

Imunohistokemični označevalci celičnega razmnoževanja Immunohistochemical markers of cellular proliferation

Andrej Cör*

Deskriptorji
novotvorbe – patologija
proliferacijska celica
jedrni antigen
imunohistokemija

Descriptors
neoplasms-pathology
proliferating cell
nuclear antigen
immunohistochemistry

Izvleček. Glavni motiv za ugotavljanje proliferacijske aktivnosti celic, še zlasti v vzorcih človeških tumorjev, je hipoteza, da lahko s kvantifikacijo tega osnovnega biološkega procesa damo objektivni odgovor o kliničnem poteku bolezni in prognozi bolnikov obolelih za rakom. V zadnjem času se za ugotavljanje proliferacijske aktivnosti celic uporablja predvsem imunohistokemično barvanje s protitelesi proti antigenom, ki se pojavljajo samo v razmnožujočih se celicah. Najpogosteje uporabljeni protitelesi sta anti-PCNA in Ki-67. PCNA je pomožni protein DNA polimeraze d. PCNA pozitivna so jedra celic v fazi S celičnega ciklusa. Protitelo Ki-67 prepozna antigene, ki se pojavijo v jedrih razmnožujočih se celic, ne pa tudi v mirujočih celicah faze G₀ celičnega ciklusa. V članku so opisane glavne biološke lastnosti označevalcev anti-PCNA in Ki-67, njuna uporabnost v patologiji ter naše izkušnje pri delu z njima.

Abstract. The author undertook the study of cellular proliferation, particularly in human tumours, in order to test the hypothesis that the quantification of this fundamental biological process can provide objective information about the clinical course and prognosis of cancer. Recently, immunohistochemical staining with antibodies against proliferation-associated antigen has been used for determining the growth fraction. Anti-PCNA and Ki-67 are the most frequently employed markers. PCNA is DNA polymerase d auxiliary protein. During S phase of the cell cycle nuclei of the cells are PCNA positive. Antibody Ki-67 recognizes nuclear antigens, which are present solely in proliferating cells and are absent in resting cells during G₀ phase. The paper gives an overview of the principal biological characteristics of immunohistochemical markers anti-PCNA and Ki-67, and presents their applications in pathology and the author's experience with these markers.

Uvod

Celična proliferacija je eden od osnovnih bioloških procesov. Lebland je razdelil celice glede na njihovo proliferacijsko sposobnost v tri tipe (1):

- statične celice, ki imajo zelo majhno sposobnost proliferiranja ali pa je sploh nimajo, npr. nevroni centralnega živčevja;
- pogojno obnovljive celice, ki v normalnih pogojih kažejo razmeroma majhno proliferacijsko sposobnost. Če pa se pojavi potreba, npr. po poškodbi, lahko izdatno regenerirajo. Take so celice ledvic, jeter, merokrinih in apokrinih žlez;
- nenehno obnavljajoče se celice, ki se ves čas razmnožujejo in s tem nadomeščajo zelo številne propadajoče celice. Take so npr. celice povrhnjih epitelijev, kostnega mozga, zarodne celice v testisu in celice holokrinih žlez.

Raziskave Howarda in Pelca, ki sta za opazovanje celic uporabila avtoradiografsko metodo, so vodila v odkritje celičnega ciklusa in njegovih faz (2). V celičnem ciklusu se iz-

*Asist. dr. sc. Andrej Cör, dr. med., Inštitut za histologijo in embriologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Korytkova 2, 1105 Ljubljana.

menjajeta interfaza in faza mitoze (M). Interfaza je sestavljena iz treh faz: G_1 , S in G_2 . Lajtha je predpostavil, da obstaja tudi t. i. G_0 faza, v kateri celice niso v ciklusu, se pa lahko po delovanju določenega stimulusa vrnejo med proliferirajočo populacijo (3). Vsako celično populacijo lahko torej razdelimo na ciklični in neciklični del. Iz tega sledi tudi definicija proliferacijske ali rastne frakcije celične populacije kot razmerje med cikličnim delom populacije in vsoto cikličnega in necikličnega dela (4).

Ker kinetika tumorskih celic neposredno vpliva na klinični potek in prognozo rakave bolezni, je določanje proliferacijske aktivnosti, poleg postavljanja diagnoze, ena od glavnih nalog patologa pri študiju vzorca tumorskega tkiva. Veliko časa in napora je bilo vložnega v poizkušanje kvantifikacije spremenljivk, ki odražajo tumorsko proliferacijsko aktivnost, ter korelacijam teh spremenljivk s sposobnostjo metastaziranja, s ponovitvijo tumorja ter z umrljivostjo za določenim tumorjem.

Za ugotavljanje proliferacijske aktivnosti se uporabljajo številne metode: štetje mitoz, ugotavljanje indeksa vgradnje ^3H -timidina in bromdeoksiuridina (BrdU), pretočna citometrična metoda, štetje posebrebnih nukleolarnih organizacijskih regij (Ag-NOR) in druge. V zadnjem času pa se za ugotavljanje proliferacijske aktivnosti celic vse več uporablja imunohistokemično ugotavljanje prisotnosti nekaterih antigenov, ki se pojavijo v jedrih celic samo v fazah celičnega ciklusa, ne pa tudi v fazi G_0 . Najpogosteje uporabljena imunohistokemična markerja sta anti-PCNA in Ki-67.

Jedrni antigen proliferirajočih celic (PCNA)

Leta 1978 je Miyachi s sodelavci opisal, da avtoimuni serum bolnikov s sistemskim eritematoznim lupusom vsebuje protitelesa, ki prepoznajo jedrni antigen v razmnožujočih se celicah (5). Ta antigen so poimenovali »proliferating cell nuclear antigen« ali PCNA. Molekula PCNA je 36 kDa velik kisli, nehistski protein v jedru, ki deluje kot pomožni protein DNA polimeraze-d in je nujno potreben za sintezo DNA (6, 7). Imunoreaktivnost molekule PCNA se izraža skupaj z vgradnjo BrdU v DNA med fazo S celičnega ciklusa. PCNA je torej tesno povezan s podvojitvijo celice oz. s samo sintezo DNA, ki se vrši v jedru med fazo S. V prisotnosti PCNA DNA polimeraza-d katalizira podaljšanje oligonukleotidnih fragmentov v dolgo verigo DNA (8).

Gen za PCNA je bil kloniran za mnoge živalske vrste, pa tudi za človeka (15). Človeški gen za PCNA je lokaliziran na kromosomu 20. Kljub variacijam na nivoju DNA, se PCNA molekula med človekom in podgano razlikuje samo v štirih aminokislinah. Približno 70 % skladnost pa je tudi med človeškim in PCNA nižjih živalskih vrst. Ta relativna evolutivska konzervativnost kaže na pomembno vlogo PCNA v celičnem podvajanju (9).

Za ugotavljanje prisotnosti PCNA na histoloških preparatih se uporabljajo številna protitelesa. Zdi se, da so epitopi, ki jih prepoznajo ta protitelesa, različni, prav tako pa je različna tudi občutljivost teh epitopov tako za fiksacijo kot tudi za različne postopke imunohistokemičnega barvanja. To je samo ena od razlag, zakaj se pojavljajo razlike med rezultati različnih avtorjev, čeprav so proučevali proliferacijsko aktivnost na tumorjih iste vrste. V patologiji najpogosteje uporabljeno in komercialno najbolj dostopno protiteleso proti PCNA je PC-10.

Sinteza in funkcija PCNA med celičnim ciklom

Sinteza proteina PCNA se dramatično poveča tik pred sintezo DNA, to je pozno v fazi G_1 . Najvišjo vrednost doseže v fazi S, nato pa se zmanjša na bazalno vrednost v pozni fazi S.

V zadnjem času se pojavljajo poročila, da je število imunoreaktivnih celic na PCNA, zlasti v nekaterih tumorjih, višje, kot bi pričakovali, oz. višje, kot je ugotovljena proliferacijska aktivnost z drugimi ustreznimi metodami, npr. vgradnjo BrdU (10). Del razlage je v tem, da je molekula PCNA vključena tudi v popraviljanje DNA, saj so odkrili, da se pojavlja v vseh fazah celičnega ciklusa po obsevanju celic z UV-svetlobo (11). Proces reparacije DNA je namreč sestavljen iz dveh delov. V prvem delu endonukleaze encimsko izrežejo okvarjeni del DNA, v drugem delu pa sledi sinteza DNA, v katero je vključena predvsem polimeraza δ s pomožnim proteinom PCNA (12).

Regulacija ekspresije

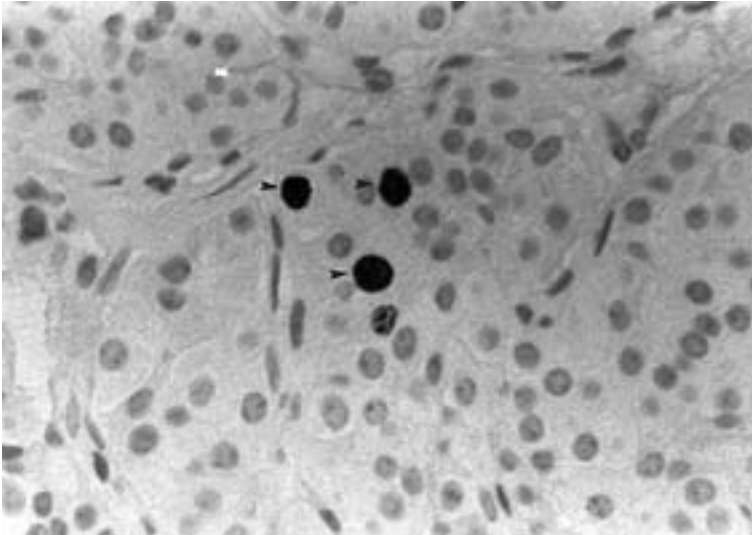
Regulacija ekspresije PCNA je kompleksna. Ekspresija PCNA je regulirana na transkripcijskem in potranskripcijskem nivoju. Čeprav je bila promotorska regija že mapirana, je transkripcijska kontrola še razmeroma nejasna (13).

Zdi se, da je izredno pomembna regulacija na potranskripcijskem nivoju. Za sintezo proteina PCNA mora biti PCNA-mRNA stabilizirana. Samo na ta način je nato prepisana v protein (14, 15). Številne celice, tudi tiste v fazi G_0 , neprestano sintetizirajo PCNA-mRNA, vendar pa jo zelo hitro tudi razgradijo, ne da bi prišlo do sinteze proteina PCNA. Za stabilnost oz. nestabilnost PCNA-mRNA je odgovoren gen za PCNA, in sicer njegov intron 4 (11). Odstranitev introna 4 vodi v nenormalno visoke vrednosti PCNA tudi v celicah, ki so v fazi G_0 . Pri stabilizaciji molekule PCNA-mRNA pa lahko sodelujejo tudi številni drugi dejavniki, med njimi predvsem rastni faktorji in onkogeni (13, 16).

Pomemben razlog za preveliko imunoreaktivnost na PCNA je tudi dolg polovični čas razgradnje molekule PCNA, ki je okoli 20 ur. Zato je v tkivih, kjer je celični cikel kratek (npr. v črevesnih resicah), število celic, ki so imunoreaktivne na PCNA, skoraj 100 % (7, 17). Torej lahko tudi nekatere celice, ki niso v fazah celičnega ciklusa, kažejo imunoreaktivnost na PCNA. Še zlasti pa je povečana imunoreaktivnost na PCNA vidna v normalnih tkivih ob tumorskih spremembah. Ena od možnih razlag je, da se to zgodi zaradi rastnih faktorjev, ki jih izločajo tumorske celice. Le-ti nato povzročijo stabilnost PCNA-mRNA (10). Vse to kaže, da je molekula PCNA sicer neobhodno potrebna za celično delitev, vendar pa ne samozadostna za proliferacijo (11).

Ki-67

Protitelesa proti Ki-67 so prvi opisali Gerdes in sodelavci, ko so poizkušali narediti protiteleso proti Reed-Sternbergovim celicam, specifičnim za Hodgkinov limfom (19). Ugotovili so, da se je protiteleso vezalo na jedra razmnožujočih se celic, ne glede na tip celice. Antigen, ki ga protitelesa Ki-67 prepoznajo, je v jedrih celic, ki so v fazah G_1 , S, G_2 in M, ni pa ga v jedrih celic, ki so v fazi G_0 celičnega ciklusa (20). Po mitozu se antigen



Slika 1. Imunohistokemično pobarvana jedra celic ščitničnega tumorja s protitelesom anti-PCNA (povečava 40-krat).

zelo hitro razgradi, ali pa epitop zelo hitro izgubi svoje antigenske lastnosti. Polovični čas razgradnje antigena je ena ura ali manj (21).

Potencialno sposobnost ugotavljanja proliferacijske aktivnosti celic z merjenjem odstotka Ki-67 pozitivnih celic so nato dokazali v številnih raziskavah različnih tumorjev, pa tudi v netumorskih tkivih. Pokazali so, da je Ki-67 pomemben označevalec ne le za ugotavljanje celične aktivnosti, pač pa ima tudi prognostično vrednost (22–27).

Velika pomankljivost protitelesa Ki-67 je v tem, da je uporabno samo na svežem materialu ali na zaledenelih rezinah, ne pa tudi na rutinskih histoloških preparatih, zato so bile retrospektivne študije nemogoče. Vzrok za to pomankljivost je občutljivost antigen-skega epitopa na rutinsko histopatološko fiksacijo s formalinom ali alkoholom. Gerdes in sodelavci so klonirali in sekvencionirali del gena Ki-67 ter z imunizacijo miši z rekombinantami produkta tega gena odkrili nova protitelesa. Poimenovali so jih MIB 1–3 (28). To so bila tri protitelesa, ki naj bi bila ekvivalentna klasičnemu protitelesu Ki-67, a naj bi delovala na parafinskih rezinah. Na zaledenelih rezinah so imela ta protitelesa enak imunohistokemični rezultat kot klasično protitelo Ki-67. Rezultati uporabe na parafinskih rezinah pa so razočarali. MIB-2 je bil na parafinskih rezinah popolnoma neuporaben, MIB-1 in MIB-3 pa sta prikazala samo celice, ki so bile v fazi mitoze (29).

Velik napredek v imunohistokemični tehniki je pomenilo odkritje, da lahko s segrevanjem v mikrovalovni pečici razkrijemo antigene in jih tako naredimo dostopne za delovanje protiteles (30). Zdi se, da formalinska fiksacija ne uniči antigena, pač pa ga samo zamaskira. Čeprav mehanizem delovanja mikrovalovne pečice še ni popolnoma pojasnjen, pa nam omogoča uspešno razkritje antigena (31).

Uporaba nove imunohistokemične tehnike je omogočila označitev jeder razmnožujočih se celic s protitelesi MIB-1 in MIB-3 tudi na parafinskih rezinah. Rezultati so se ujeli s tistimi, dobljenimi s klasičnim protitelesom Ki-67 na zaledenelih rezinah (32).

Imunohistokemično barvanje s protitelesom MIB-1 daje rezultat, ki je kombinacija zelo močnega imunohistokemičnega signala, kljub segrevanju v mikrovalovni pečici, ob relativno ohranjeni morfologiji. To omogoča dobro razpoznavanje celičnih in tkivnih podrobnosti ob lahki identifikaciji pozitivnih in negativnih celic. Metoda je primerna tudi za retrospektivne študije na arhivskem materialu.

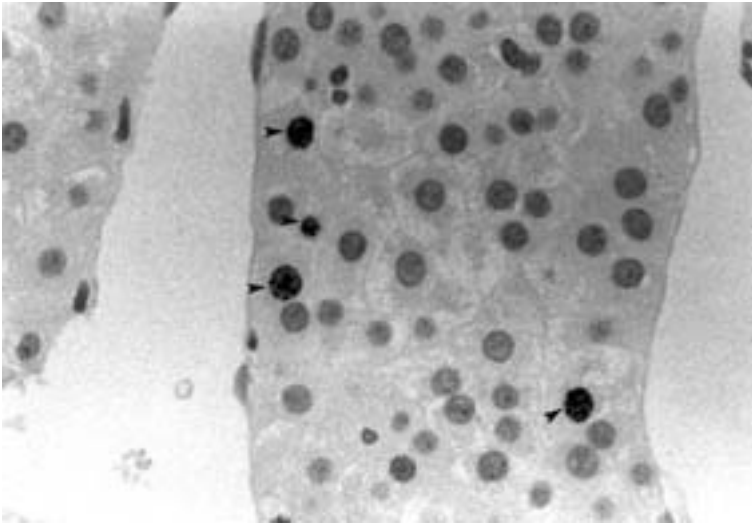
Uporabnost imunohistokemičnih označevalcev celičnega razmnoževanja in naše izkušnje

Z uporabo imunohistokemičnih označevalcev lahko z razmeroma enostavno kvantifikacijo imunoreaktivnih in nereaktivnih celic ugotovimo stopnjo proliferacijske aktivnosti preiskovanega tkiva. Oba imunohistokemična označevalca sta se izkazala kot uporabna v številnih študijah in skoraj ni tipa tumorja, na katerih ne bi bila uporabljena (22, 23, 26, 33–36). Številni avtorji so pokazali ne samo njuno diagnostično vrednost, pač pa tudi uporabnost v napovedovanju poteka bolezni, povezanost s ponovljivostjo tumorjev, njihovim metastaziranjem in seveda z umrljivostjo (37–39).

Medtem ko zahtevata metodi ugotavljanja vgradnje ³H-timidina in BrdU določen čas za vključitev obeh v fazi S celičnega cikla, je prednost imunohistokemičnih označevalcev v enostavnosti in razmeroma hitro dobljenih rezultatih. Za razliko od pretočne citometrične metode omogoča imunohistokemična metoda ohranitev morfološke slike, to pa je zlasti pri majhnih lezijah s spremenjeno proliferacijsko aktivnostjo (npr. pri »in situ« karcinomu) izredno pomembno.

Na Inštitutu za histologijo in embriologijo Medicinske fakultete v Ljubljani smo leta 1994 uvedli metodi barvanja z obema omenjenima proliferacijskima označevalcema, kot tudi metode za kvantifikacijo imunohistokemično obarvanih preparatov. Oba označevalca smo uporabili za razlikovanje ščitničnih tumorjev ter preizkusili njuno natančnost, občutljivost in specifičnost (40) (slika 1). V sodelovanju z Inštitutom za patologijo Medicinske fakultete smo oba markerja uporabili za diferenciacijo sprememb v grlu (41) in različnih neoplastičnih in neneoplastičnih bolezni jeter (slika 2).

Naše raziskave so pokazale, da je Ki-67 uporabnejši označevalec celične proliferacijske aktivnosti kot PCNA. Podobno kot nekateri drugi raziskovalci (10) smo tudi mi opazili prekomerno pozitivnost v preparatih obarvanih z anti-PCNA. Odstotki pozitivnih celic ugotovljenih z anti-PCNA in Ki-67 v posameznih serijah tumorjev so bili sicer v korelaciji, vendar pa so bili odstotki PCNA pozitivnih jeder vedno bistveno višji od odstotkov Ki-67 pozitivnih jeder. Prav tako smo imeli v preparatih obarvanih z anti-PCNA težave z določitvijo meje med pozitivnimi in negativnimi jedri, medtem ko je bila razlika v preparatih obarvanih z MIB-1 jasna. Prekomerna pozitivnost na anti-PCNA je po našem mnenju posledica številnih zgoraj navedenih dejavnikov, ki vplivajo na izražanje molekule PCNA tudi v celicah, ki so v fazi G₀.



Slika 2. Imunohistokemično obarvana jedra hepatocitov s protitelesom Ki-67 (povečava 40-krat).

Sklep

Uporaba protiteles PCNA in Ki-67 kot označevalcev celične proliferacijske aktivnosti je razmeroma enostavna, daje pa ob ohranjeni morfološki sliki izredno pomembne informacije o celicah, ki so v fazah podvojitve, o njihovem položaju v tkivu in s tem tudi o njihovi funkciji. Še zlasti pa sta oba označevalca pomembna za ugotavljanje proliferacijske aktivnosti tumorskih celic. Na ta način lahko dobimo o tumorjih nove podatke, ki so nam v pomoč v diagnostiki, pri napovedovanju poteka bolezni in pri odločanju o ustreznem zdravljenju. Razlaga rezultatov pa zahteva natančno analizo vseh vzrokov za pozitiven in negativen rezultat, to pa je mogoče samo ob natančnem poznavanju imunohistokemične reakcije in biologije antigena, ki ga protitelesa prepoznajo. Poenostavljanje bi nas vodilo v napačno sklepanje.

Literatura

1. Lebland CP. Classification of cell population on the basis of their proliferative behavior. *Monogr Natl Cancer Inst* 1963; 14: 19–145.
2. Howard A, Pelc SR. Nuclear incorporation of ^{32}P as demonstrated by autoradiographs. *Exp Cell Res* 1951; 2: 178–87.
3. Lajtha LG. On the concept of the cell cycle. *J Cell Physiol* 1963; 62: Suppl 1: 143–5.
4. Mendelson ML. The growth fraction: A new concept applied to tumours. *Science* 1963; 132: 1496–6.
5. Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 1978; 121: 2228–34.
6. Prelich G, Tan CK, Kostura M. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-d auxiliary protein. *Nature* 1987; 326: 517–20.

7. Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ . *Nature* 1987; 326: 515–6.
8. Prelich G, Stillman B. Coordinated leading and lagging strand synthesis during SV40 DNA replication in vivo requires PCNA. *Cell* 1988; 53: 117–26.
9. Baserga R. Growth regulation of the PCNA gene. *J Cell Sci* 1991; 98: 433–6.
10. Hall PA, Coates PJ, Goodlab RA, Hart IR, Lane DP. Proliferating cell nuclear antigen expression in non-cycling cells may be induced by growth factors in vivo. *Br J Cancer* 1994; 70: 244–7.
11. Hall PA, McKee PH, Menage HP, Dover R, Lane DP. High levels of p53 in UV-irradiated normal human skin. *Oncogene* 1993; 8: 203–7.
12. Shivji MK, Kenny MK, Wood RD. Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell* 1992; 69: 367–74.
13. Traveli S, Ku DH, Rizzo MG et al. Structure of the human gene for the proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem* 1989; 264: 7466–72.
14. Ottavio L, Chang CD, Rizzo MG et al. Importance of introns in the growth regulation of mRNA levels of the proliferating cell nuclear antigen gene. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 303–9.
15. Jaskulski D, Gati C, Traveli S, Calabreta B, Baserga R. Regulation of the proliferating cell nuclear antigen cyclin and thymidine kinase mRNA levels by growth factors. *J Biol Chem* 1988; 263: 1075–9.
16. Mercer WE, Shields MT, Lin D, Appela E, Ullrich S. Growth suppression induced by wild-type p53 protein is accompanied by selective down-regulation of proliferating-cell nuclear antigen expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1958–62.
17. Scott RJ, Hall PA, Haldane JS. A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. *J Pathol* 1991; 165: 173–8.
18. McCormick D, Hall PA. The complexities of proliferating cell nuclear antigen. *Histopathology* 1992; 21: 591–4.
19. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31: 13–20.
20. Gerdes J, Lemke H, Baisch H et al. Cell cycle analysis of a cell proliferation associated nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133: 1710–5.
21. Bruno S, Crissman HA, Bauer KD, Darzynkiewicz Z. Changes in cell nuclei during S phase: progressive chromatin condensation and altered expression of the proliferation-associated nuclear proteins Ki-67, cyclin (PCNA), p105 and p34. *Exp Cell Res* 1991; 196: 99–106.
22. Burger PC, Shibata T, Kleihues P. The use of the monoclonal antibody Ki-67 in the identification of proliferating cells. *Am J Surg Pathol* 1986; 10: 611–7.
23. Gatter KC, Dunnill MS, Gerdes J, Stein H, Masson DJ. New approach to assessing lung tumors in man. *J Clin Pathol* 1986; 39: 590–3.
24. Gerdes J, Van Baaren J, Pileri S et al. Tumor cell growth fraction in Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 1987; 128: 390–3.
25. Chilosi M, Iannucci A, Menestrina F et al. Immunohistochemical evidence of active thymocyte proliferation in thymoma. Its possible role in the pathogenesis of autoimmune disease. *Am J Pathol* 1987; 128: 464–70.
26. Raymond WA, Leong AS, Bolt JW, Milos-Jose JS. Growth fractions in human prostatic carcinoma determined by Ki-67 immunostaining. *J Pathol* 1988; 156: 161–7.
27. Koudevitz P, Braun-Falco O, Ernst M et al. Tumor cell growth fractions in human malignant melanomas and the correlation to histopathologic tumor grading. *Am J Pathol* 1989; 134: 1063–8.
28. Gerdes J, Li L, Schlueter C et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 1991; 138: 867–73.
29. Cattoretti G, Becker MHG, Key G et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB-1 and MIB-3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed sections. *J Pathol* 1992; 168: 357–63.
30. Shi SR, Key ME, Klara KI. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1991; 39: 741–8.

31. McKee PH, Hobbs C, Hall PA. Antigen retrieval by microwave irradiation lowers immunohistological detection thresholds. *Histopathology* 1993; 23: 377–9.
32. Cattoretti G, Pileri S, Paravicini C et al. Antigen anmasking of formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *J Pathol* 1993; 171: 83–98.
33. Connolly KM, Bogdanffy MS. Evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as an endogenous marker of cell proliferation in rat liver: A dual stain comparison with 5-bromo-2-deoxyuridine. *J Histochem Cytochem* 1993; 41: 1–6.
34. Diebold J, Lai MD, Löhns U. Analysis of proliferative activity in colorectal mucosa by immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *Virchows Arch* 1992; 62: 283–9.
35. Freeman J, Kellock DB, Yu CCW, Crocker J, Levison DA, Hall PA. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and nuclear organiser regions in Hodgkin's disease: Correlation with morphology. *J Clin Pathol* 1993; 46: 446–9.
36. Leonardi E, Girlando S, Serio G et al. PCNA and Ki-67 expression in breast carcinoma: Correlations with clinical and biological variables. *J Clin Pathol* 1992; 45: 416–9.
37. Nielsen AL, Nyholm HCJ. Proliferative activity as revealed by Ki-67 in uterine adenocarcinoma of endometrioid type: Comparison of tumours from patients with and without previous oestrogen therapy. *J Pathol* 1993; 171: 199–205.
38. Gillett CE, Barnes DM, Camplejohn RS. Comparison of three cell cycle associated antigens as marker of proliferative activity and prognosis in breast carcinoma. *J Clin Pathol* 1993; 46: 1126–8.
39. Schönborn I, Zchiesche W, Minguillon C et al. Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen and c-erB-2 compared with conventional histopathological factors in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1995; 121: 115–22.
40. Cör A. *Uporabnost nekaterih testov proliferacijske aktivnosti tirocitov za diferencialno patohistološko diagnostiko ščitničnih tumorjev*. Doktorska disertacija. Ljubljana: Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, 1995.
41. Kambič V, Gale N. *Epithelial hyperplastic lessions of the larynx*. New York: Elsevier, 1995: 134–9.

Prispelo 3.10.1995