

Калантарли С.¹, Кудайбергенова А. Г.²

Возможности цифровой микроскопии для объективизации гистологического исследования. Количественный морфометрический анализ при исследовании рака молочной железы

1 - Департамент патологии госпиталя таможенного комитета Азербайджана, Баку; 2 - Патологоанатомическая лаборатория высоких технологических методов морфологического исследования, РНЦРХТ. г. Санкт Петербург

Kalantarly S., Kudaibergenova, A.G.

The possibilities of digital microscopy for objectifying histological studies. Quantitative morphometric analysis in the study of breast cancer

Резюме

С помощью автоматизированного анализа изображений была оценена площадь ядер опухолевых клеток и эпителия неопухолевых протоков в 46 карциномах молочной железы. Нами получены количественные морфометрические показатели площади ядер опухолевых клеток для различения степени полиморфизма ядер первой и второй градации, а также доказательства того, что обозначенные выше группы достоверно различаются по площади ядер. Выделение и определение морфометрических параметров (в частности площади ядер опухолевых клеток) для градаций 1 и 2 соответственно $33,72 \pm 1,03$ мкм² и $44,9 \pm 1,16$ мкм² является одним из опорных критериев при установлении степени полиморфизма ядер при определении злокачественности инвазивного протокового рака молочной железы.

Ключевые слова: рак молочной железы, морфометрический анализ, цифровая микроскопия

Summary

We performed image analysis of nuclear area on tumor cells in invasive ductal breast carcinoma and normal ductal epithelium to establish morphometric characters of cells nuclear on histological slide according grade of nuclear polymorphism. Morphometric analysis was performed using the Panoramic Viewer software (3DHistec, Budapest) on the hematoxilin and eosin stained breast cancer tissue specimens from Baku Oncology Hospital during the 2001-2005. The study included 46 patients diagnosed with breast carcinoma and 14 cases with normal ductal epithelium behind carcinoma. For each case, we have analyzed nuclear area and nuclear perimeter this parameters were assessed by use of Statistica 6.0. Morphometric analysis yielded statistically significant differences among tumor cells and normal epithelium. Normal ductal epithelial cell has nuclear area $41,93 \pm 2,39$ mkm². Average tumor cell nuclear area had two peaks of distribution $33,72 \pm 1,03$ mkm² and $44,9 \pm 1,16$ mkm². By quantitative morphometric analysis of breast cancer, was established a main nuclear characteristic paving the way for automatic computerized image recognition for invasive ductal carcinoma.

Key words: breast cancer, morphometric analysis, digital microscopy

Введение

Первые попытки определить характеристики, которые с большой вероятностью могли бы разделить опухоли, требующие агрессивного лечения от тех, которые не требуют такой терапии были предприняты еще в начале XX в, когда клиницисты обратили внимание на то, что не все карциномы молочной железы протекают одинаково и требуют одного типа лечения.

В 1904 году немецкий клиницист Steintal предложил разделить РМЖ на три прогностические группы: 1 стадия – маленькая опухоль, которая локализована в мо-

лочной железе, 2 стадия – крупная опухоль, которая вовлекает подмышечные лимфоузлы, 3 стадия – опухоль, которая поражает окружающие ткани [16]. Позднее, в 1925 году Greenough усовершенствовал эту простую систему, предложив классификацию, основанную на микроскопическом изучении первичной опухоли молочной железы [15]. Он использовал семь микроскопических признаков для классификации карцином молочной железы на три группы по степени злокачественности. В 1928 году Patey и Scarff [29] выбрали такие гистологические признаки как образование трубочек, вариабельность (по-

Таблица 1. Показатели воспроизводимости при определении степени злокачественности рака молочной железы (общая градация и по параметрам)

Автор	Год	Число исследователей	Количество наблюдений	Каппа или другие статистические обработки			
				Образование трубочек	Полиморфизм ядер	Митозы	Grade
Delides	1982	6	158	0,45	0,19	0,42	0,30
Stenkvist	1982	2	169	0,31			
Harvey	1992	2	76	0,65	0,46	0,64	0,60
Dalton	1994	25	10	195/52/3	193/55/2	213/33/4	0,70
Frierson	1995	6	75	0,64	0,40	0,52	0,55
Robbins	1995	5	50	0,67	0,64	0,70	0,70
Raabe	1997	2	167				0,51
Lakhani	1998	7	702	0,51	0,23	0,39	
Sikka	1999	3	40	0,54	0,34	0,36	0,68
Boiesen	2000	7	93	0,61	0,44	0,46	0,54
J.S. Meyer	2005	6	631				

лиморфизм) размеров ядер и гиперхроматоз ядер в качестве принципиальных параметров, которые определяли опухоль с хорошим прогнозом или, при наличии митозов, опухоль с плохим прогнозом. В 1958 году Bloom и Richardson [1] предложили упрощенную систему, в которой использовались только три признака из классификации Greenough: образование желез (трубочек); степень изменения размеров и формы ядер (полиморфизм) и гиперхроматоз ядер как признак пролиферации. Несмотря на отсутствие специфических критериев для количественного измерения этих параметров, данная система градации была в течение многих лет эффективна для определения прогноза. В 1991 г. в эту систему в Elston & Ellis [10] были внесены небольшие изменения для увеличения воспроизводимости оценки степени злокачественности. Данные изменения были одобрены Колледжем Американских патологов [11], Всемирной Организацией Здравоохранения [34] и внесены в рекомендации для лечения на международном форуме экспертов в St. Gallen [14].

В настоящее время в основе градации гистологической степени злокачественности инвазивных карцином молочной железы положены принципы описательного и полуколичественного определения гистологического типа роста опухоли и цитологических признаков атипии. Такими параметрами являются: 1) образование железистых структур, 2) степень полиморфизма ядер и 3) количество митозов. Каждый параметр оценивается в баллах от 1 до 3, затем суммарное количество баллов определяет степени злокачественности опухоли как низкую (3-5 баллов), умеренную (6-7 баллов) и высокую (8-9). В этой системе, которая была одобрена ВОЗ и широко применяется для определения прогноза заболевания, значимость каждого признака неравноценна, а воспроизводимость градации – вопрос, требующий дальнейшего обсуждения.

Так, J.S. Meyer, 2005г. [28] приводит следующие собственные данные о показателях воспроизводимости

при градации инвазивных протоковых карцином: наиболее воспроизводимым оказался признак образования железистых структур ($\kappa=0,57-0,83$), умеренной степени воспроизводимости обладали митозы ($\kappa=0,45-0,64$) и наименьшей воспроизводимостью ядерный полиморфизм – ($\kappa=0,37-0,50$), суммарная степень злокачественности имела умеренные показатели воспроизводимости $\kappa=0,50-0,59$. В этом исследовании была пересмотрена 631 опухоль молочной железы семью патологоанатомами. Автор отдельно остановился на возрасте и опыте участников данного пересмотра: средний возраст составил 58,6 лет (разброс от 47 до 74 лет) и опыт работы по специальности в среднем составил 25,7 лет (разброс 13-44 года). Таким образом, речь идет об опытных врачах, определение степени злокачественности рака молочной железы для которых является рутинной, ежедневной практикой.

Как видно из представленной таблицы, наблюдения, описанные J.S. Meyer не являются эксклюзивными, а имеют универсальный характер. Наиболее высокие параметры воспроизводимости исследователи отмечают для признака «образование железистых структур» и наиболее низкие – для признака «полиморфизм ядер». Между тем, это один из самых популярных критериев для оценки не только степени злокачественности карциномы молочной железы, он также является гистологическим признаком злокачественной трансформации клеток и до настоящего времени остается самым субъективным критерием, определение градации которого целиком зависит от опыта и субъективного мнения исследователя. На уровне экспертов процент совпадений $\kappa=0,64$, а на уровне исследователей составляет 0,4-0,19, что только подтверждает необходимость поиска более точного, чем просто визуальная сравнительная оценка размеров и формы способа изучения полиморфизма ядер. Диагностическая ценность этого признака невелика, признак практически отсутствует в опухолях низкой степени злокачественности, имеет большой разброс в опухолях умеренной и вы-

сокой степени злокачественности, кроме того, в высокой степени зависит от проводимого перед гистологическим исследованием лучевого или химиотерапевтического лечения и погрешностей при гистологической обработке материала (отсроченная фиксация, техника гистологической проводки) [28].

Материалы и методы

В процессе работы было исследовано 46 залитых в парафин и фиксированных в формалине образца рака молочной железы, проходивших операционное лечение с последующей химиотерапией в Республиканском Онкологическом Центре г. Баку в 1997-2005 г.г. Возраст пациенток варьировал от 36 до 77 лет, средний возраст составил $53,67 \pm 1,71$ года. Наиболее часто встречались большие стадии T2N1M0 – 14 пациенток, T2N0M0 – 8 пациенток, T1N0M0 – 4 пациентки, T2N2M0 – 4 пациентки, по одному наблюдению в группах T1N1M0, T3N1M0, T3N3M0, T2N3M0. Как видно из приведенных данных, стадия T2 встречалась чаще всего и составила 27 наблюдений, T1 – 5 наблюдений, T3 – 3 наблюдения.

Готовые полностью гистологические препараты сканировались при помощи MIRAX MIDI (Zeiss) с целью получения цифровых изображений данных препаратов. После, с помощью программы просмотра изображений Pannogamic Viewer (3DHitech),

было исследовано не менее 1 мм² площади гистологического препарата, в каждом препарате исследовали такие параметры как площадь и периметр ядер. Статистическая обработка всех данных проводилась с помощью методов описательной, а также параметрической (t-критерий Стьюдента) статистики с применением программы Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

Поскольку одним из основных критериев оценки полиморфизма ядер в опухоли является сравнение опухолевых клеток с прилежащими нормальными структурами, характеризуя морфометрические показатели в опу-

холевых клетках, провели анализ нормальных структур молочной железы, прилежащих к опухоли и опухолевых клеток. Клетки неопухового эпителия протоков и долек в среднем имели площадь ядер $41,93 \pm 2,39$ мкм², периметр ядер составил $28,8 \pm 1,55$ мкм, показатель округлости ядер $0,65 \pm 0,04$. Всего нами было исследовано 1687 клеток.

На данных графиках (рис.1,2) мы наблюдаем примеры нормального распределения исследуемых величин. Средняя арифметическая и доверительный интервал указывают на то, что 95% исследуемых величин находятся непосредственно в диапазоне средней величины. Это позволяет проводить нам дальнейшие исследования данного признака с уверенностью, что мы характеризуем его с вероятностью 95%, т.е. все неопуховые клетки эпителия протоков.

При вычислении средней арифметической величины средняя площадь ядер опухолевых клеток составила $39,11 \pm 1,09$ мкм², периметр $23,27 \pm 0,6$ мкм и округлость ядер $0,8 \pm 0,01$.

Всего нами было исследовано 22981 опухолевых клеток.

определяется бимодальное распределение линейных размеров ядер опухолевых клеток. Причем наблюдается разделение площадей по медиане (рис. 3). Распределения площади, периметра и округлости ядер опухолевых клеток не соответствует нормальному закону, поэтому сравнительная характеристика данных параметров не может быть исследована для всей группы в целом. В целях получения достоверных данных необходимо разделить исследуемые объекты на две подгруппы, для которых средняя арифметическая будет характеризовать большую часть объектов. В нашем случае – первую и вторую подгруппы опухолевых клеток, разделенных по медиане, которая равна $40,17$ мкм².

Показатели площади ядер опухолевых клеток в первой подгруппе: средняя площадь ядер опухолевых клеток составила $33,72 \pm 1,03$ мкм², во второй подгруппе $44,9 \pm 1,16$ мкм². При сравнении двух подгрупп нами

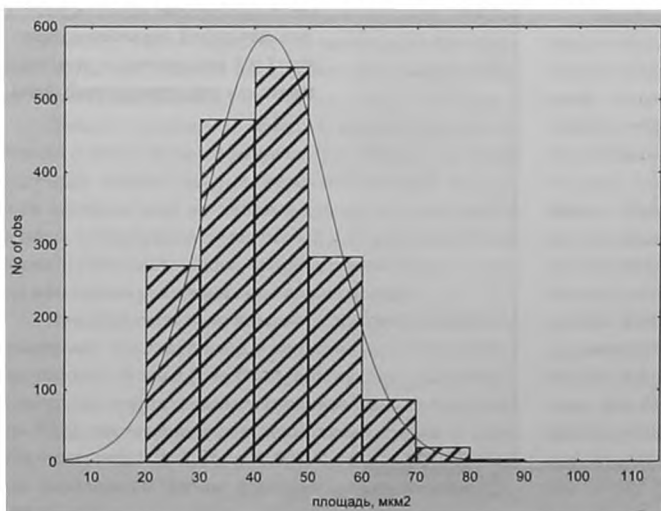


Рис.1 График нормального (гауссовского) распределения площади ядер в эпителии протоков

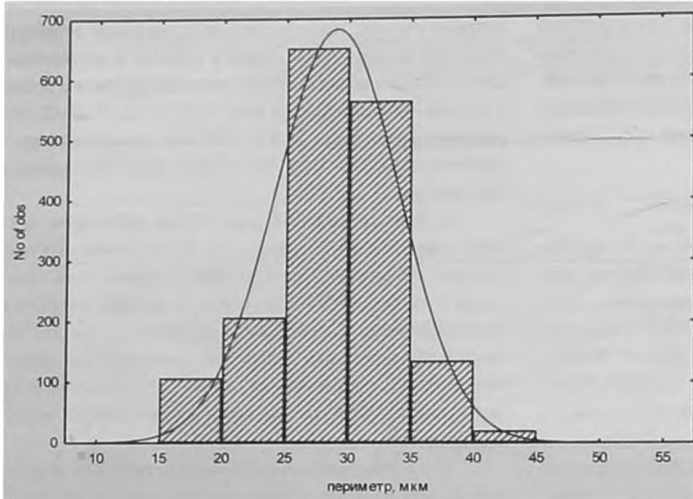


Рис.2 График нормального (гаусовского) распределения периметров ядер в эпителии протоков

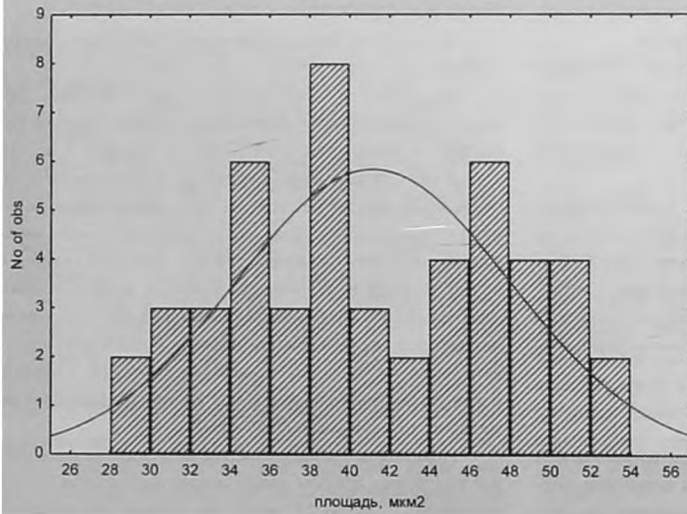


Рис.3 График распределения средних площадей ядер опухолевых клеток

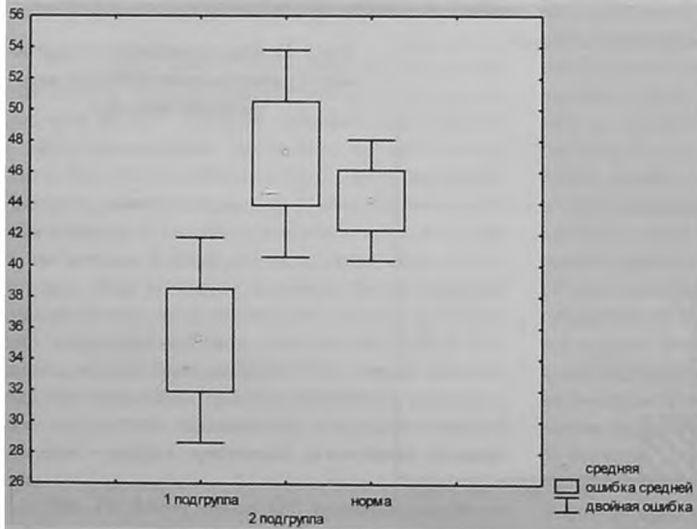


Рис.4 Сравнение средних размеров площадей опухолевых клеток (1 и 2 подгруппы) и эпителия протоков перитуморозной зоны

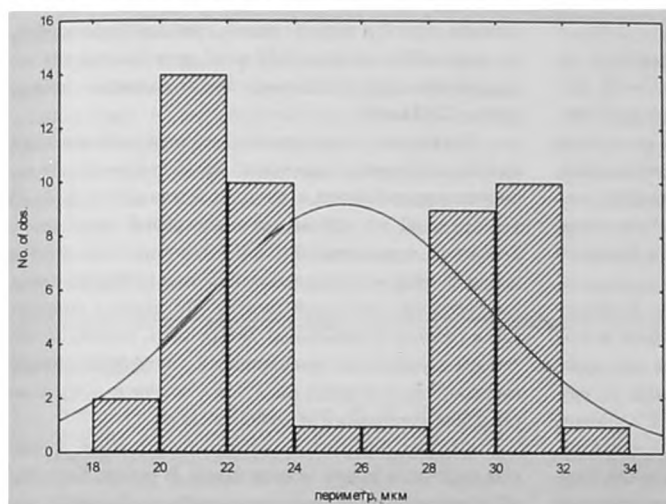


Рис.5. График распределения средних периметров ядер опухолевых клеток.

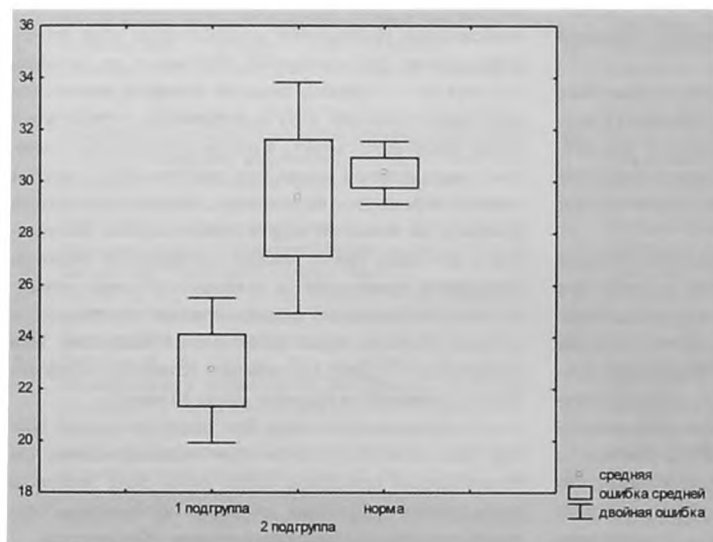


Рис.6. Сравнение средних периметров опухолевых клеток (1 и 2 подгруппы) и эпителия протоков перитуморозной зоны

получена статистически достоверная разница: $t=8,02$, $p=0,0000001$. Таким образом, по показателю площади ядер опухолевых клеток инвазивный протоковый РМЖ не является однородным.

Данные наблюдения лежат в основе визуальной оценки степени полиморфизма по трем градациям. Нами получены количественные морфометрические показатели площади ядер опухолевых клеток для различения степени полиморфизма ядер первой и второй градации, а также доказательства того, что обозначенные выше группы достоверно различаются по площади ядер.

При сравнительном анализе полученных данных с размерами площадей ядер в нормальном эпителии перитуморозной зоны (рис.4) нами получены следующие показатели: разница между сравниваемыми величинами была достоверной для показателей нормы и первой подгруппы ($t=5,74$, $p=0,00004$) и недостоверным для показателей нормы и второй подгруппы ($t=1,89$, $p=0,07$).

Периметр ядер опухолевых клеток в первой подгруппе составил $22,36 \pm 0,75$ мкм, во второй подгруппе $28,85 \pm 0,086$ мкм. (рис.5) При сравнении двух подгрупп нами получена статистически достоверная разница: $t=8,64$, $p=0,0000001$. Таким образом, по периметру ядер опухолевых клеток, также как и по площади ядер опухолевых клеток инвазивный протоковый РМЖ гетерогенен. Нами получены количественные морфометрические показатели периметра ядер опухолевых клеток для различения степени полиморфизма ядер первой и второй градации, а также доказательства того, что эти группы достоверно различаются по периметру ядер. При сравнительном анализе этих данных с размерами периметров ядер в нормальном эпителии перитуморозной зоны (рис.6) нами получены следующие данные: разница между сравниваемыми величинами была достоверной для показателей нормы и первой подгруппы ($t=11,64$, $p=0,00001$) и недостоверным для показателей нормы и второй подгруппы ($t=0,93$, $p=0,36$).

Определение размеров ядер опухолевых клеток с помощью морфометрического анализа всегда было непростой, но крайне затратной по времени работой. Различные протоколы, которыми пользуются и пользовались исследователи, основаны на принципе разделения цветовых каналов по RGB (red/green/blue) и определении границ ядер, окрашенных синим (гемаоксилином), что требует определенного навыка и времени работы оператора при подборе полей зрения и захвате изображений для анализа [4, 5, 22, 30, 32]

Поэтому для упрощения задачи оценки полиморфизма ядер во многих руководствах по молочной железе (P.Rosen, 2009 [31]) используют следующие критерии: первая градация – мелкие ядра, сопоставимые по размерам с ядрами близлежащих неопухолевых протоков, вторая градация – умеренное нарастание размеров ядер, третья градация – выраженное увеличение ядер опухолевых клеток. Как видим, из самого определения пороговые или предельные значения крайне расплывчаты, а критерии, которые используются для определения градаций полиморфизма ядер – необъективны.

В настоящее время в связи с широким развитием компьютерных технологий, в том числе связанных с анализом изображений, появляются возможности для точного и достаточно быстрого морфометрического анализа большого объема информации, который получается при фотографировании микрообъектов.

Площадь ядра является одним из факторов, который используют автоматизированные системы подсчета при анализе формы ядер. Определение площади ядер с помощью морфометрического анализа имеет прогностическое значение при раке молочной железы [5, 13.], колоректальном раке [19], почечно-клеточном раке [3], плоскоклеточном раке гортани [9], при меланоме [20] и рабдомиосаркоме [21]. Кроме того, Chiusa L, (2000) [5], Giardina C, (1996) [13], Umbricht C, (1989) [35] свидетельствуют, что показатель площади ядер опухолевых клеток при раке молочной железы, близко коррелирует с показателями полиморфизма ядер.

В процессе исследования мы пришли к следующему: площадь ядер опухолевых клеток имела бимодальное распределение, что закономерно, поскольку в исследовании брались случаи первой и второй градации по степени полиморфизма ядер. В первой группе клеток площадь ядер составила $33,72 \pm 1,03 \text{ мкм}^2$, во второй группе – $44,9 \pm 1,16 \text{ мкм}^2$.

Наши данные почти полностью совпадают с данными, опубликованными Kronqvist [23] с коллегами в 1998, которые на материале 170 случаев инвазивного протокового рака показали, что существует два пороговых значения при исследовании площади (32 мкм^2 и 47 мкм^2), и так называемого короткого диаметра ядра клетки ($4,8 \text{ мкм}$ и $6,4 \text{ мкм}$). Также эти данные не противоречат и другому исследованию, проведенному Р.Н. Тап, 2001 г. [33], который на материале 64 случаев протоковой карциномы *in situ* показал, что медиана площади опухолевых ядер составила $49,8 \text{ мкм}^2$, (средняя – $54,29 \pm 2,23 \text{ мкм}^2$), при разделении на градации у авторов фактически произошло

слияние первой и второй степени градации полиморфизма ядер – $44,14 \text{ мкм}^2$ и $47,77 \text{ мкм}^2$, а третья степень полиморфизма ядер имела наибольшие размеры площади ядер – $72,05 \text{ мкм}^2$.

Также нами было показано, что ядра эпителиальных клеток неопухолевых протоков, которые находятся в непосредственной близости к опухоли имели площадь $41,93 \pm 2,39 \text{ мкм}^2$, что превышает аналогичный показатель – $26,8 \text{ мкм}^2$, приведенный Cui Y [6], который исследовал площадь ядер эпителиальных клеток в доброкачественных опухолях молочной железы. По нашему мнению, такая разница в показаниях может быть связана с тем, что мы исследовали прилежащие к опухоли неопухолевые протоки, в то время как Y. Cui – обычные доброкачественные изменения в молочной железе.

Следует отметить методические различия, в данных работах и нашем исследовании. В работе Kronqvist и Тап использовались системы ручного захвата и анализа изображений, когда вначале исследователем выбирается относительно равномерное распределение ядер опухолевых клеток (без наслоений, обрывов и пр. артефактов резки и окраски), затем на большом увеличении микроскопа ($\times 40$ или $\times 63$) исследователь осуществляет захват (микрофото съемку), а потом, вручную (!), с помощью компьютерной мыши или графического планшета обводит ядра клеток на мониторе. Всего исследователи обводили не менее 50 ядер с одного случая. Полученные с помощью такого анализа изображений сведения, безусловно, претендуют на эталонные. Однако остаются вопросы, связанные с исключительно произвольным отбором объектов, полей зрения для исследования. При определенном опыте, как отмечает Kronqvist, обработка одного изображения занимает около 30 минут.

В нашем исследовании был применен другой подход. Мы исследовали полностью отсканированные гистологические препараты, когда отбор поля зрения, и последующая обработка цифровых изображений осуществляются с помощью программного обеспечения.

Таким образом, показатели площади и периметра ядер, измеренные автоматически с помощью программного обеспечения могут быть применены в обычной практике, а при определении размеров ядер опухолевых клеток необходимо помнить, что ядра прилежащих к опухоли неопухолевых протоков имеют достоверно большие линейные размеры, чем ядра обычных эпителиальных клеток, выстилающих протоки.

Заключение

Подводя итоги, можно заключить, что цифровая обработка гистологического материала, основанная на полном сканировании гистологического препарата, является воспроизводимым и высокопроизводительным методом исследования. По нашему мнению, в связи с развитием технологии хранения и обработки цифровых данных совсем скоро оцифрованные препараты создадут возможность для объективного и транспарентного анализа морфологических данных и будут лежать в основе любого клинического заключения, при котором используются

данные морфологического анализа.

Одним из важных результатов нашей работы является объективизация морфологических критериев, используемых в повседневной патологоанатомической практике. В первую очередь это касается такого признака как полиморфизм ядер. Выделение и определение морфометрических параметров (в частности площади ядер опухолевых клеток) для градаций 1 и 2 соответственно $33,72 \pm 1,03$ мкм² и $44,9 \pm 1,16$ мкм² является одним из опорных критериев при установлении степени полимор-

физма ядер при определении злокачественности инвазивного протокового рака молочной железы. ■

Калантарли С, Департамент патологии госпиталя таможенного комитета Азербайджана, Баку, Азербайджан; Кудайбергенова Асель Галимовна – к.м.н., врач-патологоанатом лаборатории высоких технологических методов морфологического исследования, РНЦРХТ, г. Санкт Петербург; Автор, ответственный за переписку - Асель Галимовна asel1972@mail.ru

Литература:

- Bloom H. J. G., Richardson W. W. Histological grading and prognosis in breast cancer// Br J Cancer.-1957.-11.-359-377.
- Boiesen P., Bendahl P. O., Anagnostaki L., et al. Histologic grading in breast cancer - reproducibility between seven pathologic departments. South Sweden breast cancer group// Acta Oncol.-2000.-39.-41-5.
- Carducci MA, //Urology - 1999 - 53-44-49
- Carriaga M. T., Henson D. E. The histologic grading of cancer// Cancer.-1995.-75.-406-421.
- Chiusa L., Margaria E., Pich A. Nuclear morphometry in male breast carcinoma: association with cell proliferative activity, oncogene expression, DNA content and prognosis// Int J Cancer.-2000.-89(6).-494-499.
- Cui Y., Koop E.A., van Diest P.J., Kandel R.A., Rohan T.E. Nuclear morphometric features in benign breast tissue and risk of subsequent breast cancer// Breast Cancer Res Treat.-2007.-104(1).-103-7.
- Dalton L. W., Page D. L., Dupont W. D. Histologic grading of breast carcinoma. A reproducibility study// Cancer.-1994.-73.-2765-70.
- Delides G. S., Garas G., Georgouli G., et al. Intralaboratory variations in the grading of breast carcinoma// Arch Pathol Lab Med.-1982.-106.-126-8.
- Dobros W., Gil K., Chlap Z., Olszewski E. The use of nuclear morphometry for the prediction of survival in patients with advanced cancer of the larynx// Eur Arch Otorhinolaryngol.-1999.-256(5).-257-261.
- Elston C. W., Ellis I. O. The Breast// Churchill-Livingstone: Edinburgh.-1998.-P. 367-378.
- Elston C. W., Ellis I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up// Histopathology.-1991.-19.-403-410
- Frierson H. F. Jr., Wolber R. A., Berean K. W., et al. Interobserver reproducibility of the Nottingham modification of the Bloom and Richardson histologic grading scheme for infiltrating ductal carcinoma// Am J Clin Pathol 1995.-103.-195-8.
- Giardina C., Renzulli G., Serio G., Caniglia D.M., Lettini T., Ferri C., D'Eredita G., Ricco R., Delfino V.P. Nuclear morphometry in node-negative breast carcinoma// Anal Quant Cytol Histol.-1996.-18(5).-374-382.
- Goldhirsch A., Ingle J. N., Gelber R. D., Coates A. S., Thurlimann B., Senn H.-J., and Panel members Thresholds for therapies. highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer// Ann Oncol.-2009.-20(8).-1319-1329.
- Greenough R. B. Varying degrees of malignancy in cancer of the breast// J Cancer Res.-1925.-9.-452-463.
- Haagen N. Diseases of the Breast// Philadelphia.-1956.-P. 92.
- Harris G. C., Denley H. E., Pinder S. E., et al. Correlation of histologic prognostic factors in core biopsies and therapeutic excisions of invasive breast carcinoma// Am J Surg Pathol.-2003.-27.-11-15.
- Harvey J. M., de Klerk N. H., Sterrett G. F. Histologic grading in breast cancer: interobserver agreement, and relation to other prognostic factors including ploidy// Pathology.-1992.-24.-63-8.
- Fernandez-Lopez F., Paredes-Cotore JP, Cadarso-Suarez C, Forteza-Vila J (1999) Prognostic value of nuclear morphometry in colorectal cancer Dis/ colon rectum 42 (3) 386-392
- Karbowniczek M., Chosia M., Domagala W. Nuclear morphometry of MIB-1 positive and negative tumor cells in primary and metastatic malignant melanoma of the skin// Pol J Pathol.-1999.-50(4).-235-241.
- Kazanowska B., Jelen M., Reich A., Tarnawski W., Chybicka A. The role of nuclear morphometry in prediction of prognosis for rhabdomyosarcoma in children// Histopathology.-2004.-45(4).-352-359.
- Keshgegian A. A., Cnaan A. Proliferation markers in breast carcinoma. Mitotic figure count, S-phase fraction, proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and MIB-1// Am J Clin Pathol.-1995.-104.-42-9.
- Kronqvist P., Kuopio T., Collan Y. Morphometric grading in breast cancer: thresholds for mitotic counts// Hum Pathol.-1998.-29.-1462-8.
- Kronqvist P., Kuopio T., Collan Y. Quantitative thresholds for mitotic counts in histologic grading: confirmation in nonfrozen samples of invasive ductal breast cancer// Ann Diagn Pathol.-2000.-4.-65-70.
- Kronqvist P., Kuopio T., Jalava P., et al. Morphometrical malignancy grading is a valuable prognostic factor in invasive ductal breast cancer// Br J Cancer.-2002.-87.-1275-80.
- Le Doussal V., Tubiana-Hulin M., Friedman S., et al. Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff-Bloom-Richardson (SBR). An improved score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas// Cancer.-1989.-64.-1914-21.
- Linden J. C. van der, Baak J. P. A., Lindeman J., et al. Prospective evaluation of the prognostic value of morphometry in primary breast cancer patients// J Clin Pathol.-1987.-40.-302-6.
- Meyers J.S., Alvarez C., Milikowski C. et al Breast carcinoma malignancy grading by Bloom-Richardson system vs proliferation index: reproducibility of grade and advantages of proliferation index// Mod. Pathol.-2005, Aug.-18(8).-1067-78.
- Patey Scarf// Lancet.-1928.-1.-801-804.
- Querzoli P., Albonico G., Ferretti S., Rinaldi R., Magri E., Indelli M., Nenci I. MIB-1 proliferative activity in invasive breast cancer measured by image analysis// J Clin Pathol.-1996.-49.-926-930.

31. Rosen P, Rosen's breast Pathology, 3ed// Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.-2009.-1116.
32. Stromberg S., Bjorklund M.G., Asplund C., Skollermo A., Persson A., Wester K., Kampf C., Nilsson P., Andersson A.C., Uhlen M., et al. A high-throughput strategy for protein profiling in cell microarrays using automated image analysis// Proteomics.-2007.-7.-2142-2150.
33. Tan P.H., Goh B.B., Chiang G., Bay B.H. Correlation of Nuclear Morphometry with Pathologic Parameters in Ductal Carcinoma In Situ of the Breast // MODERN PATHOL -2001 - vol. 14, - pp. 937-941.
34. Tavassoli F. A., Devilee P. World Health Organization Classification of Tumours: Tumors of the Breast and Female Genital Organs// IARC Press, International Agency for Research on Cancer: Lyon.-2003.-P. 18-19.
35. Umbricht C., Oberholzer M., Gschwind R., Christen H., Torhorst J. Prognostic significance (relapse, non-relapse) of nuclear shape parameters in lymph node negative breast cancer// Anal. Cell Pathol.-1989.-1(1).-11-23.