prognostic parameter and its increase is associated with poor outcome of the disease.

Key words: skin melanoma, nucleoli, morphology, Ki-67(MIB-1), prognosis.

Оценка прогноза заболевания при меланоме кожи по-прежнему остается актуальной проблемой для исследователей. По данным ВОЗ [1], основными прогностическими критериями меланомы являются морфологические особенности опухоли, а также ее локализация на теле, пол и возраст пациента. Среди морфологических критериев важное значение имеют толщина меланомы по Breslow, стадия инвазивного роста по Кларку, уровень митотической активности, гистологический тип, изъязвление и лимфоваскулярная инвазия.

Однако целый ряд морфометрических показателей и их влияние на прогноз меланомы кожи остаются неучтенными, и, на наш взгляд, одними из наиболее перспективных в этом отношении могут являться показатели, характеризующие содержание ядрышек в опухоли, поскольку увеличение размера и количества ядрышек — отличительная особенность многих злокачественных опухолей. Например, увеличение ядрышек и повышение их количества является характерным морфологическим изменением при интраэпителиальной неоплазме и инвазивных аденокарциномах предстательной железы. При этом предполагается избыточная экспрессия онкогена MYC, участвующего в ядрышковой программе экспрессии генов в

эпителиальных клетках предстательной железы [2]. А выявление серебро-связывающих областей ядрышковых организаторов в опухолевых клетках плоскоклеточного рака полости рта и определение их количества считается полезным и недорогим диагностическим инструментом, поскольку повышение их числа ассоциировано с плохим прогнозом опухоли [3]. Сходные результаты были получены для рака молочной железы и немелкоклеточного рака легких [4, 5].

Однако в доступных нам литературных источниках мы не обнаружили публикаций, посвященных исследованию взаимосвязи содержания ядрышек в клетках меланомы с прогнозом заболевания, в связи с чем оценка подобных показателей при меланоме кожи представляется нам актуальной.

**Цель исследования**

Оценить взаимосвязь количества ядрышек, определяемых на гистологических срезах меланомы кожи, с исходом заболевания, пролиферативной активностью и морфологией опухоли.

**Материал и методы**

Материалом для исследования послужили 65 меланом кожи, полученных при эксцизионной биопсии у пациентов Гродненской области с ретроспективно известными исходами течения опухолевого процесса, не подвергавшихся луче-

вой и химиотерапии. Медиана возраста пациентов составила 62 (51; 70) года, а медиана продолжительности жизни пациентов в послеоперационном периоде равнялась 38 (15; 90) месяцам (в скобках приведены нижний и верхний квартили).

Оценивались макроскопические параметры меланомы: большой и малый размеры, высота и степень пигментации (выражалась полуколичественно, в баллах).

Для морфологического и морфометрического исследования с парафиновых блоков получали гистологические срезы толщиной 5 мкм, которые окрашивались гематоксилином и эозином по стандартной методике.

Оценивались такие морфологические параметры меланомы, как стадия инвазивного роста по Кларку, толщина по Breslow (в мм), на основании которой определялась стадия pT согласно требованиям ВОЗ к TNM-классификации меланомы кожи [6], гистологический тип, отмечалось наличие вторичных изменений в опухоли (изъязвления и некрозы), выраженность перитуморозной лимфогистиоцитарной инфильтрации (ПТИ).

Морфометрическая оценка содержания ядрышек в меланоме заключалась в нахождении соотношения между количеством ядрышек и ядер в клетках паренхимы опухоли, а также в определении количества ядрышек, содержащихся в единице площади опухоли и опухолевой паренхимы.

Для нахождения баланса «ядрышко/ядро» в фоторедакторе «Adobe Photoshop CS3» на микрофотографиях гистологических срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, при помощи инструмента «count tool» подсчитывалось количество ядрышек и ядер, а затем находилось их соотношение, полученная цифра умножалась на 100 и округлялась до целых ( $n/N$ ). При помощи программы «Photom131» была рассчитана суммарная общая площадь опухоли и суммарная площадь опухолевой паренхимы во всех полученных полях зрения. Затем суммарное количество ядрышек в имеющихся полях зрения было разделено на площадь опухоли (показатель обозначен как  $n/t$ ) и площадь опухолевой паренхимы (показатель обозначен как  $n/t_p$ ).

Иммуногистохимическое окрашивание выполнено с использованием моноклональных мышинных антител к маркеру клеточной пролиферации KI-67(MIB-1) фирмы «DAKO» по следующей методике [7]: из парафиновых блоков готовились срезы толщиной 5 мкм, переносились на предметные стеклалаула ultra frost+; срезы в вертикальном положении высушивали 18 часов при комнатной температуре, далее помещали в термостат на 30 мин при температуре 60 °С. После этого проводилась депарфинация в ксилоле (в батарее из 3 емкостей по 3 минуты в каждой) и дегидратация в этиловом

спирте (в батарее из 3 емкостей в спиртах восходящей крепости по 3 мин в каждой). Предметные стекла со срезами переносились в цитратный буфер pH 6.0 и помещались в водяную баню при температуре 98 °С на 30 мин. Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы обрабатывались 3 % перекисью водорода. Первичные антитела наносились в стандартном разведении. Срезы инкубировались в течение 30 минут при комнатной температуре. В качестве визуализирующей системы использовали комплекс вторичных антител EnVision фирмы «DAKO» с диамибензидином. Затем срезы промывали проточной водой, докрашивали гематоксилином и заключали в канадский балзам. Проводились положительные и отрицательные контрольные реакции.

Для количественной оценки результатов иммуногистохимической реакции микропрепараты были сфотографированы при помощи микроскопа «AxioStar» и цифровой камеры «Canon» (объектив  $\times 40$ , разрешение 1600 $\times$ 1200 пикселей). Количественной мерой экспрессии ядерного маркера KI-67(MIB-1) в опухолевых клетках был клеточный пролиферативный индекс (КПИ).

Определение клеточного пролиферативного индекса по экспрессии KI67 (MIB-1) проводилось путем нахождения процентной доли KI67-позитивных (то есть окрашенных в коричневый цвет) клеточных ядер в опухоли. При оценке клеточного пролиферативного индекса подсчет проводился для клеточной популяции, насчитывающей не менее тысячи клеток, если это позволял объем представленной на исследование опухоли, и не менее чем в двух случайных полях зрения. В случаях, когда площадь опухолевой ткани в срезах содержала менее тысячи клеток, подсчет проводился в максимальном количестве неперекрывающихся полей зрения.

Для статистической обработки полученных результатов использовался пакет прикладных программ «Statistica», 10.0 согласно руководству О. Ю. Ребровой по работе с данным программным обеспечением [8].

Использовалась описательная статистика (Me (LQ; UQ) — медиана (верхний квартиль; нижний квартиль), M(SD) — среднее (стандартное отклонение)), построение гистограмм признаков. Поиск корреляционных связей между исследуемыми признаками проводился с использованием непараметрического корреляционного анализа Спирмена (связь считалась статистически значимой при уровне значимости  $p < 0,05$ ). Для сравнения множественных независимых групп использовался тест Краскела-Уоллиса и медианный тест, а для сравнения 2 независимых групп — тест Манна-Уитни (во всех случаях различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ ).

Выживаемость оценивалась путем использования регрессионной модели Каплана-Мейера, ее сравнение в группах проводилось с помощью теста Гехана-Уилкоксона (различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ ).

**Результаты и обсуждение**

Данные описательной статистики показателей, характеризующих содержание ядрышек в клетках меланом исследуемой выборки, приведены в таблице 1.

Таблица 1 — Характеристика показателей содержания ядрышек в меланоме

Показатели опухоли	Min.	Max.	M	SD	Me	LQ	UQ
n/N	30	191	—	—	118	65	136
n/t, ядрышко/мкм <sup>2</sup>	0,05	1,1	0,5	0,3	—	—	—
n/t <sub>p</sub> , ядрышко/мкм <sup>2</sup>	0,05	1,1	0,5	0,3	—	—	—

При оценке гистограммы показателя n/N (рисунок 1) выявлено, что она представляет «двугорбый» тип с наличием «провала», центр которого приходится на значение, равное 110.

Это позволило разделить выборку пациентов на 2 группы: группу с высоким (больше 110) и низким (меньше 110) содержанием ядрышек в клетках опухоли.

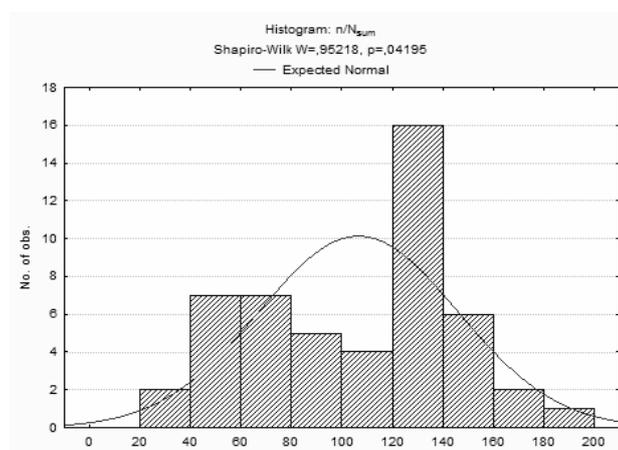


Рисунок 1 — Гистограмма показателя n/N

Показатель n/N не продемонстрировал связей с размерами и степенью пигментации опухоли (корреляционный тест Спирмена,  $p > 0,05$ ). Содержание ядрышек в единице площади меланомы было связано со степенью ее пигментации. В частности, показатели n/t и n/t<sub>p</sub> обратно коррелировали с содержанием пигмента:  $r_s = -0,37$ ,  $p = 0,01$  и  $r_s = -0,42$ ,  $p = 0,005$  соответственно, а в группе беспигментных меланом медиана содержания ядрышек в единице площади была выше, чем в группе пигмент-

ных опухолей (тест Манна-Уитни) (таблица 2). При этом следует отметить, что уровень значимости для показателя n/t при корреляционном анализе выше, чем для показателя n/t<sub>p</sub>, а при сравнении двух групп его уровень для показателя n/t теряет статистическую значимость, хотя и остается равным 0,05. Это указывает на то, что в данном случае стромальный компонент в анализе играет «балластную» роль, прямо не участвуя в найденных взаимосвязях.

Таблица 2 — Результаты сравнения содержания ядрышек в единице площади опухоли в группах пигментных и беспигментных меланом

Показатели опухоли	Me(LQ;HQ)		U	P
	беспигментные	пигментные		
n/t	0,53(0,36;0,75)	0,32(0,19;0,59)	145	0,05
n/t <sub>p</sub>	0,64(0,39;0,78)	0,34(0,19;0,62)	132,5	0,02

С размерами опухоли показатели n/t и n/t<sub>p</sub> не были связаны (тест Спирмена, во всех случаях  $p > 0,05$ ).

При оценке взаимосвязи исследуемых ядрышковых показателей с такими гистологическими параметрами опухоли, как толщина по-

Breslow и стадия инвазивного роста по Кларку и выраженность ПТИ выявлено, что показатели содержания ядрышек в единице площади опухоли в отличие от показателя  $n/N$  имели умеренную прямую корреляцию с толщиной опухоли по Breslow, ранжированной по стадиям pT ( $r_s = 0,33$ ,  $p = 0,02$  для  $n/t$  и  $r_s = 0,32$ ,  $p = 0,03$  для  $n/t_p$ ). При этом ни один из этих показателей, равно как и показатель  $n/N$ , не был связан со стадией инвазивного роста по Кларку и выраженностью ПТИ (во всех случаях  $p > 0,05$ ). Различия между меланомами различных гистологических типов по значениям ядрышковых показателей отсутствовали (тест Краскела-Уоллиса и медианный тест,  $p > 0,05$  во всех случаях), аналогичные результаты получены при сравнении меланом с наличием вторичных изменений и без них (тест Манна-Уитни, во всех случаях  $p > 0,05$ ).

Пролиферативная активность меланомы, оцененная по экспрессии KI67 (MIB-1), не обнаружила взаимосвязи с содержанием ядрышек в опухоли (корреляционный тест Спирмена, для всех ядрышковых показателей  $p > 0,05$ ). Данный факт может свидетельствовать в поль-

зу того, что формирование ядрышек в опухолевых клетках не имеет прямой связи с клеточной пролиферацией.

Безрецидивная продолжительность жизни пациентов после установки диагноза обратно коррелировала с пролиферативной активностью клеток меланомы, оцененной по экспрессии KI67 (MIB-1), а также уровнем содержания ядрышек в ядрах опухолевых клеток — показателем  $n/N$  (тест Спирмена,  $r_s = -0,33$ ,  $p = 0,037$  и  $r_s = -0,38$ ,  $p = 0,01$  соответственно).

Также обнаружена связь экспрессии KI67 (MIB-1) и содержания ядрышек в ядрах опухолевых клеток у пациентов с 5-летней безрецидивной выживаемостью. В группе пациентов, имевших рецидивы либо умерших от меланомы в течение 5 лет после постановки диагноза, имелись статистически значимо более высокие уровни клеточной пролиферации, оцененной по маркеру KI67(MIB-1), и содержания ядрышек в клеточных ядрах опухоли (показатель  $n/N$ ), чем в группе пациентов, продемонстрировавших безрецидивную 5-летнюю выживаемость (тест Манна-Уитни) (таблица 3).

Таблица 3 — Результаты сравнения КПИ и содержания ядрышек в опухоли ( $n/N$ ) в группах пациентов

Показатели опухоли	Me(LQ;HQ)		U	p
	5-летняя безрецидивная выживаемость			
	0	1		
КПИ	13,2(7;31,8)	6,6(1,8;13,9)	113,5	0,02
$n/N$	128(105;147)	97(70;128)	141	0,03

Пролиферативная активность опухоли, измеренная по экспрессии маркера KI67 (MIB-1), в группе с высокой выживаемостью была ниже в 2 раза, а содержание ядрышек в этой группе — примерно в 1,3 раза ниже.

При использовании же в качестве группирующей переменной содержание ядрышек в ядрах опухолевых клеток (показатель  $n/N$ , группы ранжировались в соответствии с выбранным на основании гистограммы значением пороговой точки) установлено, что пациенты, входившие в группу с показателем содержания ядрышек в ядрах клеток меланомы  $n/N$  меньшим 110, демонстрируют почти в 4 раза более высокую безрецидивную выживаемость (84 (38; 97) месяца), чем пациенты, показатель  $n/N$  которых более 110 (26 (15; 90) месяцев) (тест Манна-Уитни,  $U = 136,5$ ,  $p = 0,045$ ).

Идентичные результаты были получены при оценке безрецидивной выживаемости в аналогичных группах пациентов с использованием теста сравнения выживаемости в двух группах Гехана-Уилкоксона: имелось статистически значимое различие по срокам выживаемости пациентов в послеоперационном пе-

риоде в группах с показателем содержания ядрышек  $n/N$  меньше 110 и больше 110. В первой группе выживаемость была статистически значимо выше ( $p = 0,027$ ).

Здесь же следует отметить, что никаких взаимосвязей между показателями, характеризующими содержание ядрышек в единице площади опухоли, и выживаемостью пациентов не было выявлено (все использованные статистические тесты, во всех случаях  $p > 0,05$ ).

### Выводы

1. Безрецидивная выживаемость пациентов в послеоперационном периоде обратно коррелировала с уровнем содержания ядрышек в ядрах опухолевых клеток (показателем  $n/N$ ), а также пролиферативной активностью клеток меланомы, оцененной по экспрессии KI67 (MIB-1). При этом содержание ядрышек в меланоме не обнаружило взаимосвязи с пролиферативной активностью опухоли, что позволяет отнести его к самостоятельным прогностическим показателям.

2. Пациенты, отнесенные к группе с содержанием ядрышек в ядрах клеток меланомы ( $n/N$ ) меньшим 110, имели более высокую безрецидивную выживаемость (медиана продол-

жительности жизни 84 (38; 97) месяца), чем пациенты, показатель n/N которых более 110 (медиана продолжительности жизни 26 (15; 90) месяцев).

3. Показатели содержания ядрышек в единице площади меланомы (n/t, n/t<sub>p</sub>) не зависят от размера опухоли, стадии инвазивного роста по Кларку, наличия вторичных изменений и выраженности перитуморозной лимфогистиоцитарной инфильтрации опухоли. Беспигментные меланомы характеризуются почти двукратным повышением содержания ядрышек в единице площади опухолевой паренхимы, в то время как показатель n/N не продемонстрировал связей с размерами и степенью пигментации опухоли.

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Classification of Tumours. Pathology and Genetics Skin Tumours [Electronic resource] / WHO; eds.: P. E. LeBoit [et al.]. — Lyon: IARC press, 2006. — P. 64–66. — Mode of access: <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/pat-gen/bb6/>. — Date of access: 25.01.2016.
2. Alterations in nucleolar structure and gene expression programs in prostatic neoplasia are driven by the MYC oncogene / C. M. Koh [et al.]. // *Am. J. Pathol.* — 2011. — Vol. 178, № 4. — P. 34–1824.
3. Hanemann, J. A. Histologic grading and nucleolar organizer regions in oral squamous cell carcinomas / J. A. Hanemann, M. Miyazawa, M. S. Souza // *J. Appl. Oral. Sci.* — 2011. — Vol. 19, № 3 — P. 5–280.
4. Winzer, K. J. Diagnostic Pathology: Long-term analysis to objectify the tumour grading by means of automated microscopic image analysis of the nucleolar organizer regions (AgNORs) in the case of breast carcinoma [Electronic resource] / K. J. Winzer, J. Bellach, P. Hufnagel. — 2013. — Mode of access: <http://www.diagnostic-pathology.org/content/8/1/56>. — Date of access: 25.01.2016.
5. Argrophilic nucleolar organizer region in MIB-1 positive cells in non-small cell lung cancer: clinicopathological significance and survival / D. S. Kobyakov [et al.] // *Cancer Biol. Med.* — 2014. — Vol. 11, № 4. — P. 9–264.
6. Definitions of TNM // *AJCC. Cancer staging : Handbook / Am. Joint Comm. Cancer ; eds.: S. B. Edge [et al.].* — 7-th ed. — New York: Springer, 2010. — Part 6 (31): Skin. Melanoma of the Skin. — P. 407.
7. Гуревич, Л. Е. Использование в иммуногистохимических исследованиях метода восстановления антигенной специфичности, воздействием на ткани, фиксированные формалином / Л. Е. Гуревич, В. А. Исаков // *Архив патологии.* — 1999. — № 2. — С. 48–50.
8. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica / О. Ю. Реброва. — М.: МедиаСфера, 2002. — 312 с.

Поступила 28.01.2016

## ОБЩЕСТВЕННОЕ ЗДОРОВЬЕ И ЗДРАВООХРАНЕНИЕ, ГИГИЕНА

УДК 613.221+616-053.3

### ВСКАРМЛИВАНИЕ ДЕТЕЙ ПЕРВОГО ГОДА ЖИЗНИ: ПРОБЛЕМЫ И ПУТИ ИХ РЕШЕНИЯ

*А. А. Козловский, Д. А. Козловский, И. А. Козловская*

Гомельский государственный медицинский университет

Статья посвящена проблеме организации питания детей первого года жизни. Рассмотрены преимущества естественного вскармливания детей. Указаны различия материнского и коровьего молока, из которого производится большинство молочных смесей. По результатам медико-социологического анкетирования выявлены существенные нарушения сроков введения прикормов и их последовательности, что в последующем может привести к росту заболеваний пищеварительной, эндокринной, сердечно-сосудистой и других систем. Показана необходимость проведения комплекса мероприятий, способствующих повышению грамотности медицинского персонала и родителей по вопросам рационального вскармливания детей первого года жизни.

**Ключевые слова:** анкетирование, материнское молоко, естественное вскармливание, искусственное вскармливание, адаптированные молочные смеси, прикормы.

### FEEDING OF INFANTS DURING THEIR FIRST YEAR OF LIFE: PROBLEMS AND WAYS OF THEIR SOLUTION

*A. A. Kozlovsky, D. A. Kozlovsky, I. A. Kozlovskaya*

Gomel State Medical University

The article deals with the problem of the organization of nutrition of one-year-old infants. It considers the advantages of breastfeeding of infants and enumerates the differences between breast milk and cow's milk, which is used for production of most of milk formulae. The results of medical and social questionnaire surveys have revealed considerable violations of terms of introduction of supplemental feeding and its succession, which can increase the incidence of illnesses of digestive, endocrine, cardiovascular and other systems. A complex of measures promoting the competence of medical personnel and parents in questions of rational feeding of infants during their first year of life is needed.

**Key words:** questionnaire survey, breast milk, breastfeeding, artificial feeding, adapted milk formulae, supplemental feeding.