

PCNA (PROLİFERATING CELL NUCLEAR ANTİGENE) IMMUNOHİSTOKİMYASAL BOYANMASI VE AgNORs' UN MEME KARSİNOMUNDA PROGNOZU BELİRLEMEDEKİ ROLÜ

Dr. Kemal BAKIR (*), Dr. Nilgün KAPUCUOĞLU (*), Dr. H. Dilek BÜLBÜL (*)

ÖZET: PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigene) Immunohistokimyasal Boyanması ve AgNORs'un Meme Karsinomunda Prognozu Belirlemedeki Rolü. Proliferatif bir belirleyici olan PCNA'nın meme karsinomlarında prognozu belirlemedeki rolü tartışmalıdır. Bu çalışmada invaziv duktal karsinom tanısı alan, evre I, II, 9-48 ay arası takipleri olan 34 olguda PCNA pozitifliği, oranı ve AgNORs değerlerinin lenf düğümü tutulumu, nüks ve/veya uzak metastaz ile ilişkisi araştırıldı. Ayrıca bu yöntemlerin mitoz, histolojik grade ile ilişkileri de değerlendirildi. "ROC" eğrisi ile değerlendirilen AgNORs sayısı lenf nodu tutulumu, nüks ve/veya uzak metastazı, belirlemede iyi bir parametre değildir. PCNA pozitifliği % 5'ten fazla olan olguların ortalama AgNORs değeri % 5'ten az olan olgulardan daha yüksektir ($p < 0.05$). PCNA pozitifliği / oranı ve AgNORs değeri lenf düğümü tutulumu ve klinik gidişi belirlemede başarılı parametreler olarak bulunmamışlardır.

ANAHTAR KELİMELEER: Meme karsinomu, PCNA, AgNORs, prognostik faktörler.

SUMMARY: Prognostic Significance of PCNA Immunostaining and AgNORs in Breast Carcinoma. PCNA is a proliferative marker and its role in predicting the prognosis of breast carcinoma is controversial. Thirty four stage I, II, Invasive ductal carcinomas which have 9-48 months follow-up are included in this study. The relation between PCNA immunoreactivity, its ratio and AgNORs counts are evaluated. The significance of AgNORs counts in predicting the lymph node status, recurrences and/or metastasis is estimated by the "ROC" curve. No correlation is found between these parameters. Patients whose tumors express more than 5 % immunoreactivity or PCNA have AgNORs counts more than AgNORs counts of the group whose PCNA immunoreactivity is less than 5 % ($p < 0.05$). PCNA immunoreactivity, its rate and AgNORs counts are not good parameters for estimation of lymph node status and disease progression.

KEY WORDS: PCNA, AgNORs, breast carcinoma, prognostic factors.

PCNA ve AgNORs'un İnvaziv Duktal Karsinomda Prognostik Değeri:

Prognozu oldukça değişken olan meme karsinomu, dünyada kadınlar arasında en sık görülen malignitedir. Cerrahi tedaviden sonra düşük ve yüksek riskli hasta gruplarını belirlemek için pek çok prognostik parametre ortaya konmuştur (1-3). En iyi prognostik belirleyici aksiller lenf düğümü tutulumunun olup olmamasıdır. Klasik olarak kabul edilen diğer prognostik parametreler ise tümör boyutu, histolojik ve nükleer grade, hormonal reseptörlerin durumudur (1). Günümüzde tümör hücrelerinin proliferatif aktivitesinin belirlenmesinin tümör progresyonu ve prognozunu belirlemede yararlı olabileceğine dair veriler vardır (2-8). Meme kanserlerinde proliferatif aktivite çeşitli yöntemlerle incelenmiştir. PCNA immunoreaktivitesinin değerlendirilmesi, AgNORs ve mitoz sayımı da bu yöntemler arasındadır.

PCNA/siklin 36 kilodalton ağırlığında, DNA polimeraz deltaya yardımcı, DNA sentez ve replikasyonunda rol alan nükleer bir proteindir. PCNA ekspresyonu G₁ fazında artmaya başlar, erken S fazında en yüksek düzeyine erişir, G₂ boyunca düşer ve M fazı ile, çoğalmayan hücrelerde en düşük düzeydedir (2, 8-11).

NORs birlikte olduğu proteinlerle, rRNA transkripsiyonundan sorumlu DNA segmentleridir. NORs'la ilgili proteinlerin arjiofilik özellikleri nedeniyle klasik yöntemlerle hazırlanan kesitlerde görülüp, sayılabilirler. Bu nükleik asit-protein komplekslerinin fonksiyonları kesin olarak bilinmemekle birlikte hücre proliferasyonu ile ilgili olduklarına dair veriler mevcuttur (12-15).

Bu çalışmada PCNA pozitifliği ve yoğunluğunun, lenf düğümü tutulumu, histolojik grade, nüks ve/veya uzak metastazla ilişkisi, ayrıca bu marker'ın mitoz ve AgNORs sayısı gibi diğer proliferatif belirleyiciler ile ilişkisi de araştırıldı.

MATERYAL VE METOD

S.B. Ankara Onkoloji Hastanesi Patoloji bölümü'nde 1988-1989 yıllarında invaziv duktal karsinom tanısı alan, modifiye radikal veya radikal mastektomi yapılan, AJCC'ye göre evre I ve II, 9-48 ay arası takibi olan 34 olgu bu çalışmaya dahil edildi. Lenf düğümü tutulumu patoloji raporlarından, nüks ve/veya metastazlarının olup, olmadığı ise hasta dosyalarına bakılarak öğrenildi.

Araştırmacıların ikisi tarafından histolojik kesitlerden tekrar mitoz ve grade değerlendirildi (16).

Dilüye poly-L-lysine (Sigma) ile kaplı adezivli lamlara alınan 4-5 μ kalınlığındaki kesitler, 60°C etüvde 30 dakika deparafinize edildi. Kesitler ksilola alındı, ardından alkolden geçirilerek dehidratasyon işlemi yapıldı. % 3'lük H₂O₂'de 10 dakika tutularak endojen peroksit aktivitesi bloke edildi. 4 oranında deiyonize su ile dilüye edilmiş olan antijen retrival solüsyonuna (ağır metal içerir, BioGenex) alınan kesitler 5 dakika süre ile mikrodalga fırında maksimum güçte ısıtıldı. 5 dakika sonunda solüsyon düzeyine bakıldı, azalmışsa deiyonize su ile tamamlandı ve 5 dakika daha mikrodalga fırında aynı işlem tekrarlandı. Mikrodalga fırından çıkarılan cam kapaktaki preparatlar 15 dakika solüsyon içinde soğumaya bırakıldı. Preparatlar deiyonize su ile yıkanıp PBS'e (pH = 7-6) alındı. Kesitler PCNA monoklonal antikor (mouse, IgM, 19A2 BioGenex) ile oda ısısında, nemli ortamda, 2 saat inkübe edildi. Boyanma işlemine alkalen fosfataz konjuge biyotin streptavidin (APB-SA) süpersensitif, dilüye kit ile tarrife uygun olarak devam edildi. Kromojen olarak "naphthol phosphate" substratta dilüye edilen fast red tabletleri kullanıldı. Zıt boyama Mayer's hematoksileni ile yapıldı.

Rutin olarak hazırlanan parafin bloklardan 4-5 μ kalınlığında kesitler elde edildi. Preparatlar etüv ve kesilende deparafinize edildikten sonra sırasıyla alkol ve deiyonize sudan geçirilerek dehidrate edildi.

AgNORs boyama solüsyonu, önce 2 ayrı solüsyon şeklinde hazırlandı: 100 ml deiyonize suya 1 gr/dl olacak şekilde formik asid eklendi. Bu karışım içine 2 gr jelatin katılarak manyetik karıştırıcıda 15 dakika kadar ısıtılıp karıştırıldı.

* Ankara Onkoloji Hastanesi Patoloji Bölümü Baş Asistanı

TABLO 1 : OLGULARIN EVRE VE KLİNİK GİDİŞE GÖRE DAĞILIMI

Evre	LD (+)	LD (-)	Toplam	nüks / met (+)	nüks / met (-)
I	-	5	5	1	4
II	23	6	29	12	17
	23	11	34	13	21

Soğumaya bırakıldı.

50 gr/dl olacak şekilde gümüş nitrat, deiyonize su ile karıştırıldı.

Jelatinli solüsyondan 1 volüm, gümüş nitratlı solüsyondan 2 volüm alınıp, birbiriyle karıştırılarak, çalışma solüsyonu elde edildi. Çalışma solüsyonu, lam üzerindeki kesitlere damlatıldı. Daha sonra preparatlar deiyonize suda çalkalanarak yıkandı. Kesitler alkol ve bunu takiben ksilenden geçirilerek dehidrate edildi. Zıt boyama yapılamadı. Sentetik balsem ile kapatıldı.

PCNA ile boyamayı değerlendirmek için önce x40 büyütme ile en çok boyanmanın olduğu alan bulundu ve bu alandan başlanarak x400 büyütme ile birbirini izleyen 10 alanda yaklaşık 1000 hücre nükleusu sayıldı ve pozitif boyanan nükleus oranı elde edildi. Boyanma yoğunluğu ve şekline bakılmaksızın boyanan tüm nükleuslar pozitif kabul edildi.

Nükleusta siyah-koyu kahverengi olarak izlenen Ag-NORs kümeleri x100 immersiyon objektifi ile rastgele 100 hücrede sayıldı. Birbirinden net olarak ayrılmış olan Ag-NORs benekleri dikkate alınarak sayım yapıldı, ortalama alındı.

Verilerin istatistiksel analizinde ki-kare, Fisher'in kesin ki-kare, Mantel- Huanzel ki-kare, Mann-Whitney U testi, Krus-

TABLO 2 : AgNORs ORTALAMALARI VE DİĞER PARAMETRELER ARASINDAKİ İLİŞKİLER

	Ortalama	std. sapma	hasta sayısı	p
Tüm grup	2.59	0.76	32	
grade 1	2.59	0.78	13	
grade 2	2.68	0.75	15	0.70
grade 3	2.27	0.82	4	
PCNA < % 5	2.43	0.74	24	0.03
PCNA > % 5	3.08	0.61	8	
PCNA (-)	2.29	0.68	11	
PCNA (+)	2.75	0.77	21	
Mitoz düşük	2.53	0.80	27	0.19
Mitoz yüksek	2.92	0.42	5	
Mitoz 1	2.64	0.71	21	
Mitoz 2	2.14	1.03	6	0.11
Mitoz 3	2.92	0.42	5	
LD (-)	2.69	0.78	11	0.53
LD (+)	2.54	0.76	21	
Nüks (-)	2.47	0.75	20	0.28
Nüks (+)	2.78	0.77	12	
Met (-)	2.47	0.75	20	0.28
Met (+)	2.78	0.77	12	

kal-Wallis testi, "relative operating characteristics (ROC)" ve Kappa uyum analizi kullanıldı.

SONUÇLAR

Otuz dört olgunun evrelere ve klinik gidişe göre dağılımı tablo-1'de gösterilmiştir.

Nüks ve uzak metastaz ortaya çıkan evre II olguların 11'inde aksiller lenf düğümü tutulumu vardır. Nüks ve uzak metastaz ortaya çıkmayan 17 olgunun ise 12'sinde aksiller lenf düğümü tutulumu izlenirken, 5'inde aksiller lenf düğümü tutulumu yoktur.

34 olgunun 14'ü grade I, 16'sı grade II, 4'ü grade 3'tür.

Grade değerlendirilirken incelenen parametrelerden biri olan mitoz ayrıca incelendiğinde (1=0-5 mitoz, 2 = 6-10 mitoz, 3 = >11 mitoz / 10 büyük büyütme alanı) olguların 22'si 1. gruba, 7'si 2. gruba, 5'i 3. gruba girmiştir. Mitoz oranı yüksek ve düşük olarak değerlendirildiğinde ise grup 1 ve 2 düşük oranlı grubu, grup 3 ise yüksek oranlı grubu oluşturmıştır.

PCNA ile pozitif boyanma zemin artefaktı olmaksızın sadece nükleer olarak görülmüştür. Ancak bazı mitotik hücrelerde intrasitoplazmik boyanma da görülmüştür. PCNA boyanma indeksi iki farklı şekilde değerlendirilmiştir. Boyanma var veya yok olarak değerlendirilme yapıldığında olguların 13'ünde boyanma görülmemiş. 21'inde boyanma görülmüştür. % 5 oranından daha az boyanma negatif, % 5'ten fazla boyanma pozitif olarak kabul edildiğinde ise 34 olgunun 26'sında negatif, ancak 8'inde pozitif boyanma görülmüştür. PCNA ile boyanma oranı % 0 ile % 39 arasında değişmektedir.

AgNORs boyama yöntemi uygulanabilen (blokta tümör dokusu kalan) 32 olguda en düşük ve yüksek AgNORs değerleri sırasıyla 1.47 ve 3.90'dır. Ortalama 2.59 ve standart sapması ise 0.76'dır. Median 2.5'dir. Olguların 17'si mediandan yüksek, 15'i düşük AgNORs değerine sahiptir.

AgNORs değerinin lenf düğümü tutulumu ve nüks ve/veya uzak metastazı belirlemedeki performansı bilinen bir eşik değeri olmadığı için "ROC" eğrisi çizdirilerek test edilmiştir. Lenf düğümü tutulumunu belirlemede başarısız bir testtir, nüks ve/veya uzak metastazı belirlemede daha başarılı olsa da pek uygun bir test değildir.

AgNORs ortalama değeri ile histolojik grade, mitoz, lenf düğümü tutulumu, nüks ve/veya uzak metastaz arasında istatistiksel olarak (mann-Whitney U, Kruskal-Wallis testi) anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (p>0.05). Ancak PCNA pozitifliği % 5'ten fazla olan olgularda AgNORs ortalama değeri daha yüksektir (p<0.05, p = 0.03) (Tablo 2).

AgNORs median değeri ile yapılan istatistiksel incelemelerde bu parametrelerle arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. PCNA boyanması lenf düğümü tutulumu nüks ve/veya uzak metastaz, mitoz oranı, histolojik grade arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p>0.05) (Tablo 3).

Kappa uyum analizi yapıldığında PCNA değerleri, AgNORs sayısı ve mitoz arasında istatistiksel olarak anlamlı bir uyum bulunmamıştır (Tablo 4).

PCNA değerleri ve mitoz sayısı da AgNORs değerleri gibi lenf düğümü tutulumunu, nüks ve/veya uzak metastaz olasılığını belirlemede sensitivite ve spesifitesi düşük yöntemlerdir.

TARTIŞMA

Meme kansinomunda proliferatif aktivite ölçümünün prognostik önemi vardır. Tümörün proliferatif aktivitesinin ölçü-

TABLO 3 : PCNA BOYANMASI VE DİĞER PARAMETRELER ARASINDAKİ İLİŞKİ

	p	PCNA (-)	PCNA (+)	PCNA< %5	PCNA> %5	P
LD +	0.88	9	14	18	5	0.72
LD -		4	7	8	3	
Nüks/met (+)	0.48	4	9	10	3	0.86
Nüks/met (-)		9	12	16	5	
Grade 1	0.26	7	7	12	2	0.42
Grade 2		5	11	11	5	
Grade 3		1	3	3	1	
AgNORs < 2.5	0.17	7	8	13	2	0.15
AgNORs > 2.5		4	3	11	6	
Mitoz <	0.35	12	17	23	6	0.33
Mitoz >		1	4	3	2	
Mitoz 1	0.24	10	12	17	5	0.59
Mitoz 2		2	5	6	1	
Mitoz 3		1	4	3	2	

münde akım sitometrisi (DNA içeriği ve S-faz reaksiyonu), radyoizotopla işaretli nükleotidler ve hücre siklusuyla ilgili proteinlerin ekspresyonu kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin çoğunun rutin kullanımı zordur.

PCNA, DNA replikasyon ve onarımında yer alan, daha çok S-faza spesifik kabul edilen nükleer bir proteindir (3,5).

Formalin fikse dokulara uygulanabilmesi, arşiv materyali üzerinde çalışma yapılmasına olanak sağlamaktadır. Yapılan çalışmalarda bazı tümörlerde prognostik bir belirleyici olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (17,18). Ancak meme karsinomlarında prognozu belirlemedeki rolü tartışmalıdır.

Meme karsinomlarında yüksek PCNA aktivitesinin, yüksek histolojik grade, DNA aneuploidisi, yüksek S-faz fraksiyonu, yüksek oranda Ki-67 aktivitesi, yüksek mitotik aktivite ile ilişkisi olduğunu, prognozu belirlemede yardımcı bir parametre olabileceğini ileri süren yayınlar vardır (3,5,19,21,22). Ancak bu parametrelerle PCNA aktivitesinin ilişkisinin olmadığını belirten yayınlar da vardır (2,8,9,17,20).

Lenf düğümü tutulum olasılığını, sağ kalımı ve hastalıklı sağ kalımı belirlemede başarılı bir parametre olmadığını belirten yayınlar olduğu gibi, aksini savunan yayınlar da vardır (2,3,8,21,23).

Çalışmamızda ise PCNA aktivitesi ve incelenen prognostik parametrelerden mitoz oranı, lenf düğümü tutulumu arasında ilişki kurulamamıştır. Hastalıklı sağ kalım süresini belirleme açısından ise başarısız bulunmuştur. Bu uyumsuzluk çeşitli nedenlere bağlanabilir. Hassas bir antijen olan PCNA fiksasyon süresinden, boyama işlemine başlamadan önce etüvde kesitlerin deparafinize edilmesi sırasında ısıdan etkilenmiş olabilir. PCNA'nın uzun bir yarı ömrü vardır (20 saat). Hatalı olarak hücre siklusunu terk etmiş hücrelerde de pozitif boyanma tesbit edilmeyebilir.

Ayrıca PCNA sadece hücre proliferasyonunda değil DNA

TABLO 4 : PCNA DEĞERLERİ, AgNORs SAYISI VE MİTOZ ARASINDAKİ UYUM (RAKAM 1'E NE KADAR YAKINSA UYUM ORANI O KADAR YÜKSEK)

		Kappa	Yorum
Grade	Mitoz	0.34	Orta derecede uyum var
PCNA*	AgNORs	0.21	Uyum yok
PCNA*	Mitoz	0.15	Uyum yok
PCNA			
(+)	AgNORs	0.24	Uyum yok
PCNA (-)	Mitoz	0.09	Uyum yok
AgNORs	Mitoz	0.16	Uyum yok

* %5'ten fazla boyanma

onarımında da rol almaktadır (2,3,8,17). Bu nedenle özellikle meme karsinomu gibi son derece heterojen yapıya sahip bir tümörde sadece proliferatif aktivite tümörün biyolojik davranışı hakkında yeterli bilgi vermeyebilir.

AgNORs yöntemi de PCNA gibi parafin bloklardan hazırlanan kesitlere uygulanabilmektedir. Yüksek AgNORs değerinin tümör ploidi, grade, proliferatif aktivite, Ki-67 reaktivitesi ile ilişkisi olduğunu ileri süren yayınlar vardır (20, 21). Ancak histolojik grade ile ilişkisi olmadığını belirten yayınlar da mevcuttur (12). Lenf düğümü tutulumu olasılığını belirlemede de başarısı tartışmalıdır (20).

Çalışmamızda da AgNORs değerleri ve mitoz oranı, histolojik grade, lenf düğümü tutulumu ve hastalıklı sağ kalım arasında ilişki bulunamamıştır.

Meme karsinomunda prognozu belirlemedeki rolü bilinen histolojik grade'in parametrelerinden biri olan mitoz sayısı ve histolojik grade ile de incelenen parametreler arasında ilişki bulunamamıştır. Çalışmamızda fiksasyon gecikmesi gibi mitoz sayımını etkilediği bilinen faktörler nedeniyle mitoz sayısı beklenenden daha az çıkmış olabilir. Çünkü yüksek oranda mitoz içeren sadece 5 olgu vardır. Bu da tümörlerin daha düşük derecede grade'lenmesine neden olmuş olabilir.

Bu çalışmada kullanılan hiç bir proliferatif belirleyici lenf düğümü tutulumu, nüks ve/veya uzak metastaz olasılığını belirleme açısından başarılı bulunmamıştır. Ancak PCNA pozitifliği % 5'ten fazla olan olgularda ortalama AgNORs değeri daha yüksek bulunmuştur. AgNORs ise lenf düğümü tutulumu olasılığını çok başarılı olmasa da belirleyebilmektedir. Kullandığımız proliferatif belirleyicilerin (PCNA, AgNORs) meme karsinomunda prognozu belirlemedeki rolleri literatürdeki bilgilere göre hâlâ tartışmalıdır. Fakat bu konudaki bilgi birikimi oldukça azdır. Bu nedenle konunun aydınlanması için daha çok çalışma yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Gnant MFX, Blijham G, Reiner A, et al. DNA ploidy and other results of DNA flow cytometry as prognostic factors in operable breast cancer: 10 years results of a randomised study. Eur J Cancer 28 (2/3): 711-716, 1992.
2. Leonardi E, Giraldo S, Serio G, et al. PCNA and Ki-67 expression in breast carcinoma: Correlations with clinical and biological variables. J Clin Pathol 1992; 46: 416-419.
3. Schimmelpenninck H, Eriksson ET, Franzen B, et al. Prognostic value of the combined assessment of proliferating cell nuclear antigen immunostaining and nuclear DNA content in invasive human mammary carcinoma. Virchows Archiv A Pathol Anat 1993; 423: 273-279.
4. Christov K, Milev A, Todorov V. DNA aneuploidy and cell proliferation in breast tumors. Cancer 1989; 64: 673-679.
5. Dawson AE, Norton JA, Weinberg David S. Comparative assessment of proliferation and DNA content in breast carcinoma by image analysis and flow cytometry. Am J Pathol 1990; 36 (5): 1115-1124.
6. Isola JJ, Helin HJ, Helle MJ, Kallioniemi OP. Evaluation of cell proliferation in breast carcinoma. Comparison of Ki-67 immunohistochemical

- study. DNA flow cytometric analysis and mitotic count. *Cancer* 1990; 665: 1180-1184.
7. Takahashi H, Strutton GM, Parsons PG. Determination of proliferating fractions in malignant melanomas by anti-PCNA/cyclin monoclonal antibody. *Histopathology* 1991; 18:221-227.
 8. Thomas M, Noguchi M, Kitagawa A, et al. Poor prognostic value of proliferating cell nuclear antigen labelling index in breast carcinoma. *J Clin Pathol* 1993; 46: 525-528.
 9. Botti G, Chiappetta G, D'Ainto G, et al. PCNA/Cyclin and p-glycoprotein as prognostic factors in locally advanced breast cancer. An immunohistochemical, retrospective study. *Tumori*, 1993; 79: 214-218.
 10. Ishida T, Kaneko S, Akazawa K, et al. Proliferating cell nuclear antigen expression and argyrophilic nucleolar organizer regions as factors influencing prognosis of surgically treated lung cancer patients. *Cancer Research* 1993; 53: 5000-5003.
 11. Shimizu T, Usuda N, Yamada T, et al. Proliferative activity of human thyroid tumors evaluated by proliferating cell nuclear antigen/cyclin immunohistochemical studies. *Cancer* 1993; 71: 2807-12.
 12. Di Stefano D, Mingazzini PL, Scuderi L, et al. A comparative study of histopathology, hormone receptors, peanut lectin binding, Ki-67 staining, and nucleolar organizer region-associated proteins in human breast cancer. *Cancer* 1991; 67: 463-471.
 13. Freeman J, Kellock DB, Yu C CW, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and nucleolar organizer regions in Hodgkin's disease: Correlation with morphology. *J Clin Pathol* 1993; 46: 446-449.
 14. Hall PA, Levison DA. Review: Assessment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol* 1990; 43: 184-192.
 15. Sivridis E, Sims B. Nucleolar organizer regions: new prognostic variable in breast carcinomas. *J Clin Pathol* 1990; 43: 390-392.
 16. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathol* 1991; 19: 403-410.
 17. Hall PA, Levison DA, Woods LL, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 1990; 162: 285-294.
 18. Jain S, Filipe MI, Hall PA, et al. Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen in gastric carcinoma. *J Clin Pathol* 1991; 44: 655-659.
 19. Frierson HF. Immunohistochemical analysis of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in infiltrating ductal carcinomas: Comparison with clinical and pathologic variables. *Modern Pathology* 1993; 6 (3): 290-294.
 20. Bianchi S, paglierani M, Zampi G, et al. Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen in lymph node-negative breast cancer patients. *Cancer* 1993; 72: 120-125.
 21. Haerslev T, Jacobsen GK. Proliferating cell nuclear antigen in breast carcinomas. An immunohistochemical study with correlation to histopathological features and prognostic factors. *Virchows Archiv* 1994; 4240 39-46.
 22. Aaltomaa S, Lipponen P, Syrjänen K. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolabeling as a prognostic factor in axillary lymph node negative breast cancer. *Anticancerresearch*, 1993; 13: 533-538.
 23. Cummings MC, Furnival CM, Parsons PG, Townsend E. PCNA immunostaining in breast cancer. *Aust N. Z. J. Surg* 1993; 63: 630-636.