

## مطالعه همبستگی بین نکروز با میزان آنژیوژنز و پروليفراسیون در مدل

### زنوگرافت هتروتاپیک سرطان پستان

ساناز ریسمانچی<sup>۱</sup>، احد محمدنژاد<sup>۱</sup>، صمد محمدنژاد<sup>۱</sup>، محمدعلی عقابیان<sup>۲</sup>، فریبا صادقی‌فاضل<sup>۳</sup>، مهناز حدادی<sup>۴</sup>،

نرجس شرکت‌خامنه<sup>۲</sup>، سعید امانپور<sup>۱\*</sup>

#### چکیده

سرطان پستان یکی از مهمترین سرطان‌های زنان بوده و همه ساله در دنیا، تعداد کثیری از بیماران جان خود را بر اثر این بیماری از دست می‌دهند. امروزه پژوهش‌های پایه‌ای و کاربردی در زمینه سرطان‌ها بسیار گسترش یافته و سرطان پستان نسبت به سایر بدخیمی‌ها در این زمینه پیشتاز می‌باشد. تمام داروهای جدید ضد سرطان قبل از ورود به مرحله کارآزمایی‌های بالینی، می‌بایست مراحل فاز *in vitro* و *in vivo* را با موفقیت پشت سر بگذرانند. هدف این مطالعه، ارزیابی اعتبار مدل زنوگرافت سرطان پستان هتروتاپیک از نظر همبستگی بین درصد نکروز با میزان آنژیوژنز و ضریب پروليفراسیون می‌باشد. ۱۰ سر موشهای برهنه بدون تیموس (*Athyimic nude mice*) ماده ۸-۶ هفته انتخاب و رده سلولی BT-474 بصورت زیر جلدی دو طرفه تلقیح گردیدند، پس از ۴۰ روز از تومورهای حاصله، در اسلایدهای H&E، میزان نکروز و در اسلایدهای IHC با مارکرهای CD34 و Ki-67 میزان آنژیوژنز و پروليفراسیون بدست آمده و همبستگی بین آنها تعیین شد. نتایج نشان داد که بین درصد نکروز و درصد پروليفراسیون همبستگی مثبت معنی‌داری وجود داشته است ( $p < 0.001, r = 0.90$ ). همچنین این همبستگی مثبت معنی‌دار، بین نکروز و آنژیوژنز برقرار است ( $p < 0.001, r = 0.93$ ). نتایج این مطالعه به اعتبار بخشی به مدل سرطان پستان هتروتاپیک کمک نموده و به پژوهشگران این امکان را فراهم می‌سازد که برای ارزیابی پاسخ کامل پاتولوژیک (*pathologic complete response*) در فاز پیش بالینی، مدلی با قابلیت تعمیم‌پذیری بالایی در اختیار داشته باشند.

واژگان کلیدی: سرطان پستان؛ مدل زنوگرافت؛ نکروز؛ آنژیوژنز؛ پروليفراسیون

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۲

#### مقدمه

سرطان پستان یکی از مهمترین سرطان‌های زنان بوده و همه ساله تعداد کثیری از زنان در سراسر دنیا جان خود را بر

اثر این بیماری از دست می‌دهند (۱). در بروز سرطان پستان عوامل خطر (*Risk Factor*) متعددی نقش داشته، بطوریکه موتاسیون مادرزادی ژن‌های *BRCA-1* و *BRCA-2* از عوامل خطر بالا (*High risk*) محسوب شده و سبک زندگی و رژیم غذایی از عوامل خطر پائین (*low risk*) به‌شمار می‌آیند (۱۱ و ۶). امروزه برای تعیین استراتژی درمان سرطان پستان از عوامل پیش‌آگهی (*Prognostic factors*) و عوامل پیش‌بینی (*Predictive factors*) بیماری استفاده می‌نمایند (۵). سه پارامتر میزان نکروز، میزان آنژیوژنز و ضریب پروليفراسیون، در کنار سایر پارامترها از عوامل مؤثر در پیش‌آگهی بیماری به‌شمار می‌روند. در سرطان پستان انسان نشان داده شده است که هر سه پارامتر مذکور با درجه بدخیمی رابطه دارند (۱۷ و ۱۴، ۱۳، ۳). امروزه پژوهش‌های پایه‌ای و کاربردی در زمینه سرطان‌ها بسیار گسترش یافته و سرطان پستان نسبت به سایر بدخیمی‌ها در این زمینه پیشتاز می‌باشد. بر طبق راهبردهای (*Guide line*) مجامع معتبر علمی، تمام داروهای جدید ضد سرطان قبل از ورود به مرحله کارآزمایی‌های بالینی، می‌بایست مراحل فاز *in vitro* و *in vivo* را با موفقیت پشت سر بگذرانند. یکی از مهمترین دغدغه‌های محققان در حوزه پژوهش سرطان‌ها، تعمیم‌پذیری نتایج *in vitro* و *in vivo* به انسان بوده و همیشه این بیم وجود دارد که نتوان نتایج حاصله از مدل‌های تجربی سرطان‌ها را به انسان تعمیم داد (۱۰ و ۸).

\*۱- مرکز تحقیقات مدل‌های سرطان استیتو کانسر ایران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران (Saeidamanpour@yahoo.com)

۲- مرکز تحقیقات علوم و تکنولوژی در پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی تهران، تهران، ایران

۳- مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، حصارک کرج، تهران، ایران

۴- مرکز تحقیقات بهداشت باروری و لیغصر (عج)، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی تهران، تهران، ایران

رده سلولی به استروژن، پلت آهسته رهش استرادیول بصورت زیر جلدی در بدن موش‌ها کاشته شد. برای هر موش،  $5 \times 10^6$  سلول به صورت هتروتایپیک به همراه ژل تجاری بستر خارج سلولی در دو پهلو چپ و راست حیوان تلقیح گردید. ۴۰ روز بعد موش‌ها آسان کشی شده و تومورهای حاصله در داخل فرمالین - بافر ۱۰٪ به آزمایشگاه پاتولوژی ارسال شد. از ۲۰ تومور القاء شده، ۱۴ تومور رشد کرده بودند (نگاره ۱).



نگاره ۱- نمائی از مدل زنوگرافت هتروتایپیک سرطان پستان که بصورت زیر جلدی ایجاد شده است

در ظرف کمتر از ۴۸ ساعت آماده سازی بافتی انجام و اسلایدهای هیستوپاتولوژی با رنگ آمیزی H&E از آنها تهیه و مورد مطالعه قرار گرفتند. در هر ۱۴ مورد، داکتال کارسینومای تهاجمی با گرید پاتولوژیکی III مورد تأیید قرار گرفت. بلوک‌ها کد گذاری شده و به آزمایشگاه ایمونوهیستوشیمی ارسال شدند. از بلوک‌ها مقاطعی به اندازه ۴ میکرون تهیه و با آنتی‌بادی‌های CD34 و Ki-67 بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده (Dako دانمارک) مجاورت گردید و پس از رنگ‌آمیزی زمینه، اسلایدهای ایمونوهیستوشیمی تهیه شد. اگرچه تاکنون هیچ مارکر که بتواند میزان واقعی آنژیوژن را نشان بدهد، معرفی نشده است، اما با این حال مارکر CD34 قادر است علاوه بر شناسائی عروق خونی، تا حدودی عروق لنفی را نیز ایمونوراکتیو می‌کند.

در موش‌های برهنه فاقد تیموس (*Athymic nude mice*) بطور مادرزادی ژن *Fox-I* در آنها جهش یافته و در نتیجه بخش قشری تیموس تشکیل نمی‌شود. چنین موش‌هایی فاقد ایمنی سلولی بوده و دیگر قدرت پس زدن پیوند (*Graft rejection*) را ندارند. این ویژگی منحصر بفرد، سبب شده است که سلول‌های سرطانی انسان در بدن آنها بخوبی رشد کند. در مدل تومورهای زنوگرافت، سلول‌های بدخیم انسانی خصوصیات ژنوتیپی خود را حفظ نموده و از اینرو مجامع معتبر علمی، فاز پیش‌بالینی داروهای ضد سرطان را در مدل تومورهای زنوگرافتی مجاز دانسته‌اند. با این حال لازم است مرتباً اعتبار (*Validity*) این مدل‌های ارزیابی گردد. هدف از اجرای این مطالعه، ارزیابی اعتبار مدل زنوگرافت سرطان پستان هتروتایپیک از زاویه دیگر بوده و همچنین پاسخ به این سوال که در مدل زنوگرافت سرطان پستان، همبستگی و همپوشانی نتایج بررسی بین این سه مورد تا چه حدی است.

## مواد و روش کار

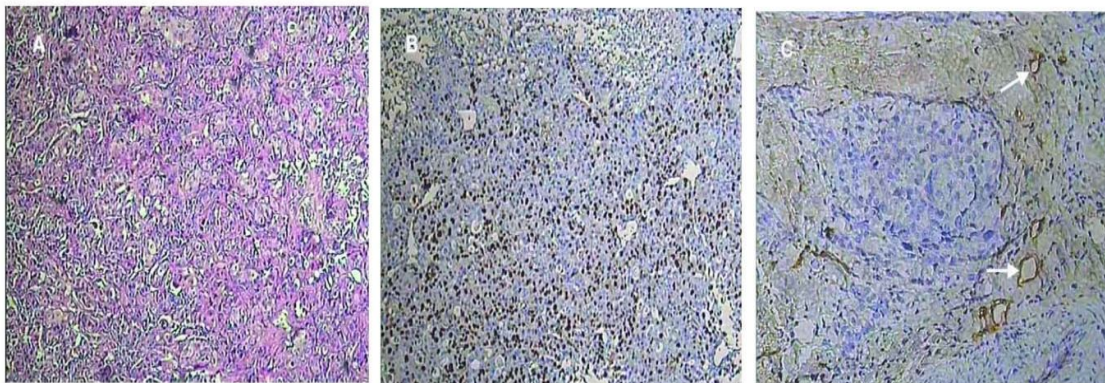
این مطالعه از نوع تجربی بوده و در تمام مراحل تحقیق، اصول اخلاق کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی مراعات گردیده است. القاء تومورها در آزمایشگاه کاشت تومورهای تجربی واقع در مجتمع بیمارستانی امام خمینی تهران انجام شده و مطالعات آسیب‌شناسی آنها در آزمایشگاه سرطان‌های تجربی مرکز تحقیقات سرطان انستیتو کانسر ایران صورت گرفت. در این مطالعه ۱۰ سر موش برهنه فاقد تیموس ماده ۸-۶ هفته با زمینه ژنتیکی *BALB/c* انتخاب و در قفس‌های استریل فیلتردار - *Microisolator* نگهداری شدند. آب و غذای استریل به شکل *ad libitum* در دسترس موش‌ها قرار گرفت. رده سلولی *BT-474* (رده سلولی جدا گردیده از سرطان پستان انسان با زیر گروه مولکولی *luminal-B*) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران (*NCBI*) تهیه و در محیط کشت *RPMI-1640* تکثیر داده شد. بدلیل وابستگی رشد این

آن اسلاید در نظر گرفته شد. ارزیابی پرولیفراسیون توسط مارکر Ki-67 انجام شد. ۱۰۰۰ سلول اپی تلیالی در ۱۰ فیلد تصادفی شمارش شده و نسبت هسته‌های ایمونوراکتیو، درصد پرولیفراسیون آن اسلاید منظور شد. به منظور ارزیابی همبستگی میزان نکروز با ضریب پرولیفراسیون و آنژیونز، از آزمون آنالیز رگرسیون خطی استفاده شد. سطح معنی‌دار برابر با ۰/۰۵ تعریف گردید و تجزیه و تحلیل‌های آماری با نرم‌افزار *Biostat 2008*<sup>®</sup> انجام شد.

### نتایج

مطالعه هیستوپاتولوژی در اسلایدهای H&E، درصد نکروز را از ۴۵-۶ (میانگین برابر ۲۶/۰۷٪) نشان دادند در حالیکه درصد پرولیفراسیون در اسلایدهای IHC از ۵۹-۱۷ گزارش شد (میانگین برابر ۳۳٪). از طرفی تعداد آنژیونز در این مطالعه از ۱۶ تا ۵۷ متغیر بوده و میانگین آن ۳۸/۱۸ بود. (نگاره ۲).

مطالعات میکروسکوپی در حالت دو سو کور و دوبار در زیر میکروسکوپ نوری انجام شد. برای ارزیابی میزان نکروز در اسلایدهای H&E، ۱۰ فیلد تصادفی در بین بخش اپی تلیالی تومور انتخاب و در درشت‌نمایی ۴۰۰ برابر، تصاویر دیجیتالی تهیه و با استفاده از نرم‌افزار *ACDSee Photo Manager 12*<sup>®</sup>، تصاویر در ۱۰۰ خانه مدرج شده و نسبت بخش نکروز به بخش غیر نکروز در هر اسلاید مشخص شد. برای ارزیابی آنژیونز از روش سنجش تراکم عروق کوچک (*MVD*) استفاده گردید. بدین نحو که مقاطع برش یافته با آنتی‌بادی *CD34* رنگ‌آمیزی شدند. در زیر میکروسکوپ و با درشت‌نمایی ۴۰۰ برابر، ۴ نقطه پرعروق (*Hot spot*) در نظر گرفته شده و سپس در درشت‌نمایی ۴۰۰ برابر، تمام اندوتلیال‌های رنگ گرفته شمارش گردیدند. در شمارش اندوتلیال‌های بدون جداره عروقی دقت شد که سلول‌های نکروزه، اندوتلیال کاذب محسوب نشوند. میانگین عدد بدست آمده بعنوان تراکم عروق کوچک (*MVD*)



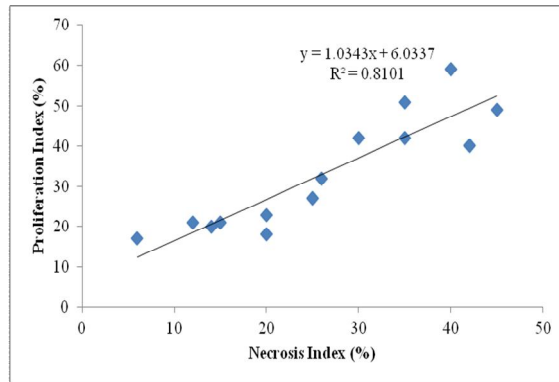
نگاره ۲- میکروگراف‌های مدل زئوگرافت هتروتاپیک سرطان پستان؛ A: رنگ‌آمیزی H&E، سلول‌های توموری بشدت پلئومورف بوده ضریب میتوز در آنها بالا است. همچنین نواحی متعدد نکروز در بین سلول‌های توموری مشاهده می‌شود. B: رنگ‌آمیزی IHC با مارکر Ki-67، هسته‌های ایمونوراکتیو نشانگر آغاز چرخه سلولی در سلول‌های بدخیم می‌باشد. C: رنگ‌آمیزی IHC با مارکر CD34، نوک پیکان‌ها نشانگر عروق اندوتلیالی ریز بوده و در بافت بستره توموری دیده می‌شوند.

آنالیز آماری نتایج این مطالعه نشان داد که بین درصد نکروز و درصد پرولیفراسیون همبستگی مثبت معنی‌داری وجود دارد ( $p < 0.001$ ,  $r = 0.90$ ). (نمودار ۱).

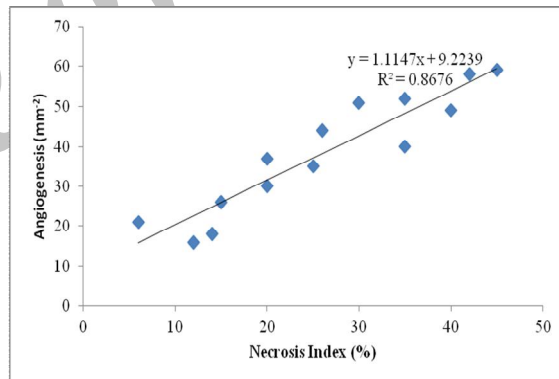
باشند که بتوان در مورد تعمیم‌پذیری نتایج از مدل به انسان قضاوت نمود (۷).

بیش از سه دهه است که مؤسسه ملی سرطان ایالات متحده آمریکا (NCI)، استفاده از مدل زئونگرافتی تومورها را برای فاز پیش‌بالینی داروهای جدید ضد سرطان توصیه نموده و اغلب داروهای ضد سرطان برای ورود به مرحله کارآزمایی بالینی، می‌بایست مدارک اثربخشی بر روی مدل‌های زئونگرافتی را ارائه نمایند. *RS-Kerbel* در سال ۲۰۰۳؛ برای توسعه و بهبود مدل‌های زئونگرافتی تومورها در فاز پیش‌بالینی داروهای ضد سرطانی، پیشنهادهای ارزنده‌ای ارائه نمود (۱۵). مدل‌های سرطانی زئونگرافتی، در دو مدل ارتوتاپیک و هتروتاپیک ایجاد شده و هر کدام مزایا و معایب خاصی دارند. اگرچه مدل‌های ارتوتاپیک از اعتبار بالایی نسبت به مدل‌های هتروتاپیک برخوردارند (۱۵)، اما مشکلات تکنیکی در القاء تومور و همچنین مونیتورینگ دشوار این مدل، باعث شده که رغبت پژوهشگران به مدل‌های هتروتاپیک بیشتر شود.

در این مطالعه، مدل هتروتاپیک سرطان پستان داکتال کارسینومای تهاجمی با زیر گروه مولکولی *luminal-B* ایجاد شد. رده سلولی *BT-474* در سال ۱۹۷۵ از افیوژن پلورال یک زن ۶۰ ساله مبتلاء به سرطان پستان با نوع بافت‌شناسی داکتال کارسینومای تهاجمی با *Grade III* و *Stage IV* جدا گردید و بعنوان نماینده سرطان پستان ( $HER-2^+$ ,  $ER^+$ ) محسوب می‌شود (۴). در این مطالعه همبستگی بین نکروز با آنژیوژن و نکروز با پرولیفراسیون ارزیابی شد. *Kerebel* ۲۰۰۸؛ مسیرهای دقیق آنژیوژن در تومورها را بطور دقیق تبیین نمود (۹). در سرطان‌هایی که سلول‌های بدخیم از سرعت رشد بالایی برخوردارند، در بخش‌های تومور ایسکمی رخ داده و در نتیجه نکروزهای متعددی در تومورها دیده می‌شود. از سوئی بر اثر القاء هیپوکسی در سلول‌های توموری، یک سلسله مسیرهای آبخاری فعال شده و در انتها



نمودار ۱- همبستگی بین نکروز با پرولیفراسیون توموری، نمودار نشانگر همبستگی بین درصد نکروز و ضریب پرولیفراسیون در مدل زئونگرافت هتروتاپیک سرطان پستان از طرفی این همبستگی مثبت معنی‌دار بین نکروز و آنژیوژن مشاهده می‌شود ( $p < 0.001$ ,  $r = 0.93$ ). (نمودار ۲).



نمودار ۲- همبستگی بین نکروز و آنژیوژن توموری، نمودار نشانگر همبستگی بین درصد نکروز و میزان آنژیوژن در مدل زئونگرافت هتروتاپیک سرطان پستان

## بحث

امروزه پژوهش‌های ترجمه‌ای (*Translational research*) در سرطان‌ها به بخشی از مطالعات محققان تبدیل شده و هدف از چنین مطالعاتی، اعتباربخشی به مدل‌ها و تکنیک‌ها می‌باشد (۸). مدل‌های سرطانی و درمان‌های تجربی بر روی آنها باید آنقدر از مدارک متکی بر شواهد (*Evidence bases*) قوی برخوردار

مرکز جناب آقای دکتر کاظم زنده‌دل تشکر و قدردانی می‌نمایند.

## REFERENCES

- 1- Andic, S., Karayurt, O. (2012): Determination of information and support needs of first degree relatives of women with breast cancer. *Asian. Pac. J. Cancer. Prev.* 13(9): 4491-9.
- 2- Burcombe, R., Wilson, G.D., Dowsett, M., Khan, I., Richman, P.I., Daley, F., Detre, S., Makris, A. (2006): Evaluation of Ki-67 proliferation and apoptotic index before, during and after neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer. *Breast. Cancer. Res.* 8(3): R31.
- 3- Cochet, A., Pigeonnat, S., Khoury, B., Vrigneaud, J.M., Touzery, C., Berriolo-Riedinger, A., Dygai-Cochet, I., Toubeau, M., Humbert, O., Coudert, B., Fumoleau, P., Arnould, L., Brunotte, F. (2012): Evaluation of breast tumor blood flow with dynamic first-pass 18F-FDG PET/CT: comparison with angiogenesis markers and prognostic factors. *J. Nucl. Med.* 53(4): 512-20.
- 4- Engel, L.W., Young, N.A. (1978): Human breast carcinoma cells in continuous culture: a review. *Cancer Res.* 38(11 Pt 2): 4327-39.
- 5- Georgescu, R., Coroş, M.F., Stolnicu, S., Podeanu, D., Sorlea, S., Roşca, A., Copotoiu, C. (2012): Prognostic factors in breast cancer. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi.* 116(1): 262-7.
- 6- Gompel, A., Santen, R.J. (2012): Hormone therapy and breast cancer risk 10 years after the WHI. *Climacteric.* 15(3): 241-9.
- 7- Hilsenbeck, S.G., Clark, G.M.J. (1993): Surrogate endpoints in chemoprevention of breast cancer: guidelines for evaluation of new biomarkers. *Cell. Biochem. Suppl.* 17G: 205-11.
- 8- Kreipe, H.H. (2012): [Translational research and diagnostics for breast cancer]. *Pathologie.* 12.
- 9- Kerbe, Robert, S. (2008): Tumor Angiogenesis. *N. Engl. J. Med.* 358: 2039-2049.
- 10- Lin, T.Y., Zhang, H., Wang, S., Xie, L., Li, B., Rodriguez, CO, Jr, de, Vere, White, R., Pan, CX. (2011): Targeting canine bladder transitional cell carcinoma with a human

فاکتورهای آنژیوژنیک آزاد می‌شود. در نهایت رگ‌زائی‌های جدید، سبب تأمین مایحتاج فعالیت‌های متابولیکی سلول‌های توموری خواهد شد (۱۳). از طرفی افزایش آنژیوژنز، رابطه مستقیمی با پروليفراسيون سلول‌های توموری دارد (۱۸ و ۱۶). *Diest* و همکاران ۲۰۰۴؛ در یک مطالعه مروری، ارزیابی پروليفراسيون با *Ki-67* را در پیش‌آگهی سرطان پستان مثبت ارزیابی کردند (۱۴). همچنین *Tollefson* و همکاران ۲۰۰۷؛ در یک تحقیق به بررسی ارتباط بین *Ki-67* با نکروز انعقادی در *Clear cell renal cell carcinoma* پرداخته و نتیجه گرفته‌اند که با افزایش *Ki-67* میزان نکروز هم افزایش می‌یابد (۲۰). قبلا *Tan* و همکاران ۲۰۰۵؛ به نتایج مشابهی در سرطان پستان دست یافته بودند که نتایج *Tollefson* و همکاران همسو با نتایج این مطالعه بود (۱۹). در این مطالعه همبستگی بین نکروز با آنژیوژنز و نکروز با پروليفراسيون معنی‌دار بود، بنابراین از این منظر نیز اعتبار این مدل سرطان پستان هتروتاپیک به اثبات می‌رسد و می‌تواند مدل مناسبی برای ارزیابی *Pathologic complete response* (PCR) در مرحله پیش بالینی محسوب شود. در حال حاضر ارزیابی PCR یکی از شاخص‌های مهم در میزان پاسخ‌دهی به درمان‌ها بخصوص در شیمی‌درمانی *Neoadjuvant* به‌شمار می‌آید (۱۲ و ۲). نتایج این مطالعه به اعتبار بخشی به مدل سرطان پستان هتروتاپیک کمک نموده و به پژوهشگران این امکان را فراهم می‌سازد که برای ارزیابی PCR در مرحله پیش بالینی، مدلی با قابلیت تعمیم‌پذیری بالایی در اختیار داشته باشند.

## تشکر و سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی تهران و همچنین از ریاست محترم مرکز تحقیقات سرطان، انستیتو کانسر - دانشگاه علوم پزشکی تهران؛ جناب آقای دکتر محمدعلی محقق و قائم مقام آن

- 27; 10(1): 9.
- 11- Lipworth, L., Sonderman, J.S., Tarone, R.E., McLaughlin, J.K. (2012): Review of epidemiologic studies of dietary acrylamide intake and the risk of cancer. *Eur. J. Cancer. Prev.* 21(4): 375-86.
  - 12- Marinovich, M., Sardanelli, F., Ciatto, S., Mamounas, E., Brennan, M., Macskill, P., Irwing, Von, Minckwitz, G., Houssami, N., (2012): Early prediction of pathologic response to neoadjuvant therapy in breast cancer: systematic review of the accuracy of MRI. *21(5): 669-77.*
  - 13- Miller, Bryan.P., Schneider, Kathy, D. (2005): Angiogenesis of Breast Cancer. *J. Clin. Onco.* 1 23: 1782-1790.
  - 14- Pvan Diest, J., Van, E., Wall, D., Baak, J.P.A. (2004): Prognostic value of proliferation in invasive breast cancer: a review. *J. Clin. Pathol.* 57(7): 675-681.
  - 15- R Kerbel, S. (2003): Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived-but they can be improved. *Cancer. Biol. Ther.* 2(4 Suppl 1): S. 134-9.
  - 16- Schroder, C.P., Moons, K.G., de Vries, E.G. (2011): Targeted therapy: the benefit of new oncological tests. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 155(45): A. 4089.
  - 17- Stasik, C.J., Davis, M., Kimler, B.F., Fan, F., Damjanov, I., Thomas, P., Tawfik, ow. (2011): Grading ductal carcinoma in situ of the breast using an automated proliferation index. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 41(2): 122-30
  - 18- Subik, K., Lee, J.F., Baxter, L., Strzepek, T., Costello, D., Crowley, P, Xing .L., Hung, M.C., Bonfiglio, T., Hicks, D.G., Tang, P. (2010): The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Line. *Breast Cancer (Auckl).* 20; 4: 35-41.
  - 19- Tan, P.H., Bay, B.H., Yip, G., Selvarajan, S., Tan, P., Wu, J., Lee, CH., Li, KB. (2005): Immunohistochemical detection of Ki67 in breast cancer correlates with transcriptional bladder cancer-specific ligand. *Mol. Cancer. regulation of genes related to apoptosis and cell death. Mod. Pathol.* 18(3):374-81.
  - 20- Tollefson, M.K., Thompson, R.H., Sheinin, Y., Lohse, C.M., Cheville, J.C., Leibovich, B.C., Kwon, E.D. (2007): Ki-67 and coagulative tumor necrosis are independent predictors of poor outcome for patients with clear cell renal cell carcinoma and not surrogates for each other. *Cancer.* 15; 110(4): 783-90.