

**KI-67 ANTIGEEENIN VÄRJÄYTYVYYS RINNAN
LEIKKAUSPREPARAATISSA VERRATTUNA SAMAN POTILAAN
PAKSUNEULABIOPSIAAN**

Sofia Heinonen
Syventävien opintojen kirjallinen työ
Tampereen Yliopisto
Lääketieteen yksikkö
Syöpäbiologian tutkimusryhmä
Lokakuu 2014

Tampereen yliopisto

Lääketieteen yksikkö

Syöpäbiologian tutkimusryhmä

SOFIA HEINONEN: KI-67 ANTIGEEENIN VÄRJÄYTYVYYS RINNAN LEIKKAUSPREPARAATISSA
VERRATTUNA SAMAN POTILAAN PAKSUNEULABIOPSIAAN

Kirjallinen työ, 13 s.

Ohjaaja: Professori Jorma Isola

Lokakuu 2014

Avainsanat: Ki-67, ennustetekijä, rintasyöpä

Rintasyöpä on naisten yleisin syöpä Suomessa. Rintasyövän diagnostiikassa käytetään hyödyksi eri ennustetekijöitä, joiden perusteella voidaan arvioida potilaan ennustetta ja valita potilaalle sopivin hoito. Yksi ennustetekijöistä on Ki-67-indeksi, joka kuvaa solujen erilaistumisastetta. Se määritetään tavallisimmin paksuneulabiopsiasta, joka otetaan potilaan kasvaimesta ennen leikkausta. Paksuneulanäyte on kuitenkin vain pieni osa kasvainta. Tarkoituksena oli selvittää vastaako paksuneulabiopsiasta saatu Ki-67 indeksi saman potilaan leikkausnäytteen Ki-67 indeksiä.

Tutkimuksemme käsitti 25 potilasta, joiden edustava paksuneulabiopsia (PNB) ja leikkauksen kudoksenäyte (parafiiniblokki) olivat saatavilla Tampereen Yliopistollisen sairaalan Patologian laitoksella. Näytteet värjättiin immunohistokemiallisesti ja analysoitiin ImmunoRatio-ohjelmistolla. Tilastolliseen analyysiin käytettiin SPSS for Windows-ohjelmistoa.

Saimme tutkimuksessamme kohtalaisen korrelaation saman potilaan paksuneulanäytteen ja leikkausnäytteen Ki-67 indeksin välille ja tulos oli tilastollisesti merkitsevä ($p < 0,001$). Aineistomme oli kuitenkin pieni ($n=25$), joten pitkälle meneviä johtopäätöksiä ei tämän tutkimuksen perusteella voi tehdä. Asia vaatii lisätutkimuksia suuremmilla potilasmäärillä ja potilaiden mahdollisten leikkausta edeltävien syöpähoitojen huomioonottamista.

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	1
1.1	Rintasyövän diagnostiikka	1
1.2	Ki-67-antigeeni.....	2
1.3	Ki-67- antigeenin merkitys	2
1.4	Ki-67- antigeenin määrittäminen	3
1.4.1	Fiksaation vaikutus Ki-67- indeksiin	3
1.5	Aikaisemmat tutkimukset	4
1.6	Tutkimuksen tavoite	5
2	AINEISTO JA MENETELMÄT	6
2.1	Näytteet	6
2.2	Immunohistokemiallinen värjäys	6
2.3	Digitaalinen kuva-analyysi	7
3	TULOKSET	8
4	POHDINTA.....	10
5	VIITTEET	12

1 JOHDANTO

Rintasyöpä on naisten yleisin syöpä Suomessa. Rintasyövän osuus kaikista naisten syövästä Suomessa on 31,2 % (1). Vuosien 2007–2011 välillä rintasyöpään sairastui noin 4 300 naista vuodessa ja rintasyöpään menehtyi keskimäärin 844 naista vuodessa (1). Rintasyövälle altistavia tunnettuja tekijöitä ovat varhainen menarke, myöhään alkaneet vaihdevuodet, lapsettomuus tai myöhäinen ensisynnytys, pitkäaikainen hormonikorvaushoito, ylipaino, tupakointi, runsas alkoholinkäyttö ja ionisoiva säteily. Perinnölliseen rintasyöpäalttiuteen liittyvät erityisesti BRCA1- ja BRCA2-geenimutaatiot. Rintasyövän ennuste on parantunut varhaisemman diagnostiikan ja uusien hoitojen myötä. Suhteellinen viiden vuoden elossaolo-osuus vuosina 2009–2011 diagnosoiduilla potilailla oli jo 92 % (1).

1.1 Rintasyövän diagnostiikka

Kasvain luokitellaan WHO:n histologisen luokituksen mukaisesti. Patologi arvioi kasvaimen kokoa, erilaistumisastetta ja invaasiota ympäröiviin kudoksiin. Lisäksi tavanomaiseen histopatologiseen määrittelyyn sisältyy estrogeeni – ja progesteroni- reseptoreiden, HER2-onkogeenin ja solujen proliferaatioasteen määrittely (Ki-67-antigeeni). Nämä ennustetekijät voidaan määrittää paksuneulabiopsiasta jos syöpädiagnoosi on varmistunut histologisessa tutkimuksessa (2). Ennustetekijöiden avulla arvioidaan potilaan ennustetta ja valitaan potilaalle sopivin hoito. Rintasyövän lopullinen histopatologinen diagnoosi tehdään leikkauksessa poistetuista primaarisista tuumorista ja kainalon imusolmukkeista.

1.2 Ki-67-antigeeni

Suomessa kasvaimen proliferaatioastetta eli syöpäsolujen jakautumisnopeutta kuvataan Ki-67-antigeenillä (2). Tutkijat kuvasivat Ki-67-antigeenin ensimmäisen kerran vuonna 1983 (3). Ki-67-antigeeni ilmenee soluissa solujakautumisen aktiivisissa vaiheissa (G1-, S-, G2- ja M-vaiheet), mutta ei soluissa, joissa solusykli on pysähtynyt (G0-vaihe) (3,4). Ki-67-proliferaatioindeksi kuvaa hyvin tietyn solupopulaation jakautumisnopeutta, jonka vuoksi se on käyttökelpoinen syöpädiagnostiikassa. Aluksi Ki-67-antigeenia määritettiin vain tuoreesta kudoksesta tai jääleikkeistä. Nykyään käytössä on useita vasta-aineita, joiden avulla Ki-67 antigeenia voidaan määrittää parafiiniin valetuista kudosblokeista. MIB-1 on näistä vasta-aineista käytetyin (5). Ki-67-indeksi kuvaa positiivisesti värjäytyneiden tuumorisolujen osuutta näytteessä.

1.3 Ki-67- antigeenin merkitys

Ki-67-antigeenin käyttöä rintasyövän prediktivisena (hoitovaste) ja prognostivisena (syövän uusiutuminen) tekijänä on tutkittu paljon. Laajassa yli 12 000 potilasta käsittävässä meta-analyysissä, Ki-67-antigeenin runsaalla esiintymisellä rintasyöpäkasvaimessa oli yhteys huonompaan ennusteeseen. Ki-67-antigeenia ei kuitenkaan pystytty osoittamaan itsenäiseksi prognostiseksi tekijäksi (6). Myös saksalaisessa yli 3 600 potilasta kattavassa monikeskustutkimuksessa korkea Ki-67-indeksi oli yhteydessä huonompaan ennusteeseen (7). Lisäksi sillä arvioitiin olevan merkitystä myös itsenäisenä prognostisena tekijänä (7).

Ongelmalliseksi Ki-67-antigeenin käyttöönotossa rutiinidiagnostiikkaan on ollut yhtenäisten Ki-67 raja-arvojen puuttuminen (7,8). Tästä huolimatta esimerkiksi Suomessa ja Saksassa Ki-67-indeksi määritetään uusissa rintasyövissä rutiinista (1,7).

Rintasyöpä on heterogeeninen sairaus ja se voidaan jakaa useisiin alatyyppeihin. Erilaiset immunohistokemialliset määritykset auttavat erottamaan alatyypit toisistaan (8). Jako alatyyppeihin on tärkeää koska ne eroavat toisistaan sekä ennusteen, kliinisen käyttäytymisen että lääkehoitojen vasteen suhteen (9,10). 12th St Gallen International Breast Cancer Conference (2011) Expert Panel nosti loppuraportissaan esille Ki-67-indeksin merkityksen rintasyövän diagnostiikassa. Ki-67-antigeeniä voidaan käyttää Luminal A ja Luminal B (HER2 negatiivisen) tyyppin rintasyöpien erottamiseksi toisistaan. Luminal A tyyppin syöpä vastaa kemoterapiaan huonosti (9). Luminal B tyyppin syövässä sen sijaan kemoterapia on käyttökelpoinen (9). Suomessa hyvin matala Ki-67 indeksi yhdistettynä kasvaimen pieneen kokoon johtaa käytännössä sytostaattihoidoista pidättäytymiseen.

1.4 Ki-67- antigeenin määrittäminen

Ki-67-antigeeni voidaan määrittää immunohistokemiallisesti joko histologisesti edustavasta preoperatiivisesta paksuneulabiopsiasta tai kirurgisesti poistetusta primaarista tuumorista. Paksuneulabiopsian etuna on turhien leikkausten vähentäminen ja kustannusten pieneneminen (2). Paksuneulan haittapuolena on havaittu, että se ei välttämättä osu haluttuun kohtaan ja näytteeksi saatu kudospala ei välttämättä edusta luotettavasti primaarin tuumorin histologisia piirteitä (11). Lisäksi Nassar ym. havaitsivat että paksuneulabiopsian negatiivinen Ki-67 tulos ei poissulkenut Ki-67 antigeenin ilmentymistä muualla kasvaimessa (12).

1.4.1 Fiksaation vaikutus Ki-67- indeksiin

Ennen kuin kudospaljat ovat valmiita valettaviksi kudospaljoiksi ja edelleen värjättäviksi kudospaljat täytyy kiinnittää eli fiksoida. Fiksaation tarkoituksena on säilyttää kudoksen rakenteet mahdollisimman luonnollisena näköisinä patologin arviota varten. Neulabiopsiat läpikäyvät usein lyhemmän fiksaation ja kudosten prosessoinnin parafiiniblokeiksi verrattuna kirurgisesti poistettuun kudospaljoon. Paksuneulabiopsia fiksoituu nopeammin kuin leikkausnäyte (11). Kudosten paksuus vaikuttaa fiksaation nopeuteen ja se voi muodostua ongelmaksi immunohistokemiallisissa

määrityksissä. Ki-67 antigeenin on havaittu olevan altis fiksaatiolle ja pitkän fiksaatioajan vähentävän näytteiden immunoreaktiivisia kohtia ja edelleen huonontavan Ki-67-antigeenin määritystä (13).

1.5 Aikaisemmat tutkimukset

Ki-67 antigeenin värjäytyvyyttä paksuneulanäytteen ja leikkausnäytteen välillä on tutkittu vähän ja tutkimustulokset ovat olleet ristiriitaisia. Ough ym. vuonna 2011 julkaistu tutkimus käsitti yhteensä 209 potilasta. Tutkimuksessa verrattiin kasvaimen histologian, tuumorin gradeerauksen, mitoottisen asteen, Ki-67:n, hormonireseptoreiden, HER2:n ja P53:n ekspression yhtäpitävyyttä paksuneulabiopsian ja leikkausnäytteen välillä. (14)

Ki-67:n osalta tutkimus osoitti, että ekspression yhtäpitävyys paksuneulabiopsian ja leikkausnäytteen välillä on huono (59%, $k=0,3602$), eivätkä tutkijat suositelleet luottamaan paksuneulabiopsian perusteella määritettyihin tuumorimarkkereihin. Tutkimuksessa oli myös poissuljettu potilaat jotka olivat saaneet neoadjuvanttihoitoa. (14)

Connor ym. vuonna 2002 julkaistuun tutkimukseen valittiin 44 invasiivista rintasyöpää sairastavaa naista. Yksikään tutkimukseen valituista potilaista ei ollut saanut leikkausta edeltävää kemoterapiaa tai sädehoitoa. Tutkimuksessa verrattiin potilaiden diagnoosin, tuumorin gradeerauksen, estrogeenireseptorin, progesteronireseptorin, MIB-1:n (Ki-67), EGFR:n, HER2-neu:n, p-53:n ja bcl-2 yhtäpitävyyttä paksuneulabiopsian ja leikkausnäytteen välillä. (15)

Tutkimus osoitti, että 18%:ssa tapauksista Ki-67-antigeenin määrittystulos oli saman potilaan paksuneulabiopsian ja leikkausnäytteen välillä erilainen. Tutkimuksessa Ki-67:n raja-arvo oli 10. Tutkijat suosittelivat Ki-67:n määrittymisen toistoa jos tulos ei sovi tuumorin muuhun prognostiseen profiiliin. (15)

Railo ym. julkaisu vuodelta 1996 tutki 98 rintasyöpää sairastavan potilaan ohutneulanäytteestä ja paksuneulabiopsiasta määritettyjä Ki-67, PR ja ER arvoja ja niitä verrattiin samojen potilaiden leikkausnäytteisiin. Paksuneulabiopsiasta määritetty Ki-67 antigeeni korreloi hyvin leikkausnäytteen Ki-67 arvon kanssa ($k=0.474$) ja tutkimusryhmä suositti paksuneulabiopsian käyttöä preoperatiivisessa diagnostiikassa. (16)

Vuonna 2013 brasilialaisessa retrospektiivisessä tutkimuksessa verrattiin 69 potilaan paksuneulabiopsian ja leikkausnäytteen välistä yhtäpitävyyttä kasvaimen ER, PR, HER-2 ja Ki-67 statusten välillä. Tutkimuksessa saatiin leikkausnäytteen ja paksuneulabiopsian Ki-67 arvojen välille merkittävä korrelaatio (kappa-arvo 0,74, $p<0.001$). (17)

1.6 Tutkimuksen tavoite

Rintasyövän diagnoosi perustuu histologispatologiseen luokitteluun. Ki-67 voidaan määrittää immunohistokemiallisesti histologisesti edustavasta preoperatiivisesta paksuneulabiopsiasta tai kirurgisesti poistetusta primaarista tuumorista. Tällä hetkellä on epäselvää kuinka paljon edellä mainitut eri tekijät vaikuttavat immunohistokemiallisesti määritettyyn Ki-67-indeksiin ja edelleen syöpädiagnostiikkaan. Tutkimuksemme tavoitteena oli tutkia Ki-67 värjäytyvyyttä saman potilaan leikkausnäytteen ja paksuneulabiopsian välillä.

2 AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Näytteet

Valitsimme tutkimukseemme 25 potilasta, joiden edustava paksuneulabiopsia (PNB) ja leikkauksen kudosnäyte (parafiiniblokki) olivat saatavilla Tampereen Yliopistollisen sairaalan Patologian laitoksella. Kaikkien tutkimukseen valittujen potilaiden rintasyöpä oli diagnosoitu vuoden 2010 syyskuun ja joulukuun välillä. Tutkimuksen aineisto kerättiin kesäkuun 2011 aikana. Potilaat valittiin satunnaisesti. Tietoa potilaiden mahdollisista aikaisemmista syöpähoidoista ei ollut.

Rutiinisti paksuneulabiopsiat upotetaan neutraalisti puskuroituun formaliiniin, jossa ne prosessoituvat ennen laboratorioon saapumista. Patologian laboratorioon näytteet saapuvat kahden tunnin sisällä näytteenotosta. Sen jälkeen ne läpikäyvät normaalin yön yli ajon. Prosessointi tehdään Milestonen Pathos Delta kudosprosessoreilla. Prosessointiohjelma sisältää vaihtelevia syklejä eri lämpötiloissa ja paineissa formaliinissa, isopropanolissa ja alkoholeissa päättyen parafiiniin. Käytäntö leikkausnäytteiden kanssa vaihtelee. Normaalisti näytteet kiinnitetään yön yli puskuroidussa formaliinissa ja prosessoidaan parafiiniblokeiksi (parafiini Histolab) seuraavana päivänä. Poikkeuksena perjantaina saapuvat näytteet, jotka käyvät läpi normaalin ajon yön yli, mutta joutuvat joskus odottamaan käsittelyä 2-3 päivää formaliinissa.

2.2 Immunohistokemiallinen värjäys

Formaliinifiksoidut ja parafiiniin valetut kudospalat leikattiin mikrotomilla 3-4µm paksuisiksi leikkeiksi SuperFrost Plus laselle (Leica SM 2000R). Värjäämättömät leikkeet säilytettiin +4 asteessa. Immunohistokemiallisessa värjäyksessä parafiini poistettiin heksaanilla (3x5 minuuttia), etanolilla (2minuuttia) ja sen jälkeen kuivattiin. Antigeenien paljastus tehtiin Tris-EDTA puskurilla (pH 9, 95 °C

15 minuutin ajan, käytössä PT-Module). Immunohistokemiallinen värjäys toteutettiin automaattisesti (Autostainer 480, Labvision). Ki-67- antigeenin reaktiivisia osia vastaan käytettiin monoklonaalista Ki-67- vasta-ainetta (MIB-1) (laimennettu 1:500, Dako, DK-2600 Glostrup, Denmark). Verrattavina olleet paksuneulabiopsia ja sen vastaava leikkausnäyte värjättiin samassa erässä, jotta vältettäisiin mahdollinen vaihtelu eri värjäyserien välillä. Kontrollina käytettiin monikudosblokkia, jotta voitiin varmistua värjäyksen onnistumisesta.

2.3 Digitaalinen kuva-analyysi

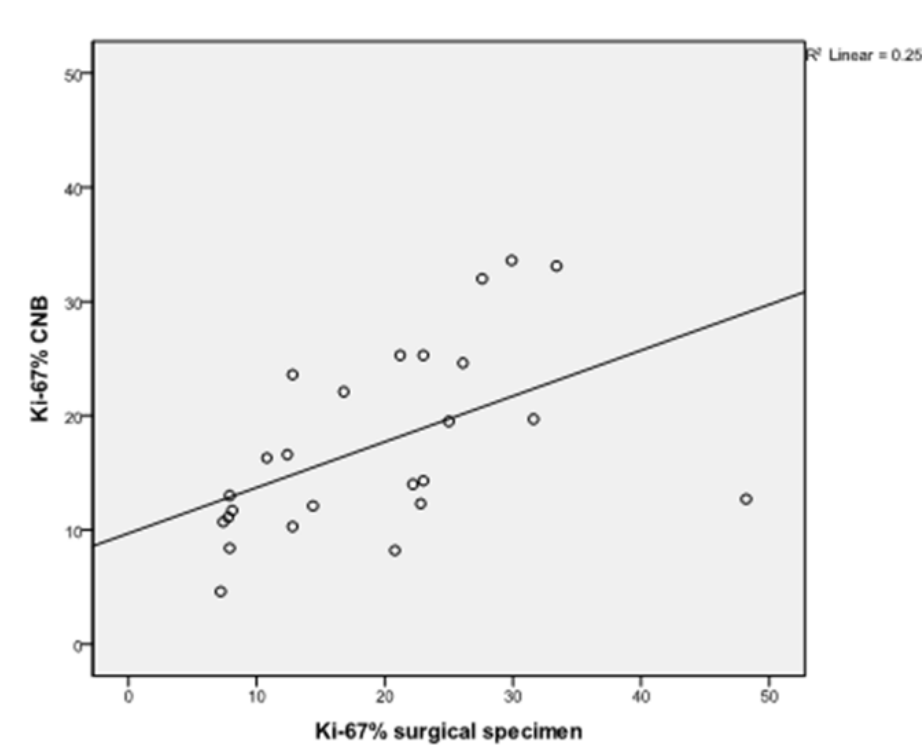
Värjäyksen jälkeen lasit analysoitiin. Analysointia varten otettiin kolme kuvaa jokaisesta näytteestä Olympus BX41 mikroskoopilla, joka oli varustettu 20x linssillä ja OptixCam 3 megapixel CCD Scion 1612C kameralla (Scion Corporation ,USA). Kuvat analysoitiin ImmunoRatio ohjelmistolla, joka määrittää positiivisesti värjäytyneiden pikseleiden määrän ja laskee Ki-67-indeksin (DAB-värjäytyneen pinta-alan verrattuna koko tuma-alueeseen) (18). Saatuja Ki-67 arvoja käytettiin tilastollisessa analyysissä.

Tilastollinen analyysi suoritettiin käyttämällä SPSS 19.0 for Windows- ohjelmistoa. Ki-67-indeksejä paksuneulabiopsian ja leikkausnäytteen välillä verrattiin. Lisäksi käytössä oli patologin diagnoosi hetkellä tekemät Ki-67- indeksi määritykset, joihin nyt värjäytyjen näytteiden Ki-67- indeksejä verrattiin. Korrelaatiota testattiin käyttämällä Pearsonin korrelaatiokerrointa.

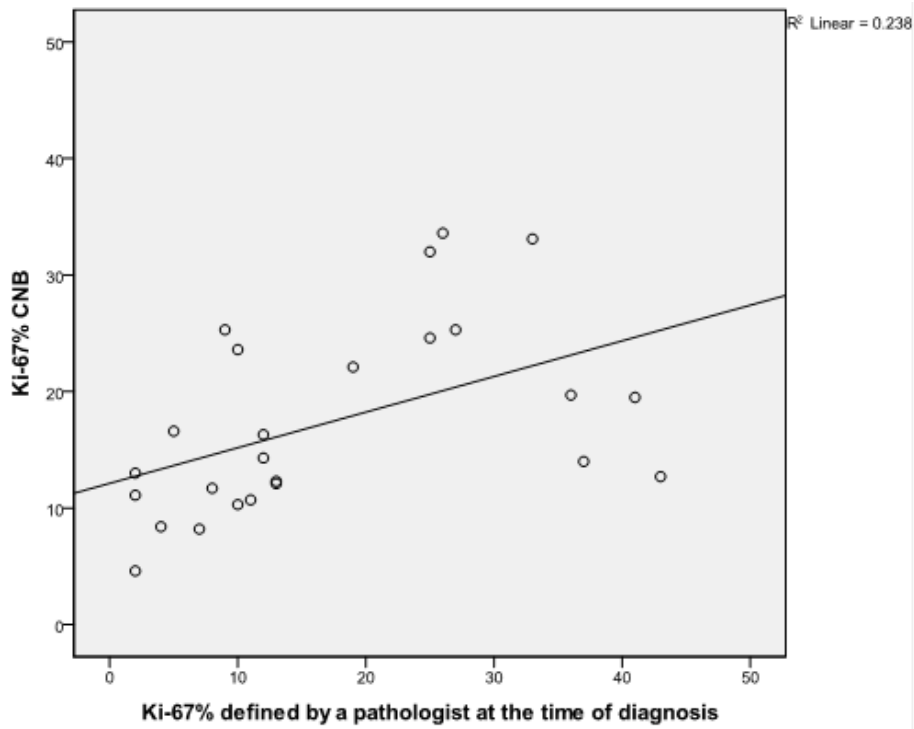
3 TULOKSET

Aineistomme käsitti 25 PNB ja leikkausnäyteparia, joiden Ki-67-indeksejä verrattiin keskenään. Paksuneulabiopsian (CNB) ja leikkausnäytteen (Surgical specimen) Ki-67 indeksien välille saatiin Pearsonin korrelaatiokertoimella kohtalainen korrelaatio (0,507) ja tulos on tilastollisesti merkitsevä ($p < 0.001$) (Taulukko 1.). Paksuneulabiopsiasta ja leikkausnäytteestä määritettyjä Ki-67- indeksejä verrattiin patologin diagnoosi hetkellä määrittämiin Ki-67 arvoihin. Paksuneulabiopsian Ki-67-indeksi korreloi patologin diagnoosi hetkellä määrittämän arvon kanssa kohtalaisesti 0,488 ($p < 0,05$) (Taulukko 2). Leikkausnäytteen Ki-67- indeksi korreloi hyvin patologin aiemmin määrittämän arvon kanssa 0,825 ($p < 0,01$) (Taulukko 3.).

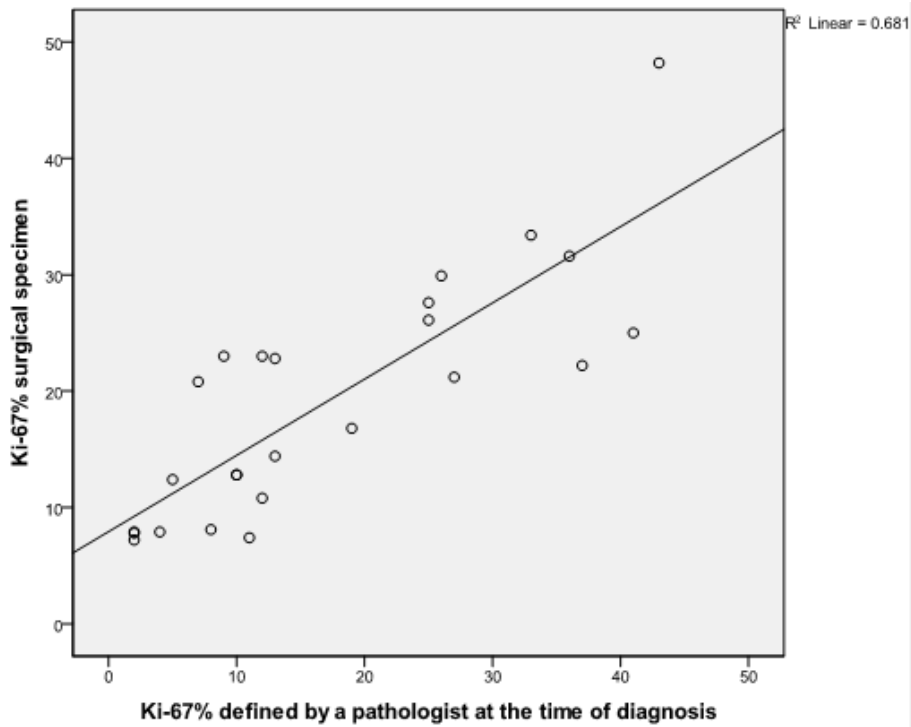
Taulukko 1. Ki-67-indeksin korrelaatio saman potilaan leikkausnäytteen ja paksuneulabiopsian välillä



Taulukko 2. Paksuneulabiopsiasta määritetty Ki-67-indeksi verrattuna patologin diagnoosihetkellä määrittämään Ki-67-indeksiin.



Taulukko 3. Leikkausnäytteen Ki-67-indeksi verrattuna patologin diagnoosihetkellä määrittämään Ki-67-indeksiin.



4 POHDINTA

Rintasyöpää diagnosoitaessa kasvaimesta määritetään useita ennustetekijöitä. Ki-67 antigeenin esiintyvyys kasvaimessa on yksi ennustetekijöistä. (2) Vertasimme tutkimuksessamme Ki-67 antigeenin värjäytyvyyttä saman potilaan paksuneulabiopsian ja leikkausnäytteen välillä. Tutkimuksessamme saimme leikkausnäytteen ja paksuneulabiopsian Ki-67 indeksin välille kohtalaisen korrelaation. Tulos on yhtenevä Ough ym ja Connor ym. saamien tutkimustulosten kanssa (14,15). Leikkausnäytteen Ki-67- indeksi korreloi hyvin patologin aiemmin määrittämän Ki-67-indeksin kanssa. Sen sijaan paksuneulabiopsian ja patologin diagnoosihetkellä määrittämän Ki-67-indeksin välillä oli vain kohtalainen korrelaatio.

Osalla potilaista paksuneulabiopsia saattaa olla ainoa näyte ennen syöpähoitojen aloittamista. Tällöin se vaikuttaa merkittävästi siihen minkälaista neoadjuvantti tai adjuvanttihoitoa potilas saa. Hyvin matala Ki-67 yhdistettynä pieneen kasvaimen kokoon, johtaa käytännössä sytostaattihoidoista pidättäytymiseen. Ki-67-indeksi vaikuttaa myös potilaan ennusteen arviointiin. (5,6)

Tutkimusaineistomme oli pieni ja käsitti vain 25 potilasta. Käytettävissämme ei myöskään ollut tietoa potilaiden mahdollisista neoadjuvanttihoidoista, jotka olisivat voineet vaikuttaa Ki-67 antigeenin ilmenemiseen kasvaimessa. Teoreettisesti syöpähoitot saattavat vaikuttaa kasvaimen hormonaalisten ja proliferatiivisten tekijöiden ilmenemiseen (16).

Näytteen värjäytyvyyteen vaikuttaa huomattavasti näytteen käsittely ennen värjäystä. Fiksaatioon vaikuttaa näytteen paksuus ja fiksaatioaika. Tutkimuksessamme paksuneulabiopsioiden käsittely on yhtäläisempää verrattuna leikkausnäytteisiin. Tietoa yksittäisten leikkausnäytteiden fiksaatioajoista ei ollut. Ne ovat mahdollisesti vaihdelleen riippuen siitä ovatko näytteet saapuneet laboratorioon viikonloppua vasten, jolloin niiden käsittely viivästyy. Paksuneulabiopsiat sen sijaan fiksoitiin välittömästi. Nämä tekijät ovat voineet vaikuttaa värjäytyvyyseroihin paksuneulabiopsian ja vastaavan leikkausnäytteen välillä.

Muita Ki-67- indeksiin vaikuttavia seikkoja prosessoinnin aikana on monia. Värjäys toteutettiin automaattisella laitteistolla, jolla saadaan minimoitua laboratoriossa työskentelevästä henkilöstä johtuvat mahdolliset virhelähteet värjäyksen aikana. Värjäyserien välillä oleva mahdollinen vaihtelu Ki-67 indeksissä oli poistettu värjäämällä paksuneulabiopsia ja leikkausnäyte samassa erässä. Värjäyksen onnistuminen oli varmistettu käyttämällä kontrollina monikudosblokkia.

Näytteistä otetut kuvat analysoitiin ImmunoRatio-ohjelmistolla, jonka käyttö on tutkimuksessa validoitu (18). Analyysia varten kuvat kasvainalueelta otti lääketieteen kandidaatti eikä kokenut patologi. Siinä on mahdollisesti voinut tulla arviointivirheitä.

Ki-67 indeksi korreloi kohtalaisesti saman potilaan rinnan paksuneulabiopsian ja leikkausnäytteen välillä. Aineistomme oli pieni (n=25), joten pitkälle meneviä johtopäätöksiä ei tämän tutkimuksen perusteella voi tehdä. Asia vaatii lisätutkimuksia suuremmilla potilasmäärillä ja potilaiden mahdollisten leikkausta edeltävien syöpähoitojen huomioonottamista.

5 VIITTEET

1. Syöpärekisteri. Saatavilla World Wide Webistä: <http://www-dep.iarc.fr/NORDCAN/FI/StatsFact.asp?cancer=180&country=246>
2. Terveyskirjasto. Rintasyöpä (diagnoosi ja seulonta). Saatavilla World Wide Webistä: <http://www.terveyskirjasto.fi/xmedia/hoi/hoi25030.pdf>
3. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *International Journal of Cancer*. 1983;31(1):13-20.
4. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody ki-67. *Journal of Immunology*. 1984;133(4):1710-1715.
5. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: Prognostic and predictive potential. *Lancet Oncology*. 2010;11(2):174-183.
6. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G, Jr, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: A meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer*. 2007;96(10):1504-1513.
7. Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstadter F, et al. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: Results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Research & Treatment*. 2013;139(2):539-552.
8. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: Prognostic and predictive potential. *Lancet Oncology*. 2010;11(2):174-183.
9. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, et al. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: Highlights of the st. gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. *Annals of Oncology*. 2011;22(8):1736-1747.
10. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: A collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Medicine / Public Library of Science*. 2010;7(5):e1000279.
11. Walker RA. Immunohistochemical markers as predictive tools for breast cancer. *J Clin Pathol*. 2008;61(6):689-696.
12. Nassar A, Radhakrishnan A, Cabrero IA, Cotsonis GA, Cohen C. Intratumoral heterogeneity of immunohistochemical marker expression in breast carcinoma: A tissue microarray-based study. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 2010;18(5):433-441.
13. Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol*. 2000;24(7):1016-1019.
14. Ough M, Velasco J, Hieken TJ. A comparative analysis of core needle biopsy and final excision for breast cancer: Histology and marker expression. *Am J Surg*. 2011;201(5):685-687.

15. Connor CS, Tawfik OW, Joyce AJ, Davis MK, Mayo MS, Jewell WR. A comparison of prognostic tumor markers obtained on image-guided breast biopsies and final surgical specimens. *Am J Surg.* 2002;184(4):322-324.
16. Railo M, Nordling S, Krogerus L, Sioris T, von Smitten K. Preoperative assessment of proliferative activity and hormonal receptor status in carcinoma of the breast: A comparison of needle aspiration and needle-core biopsies to the surgical specimen. *Diagn Cytopathol.* 1996;15(3):205-210.
17. Ricci MD, Calvano Filho CM, Oliveira Filho HR, Filassi JR, Pinotti JA, Baracat EC. Analysis of the concordance rates between core needle biopsy and surgical excision in patients with breast cancer. *Rev Assoc Med Bras.* 2012;58(5):532-536.
18. Tuominen VJ, Ruotoistenmaki S, Viitanen A, Jumppanen M, Isola J. ImmunoRatio: A publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and ki-67. *Breast Cancer Research.* 2010;12(4):R56.