

## دراسة تشريحية خلوية لتعداد النوى في مقاطع الخزعات العضلية لمرضى السرطان بعد العلاج الكيماوي.

عبد الجواد قبيلي \*

علي داود \*\*

بسام صارم \*\*\*

(تاريخ الإيداع 2023 /3/26 – تاريخ النشر 2023 /5/10)

### □ ملخص □

**مقدمه:** تشكل العضلات الهيكلية %40 من كتلة الجسم وبذلك توفر حيز مناسب لتقييم سمية العلاج الكيماوي في وقت تشير فيه الأدبيات الطبية إلى تواتر حدوث الدنف بعد العلاج الكيماوي. **المواد والطرائق:** أنجزت الدراسة خلال عامي 2021-2022 في مشفى تشرين الجامعي باللاذقية. تم عشوائياً اختيار 51 مريضة سرطان ثدي غازي في المرحلة IIIA من تطور المرض وتوزعن في مجموعتين: مجموعة الشاهد شملت 21 مريضة قبل العلاج الكيماوي، ومجموعة التعرض شملت 30 مريضة بعد انتهاء دورات العلاج الكيماوي المتضمن مشاركة الدوكسوروبيسين بجرعة 60 ملغ/م<sup>2</sup> والسيكلوفوسفاميد بجرعة 600 ملغ / م<sup>2</sup>. تم تثبيت العينات بالفورمالين NBF 10% والتشريب بالبارافين والتقطيع باستخدام ميكروتوم إلى مقاطع بسماكة 5 ميكرون والتلوين بالهيماتوكسيلين أيزون. أجري تعداد النوى في ثلاث ساحات مجهرية FOVs باستخدام المجهر الضوئي مع ضبط العدسة العينية على 20x والعدسة الجسمية على 40x. تم تصوير الساحات المجهرية باستخدام كاميرا Nikon10 وطباعة الصور باستخدام طابعة HP Deskjet 2752 وذلك لعد النوى يدوياً وأخذ متوسط للساحات الثلاث لكل عينه. **النتائج:** أظهرت متوسط تعداد للنوى في عينات الشاهد 226 نواة بالساحة المجهرية بينما كان المتوسط لعينات التعرض 78 نواة بالساحة المجهرية. **الخلاصة:** تعداد النوى الذي توفره الخزعة العضلية بالإبرة يوفر معيار جيد لتقييم سمية العلاج الكيماوي على المرضى. **كلمات مفتاحية:** العلاج الكيماوي، الخزعة العضلية بالإبرة، تعداد النوى، سرطان الثدي الغازي.

\* أستاذ مساعد، قسم التشريح، كلية الطب، جامعة تشرين، اللاذقية.

\*\* أستاذ مساعد، قسم التشريح المرضي، كلية الطب، مشفى تشرين الجامعي، جامعة تشرين، اللاذقية.

\*\*\* معيد موفد، طالب دكتوراه في قسم التشريح، كلية الطب، جامعة تشرين، اللاذقية.

## Cell anatomy study of nuclei count in muscle biopsies of cancer patients after chemotherapy.

Dr. Abduljawad koubili\*

Dr. Ali Daod\*\*

Dr. Bassam Sarem\*\*\*

(Received 26/3/2023. Accepted 10/5/2023)

### □ ABSTRACT □

**Background:** Skeletal muscles form 40% of the body mass so they provide a good area to evaluate the toxicity of chemotherapy since medical literature shows frequent incidence of cachexia after chemotherapy. **Methods:** Fifty-one patients with invasive breast cancer (Stage IIIA) selected randomly at Tishreen University Hospital during 2021-2022. Patients were divided into two groups, Controls (21 patients before chemotherapy) and Cases (30 patients after chemotherapy). Muscle needle biopsies performed on gastrocnemius muscle after a combination cycle of doxorubicin and cyclophosphamide is finished. Samples fixed in neutral buffered formalin (NBF) 10%, stained with Hematoxylin-Eosin. The number of nucleus counted through three microscopic fields of view (FOV) using light microscope, magnification adjusted to 40x for objective lens and 20x for the ocular, the FOVs imaged using USB Microscope Camera, printed by HP printer to count nuclei manually. **Results:** showed an average number of nucleus (226/FOV) for control samples while the average was (78/FOV) for the oppose-group after chemotherapy. **Conclusion:** the nucleus count provided by muscle needle biopsy indicates a good criterion to evaluate the toxicity of chemotherapy.

**Keywords:** chemotherapy, muscle needle biopsy, nucleus concentration, invasive breast cancer.

---

\*Assistant Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Tishreen University, Latakia.

\*\*Assistant Professor, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Tishreen University, Latakia.

\*\*\* Teaching Assistant on PhD internal scholarship, Department of Cytology and Histology, Faculty of Medicine, Tishreen University, Latakia.

## مقدمه Introduction:

تشكل العضلات الهيكلية عند الانسان 40% تقريباً من وزن الجسم<sup>1</sup> [Walter R Frontera , Julien ] 2015 [Ochala. 2015] وتشمل وظائفها: الحفاظ على الوضع والحركة وتنظيم حرارة الجسم وتخزين الطاقة ودعم النسيج الرخوه.

يحدث لدى مرضى السرطان تراجع<sup>2</sup> [Zaira Aversa, Paola Costelli, and Maurizio Muscaritoli. ] 2017 [ في القوة والكتلة العضلية بنسبة إجمالية 40% عند تشخيص المرض وقد تصل إلى 70% مع تقدم المرض ما يؤدي لحدوث التعب Fatigue والذي ينتج<sup>3</sup> [Julienne E. Bower. 2014] عن المرض نفسه أو المعالجة أو الأعراض والظروف الصحية الناتجة عن المرض أو العلاج و/أو الاستجابة النفسية للمرض.

يعتبر التعب عند مرضى سرطان الثدي Breast cancer أحد أهم الآثار الجانبية للعلاج الكيماوي<sup>4</sup> [Ana Ruiz-Casado , Alejandro Álvarez-Bustos. et al. 2021] ويصيب 70% من المرضى وقد يستمر لأشهر وحتى سنين بعد انتهاء العلاج الكيماوي Chemotherapy، وتتضمن الآثار الجانبية الأخرى تثبيط النقي myelosuppression ونقص الألبومين hypoalbuminemia.

يقدر حدوث نقص المعتدلات<sup>5</sup> [Yi Ba, Yuankai Shi. et al. 2020] بحوالي 13-21% من المرضى الخاضعين للعلاج الكيماوي وأكثر ما يحدث خلال الجولة الأولى للعلاج الكيماوي وتعتبر الأعمار فوق 65 سنة عامل خطر لحدوث نقص المعتدلات.

يستخدم بروتوكول AC<sup>6</sup> [S E Jones, B G Durie. et al. 1975] في العلاج الكيماوي لسرطان الثدي الغازي ويتضمن مشاركة بين الدوكسوروبيسين Doxorubicin بجرعة ٦٠ ملغ / م٢ والسيكلوفوسفاميد Cyclophosphamide بجرعة ٦٠٠ ملغ / م٢ في أربع دورات بفواصل ٢-٣ أسابيع.

يثبط الدوكسوروبيسين<sup>7</sup> [Hilal Taymaz-Nikerel. et al. 2018] تنسخ DNA ما يؤدي لافتراق جديلي الـ DNA وتحريض الموت الخلوي المبرمج Apoptosis ويحدث ذلك نتيجة تثبيط الدوكسوروبيسين لأنزيم topoisomerase II، كما أنه يتأكسد إلى مركب غير ثابت ينتج عن ارجاعه في المتقدرات إنتاج مركبات (ROS) mitochondrial reactive oxygen species والتي تخرب الغشاء الخلوي وتقلل سبيل الموت الخلوي المبرمج. بألية مشابهة تؤكسد أنزيمات السيتوكروم C450 السيكلوفوسفاميد<sup>8</sup> [Kuleshwar Sahu, Urvashi Langeh. et al. 2021] وينتج عن ارجاعه مركبات (ROS) تخرب الغشاء الخلوي والمتقدرات الـ DNA وتقلل بروتينات Caspase cascade وهي أنزيمات حالة للبروتين protease تلعب دوراً هاماً في الاستماتة الخلوية.

يستهدف العلاج الكيماوي الخلايا السرطانية التي تنقسم بسرعة لكن بعض الخلايا السليمة تتأثر أيضاً<sup>9</sup> [Tetyana Bagnyukova. et al. 2010] وبما أن العضلات الهيكلية تشكل 40% من كتلة الجسم فإنها تشكل بيئة مناسبة لتقييم هذه السمية للعلاج الكيماوي على الخلايا السليمة.

يقدر أن الخلايا العضلية التابعة<sup>10</sup> [Satellite Cells Maria Elena Danoviz. et al. 2012] تشكل 10-30% من تعداد نوى الخلايا العضلية الهيكلية وتشكل مصدر لتوليد النوى الجديدة وذلك بسبب قدرتها على الانقسام والاندماج مع الألياف العضلية، ويعتمد طول الليف العضلي على عدد النوى والتي تعطي الليف القدرة على

النمو وتعويض ما قد يتخرب من النوى أثناء العلاج الكيماوي وبالتالي فإن تعداد النوى يقدم رؤية غير مباشرة لوظيفة الخلايا العصبية التابعة.

### المواد والطرائق **Materials & Methods**:

تم عشوائياً اختيار 51 مريضة سرطان ثدي غازي في المرحلة IIIA وذلك خلال عامي 2021-2022 في مشفى تشرين الجامعي وتوزع العدد في مجموعتين: مجموعة الشاهد قبل تطبيق العلاج الكيماوي ومجموعة التعرض بعد تطبيق العلاج الكيماوي. تم أخذ الخزع العصبية بالإبرة<sup>11</sup> [K Tanji, A.P. Hays. 2014] من العضلة التوأمية gastrocnemius بعد أسبوع من انتهاء العلاج الكيماوي.

تضمنت مجموعة الشاهد 21 مريضة قبل تطبيق العلاج الكيماوي بينما تضمنت مجموعة التعرض 30 مريضة بعد تطبيق أربع دورات من العلاج الكيماوي المتضمن مشاركة الدوكسوروبيسين بجرعة 60 ملغ / م<sup>2</sup> والسيكلوفوسفاميد بجرعة 600 ملغ / م<sup>2</sup> في أربع دورات بفواصل 2-3 أسابيع.

تم تثبيت العينات باستخدام الفورمالين 10% neutral buffered formalin وبعد التثريب بالبارافين تم التقطيع باستخدام ميكروتوم Microtome للحصول على مقاطع بسماكة 5 ميكرون والتلوين بالهيماتوكسيلين - أيوزين Hematoxylin-Eosin.

تم التلوين بالهيماتوكسيلين - أيوزين وفق إرشادات<sup>12</sup> شركة Leica Microsystems لعام 2022:

- إزالة الشمع Remove the Wax: باستخدام الكزيلين xylene لمدة دقيقتين.
- إماهة المقطع Hydrate the Section: بالتمرير في الكحول لإزالة الكزيلين. إيتانول 100% لمدة دقيقتين، إيتانول 95% لمدة دقيقتين، ثم غسيل بالماء لمدة دقيقتين.
- تطبيق الهيماتوكسيلين Apply Hematoxylin: يطبق الهيماتين مع كاشف مباين mordant agent كأملح الألمنيوم لمدة ثلاث دقائق ثم غسل بالماء لمدة دقيقتين.
- Blueing: باستخدام محلول قلوي ضعيف للأمونيا 0.05% لمدة دقيقة لتحويل الهيماتوكسيلين من الأرجواني إلى الأزرق الغامق.
- المباينة Differentiate: لإزالة الصباغ الزائد في الخلفية باستخدام أسيد ضعيف للكحول 0.3% لمدة دقيقة واحدة ثم غسيل بالماء لمدة دقيقة واحدة. (يحول المحلول الصباغ الزائد في الخلفية إلى اللون الأحمر).
- تطبيق الأيوزين Eosin: باستخدام محلول مائي أو كحولي للأيوزين لمدة 45 ثانية.
- نزع الماء Dehydrate بالتمرير بالإيتانول 95% لمدة دقيقة ثم بالإيتانول 100% لمدة دقيقتين ثم يطبق الكزيلين لمدة دقيقتين وأخيراً توضع طبقة رقيقة من بلسم كندا وتغطي الشريحة بساترة وتوضع على حامل المجهر.

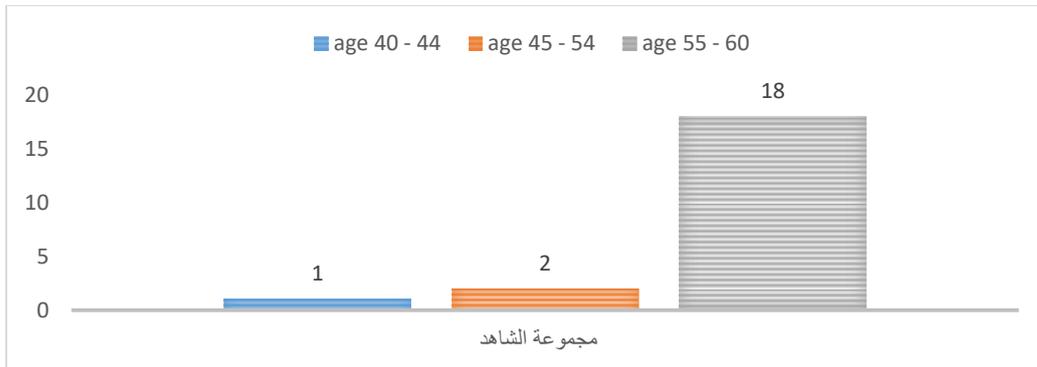
تم إجراء تعداد النوى في ثلاث ساحات مجهرية (Microscopic Fields of View (FOVs) باستخدام تكبير 40x للعدسة الجسمية objective lens و 20x للعينية ocular بحيث (FOV=0.5mm) وفق إرشادات<sup>13</sup> [NNMI, LLC. 2018] من، تم تصوير الساحات الثلاث باستخدام كاميرا Nikon 10 وطباعتها باستخدام HP Deskjet 2752 وذلك لإجراء تعداد النوى يدوياً واحتساب قيمة متوسطة لكل عينة.

تم تسجيل قيم الألبومين غ/دل Serum Albumin ومشعر كتلة الجسم كغ/م<sup>2</sup> BMI: Body Mass Index وتعداد المعتدلات/مكروليتر Neutrophils لكل مريض في عينة الشاهد والتعرض.

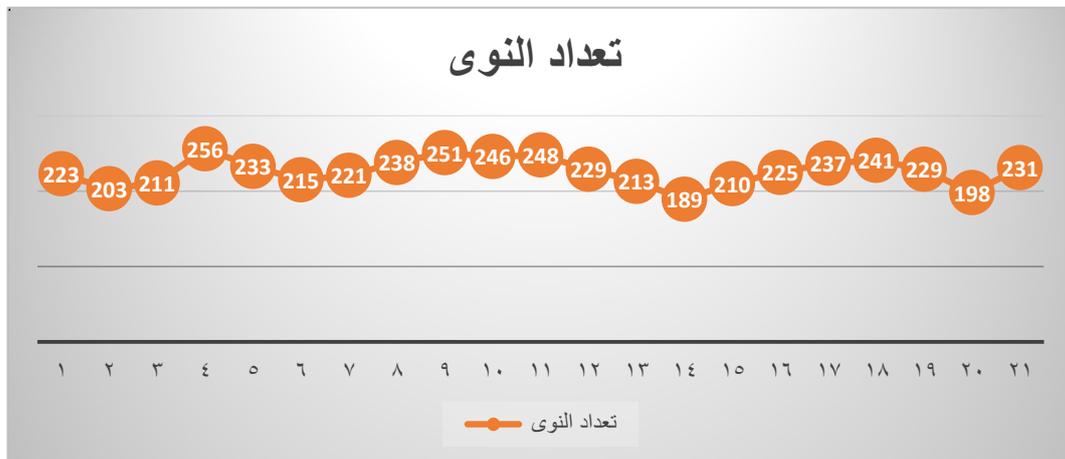
شملت معايير الاستبعاد Exclusion criteria وجود أي مما يلي: ضمور عضلي atrophy، اعتلال عضلي myopathy (أولي أو ثانوي أو وراثي)، حثل عضلي، التهاب عضلات بالإضافة إلى الأمراض المزمنة والجهازية. اعتمدت الدراسة على تصميم الحالة - شاهد Case- Control وحساب معامل الأرجحية Odds ratio الخاص بهذا التصميم<sup>14</sup> [Magdalena Szumilas. 2010].

## النتائج Results:

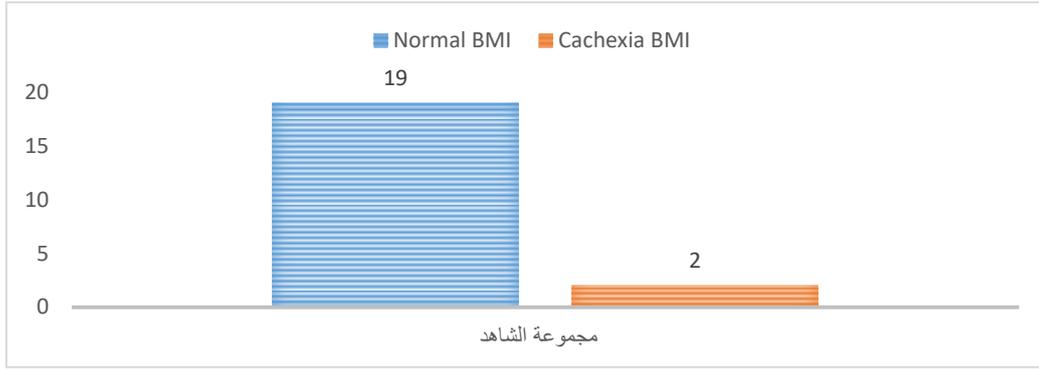
مجموعة الشاهد: تراوحت الأعمار بين 44-60 سنة وكانت النتائج كما يلي:



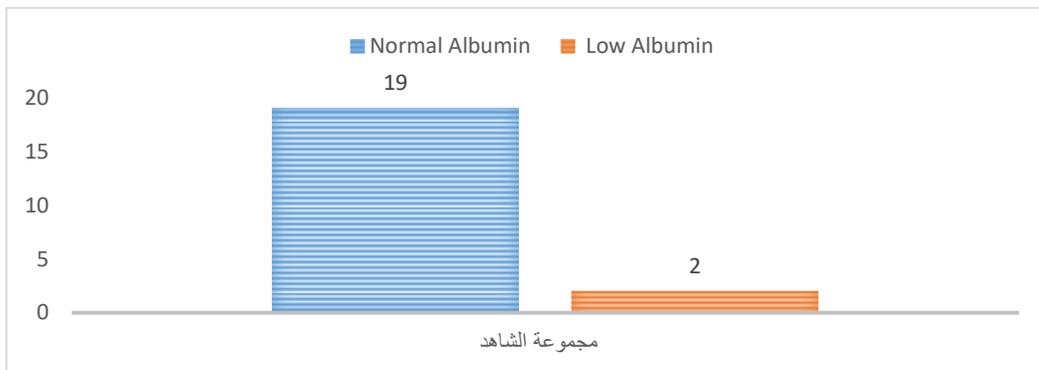
الشكل (1) يظهر توزيع الأعمار في مجموعة الشاهد.



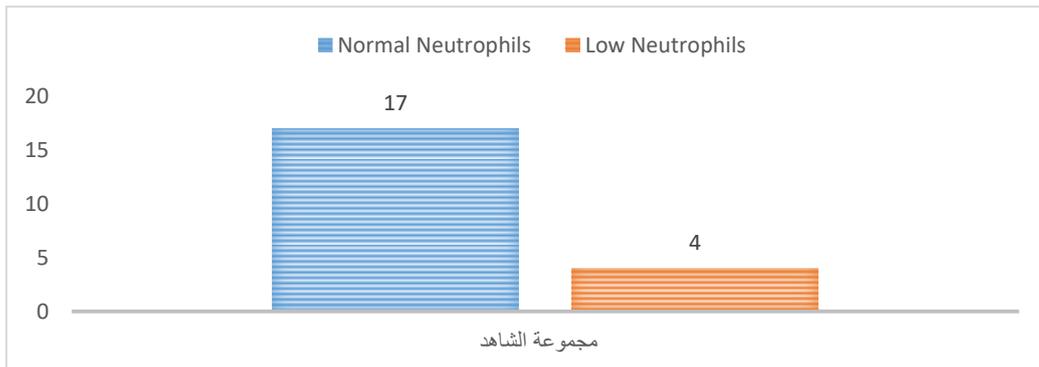
الشكل (2) يظهر تعداد النوى في المقاطع العرضية لمجموعة الشاهد.



الشكل (3) يظهر قيم مؤشر كتلة الجسم BMI في مجموعة الشاهد.

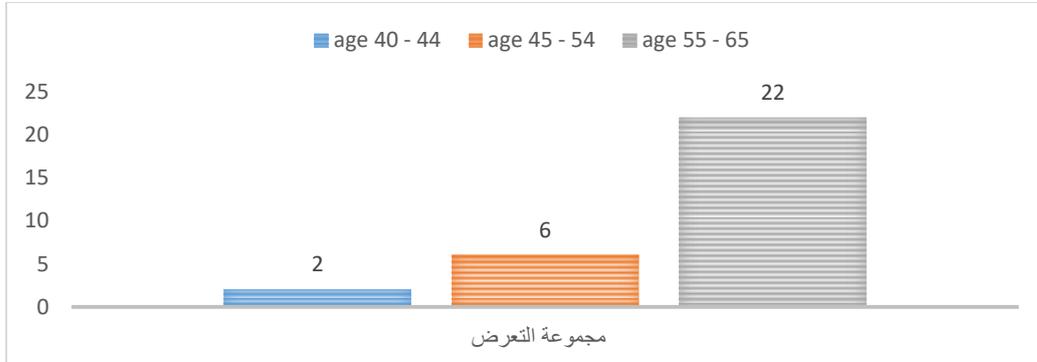


الشكل (4) يظهر قيم ألبومين المصل لدى مجموعة الشاهد.

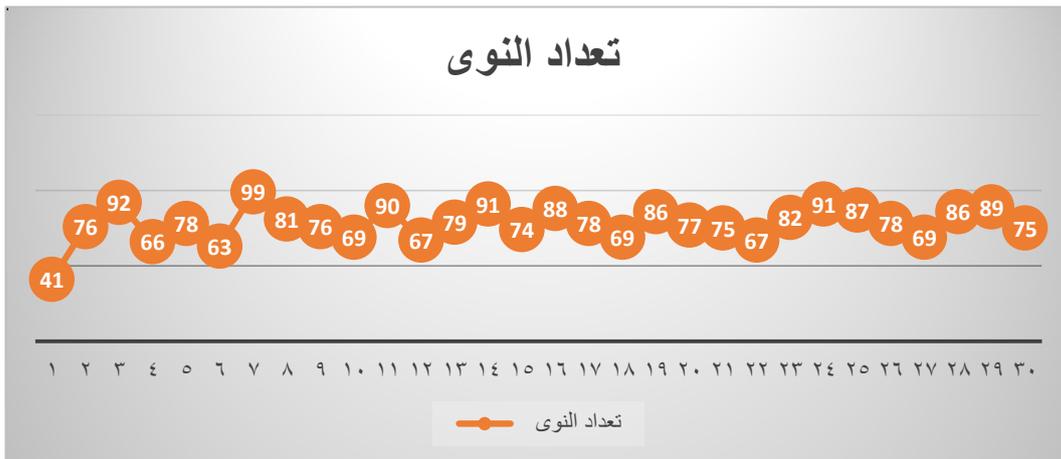


الشكل (5) يظهر تعداد المعتدلات لدى مجموعة الشاهد.

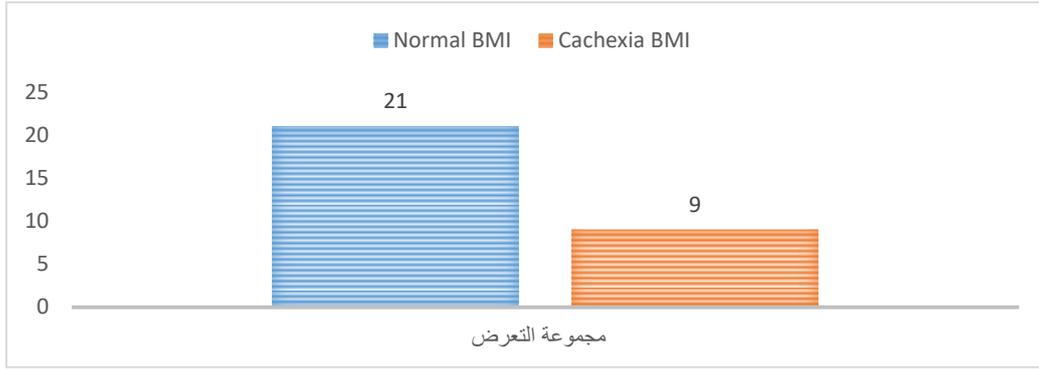
مجموعة التعرض: تراوحت الأعمار في هذه المجموعة بين 43-65 سنة وكانت النتائج كما يلي:



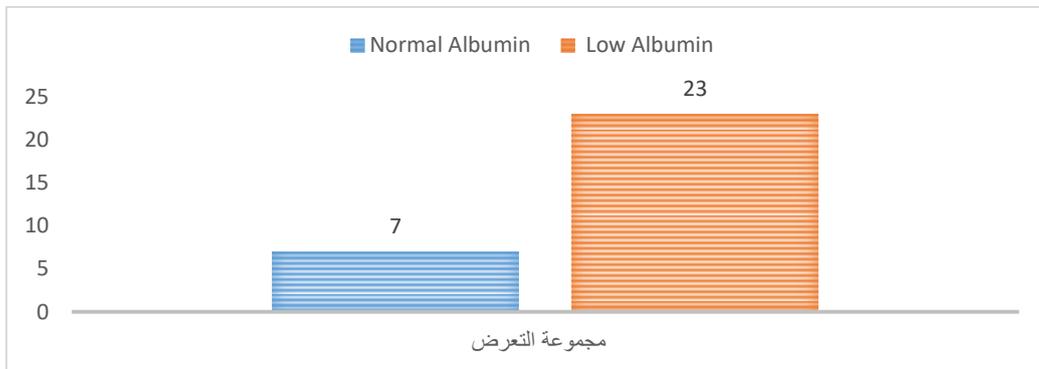
الشكل (6) يظهر توزيع الأعمار في مجموعة التعرض.



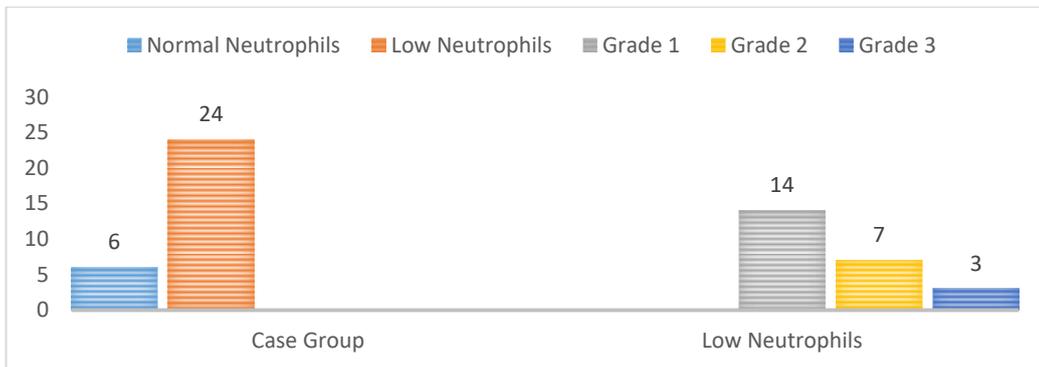
الشكل (7) يظهر تعداد النوى في المقاطع العرضية لمجموعة التعرض.



الشكل (8) يظهر قيم مؤشر كتلة الجسم BMI في مجموعة التعرض.



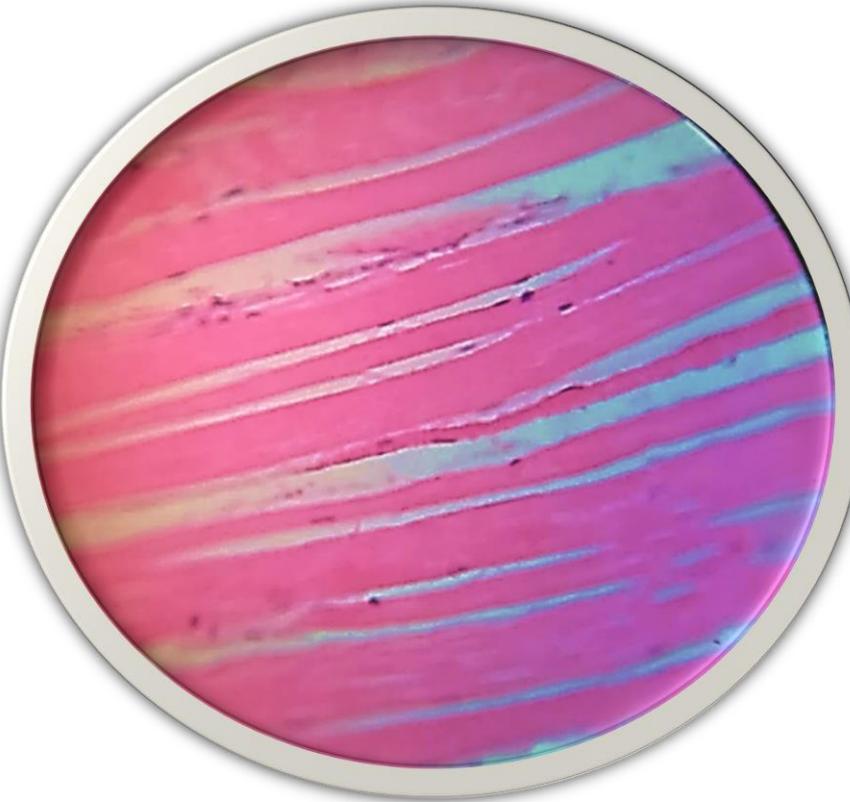
الشكل (9) يظهر قيم ألبومين المصل لدى مجموعة التعرض.



الشكل (10) يظهر تعداد المعتدلات لدى مجموعة التعرض.



الشكل (11) يظهر ساحة مجهرية FOV لعينة من مجموعة الشاهد.



الشكل (12) يظهر ساحة مجهرية FOV لعينة من مجموعة التعرض.

## المناقشة Discussion:

يظهر الشكل (1) أن الأعمار في مجموعة الشاهد تراوحت بين 44-60 سنة مع متوسط عمري 52,46.

وكانت نسبة 85% (18 مريضة) من تعداد مجموعة الشاهد بأعمار 55-60 سنة، بينما يظهر الشكل (6) أن الأعمار في مجموعة التعرض تراوحت بين 46-65 سنة مع متوسط عمري 53 وكان نسبة 73.33% (22 مريضة) بعمر 55-60 سنة.

يوضح الشكل (2) تعداد النوى في الساحة المجهرية (FOV) لدى مجموعة الشاهد بالاعتماد على ثلاث ساحات مجهرية بعد ضبط التكبير على 40x للعدسة الجسمية و20x للعينية بحيث (FOV=0.5mm) وتراوح التعداد بين 189 نواة بالساحة (العمر 51)، (BMI=21.5) و256 نواة بالساحة (العمر 60)، (BMI=19.2) مع متوسط 226 وكانت نسبة التعداد الذي تجاوز 200 نواة بالساحة 90.47% أي (19 مريضة) من مرضى مجموعة الشاهد، بينما في مجموعة التعرض يظهر الشكل (7) أن تعداد النوى تراوح بين 41 نواة بالساحة (العمر 60)، (BMI=14.3) و99 نواة بالساحة (العمر 46)، (BMI=17.1) مع متوسط تعداد 78، وكانت نسبة التعداد الأقل من 80 نواة بالساحة 60% من مرضى مجموعة التعرض. وبحساب معامل الأرجحية Odds ratio كانت القيمة أكبر من (1) بكثير ما يقترح علاقة سببية قوية بين العلاج الكيماوي وانخفاض تعداد النوى.

بالعودة للشكل (3) يظهر أن مريضتان فقط من مجموعة الشاهد سجلت لديهما قيم مشعر كتلة جسم BMI ضمن مجال الدنف (أقل من 18.5 كغ/م<sup>2</sup>) بينما كانت قيم مشعر كتلة الجسم طبيعية لدى بقية مرضى المجموعة أي بنسبة 90.47% من مجموعة الشاهد وتراوحت بين 20.5-25 كغ/م<sup>2</sup>. وبالمقارنة مع مجموعة التعرض يظهر الشكل (8) أن نسبة 42.85% أي (9 مريضات) من مجموعة التعرض سجلن قيم BMI ضمن مجال الدنف (وذلك بعد أسبوع من انتهاء دورات العلاج الكيماوي) وتراوحت القيم بين 16.1-18.3 كغ/م<sup>2</sup> وترافقت بتعداد نوى بين 61-99 نواة بالساحة وكان التعداد لدى 80% منهن أقل من 80 نواة بالساحة. وبحساب معامل الأرجحية Odds ratio كانت القيمة أكبر من (4.07) ما يقترح علاقة معتبرة بين العلاج الكيماوي والدنف.

يظهر الشكل (4) أن نسبة 85.71% أي (18 مريضة) من مجموعة الشاهد سجلت قيم طبيعية للألبومين المصل تراوحت بين 4.6-5.5 غ/دل بينما كشفت القيم المسجلة في مجموعة التعرض الشكل (9) انخفاض واضح في ألبومين المصل دون 3.2 غ/دل hypoalbuminemia لدى معظم المريضات (23 مريضة) أي بنسبة 76.66% وتراوحت القيم المسجلة لهن بين 2.1-3 غ/دل وترافقت بنسبة 60% (18 مريضة) مع تعداد للنوى أقل من 80 نواة بالساحة، وبحساب معامل الأرجحية Odds ratio كانت القيمة (19.71) ما يقترح علاقة قوية بين العلاج الكيماوي وانخفاض ألبومين المصل.

بالرجوع للشكل (5) سجلت قيم طبيعية لتعداد المعتدلات Neutrophil Counts بنسبة 80.95% من مجموعة الشاهد (17 مريضة) وتراوحت القيم بين 3500-4500/مكروليتر، بينما انخفض تعداد المعتدلات المسجل في مجموعة التعرض الشكل (10) دون 2000/مكروليتر لدى 80% من المجموعة وكان منهن (14 مريضة) سجلت نقص معتدلات درجة 1 (1500-1999) grade 1، مريضتان سجلتا نقص معتدلات

درجة 2 (1000–1499) grade، ثلاث مريضات سجلن نقص معتدلات درجة 3 (500–999) grade وكانت نسبة 60% ممن سجل لديهن تثبيط نقوي myelosuppression (نقص المعتدلات) مترافقة مع تعداد نوى أقل من 80 نواة بالساحة وبحساب معامل الأرجحية Odds ratio كانت القيمة (7.89) ما يقترح علاقة قوية بين العلاج الكيماوي ونقص المعتدلات.

بالمقارنة مع الدراسات العالمية، أظهرت دراسة<sup>15</sup> Takaaki Fujii. et al عام ٢٠٢٠ بعنوان Implications of Low Serum Albumin in Patients with Breast Cancer انخفاض الألبومين لدى 12.1% من مريضات الشاهد وفي دراستنا كانت النسبة 14.29%.

كشفت دراسة<sup>16</sup> Masako Ishizuka. et al عام 2011 بعنوان Relationship between hepatotoxicity and chemotherapy نقص واضح في تعداد المعتدلات بنسبة 88.9% وهي نسب قريبة من دراستنا 80% ويمكن تفسير الفرق بالاختلافات العرقية والبيئية والتقنية وفروقات الاعتيان. بينت دراسة<sup>17</sup> Koji Takada. et al عام 2021 بعنوان BMI in patients with breast cancer receiving chemotherapy أن قيم مشعر كتلة الجسم BMI بعد العلاج الكيماوي كانت ضمن مجال الدنف بنسبة 35.5% وهي قريبة من نسبة دراستنا 42.85%.

في دراسة<sup>18</sup> Alyssa A. W. Cramer. et al عام 2020 وعنوان الدراسة Nuclear numbers in muscle fibers promote size and development كان تعداد النوى في مقاطع العضلات الهيكلية السليمة 225 نواة في الساحة بينما كان في دراستنا 226.

### الخلاصة Conclusion:

إن تعداد النوى الذي تقدمه الخزعات العضلية بالإبرة يوفر دلالة قوية لتقييم سمية العلاج الكيماوي. وإن تعداد النوى المنخفض في مقاطع الخزعات العضلية يتوافق في معظم الحالات وليس في كل الحالات مع الدنف وانخفاض ألبومين المصل ونقص المعتدلات.

### References:

1. Walter R Frontera , Julien Ochala. *Skeletal muscle: a brief review of structure and function*. Calcif Tissue Int. 2015 Mar; 96(3):183-95. DOI: 10.1007/s00223-014-9915-y.
2. J Zaira Aversa, Paola Costelli, and Maurizio Muscaritoli. *Cancer-induced muscle wasting: latest findings in prevention and treatment*. Ther Adv Med Oncol. 2017 May; 9(5): 369–382. doi: 10.1177/1758834017698643.
3. Julienne E. Bower. *Cancer-related fatigue: Mechanisms, risk factors, and treatments*. Nat Rev Clin Oncol. 2014 Aug 12. doi: 10.1038/nrclinonc.2014.127.
4. Ana Ruiz-Casado, Alejandro Álvarez-Bustos , Cristina G. de Pedro , Marta Méndez-Otero , María Romero-Elías. *Cancer-related Fatigue in Breast Cancer Survivors: A Review*. Clinical Breast Cancer. Volume 21, Issue 1, February 2021, Pages 10-25.
5. Yi Ba. Yuankai Shi, Wenqi Jiang, Jifeng Feng, Ying Cheng, Li Xiao, Qingyuan Zhang, Wensheng Qiu, Binghe Xu, Ruihua Xu, Bo Shen, Zhiguo Luo , et al. *China Anti-Cancer Association Committee of Clinical Chemotherapy. Current management of*

*chemotherapy-induced neutropenia in adults: key points and new challenges*. *Cancer Biol Med*. 2020 Nov 15; 17(4): 896–909. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0069.

6. S E Jones, B G Durie, S E Salmon. *Combination chemotherapy with adriamycin and cyclophosphamide for advanced breast cancer*. 1975 Jul; 36(1):90-7. doi: 10.1002/1097-0142(197507)36:1<90::aid-cnrc2820360104>3.0.co;2-h.
7. Hilal Taymaz-Nikerel. *Muhammed Erkan Karabekmez, Serpil Eraslan and Betül Kirdar. Doxorubicin induces an extensive transcriptional and metabolic rewiring in yeast cells*. *Nature*. September 2018.
8. Kuleshwar Sahu, Urvashi Langeh, Charan Singh and Arti Singh, *Curr Res Pharmacol Drug Discov. Crosstalk between anticancer drugs and mitochondrial functions*. 2021 Aug 19. doi: 10.1016/j.crphar.2021.100047.
9. Tetyana Bagnyukova, K. Ilya G Serebriiskii, Yan Zhou, *Elizabeth A Hopper-Borge, Erica A Golemis, and Igor Astsaturov. Chemotherapy and signaling: How can targeted therapies supercharge cytotoxic agents?*. *Cancer Biol Ther*. 2010 Nov 1; 10(9): 839–853. doi: 10.4161/cbt.10.9.13738.
10. Maria. Elena Danoviz and Zipora Yablonka-Reuveni. *Skeletal Muscle Satellite Cells: Background and Methods for Isolation and Analysis in a Primary Culture System*. *Methods Mol Biol*. 2012; 798: 21–52. doi: 10.1007/978-1-61779-343-1\_2.
11. K Tanji, A.P. Hays. *Muscle Biopsy. Encyclopedia of the Neurological Sciences (Second Edition)*, 2014.
12. H&E Staining Overview: A Guide to Best Practices. *Leica Microsystems, Inc*. 2023.
13. *EssentialPathology, NuoNuo Medical NNMI, LLC*. 2003-2018.
14. Magdalena Szumilas. *Explaining Odds Ratios*. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2010 Aug; 19(3): 227–229. PMID: 20842279.
15. Takaaki Fujii, Shoko Tokuda, Yuko Nakazawa, *Sasagu Kurozumi, et al. Implications of Low Serum Albumin as a Prognostic Factor of Long-term Outcomes in Patients With Breast Cancer*. *In Vivo*. 2020 Jul-Aug; 34(4): 2033–2036. doi: 10.21873/invivo.12003.
16. Masako Ishizuka, Yasushi Fujimoto, *Yoshiyuki Itoh, Koichi Kitagawa, Motoki Sano, Yasuhiro Miyagawa, Atsushi Ando, Mariko Hiramatsu, Naoki Hirasawa, Shunichi Ishihara, Tsutomu Nakashima and Kiyofumi Yamada. Relationship Between Hematotoxicity and Chemoradiotherapy*. *Japanese Medical Journal*. 2011. V(41) 8. doi:10.1093/jjco/hyr076.
17. Koji Takada, Shinichiro Kashiwagi, Yuka Asano, *Wataru Goto, Sae Ishihara, Tamami Morisaki, Masatsune Shibutani, Hiroaki Tanaka, Kosei Hirakawa and Masaichi Ohira, Clinical verification of body mass index in patients with breast cancer receiving chemotherapy*. *BMC Cancer*. 2021. V(21). <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08857-7>.
18. Alyssa A. W. Cramer, Vikram Prasad, Einar Eftestøl, *Taejeong Song, Kenth-Arne Hansson, Hannah. Dugdale, Sakthivel Sadayappan, Julien Ochala, Kristian Gundersen and Douglas P. Millay. Nuclear numbers in muscle fibers promote size and development*. *Nature communications*. 2020 11. <http://doi.org/10.1038/s41467-020-20058-7>.