

## MİDENİN BENİGN İLE MALİGN LEZYONLARININ AYIRIMI VE MALİGN LEZYONLARIN TİP TAYİNİNDE p53 VE Ki-67'NİN ÖNEMİ\*

Mehmet Reşat ÖZERCAN

Ahmet BOZ

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Elazığ – TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 27.04.1999

**Importance of p53 and Ki-67 in Differential Diagnosis of Malign and Benign Lesions and in Determination of Histological Types of Malign Lesions in the Stomach**

### Summary

Mutations of p53 gene, which is one of the tumor suppressor genes, are the most common genetic abnormalities detected in human tumors. Ki-67 antigen, a proliferation marker, is a non-histon nuclear protein which is present in all phases of the cell cycle apart from G0. In this study, p53 protein accumulation and Ki-67 labelled index in specimens of benign lesions and carcinomas of the stomach were immunohistochemically investigated by using Labelled Streptavidin-Biotin (LSAB) Peroxidase method. While there was no staining of p53 in normal mucosa and benign lesions, positive staining were detected in 23 (48%) out of carcinoma cases. Proliferative activity determined by Ki-67 was significantly higher in carcinomas than gastritis cases ( $p<0.001$ ). Ki-67 positivity was also higher in p53 positive carcinomas compared to the carcinomas without p53 staining ( $p<0.005$ ).

As a result, it was considered that the determination of p53 protein accumulation in immunohistochemical application might not be useful for stomach carcinoma diagnosis when used alone. It was also observed that Ki-67 labelling index in the differential diagnosis of benign and malign lesions and Ki-67 determination together with p53 assay in determination of tumors with high proliferative activity might be utilized.

**Key Words:** Stomach, carcinoma, gastritis, p53, Ki-67

### Özet

Tümör süpressör genlerden birisi olan p53 genindeki mutasyonlar birçok insan tümöründe saptanan en yaygın genetik bozukluklardır. Bir proleferasyon belirleyicisi olan Ki-67 antigeni hücre siklusunun Go dışındaki tüm fazlarında hücrede bulunan bir non-histon nükleer proteindir. Bu çalışmada, Labelled Streptavidin-Biotin (LSAB) Peroxidase yöntemi kullanılarak, midenin benign lezyonları ile karsinomlarına ait materyallerde p53 protein birikimi ve Ki-67 işaretleme indeksleri immünohistokimyasal olarak incelendi. Normal mukoza ve benign lezyonlarda p53 ile boyanma gözlenmezken, karsinom olgularının 23'ünde (%48) pozitif boyanma saptandı. Ki-67 ile belirlenen proliferatif aktivite, gastritlere oranla karsinomlarda ( $p<0.001$ ) ve p53 ile boyanmayan karsinoma oranla boyananlarda anlamlı derecede daha yüksekti ( $p<0.005$ ).

Sonuç olarak, immünohistokimyasal uygulama sonucu p53 protein birikiminin belirlenmesinin, tek başına mide karsinomu tanısı için pek yararlı olamayacağı; Ki-67 işaretleme indeksinin ise, benign ile malign lezyonların ayrılmasında ve p53 ile birlikte kullanıldığında yüksek proliferatif aktiviteye sahip tümörlerin belirlenmesinde yararlı olabileceği sonucuna varıldı.

**Anahtar kelimeler:** Mide, karsinom, gastrit, p53, Ki-67.

### Giriş

p53 geni 17. kromozomun kısa (p) kolunda lokalize (1-9), tümör baskılayıcı genlerden birisidir (1-12). Mutasyona uğramış p53 gen ürünü oldukça stabildir, yarılanma ömrü uzamıştır ve immünohistokimyasal olarak saptanabilecek düzeylerde birikir (1,6,10-12).

Ki-67 antigeni bir proliferasyon belirleyicisi olup, hücre siklusunun Go dışındaki tüm fazlarında hücrede bulunan bir non-histon nükleer proteindir ve immünohistokimyasal olarak kolayca saptanır (13-15). Ki-67 ve PCNA indekslerinin hücre proliferasyonunun morfolojik özellikleri ile korele

\* Bu çalışma Fırat Üniversitesi Araştırma Fonu (FÜNAF) Müdürlüğü tarafından 268 nolu proje olarak desteklenmiştir.

olduğu ve artmış proliferasyon oranı ile p53 gen bozuklukları arasında doğru bir orantı bulunduğu belirtilmektedir (15).

Bu çalışmadaki amaç; midenin benign ve malign lezyonlarının ayırımı, mide kansinomlarının olağan prognostik belirleyicileri ile p53 gen ürünü protein birikimi ve Ki-67 indeksleri arasındaki ilişkinin önemini belirlemektir.

### Materyal ve Metot

Bu çalışmada, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına 1992-1998 yılları arasında gelen materyallerden seçilen 48 mide kansinomu ile 49 gastrit olgusuna ait fomalinde tespit edilmiş parafine gömülmüş doku örnekleri incelendi.

Her bloktan elde edilen 5 µm'lik kesitler jelatin ile kaplanmış lamlara alındı. Bir gece oda ısısında bekletilen lamlar, ksilolde deparafinize edildi, azalan derecelerdeki alkol serilerinden ve distile sudan geçilerek rehidrate edildi. Daha önce kaynama noktasına kadar ısıtılmış 10 mM Citrat Buffer, pH 6.0 taze solüsyonu içeren kapalı, basınçlı bir ortamda (düdüklü tencere), vanalar açık olarak 4 dakika ve vanalar kapatılarak 1 dakika süreyle kaynatıldı. Oda sıcaklığına gelen lamlara, dokuyu örtecek miktarda, Tris-HCl buffer (TBS) içinde hazırlanmış %0.1'lik Trypsin solüsyonu damlatıldı ve dokunun büyüklüğüne bağlı olarak 10 ile 15 dakika süreyle tutuldu. Sonra, sırasıyla, % 3'lük Hydrogen Peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), primer antikör veya negatif kontrol kitleri ile Peroxidase Link ve Streptavidin (Peroxidase Conjugated) solüsyonları 10'ar dakika süreyle uygulandı. Daha sonra TBS ile hazırlanmış ve %0.02'lik hydrogen peroxide içeren 1mg/ml DAB chromogen (DAKO Corporation, 6392 Via Real, Carpinteria, CA 93013 ABD) solüsyonu damlatıldı ve 5 dakika süreyle inkübe edildi. Basamaklar arasında lamlar TBS içinde dikkatlice yıkandı ve TBS banyosuna kondu. DAB chromogen'den sonra lamlar distile suda yıkandı ve Hematoksilin'de 30 saniye süreyle tutularak zıt boyama sağlandı. Alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek DPX ile kapatıldı. İşlemler sırasında dokuların kurummasına izin verilmedi ve dokular sürekli nemli tutuldu.

p53 için primer antikör olarak DO-7, Prediluted Mouse Anti-Human p53 Protein ile Negatif Kontrol (DAKO Corporation, 6392 Via Real, Carpinteria, CA 93013 USA); Ki-67 için ise primer antikör olarak Rabbit Anti-Human Ki-67 Antigen ve Negatif Kontrol (DAKO Corporation, 6392 Via Real, Carpinteria, CA 93013 ABD) kitleri kullanıldı. Boyanan her seride, p53 ekspresyonu ettiği bilinen, insan epidermoid kansinomuna ait bir adet p53 pozitif

kontrol preparatı (DAKO Corporation, 6392 Via Real, Carpinteria, CA 93013 USA) dahil edildi.

Hazırlanan tüm preparatlar ışık mikroskopunda değerlendirildi. p53 antikoru için, olgudaki epitel hücrelerinin %5' inden fazla olan nükleer boyanma pozitif kabul edildi. Ki-67 işaretleme indeksi (İİ); her bir olgu için 5-6 büyük büyüme alanında 1000 epitel hücresi sayılarak, pozitif boyanma gösteren nükleusların toplam nükleuslara oranı şeklinde belirlendi ve % olarak değerlendirildi.

p53 pozitifliği için  $\chi^2$  testi; olgu sayısının az olduğu durumlarda Yates düzeltilmeli Fisher exact testi uygulandı. Ki-67 indeks karşılaştırmaları One Way ANOVA (MINITAB 10.0 Windows; IBM) testi ile yapıldı. 0.05'ten küçük p değeri anlamlı kabul edildi.

### Bulgular

Karsinom olguları 17 kadın ve 31 erkek, gastrit olguları ise 17 kadın ve 32 erkekten oluşuyordu. Yaş ortalamaları karsinom olgularında 59.2 (30-82), gastrit olgularında ise 51.8 (25-75) yıl olarak hesaplandı.

Karsinomlara ait ortalama çap 6.8 (1.5-13) cm olarak bulundu; histopatolojik özellikler tablo 1'de özetlendi. Lauren sınıflandırmasına göre mikroskopik olarak 48 karsinom olgusunun 30'u (%62.5) intestinal tip ve 18'i (%37.5) diffüz tip karsinom olarak tanımlandı. Histopatolojik olarak olguların çoğu (%43.7) kötü diferansiye idi (Tablo 1). Toplam 28 olguda (%58.3) komşu mukozada intestinal metaplazi (İM), 25 olguda (%52.1) gastrit saptandı. Ayrıca ikisi şiddetli olmak üzere, 11 olguda (%22.9) displazi belirlendi.

Gastrit olgularının %67.3'ü kronik atrofik gastrit, geriye kalanlar kronik yüzeysel gastrit idi. Yirmioç olguda aktivite ve 14 olguda İM görüldü. Üç olguda (%6.1) dispazi belirlendi ve kronik atrofik gastrit ile birlikteydi (Tablo 2).

Karsinom olgularının %47.9'unda pozitif p53 immünreaktifliği saptandı (Tablo 1). Boyanma hem tümörler arasında hem de aynı tümör içinde bölgeler arasında farklı yoğunluklardaydı. Negatif kontrollerin hiçbirinde pozitif boyanma saptanmadı. Kuvvetli boyanan olgular yanısıra, boyanma genellikle hafif veya orta derecede homojen nükleer reaktiflik şeklinde görüldü (Şekil 1). Lauren sınıflandırmasına göre intestinal tip tümörlerin %40.0'ında ve diffüz tip tümörlerin %61.1'inde p53 protein birikimi saptandı (Tablo 1). Gastrit olgularının hiçbirisinde pozitif boyanma saptanmadı.



**Tablo 1.** Mide kansinomlarında p53 pozitifliği ve Ki-67 indeksleri ile klinik ve histopatolojik özelliklerin karşılaştırılması.

		Toplam olgu Sayısı (%)	p53 pozitif olgu sayısı (%)	Ki-67 İİ %
Cinsiyet:	Kadın	17 (35.4)	7 (41.2)	25.2
	Erkek	31 (64.6)	16 (51.6)	25.0
<b>Toplam</b>		<b>48 (100)</b>	<b>23 (47.9)</b>	<b>25.1</b>
Yaş:	<60	24 (50.0)	13 (54.2)	24.2
	>60	24 (50.0)	12 (50.0)	26.2
Tümör çapı.*	< 5cm	5 (25.0)	3 (60.0)	17.8
	>5cm	15 (75.0)	7 (46.7)	16.7
Yerleşme yeri:*	Kardia	-	-	-
	Korpus	4 (20.0)	3 (75.0)	19.2
	Antrum	11 (55.0)	5 (45.5)	21.4
	Tüm mide	5 (25.0)	2 (40.0)	17.1
Makroskopik tip*	Polipoid/vegetan	2 (10.0)	1 (50.0)	17.3
	Ülseratif	5 (25.0)	2 (40.0)	19.1
	Ülsero-vegetan	9 (45.0)	5 (55.6)	19.5
	İnfiltratif	4 (20.0)	2 (50.0)	16.8
Histolojik tip:	İntestinal	30 (62.5)	12 (40.0)	29.4
	Diffüz	18 (37.5)	11 (61.1)	20.3
Diferansiyasyon Derecesi:	İyi	13 (27.1)	5 (38.5)	38.5
	Orta	14 (29.2)	7 (50.0)	30.0
	Kötü	21 (43.7)	11 (52.4)	19.0
Evre:*	I	-	-	-
	II	9 (45.0)	4 (44.4)	17.0
	III	8 (40.0)	4 (50.0)	20.0
	IV	3 (15.0)	2 (66.7)	19.2
Lenf düğümü Tutulumu:*	Var	11 (55.0)	6 (54.5)	19.8
	Yok	9 (45.0)	4 (44.4)	10.0

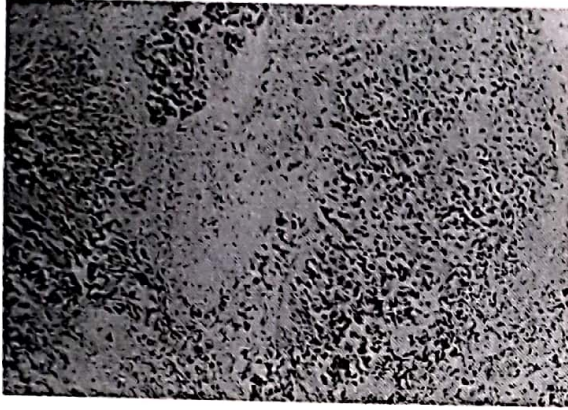
\*20 gastrektomi olgusuna ait değerler.

İİ: İşaretleme indeksi.

**Tablo 2.** Gastrit olgularına ait klinik ve histopatolojik özellikler ile Ki-67 indeksleri.

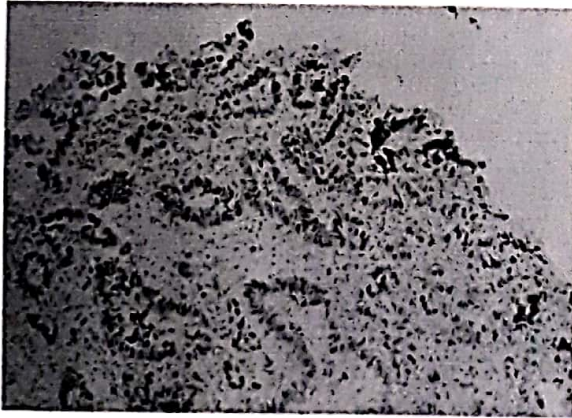
		Olgu Sayısı (%)	Ki-67 İİ, %
Cinsiyet	Kadın	17 (34.7)	8.3
	Erkek	32 (65.3)	7.3
<b>Toplam</b>		<b>49 (100)</b>	<b>7.6</b>
Yaş	<50	23 (46.9)	7.1
	>50	26 (53.1)	8.0
Alınma yeri	Korpus	6 (12.3)	6.2
	Antrum	38 (77.5)	8.1
	Her ikisi	5 (10.2)	7.9
Histopatolojik tanı	Kronik yüzeyel astit	16 (32.7)	7.4
	Kronik atrofik gastrit	33 (67.3)	7.9
Eşlik eden lezyonlar	Aktivite	23 (46.9)	9.1
	İntestinal metaplazi	14 (28.6)	8.8
	Displazi	3 (6.1)	11.0

İİ: İşaretleme indeksi.



Şekil 1. Adenokarsinom olgusunda kuvvetli p53 protein boyanması. P53x100

Ki-67 antijeni ile nükleer boyanma pozitif kabul edildi (Şekil 2). Karsinom olguları için belirlenen toplam Ki-67 İİ %25.1 (2.8-56.2) olarak saptandı (Tablo 1). Ki-67 indeksleri intestinal tip karsinomlarda %29.4 (6.7-56.2) ve diffüz tiplerde %20.3 (2.8-44.3) olarak belirlendi, ancak aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi. Gastrit olgularında Ki-67 antijeni ile pozitif nükleer boyanma genellikle mukoza kriptlerinin boyun ve istmus alanlarına lokalize idi. Ki-67 İİ yüzeysel ve atrofik gastritler için, birbirine yakın değerler olarak, sırasıyla, %7.9 (1.8-19.2) ve %7.4 (2.2-16.6) olarak belirlendi.



Şekil 2. Adenokarsinom olgusunda Ki-67 antijen boyanması. Ki-67x100

Olgular benign ve malign olarak karşılaştırıldıklarında, Ki-67 İİ'leri, sırasıyla %7.6 (1.8-19.2) ve %25.1 (2.8-56.2) olup, aralarında ileri derecede anlamlı farklılık saptandı ( $p < 0.001$ ). Benzer şekilde p53 boyanmasına göre pozitif ile negatif olgular kıyaslandığında indeksler, sırasıyla, %32.0 (8.5-56.2) ve %11.2 (2.8-22.7) olarak belirlendi. Aralarındaki fark anlamlıydı ( $p < 0.005$ ; Tablo 3).

Tablo 3. Karsinom ile gastrit ve p53 pozitifliğine göre karsinomların Ki-67 İndeksleri. İİ: İşaretleme indeksi.

	Ki-67 İİ, %	P değeri
Histopatolojik tanı		
Karsinom	25.1±16.8	< 0.001
Gastrit	7.6±4.2	
P53 pozitifliğine göre		
Pozitif	32.0±15.7	< 0.005
Negatif	11.2±7.9	

### Tartışma

Mide kanseri, dünyanın birçok yerinde farklı sıklıklarda olmasına karşın, halen dünyada en sık karşılaşılan kanserlerden birisidir (1,16,17). Erkeklerde kadınlardan iki kat fazla görülmektedir (16). Genellikle 50 ve daha ileri yaşlarda saptanmaktadır (16-19). Çalışmamızda karsinom hastalarının 2/3'ü erkek olup, geriye kalanlar kadınlardan oluşmaktadır. Aralarında ülkemizin de bulunduğu birçok ülkede mide kanserleri ileri evrelerde saptanmaktadır (16-20). Çalışmamızda karsinom olgularının %55'i III ve IV. Evrelerde olup, %55'i lenf düğümü ve/veya uzak metastaz göstermekteydi (Tablo 1).

Birçok çalışmada mide karsinomlarında saptanan p53 protein birikimi %4-64 arasında değişmektedir (11). Bazı çalışmalarda p53 protein aşırı ekspresyonu ile hastanın prognozu arasında ters bir ilişki olduğu belirtilmektedir (4). Çalışmamızda karsinom olgularının %48'inde p53 immünreaktifliği saptandı. Çok farklı sonuçlar bildirilmesine karşın, bu çalışmanın sonuçları birçok çalışmada saptananlarla uyumludur (1,2,6,8,12). Bazı yayınların tersine çalışmamızda p53 protein birikimi, intestinal tip karsinomlara göre, diffüz tiplerde daha fazla gözlemlendi, ancak aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamadı (Tablo 1) (6,11). Bu bulgu ileri sürülen aksine, p53'ün sadece intestinal tip mide karsinomlarında rol oynadığı teziyle uyumsuzdur. Zira p53'ün diffüz tip karsinomlarda da etkili bir rol oynayabileceği muhtemeldir.

Makroskopik görünüm, yerleşme yeri, tümör çapı ve tümör evresi ile p53 protein ekspresyonu arasında, bazıları sınırda da olsa, anlamlı ilişki saptayan çalışmalar olmasına karşın, çalışmamızda hastanın yaşı, cinsiyeti ve tümör çapı, makroskopik görünümü, midedeki yerleşme yeri ve diferansiyasyonu ile p53 protein ekspresyonu arasında anlamlı ilişki bulunamadı (1,7). Kakeji ve ark.'nın (22), p53 protein aşırı ekspresyonu ile lenf düğümü metastazı arasında anlamlı ilişki olduğunu



belirtmelerine karşın, çalışmamızda lenf düğümü ve/veya uzak metastaz yapan ve yapmayan olgular arasında fark bulunamadı (Tablo 1). Benzer sonuç birçok araştırmacı tarafından da bildirilmektedir (2,11,12).

Çalışmamızda, Ki-67 indeksleri açısından karsinomlar ile gastrit olguları karşılaştırıldıklarında, aralarında anlamlı farklılık bulunmaktadır ( $p < 0.001$ ; Tablo3). Hem karsinom hem de gastrit olgularında Ki-67 indeksleri arasında yaş ve cinsiyete göre anlamlı farklılık saptanmazken, gastrit gurubunda aktivite, İM veya displazinin varlığı, sonucu etkilemedi. Oya ve ark.'nın (23), Ki-67 yüksek indeksleri ile lenf düğümü metastazı yada damar invazyonu arasında yakın bir ilişki saptamalarına karşın, çalışmamızda karsinom olgularında tümör çapı, yerleşme yeri, makroskopik ve mikroskopik tip, diferansiyasyon derecesi, evre yada lenf düğümü

metastazı ile Ki-67 indeksleri arasında anlamlı farklılık bulunamadı (Tablo 1). Bununla beraber p53 pozitifliğine göre karsinom olguları kıyaslandığında, p53 pozitif tümörler ile negatifler arasında anlamlı farklılık mevcut olup, p53 pozitifliği ile Ki-67 indeksi arasında doğru bir orantı bulundu ( $p < 0.005$ ; Tablo 3). Bu da Kakeji ve arkadaşlarının (22) bulgularını desteklemektedir. Buna dayanarak, p53 pozitif boyanan tümörlerin daha yüksek proliferatif aktiviteye sahip oldukları söylenebilir.

Sonuç olarak, immünohistokimyasal uygulama sonucu p53 protein birikiminin belirlenmesinin, tek başına mide karsinomu için pek yararlı olamayacağı; Ki-67 işaretleme indeksinin ise, benign ile malign olguların ayrılmasında ve p53 ile birlikte kullanıldığında yüksek proliferatif aktiviteye sahip tümörlerin belirlenmesinde yararlı olabileceği sonucuna varıldı.

### Kaynaklar

1. Starzynska T, Markiewski M, Domagala W, et al. The clinical significance of p53 accumulation in gastric carcinoma. *Cancer* 1996; 77(10): 2005-2012.
2. Joypaul BV, Hopwood D, Newman EL, et al. The prognostic significance of the accumulation of p53 tumour-suppressor gene protein in gastric adenocarcinoma. *Br J Cancer* 1994; 69: 943-946.
3. Seruca R, David L, Holm R, et al. P53 mutations in gastric carcinomas. *Br J Cancer* 1992; 65: 708-710.
4. Martin HM, Filipe MI, Morris RW, et al. P53 expression and prognosis in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 1992; 50: 859-862.
5. Motojima K, Furuji J, Kohara N, et al. Expression of p53 protein in gastric carcinomas is not independently prognostic. *Surgery*, 1994; 116(5): 890-895.
6. Fukunaga M, Monden T, Nakanishi H, et al. Immunohistochemical study of p53 in gastric carcinoma. *Anatomic Pathology* 1994; 101(2): 177-180.
7. Brito MJ, Williams GT, Thompson H, et al. Expression of p53 in early (T1) gastric carcinoma and precancerous adjacent mucosa. *Gut* 1994; 35: 1697-1700.
8. Starzynska T, Bromley M, Ghosh A, et al. Prognostic significance of p53 overexpression in gastric and colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 1992; 66 (3): 558-562.
9. Joypaul BV, Vojtesek B, Newman EL, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for p53 in gastrointestinal malignancy: comparison with immunohistochemistry. *Histopathology* 1993; 23: 465-470.
10. Joypaul B, Newman EL, Hopwood D, et al. Expression of p53 protein in normal, dysplastic, and malignant gastric mucosa: An immunohistochemical study. *J of Pathology* 1993; 170: 279-283.
11. Hurlimann J and Saraga EP. Expression of p53 protein in gastric carcinomas. *Am J Surg Pathol* 1994; 18 (12): 1247-1253.
12. Müller W and Borchard F. Prognostic influence of p53 expression in gastric cancer. *J of Pathology* 1996; 178: 255-258.
13. Nakamura S, Akazawa K, Yao T, et al. Primary gastric lymphoma. A clinicopathologic study of 233 cases with special reference to evaluation with the MIB-1 index. *Cancer* 1995; 76(8): 1313-1324.
14. Maehara Y, Yamamoto M, Oda S, et al. Cytokeratin-positive cells in bone marrow for identifying distant micrometastasis of gastric cancer. *Br J Cancer* 1996; 73: 83-87.
15. Cote RJ and Taylor CR. Immunohistochemistry and related marking techniques. In: Damjanov I and Linder J. Editors. *Anderson's pathology 10<sup>th</sup> ed.* St Louis Mosby-Year Book Inc 1996; 157-158.
16. Rosai J. *Ackerman's Surgical Pathology*. 8<sup>th</sup> ed. St Louis Mosby-Year Book Inc 1996; 616-666.
17. Lechago J and Genta RM. Stomach and duodenum. In: Damjanov I and Linder J. Editors. *Anderson's pathology*. 10<sup>th</sup> ed. St Louis Mosby-Year Book Inc 1996; 1661-1707.
18. Crawford JM. The gastrointestinal tract. Schoen FJ. Editor. *Robbins pathologic basis of disease*. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia. WB Saunders Company 1994; 767-783.

19. Williams GT. The stomach: developmental and inflammatory conditions. In: McGee JOD, Isaacson PG, Wrigth NA Editors. Oxford textbook of pathology. Oxford. Oxford University Press 1992; 1149-1164.
20. Karaayvaz M, Kocaoğlu H, Demirci S. Mide kanserleri. Ünal A. Editor. Klinik cerrahi onkoloji. Ankara. Ortadoğu Reklam Tamtım ve Yayıncılık AŞ 1997; 468-478.
21. Gabbert HE, Müller W, Schneiders A, et al. The relationship of p53 expression to the prognosis of 418 patients with gastric carcinoma. Cancer 1995; 76 (5): 720-726.
22. Kakeji Y, Korenaga D, Tsujitani S, et al. Gastric cancer with p53 overexpression has high potential for metastasising to lymph nodes. Br J Cancer 1993; 67: 589-593.
23. Oya M, Yao T, Nagai E, et al. Metastasizing intramucosal gastric carcinomas. Well differentiated type and proliferative activity using Proliferative Cell Nuclear Antigen and Ki-67. Cancer 1995; 75(4): 926-935.