

УДК: 616-091.0

В.А. Кушнарев¹, А.С. Артемьева¹, Д.А. Чуглова¹,
Г.Г. Прохоров¹, А.Н. Стуков¹, Д.Г. Прохоров²

ВОЗМОЖНОСТИ ЦИФРОВОГО АНАЛИЗА ИЗОБРАЖЕНИЙ В ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМБИНИРОВАННОЙ ЛОКАЛЬНОЙ КРИОХИМИОТЕРАПИИ HER2 ПОЗИТИВНЫХ КАРЦИНОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

¹НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация;

²Российский научный центр радиологии и хирургических технологий, г. Санкт-Петербург,
Российская Федерация

V.A. Kushnarev¹, A.S. Artemyeva¹, D.A. Chuglova¹,
G.G. Prokhorov¹, A.N. Stukov¹, D.G. Prokhorov²

CAPABILITIES OF DIGITAL IMAGE ANALYSIS IN THE EVALUATION OF COMBINED LOCAL CRYOCHEMOTHERAPY OF HER2 POSITIVE BREAST CARCINOMAS IN THE EXPERIMENT

¹N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, St. Petersburg, Russian Federation;

²Russian Scientific Center of Radiology and Surgical Technologies, St. Petersburg, Russian Federation

Резюме. Цифровой анализ изображений — перспективное направление для изучения патоморфологической оценки некроза и жизнеспособных опухолевых клеток на основе программных алгоритмов? и рассматривается как метод повышения воспроизводимости и стандартизации доклинических и клинических исследований. **Цель.** Изучить возможности алгоритмов цифрового метода анализа изображений в патоморфологической оценке зоны некроза и жизнеспособной опухоли в экспериментальном режиме криодеструкции на фоне введения цисплатина. **Материал и методы.** На 12 лабораторных мышах трансгенной линии FBV/ N, с трансплантированной внутримышечно HER2-положительной карциномой молочной железы в зоне опухоли выполнялась пункционная криодеструкция в одноцикловом режиме с последующим введением через двое суток в центр крионекроза цисплатина. Через два месяца опухоль подвергалась патоморфологическому исследованию с применением программного обеспечения HistoPattern Analysis (3DHitech) для цифрового количественного анализа, а также визуального метода анализа микропрепаратов по категориям зона некроза и зона жизнеспособной опухоли. Визуальная оценка выполнялась двумя независимыми исследователями-патоморфологами. **Результаты.** При количественной оценке материала доля жизнеспособной опухолевой ткани в срезе составила от 25,35 до 49,6%, доля некротизированной опухолевой ткани от 50,4 до 74,65% по данным цифрового анализа изображений. При анализе данных, полученных от исследователя 1 и исследователя 2, по данным световой микроскопии разброс количественной оценки ЖОК составил от 10 до 65%, а доля некротизированной ткани от 35 до 90%. Внутриклассовый коэффициент корр-

Abstract. Digital image analysis is a promising way for studying pathological response such as necrosis and viable tumor cells based on software algorithms and is considered as a method for increasing reproducibility and standardizing research. **Purpose.** The aim is considered the capabilities of the digital image analysis for the pathological quantification of the necrosis and viable tumor areas in experimental cryodestruction with cisplatin. **Material and methods.** Puncture cryodestruction was performed on 12 laboratory mice of the transgenic FBV / N line, transplanted with intramuscular HER2-positive breast carcinoma. Two months later, the tumor was subjected to pathological report using the HistoPattern Analysis software (3DHitech), as well as a visual method for evaluation of necrosis, the viable tumor cells by two researchers. **Results.** In the quantitative assessment of the material, the proportion of viable tumor tissue in the section was from 25.35 to 49.6%, the proportion of necrotic tumor tissue from 50.4 to 74.65% according to digital image analysis. The data obtained from the researcher 1 and the researcher 2 showed the proportion of viable tumor tissue ranged from 10 to 65%, and the proportion of necrotic tissue ranged from 35 to 90%. The intraclass correlation coefficient (ICC) between researchers is 0.59 CI (-1; 0.92) for necrosis, ICC 0.98 CI (0.41; 0.99) for viable tumor tissue. **Conclusion.** The obtained results indicate the possibility of quantitative analysis of H&E slides of the pathology response to therapy using software algorithms, which is important for low reproducible quantitative parameters. These algorithms can be used both to train researchers and to independent control the pathology response to therapy during research.

реляции (ICC) между исследователями равен 0,59 CI (-1;0,92) при изучении процента некроза, ICC 0,98 CI (0,41;0,99) при изучении результатов оценки ЖОК. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют о применимости алгоритма количественного анализа морфологических критериев ответа опухоли на терапию на гистологических препаратах с окраской гематоксилин-эозин. Это возможно с помощью сегментационного самообучаемого алгоритма программного обеспечения, что актуально для низковоспроизводимых количественных показателей. Данные алгоритмы можно использовать как для тренировки исследователей, так и для метода контроля ответа опухоли на терапию при проведении исследований.

Ключевые слова: рак молочной железы, экспериментальные опухоли, криохирургия, криоабляция, криотерапия, химиотерапия, комбинированная химиотерапия

Конфликт интересов отсутствует.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Кушнарев Владимир Андреевич
kushnarevvladimir1@gmail.com

Дата поступления 04.02.2019

Образец цитирования:

Кушнарев В.А., Артемьева А.С., Чуглова Д.А., Прохоров Г.Г., Стуков А.Н., Прохоров Д.Г. Возможности цифрового анализа изображений в патоморфологической оценке эффективности комбинированной локальной криохимиотерапии HER2 позитивных карцином молочной железы в эксперименте. Вестник уральской медицинской академической науки. 2019, Том 16, № 1, с. 34–40, DOI: 10.22138/2500-0918-2019-16-1-34-40

Keywords: breast cancer, experimental tumors, cryosurgery, cryoablation, cryotherapy, chemotherapy, combined chemotherapy

There is no conflict of interest.

Contact details of the corresponding author:

Vladimir A. Kushnarev
kushnarevvladimir1@gmail.com

Received 04.02.2019

For citation:

Kushnarev V.A., Artemyeva A.S., Chuglova D.A., Prokhorov G.G., Stukov A.N., Prokhorov D.G. Capabilities of digital image analysis in the evaluation of combined local cryochemotherapy of HER2 positive breast carcinomas in the experiment. Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science. 2019, Vol. 16, no. 1, pp. 34–40. DOI: 10.22138/2500-0918-2019-16-1-34-40 (In Russ)

Актуальность

Воспроизводимость *in vivo* исследований на экспериментальных животных, в частности мышах как модельных организмах, зависит от многих факторов, включая экспериментальный дизайн, методы и анализ полученных данных. Макроскопическое и микроскопическое исследование органов и тканей часто являются конечными точками исследований.

Морфологический регресс опухоли на фоне лечения является критерием эффективности терапии [1]. Существующие схемы оценки ответа на терапию в солидных опухолях связаны с описательными характеристиками, такими как дистрофия, апоптоз, некроз, полиморфизм опухолевых клеток, митотическая активность, выраженность фиброза и гиалиноза в опухолевой ткани, а также иммунной инфильтрации опухоли [2]. Эти морфологические биомаркеры не имеют общепринятой количественной характеристики для солидных опухолей, выступая качественными или

полуколичественными критериями в ряде шкал морфологического регресса или просто описательно выносятся в микроскопическое заключение. Это затрудняет соответствие с конечными точками в исследовании, например, как общая выживаемость, выживаемость до прогрессирования [3].

Цифровой анализ изображений является методом автоматизации и стандартизации процесса оценки морфологических параметров [4]. Анализ цифровых копий гистологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, возможен с помощью небольшого числа коммерческих и свободно распространяемых программных продуктов. Рассматриваются возможности и подходы для использования алгоритмов сегментации изображения по определенным кластерам, например, как некроз или жизнеспособные опухолевые клетки [5].

Кроме того, для оценки степени морфологического ответа опухоли на терапию имеет значение и тип

воздействия на опухоль. Сочетание разных методов воздействия, включая лучевую, системную химиотерапию, иммунотерапию в комбинации с локальными методами воздействия индуцирует каскад изменений в опухолевых и нормальных клетках разных по кинетике морфологических проявлений [6]. На сегодняшний день отсутствуют стандартизированные подходы к оценке морфологического ответа опухоли на локальные воздействия, в частности криодеструкции с отсроченной инъекцией химиотерапевтического препарата.

Мы изучили алгоритмы использования цифрового метода анализа изображений для оценки количественных морфологических показателей жизнеспособных опухолевых клеток и некроза в зоне трансплантированной HER2 положительной опухоли молочной железы на фоне криодеструкции и локального введения цисплатина, используя методику одноциклового криодеструктивного воздействия.

Материал и методы исследования

Подготовка экспериментальной модели

Экспериментальная часть включала опыты на 12 мышах трансгенной линии FBV/N, несущих онкоген рецептора эпидермального фактора роста HER2. В течение эксперимента все животные находились в стандартных условиях, получали стандартный комбинированный корм и питьевую воду. Все экспериментальные исследования проводились в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей [7], под контролем этического комитета ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава РФ.

Почти у 100% самок мышей линии FBV/N развиваются спонтанные HER2-положительные опухоли молочных желез [8]. Для проведения эксперимента спонтанная HER2-положительная опухоль молочной железы, развившаяся у мыши-самки линии FBV/N, была трансплантирована самцам этой линии посредством внутримышечной инокуляции 20%-ной измельченной взвеси опухоли в изотоническом растворе натрия хлорида. Трансплантацию осуществляли в бедренную мышцу правой задней конечности, криовоздействие на опухоль производили на 30 день после ее трансплантации.

Методика криодеструкции и введения цисплатина

12 животным выполняли пункционную чрескожную криодеструкцию опухоли правой тазовой конечности с использованием криозондов диаметром 1,5 мм с охлаждением жидким азотом. В одноцикловом воздействии температура криозонда составляла 110-120°C на протяжении 3 минут. Отогрев происходил за счет пассивного согревания в течение 7-10 минут после прекращения охлаждения. Через двое суток в центр крионекроза правой лапки иглой 32G инъецировали от 1,5 до 1,8 мл 0,1% раствора цисплатина в зависимости от массы животного.

Методика патоморфологического исследования

Спустя 2 месяца мышей выводили из эксперимента, опухоли резецировали и помещали в 10% раствор нейтрального формалина на 24 часа, затем препарировали и материал маркировали. После предварительной препаровки с отделением кожи и кости, материал был проведен в процессоре Leica TP 1021, залит в парафиновые блоки, затем изготовлены стандартные тонкие срезы, которые окрашивались гематоксилином и эозином в гистостейнере Leica Autostainer XL. Далее гистологические препараты были отсканированы с помощью сканера гистологических препаратов Panogamic III (Венгрия, 3D Histech) и получены цифровые изображения. Полученные препараты были оценены двумя исследователями-онкопатоморфологами 1 и 2 независимо друг от друга, визуально с помощью светового микроскопа Olympus BX46.

Помимо рутинного исследования материала при помощи световой микроскопии, мы применили метод цифрового анализа изображений (Digital image analysis, DIA). Метод заключается в том, чтобы количественно оценить гистологические паттерны при помощи нейросетевого анализа, с выделением кластеров на цифровой копии гистологического препарата. Цифровой анализ изображений проведен с помощью программного обеспечения 3D Histech QuantCenter (Венгрия, 3D Histech), с использованием модуля HistoPattern Analysis. Мы обучили модуль, введя в обучение два кластера: некротизированной и жизнеспособной опухоли, а затем вычислили пропорциональные доли этих компонентов в целом срезе в процентном соотношении.

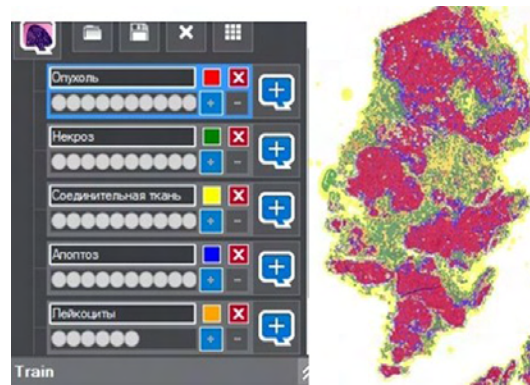


Рисунок 1. Пример алгоритма кластеризации для обучения и количественного анализа морфологических параметров: опухоль, некроз, соединительная ткань, лейкоциты оцифрованного гистологического микропрепарата карциномы молочной железы, окрашенного гематоксилином и эозином.

Figure 1. An example clustering algorithm for learning and quantitative analysis of morphological parameters: tumor, necrosis, connective tissue, leukocytes. Scan of histological slide of breast carcinoma stained with hematoxylin and eosin.

Этот сегментационный алгоритм представлен на рисунке 1, каждый кластер имеет возможность обучение до 10 паттернов на слайде. Независимый исследователь проводит обучение программы посредством выделения паттернов на препарате до 200-400 мкм². Участки нормальных тканей (мышцы, соединительная ткань, жировая ткань), лимфолейкоцитарная инфильтрация, попавшие в срез, не учитывались при расчете, но были введены в обучающий алгоритм.

Статистический анализ

Статистический анализ был выполнен с помощью программного обеспечения R studio, с применением внутрикласового коэффициента корреляции (Intraclass Correlation, ICC), который использовался для выявления связи между методами оценки, где коэффициент, стремящийся к 1, показывает высокую согласованность между исследователями [9].

Результаты исследования

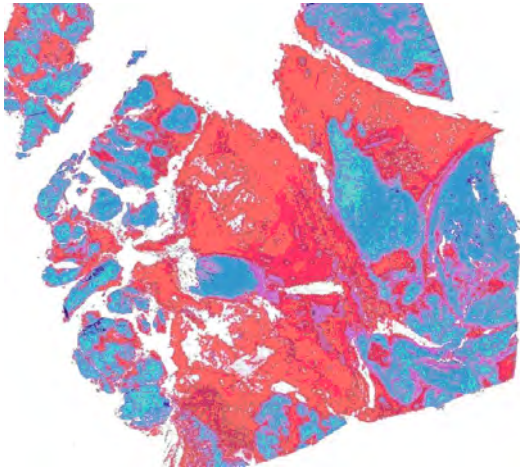


Рисунок 2. Зона опухолевого роста и некроза через 2 месяца после изолированной одноциклового криодеструкции опухоли конечности на фоне введения цисплатина. Обозначены: жизнеспособная опухоль голубого цвета, зона некроза красного цвета. Обучение и анализ произведены с помощью модуля HistoPattern Analysis.

Figure 2. The zone of tumor growth and necrosis after 2 months single-cycle cryodestruction of a limb breast carcinoma and injection of cisplatin. Marked: viable tumor of blue color, the zone of necrosis of the red color. Training and analysis was performed using the HistoPattern Analysis module.

В образцах подвергшихся криодеструкции опухоли в одноциклового режиме с введением цисплатина наблюдался некроз опухолевой ткани разной степени выраженности от слабо до выраженного некроза (рис. 2). При количественной оценке материала доля жизнеспособной опухолевой ткани в срезе составила от 25,35 до 49,6%, доля некротизированной опухолевой ткани от 50,4 до 74,65% по данным DIA (рис. 3). При анализе данных, полученных от исследователя 1 и исследователя 2, по данным световой микро-

скопии разброс количественной оценки ЖОК составил от 10 до 65%, а доля некротизированной ткани от 35 до 90%. ICC между исследователями равен 0,59 CI (-1;0,92) при изучении процента некроза, ICC 0,98 CI (0,41;0,99) при сравнении результатов оценки ЖОК.

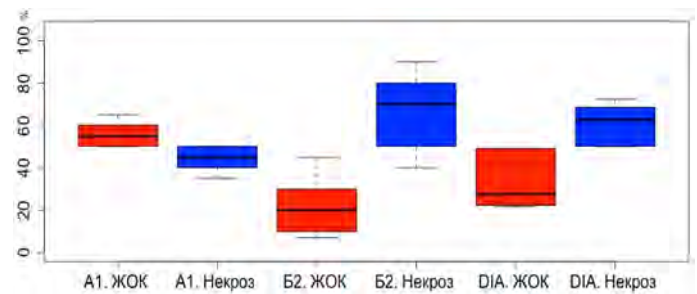


Рисунок 3. Характеристика процента некроза в группе с одноциклового криодеструктивным воздействием на фоне введения цисплатина. Обозначения: А1 — исследователь 1, В2 — исследователь 2; ЖОК — жизнеспособные опухолевые клетки; DIA — цифровой анализ изображений, с помощью модуля HistoPattern Analysis.

Figure 3. Characterization of the percentage of necrosis in the group with a single-cycle cryodestruction of a limb breast carcinoma and injection of cisplatin. Legend: A1 — Researcher 1, B2 — Researcher 2; ЖОК — viable tumor cells; DIA — digital image analysis using the HistoPattern Analysis module.

Также на границе жизнеспособной опухоли и некротических масс имелось небольшое количество клеток, находящихся в состоянии глубокой дистрофии: уменьшение размеров клетки, уплотнение и вздутие мембраны, кариопикноз, кариорексис, конденсация и маргинация хроматина (рис. 4).

Обсуждение и выводы

Повреждающее действие криодеструкции и химиотерапевтического препарата направлено в одну точку: на углубление и ускорение механизмов апоптоза как главного фактора последующего некроза опухоли. К аналогичному выводу пришли и другие исследователи [10, 11]. Исследования на клеточных линиях аденокарциномы простаты показали, что криогенное разрушение проницаемости мембран клеток и органелл приводит к беспрепятственному проникновению цитотоксических препаратов в клетки и митохондрии [12, 13]. При этом важно, что для потенцирования эффекта каждое последующее воздействие на опухолевые клетки должно происходить прежде, чем в них завершатся репаративные процессы, вызванные предыдущим воздействием [14].

Количественная оценка некроза и клеточности опухоли являются важными прогностическими факторами в различных локализациях солидных опухолей, а также в оценке эффективности химиотерапии и иммунотерапии. Патологи с высокой степенью воспроиз-

димостью могут определить наличие или отсутствие опухоли (полный патоморфологический регресс), а также некроза в изучаемых препаратах. Но при количественной характеристике морфологических и иммуногистохимических параметров солидных опухолей ряд исследований [15] показал, что существуют промежуточные количественные значения изучаемых показателей, являющиеся низковоспроизводимыми. Количественная оценка как морфологических, так и иммуногистохимических параметров субъективна и может изменяться в зависимости от лаборатории и исследователя [16].

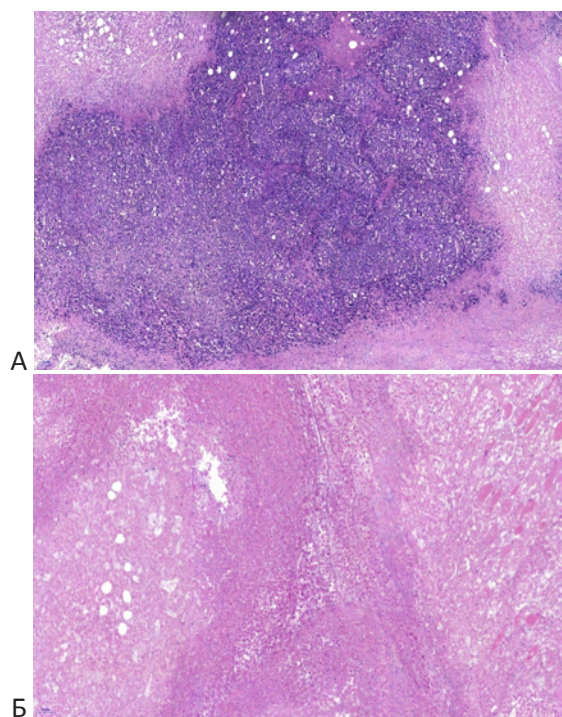


Рисунок 4. Зона опухолевого роста и некроза. Опухоль и некроз по краю инвазивного фронта (А) и тотальный некроз (Б). Окраска Н&Е, $\times 100$.

Figure 4. Zone of tumor growth and necrosis. Tumor and necrosis along the edge of the invasive front (A) and total necrosis (B). Stain H & E, $\times 100$.

Одноцикловое криодеструктивное воздействие показало разнонаправленные, низковоспроизводимые результаты оценки между исследователями. Цифровой анализ изображений на гистологических препаратах с окраской гематоксилин-эозин с сегментационным алгоритмом обучения позволяет получить стандартизированные количественные данные, с учетом индивидуальных особенностей окраски и процессинга операционного материала.

Полученные нами данные свидетельствуют, что количественная оценка жизнеспособных опухолевых клеток и зоны некроза меняются в зависимости от исследователя, что может привести к расхождению данных и невозможности выводов по отношению к экспериментальным методикам воздействия на опухоль. Мы считаем, что метод цифрового анализа изображений выступает методом объективизации морфологического ответа опухоли на терапию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Carter, B. Histopathologic Response Criteria Predict Survival of Patients with Resected Lung Cancer After Neoadjuvant Chemotherapy. Yearbook of Pathology and Laboratory Medicine, 2013, pp.116-118.
2. Jin-Woo Kang et al. Inter- and intra-observer reliability in histologic evaluation of necrosis rate induced by neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma. Int J Clin Exp Pathol 2017;10(1):359-367.
3. Pichler, M., Hutterer, G., Chromecki, T., Jesche, J., Kampel-Kettner, K., & Rehak, P. et al. Histologic Tumor Necrosis Is an Independent Prognostic Indicator for Clear Cell and Papillary Renal Cell Carcinoma. American Journal Of Clinical Pathology, 2012, 137(2), 283-289. doi: 10.1309/ajcplbk9I9kdyqzp
4. Komura, D., & Ishikawa, S. Machine Learning Methods for Histopathological Image Analysis.

REFERENCES

1. Carter, B. Histopathologic Response Criteria Predict Survival of Patients with Resected Lung Cancer After Neoadjuvant Chemotherapy. Yearbook of Pathology and Laboratory Medicine, 2013, pp. 116-118.
2. Jin-Woo Kang et al. Inter- and intra-observer reliability in histologic evaluation of necrosis rate induced by neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma. Int J Clin Exp Pathol. 2017, No. 10 (1), pp. 359-367.
3. Pichler, M., Hutterer, G., Chromecki, T., Jesche, J., Kampel-Kettner, K., & Rehak, P. et al. Histologic Tumor Necrosis Is an Independent Prognostic Indicator for Clear Cell and Papillary Renal Cell Carcinoma. American Journal Of Clinical Pathology, 2012, 137(2), pp. 283-289. doi: 10.1309/ajcplbk9I9kdyqzp
4. Komura, D., & Ishikawa, S. Machine Learning Methods for Histopathological Image Analysis.

Computational And Structural Biotechnology Journal, 2018, 16, 34-42. doi: 10.1016/j.csbj.2018.01.001

5. Arunachalam HB et al. Computer aided image segmentation and classification for viable and non-viable tumor identification in osteosarcoma. *Biocomputing* 2017. doi: 10.1142/9789813207813_0020

6. Le Pivert P., Haddad R.S., Aller A. et al. Ultrasound guided combined cryoablation and microencapsulated 5-fluorouracil inhibits growth of human prostate tumors in xenogenic mouse model assessed by luminescence imaging// 2004.- *Technol.Cancer Res Treat.*- 3.- pp. 135-142.

7. Rakoczy, B. Act on the Protection of Animals Used for Scientific or Educational Purposes - legal regulation review. *Polish Yearbook Of Environmental Law*, 2015, (5), 79. doi: 10.12775/pyel.2015.004

8. Huang P, Duda DG, Jain RK, Fukumura D. Histopathologic findings and establishment of novel tumor lines from spontaneous tumors in FVB/N mice. *Comp Med.* 2008;58(3):253-63.

9. Trevethan, R. (2016). Intraclass correlation coefficients: clearing the air, extending some cautions, and making some requests. *Health Services And Outcomes Research Methodology*, 17(2), 127-143. doi: 10.1007/s10742-016-0156-6

10. Costa, F., Brito, G., Pessoa, R., & Studart-Soares, E. Histomorphometric assessment of bone necrosis produced by two cryosurgery protocols using liquid nitrogen: an experimental study on rat femurs. *Journal Of Applied Oral Science*, 19(6), 604-609. doi: 10.1590/s1678-77572011000600010

11. Pichler, M., Hutterer, G., Chromecki, T., Jesche, J., Kampel-Kettner, K., & Rehak, P. et al. Histologic Tumor Necrosis Is an Independent Prognostic Indicator for Clear Cell and Papillary Renal Cell Carcinoma. *American Journal Of Clinical Pathology*, 137(2), 283-289. doi: 10.1309/ajcplbk919kdyqzp].

12. Ablin R.J. The current status and the prospect for cryoimmunotherapy // *Low temperature medicine.* – 2003. - Vol.29, N. 2. – P.46-49.

13. Benson J.W. Combined chemotherapy and cryosurgery for oral cancer// *Am. J.Surg.*-1975.- 139.- pp.596-600.

14. Forest V., Peoc'h M., Campos L., Guyotat D., Vergnon J. Effects of cryotherapy or chemotherapy on apoptosis in a non-small-cell lung cancer xenografted into SCID mice // *Cryobiology.* -2005. -Vol.50, N. 1. – pp. 29–37.

15. Bernardo, V., Lourenço, S., Cruz, R., Monteiro-Leal, L., Silva, L., & Camisasca, D. et al. (2009). Reproducibility of Immunostaining Quantification and Description of a New Digital Image Processing Procedure for Quantitative Evaluation of Immunohistochemistry in Pathology. *Microscopy And Microanalysis*, 15(04), 353-365. doi: 10.1017/s1431927609090710.

16. Smits, A., Kummer, J., de Bruin, P., Bol, M., van den Tweel, J., & Seldenrijk, K. et al. . The estimation of tumor cell percentage for molecular testing by pathologists is not accurate. *Modern Pathology*, 2013, 27(2), 168-174. doi: 10.1038/modpathol.2013.134

Computational And Structural Biotechnology Journal, 2018, No. 16, pp. 34-42. doi: 10.1016/j.csbj.2018.01.001

5. Arunachalam HB et al. Computer aided image segmentation and classification for viable and non-viable tumor identification in osteosarcoma. *Biocomputing* 2017. doi: 10.1142/9789813207813_0020

6. Le Pivert P., Haddad R.S., Aller A. et al. Ultrasound guided combined cryoablation and microencapsulated 5-fluorouracil inhibits growth of human prostate tumors in xenogenic mouse model assessed by luminescence imaging. 2004. *Technol.Cancer Res Treat.* No. 3. pp. 135-142.

7. Rakoczy, B. Act on the Protection of Animals Used for Scientific or Educational Purposes - legal regulation review. *Polish Yearbook Of Environmental Law*, 2015, (5), 79. doi: 10.12775/pyel.2015.004

8. Huang P, Duda DG, Jain RK, Fukumura D. Histopathologic findings and establishment of novel tumor lines from spontaneous tumors in FVB/N mice. *Comp Med.* 2008;58(3):253-63.

9. Trevethan, R. (2016). Intraclass correlation coefficients: clearing the air, extending some cautions, and making some requests. *Health Services And Outcomes Research Methodology*, 17(2), 127-143. doi: 10.1007/s10742-016-0156-6

10. Costa, F., Brito, G., Pessoa, R., & Studart-Soares, E. Histomorphometric assessment of bone necrosis produced by two cryosurgery protocols using liquid nitrogen: an experimental study on rat femurs. *Journal Of Applied Oral Science*, 19 (6), 604-609. doi: 10.1590/s1678-77572011000600010

11. Pichler, M., Hutterer, G., Chromecki, T., Jesche, J., Kampel-Kettner, K., & Rehak, P. et al. Histologic Tumor Necrosis Is an Independent Prognostic Indicator for Clear Cell and Papillary Renal Cell Carcinoma. *American Journal Of Clinical Pathology*, 137(2), 283-289. doi: 10.1309/ajcplbk919kdyqzp].

12. Ablin R.J. The current status and the prospect for cryoimmunotherapy. *Low temperature medicine.* 2003. Vol. 29, No. 2. pp. 46-49.

13. Benson J.W. Combined chemotherapy and cryosurgery for oral cancer. *Am. J.Surg.* 1975. 139. pp. 596-600.

14. Forest V., Peoc'h M., Campos L., Guyotat D., Vergnon J. Effects of cryotherapy or chemotherapy on apoptosis in a non-small-cell lung cancer xenografted into SCID mice. *Cryobiology.* 2005. Vol. 50, No. 1. pp. 29–37.

15. Bernardo V., Lourenço S., Cruz R., Monteiro-Leal L., Silva L., Camisasca D. et al. Reproducibility of Immunostaining Quantification and Description of a New Digital Image Processing Procedure for Quantitative Evaluation of Immunohistochemistry in Pathology. *Microscopy And Microanalysis.* 2009, No. 15 (04), pp. 353-365. doi: 10.1017/s1431927609090710.

16. Smits, A., Kummer, J., de Bruin, P., Bol, M., van den Tweel, J., & Seldenrijk, K. et al. . The estimation of tumor cell percentage for molecular testing by pathologists is not accurate. *Modern Pathology.* 2013, No. 27 (2), pp. 168-174. doi: 10.1038/modpathol.2013.134

Авторы

Кушнарев Владимир Андреевич
НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава России
Аспирант научной лаборатории морфологии опухолей
Российская Федерация, 197758, г. Санкт-Петербург,
пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68
orcid.org/0000-0003-4608-9349,
kushnarevvladimir1@gmail.com

Артемьева Анна Сергеевна

НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава России
Кандидат медицинских наук, заведующий научной лабораторией морфологии опухолей
Российская Федерация, 197758, г. Санкт-Петербург,
пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68

Прохоров Георгий Георгиевич

НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава России
Доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник и врач-онколог отделения урологии и общей онкологии
Российская Федерация, 197758, г. Санкт-Петербург,
пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68

Стуков Александр Николаевич

НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава России
Старший научный сотрудник научного отдела инновационных методов терапевтической онкологии и реабилитации
Российская Федерация, 197758, г. Санкт-Петербург,
пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68

Чуглова Дина Александровна

НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава России
Врач-патологоанатом патологоанатомического отделения
Российская Федерация, 197758, г. Санкт-Петербург,
пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68

Прохоров Денис Георгиевич

Российский научный центр радиологии и хирургических технологий
Кандидат медицинских наук, Старший научный сотрудник, врач-онколог отделения оперативной онкологии и оперативной урологии
Российская Федерация, 197758, г. Санкт-Петербург,
пос. Песочный, ул. Ленинградская, 70

Authors

Vladimir A. Kushnarev
N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology
PhD student laboratory of tumor morphology
Leningradskaya 68, Pesochny, 197758, St. Petersburg,
Russian Federation
orcid.org/0000-0003-4608-9349
kushnarevvladimir1@gmail.com

Anna S. Artemyeva

N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology
Cand. Sci. (Med.), Head of the Research Laboratory
Leningradskaya 68, Pesochny, 197758, St. Petersburg,
Russian Federation

Georgy G. Prokhorov

N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology
Dr. Sci. (Med.), Professor, Leading Researcher and MD of the Department of Urology and General Oncology
Leningradskaya 68, Pesochny, 197758, St. Petersburg,
Russian Federation

Alexander N. Stukov

N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology
Senior Researcher of the Scientific Department of Innovative Therapeutic Oncology and Rehabilitation Methods
Leningradskaya 68, Pesochny, 197758, St. Petersburg,
Russian Federation

Dina A. Chuglova

N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology
MD, pathologist of the pathology department
Leningradskaya 68, Pesochny, 197758, St. Petersburg,
Russian Federation

Denis G. Prokhorov

Russian Scientific Center of Radiology and Surgical Technologies
Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Oncologist, Department of Operative Oncology and Operative Urology
Leningradskaya 70, Pesochny, 197758, St. Petersburg,
Russian Federation