

PANKREATİK ADENOKARSİNOM VE PANKREATİK İNTRAEPİTELİYAL NEOPLAZİLERDE İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK p53 VE Ki 67 EKSPRESYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

EVALUATION OF P53 AND Ki67 EXPRESSION IMMUNOHISTOCHEMICALLY IN PANCREATIC DUCTAL ADENOCARCINOMA AND PANCREATIC INTRAEPITHELIAL NEOPLASIAS

Deniz NART¹ Yeşim ERTAN¹ Metin ÇİRİŞ² Murat ZEYTUNLU²
Gül YÜCE¹ Yıldırım YÜZER³ Ahmet ÇOKER³ Funda YILMAZ¹

¹Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji A.D

²Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji A.D

³Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi A.D

Anahtar Sözcükler : Pankreas karsinomu, pankreatik intraepitelyal neoplazi, immunohistokimya

Key Words : Pancreatic, carcinoma, pancreatic intraepithelial neoplasia, immunohistochemistry

ÖZET

Pankreatik duktal adenokarsinomlar (PDA), pankreatik intraepitelyal neoplaziler (PanIN) olarak isimlendirilen noninvaziv displastik intraduktal lezyonlardan köken almaktadır. Morfolojik ve genetik çalışmalar, PanIN'lerin PDA'ların prekürsörü olabileceğinin güçlü bir kanıtını oluşturmuştur.

Çalışmada PDA tanılı 21 hasta değerlendirildi. PanIN ve PDA içeren histolojik kesitler gözden geçirildi. PanIN lezyonları sayıldı, derecelendirildi ve lokalizasyonları değerlendirildi. İmmunohistokimyasal (IHK) olarak Ki67 ve P53 ekspresyonu araştırıldı.

Olgularda, PanIN lezyonlarının interlobuler lokalizasyonu (%58.20) intralobuler lokalizasyonuna göre (%41.80) daha belirgin olup, interlobuler duktuslardaki PanIN 2 ve 3 lezyonları intralobuler duktuslara göre daha fazla olduğu gözlemlendi ($p=0.0026$ ve $p=0.006$). PanIN'lerde Ki67 ve P53 ekspresyonu istatistiksel olarak daha düşük bulundu ($p=0.0045$ ve $p=0.0002$).

Tümör supresör gen olan p53 protein ve proliferasyon belirleyicisi olan Ki67, PanIN lezyonlarının progresyon göstererek invazyon potansiyeli kazanabileceği hipotezine ek bir yarar sağlayacaktır.

SUMMARY

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDA) is thought to arise from noninvasive dysplastic intraductal lesions, named pancreatic intraepithelial neoplasias (PanIN). Morphologic and genetic observations have provided strong evidence that PanINs can be the precursors of PDA.

We evaluated 21 patients with diagnosis of PDA. The histologic sections, harboring both PanIN and PDA were identified. PanIN lesions were counted, graded and their localization was evaluated. We examined also the expression of Ki67 and p53, immunohistochemically. Interlobular location of PanIN lesions (58.20%) were more intense than intralobular location (41.80%). PanIN 2 and 3 within interlobular ducts were significantly higher than intralobular ducts ($p=0.0026$ ve $p=0.006$, respectively). P53 and Ki67 expression in PanIN were lower than PDA, statistically ($p=0.0045$ ve $p=0.0002$, respectively). P53 tumor suppressor gene and Ki67, proliferation marker in PanINs can provide additional support for the hypothesis that these lesions represent progression with the potential for invasion.

GİRİŞ

Değişik organlardan köken alan karsinomların birçoğunun gelişiminde prekürsör lezyonlar içeren çok basamaklı karsinogenez sürecinin yer aldığı bilinmektedir. Serviks, meme, kolon, akciğer ve prostat gibi organların infiltratif karsinomlarının prekürsör lezyonları tanımlanmıştır (1,5). Bu lezyonların, invaziv karsinomların gelişiminde öncü olduğu anlaşılmış ve bu bulgu, karsinomların yayılmadan erken dönemde tanınmasına yarayan tekniklerin gelişimine olanak sağlamıştır (6).

PDA, PanIN olarak isimlendirilen noninvaziv displastik lezyonlardan köken aldığı düşünülmektedir (7). İlk olarak 1954'de Sommers ve arkadaşları, bu lezyonları 'pankreatik duktal hiperplazi' olarak tanımlamış ve PDA'lı hastaların 1/3'ünden fazlasında gözlemlemişlerdir (8). Daha sonra yapılan morfolojik ve genetik çalışmalarda PanIN'lerin histolojik derecesi arttıkça PDA'larda tanımlanan gen mutasyonlarına benzer mutasyonlar görülmüş; bu bulgu da, PanIN'lerin PDA'ların prekürsör lezyonları olduğunu kuvvetle desteklemiştir (9,12).

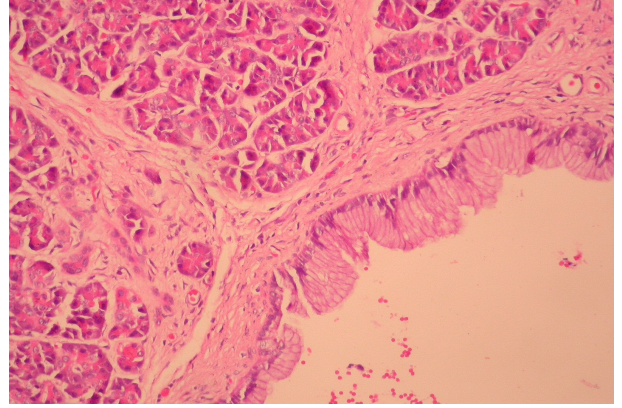
PDA'larda K-ras mutasyonu, p16 ve p53 inaktivasyonu, HER-2/neu ekspresyonu gibi çeşitli genetik değişiklikler sıklıkla bulunmaktadır (9,12,13). Ki67 proteini ise, proliferasyondaki hücrelerde eksprese edilen nükleer bir proteindir. Hücre siklusunda, Go haricindeki tüm fazlarda eksprese edilir (14,15). Yapılan birçok çalışmada, pankreas kanserlerinde, karsinogenezis progresyonuyla birlikte Ki67 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (16,17).

Çalışmamızda, aynı histolojik kesitteki normal, PanIN ve karsinomatöz pankreatik lezyonlar incelenerek PanIN lezyonlarının dağılımı ve immunohistokimyasal (İHK) olarak p53 ve Ki67 ekspresyonları değerlendirildi.

GEREÇ VE YÖNTEM

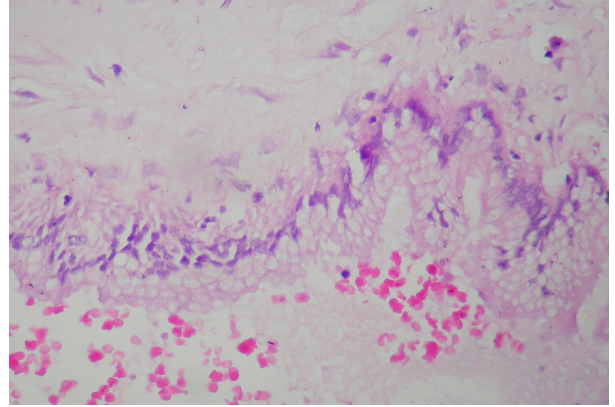
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi AD'da PDA nedeniyle pankreatikoduodenektomi (Whipple operasyonu) yapılan 21 olgu çalışma grubuna dahil edildi. Olguların hematoksilen-eozin boyalı preparatları ışık mikroskopunda tekrar gözden geçirilerek PanIN lezyonlarını gösteren duktusların sayısı, derecesi ve lokalizasyonları incelendi. Duktus lezyonlarının derecelendirilmesi Hruban ve arkadaşları tarafından önerilen klasifikasyon sistemindeki morfolojik kriterler kullanılarak aşağıdaki gibi yapıldı (7);

PanIN 1A: Kısa kolumnar, küboidal duktus epitelinin yüksek kolumnar hal alması, nükleusların bazale yerleşimi ve supranükleer müsin içermesi (Resim 1).



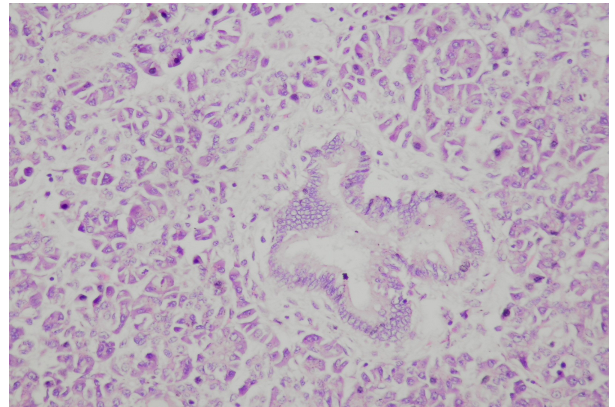
Resim 1. PanIN 1A'nın histolojik görünümü (Hematoksilen eozin x 100)

PanIN 1B: PanIN 1A lezyonundaki epitelyal değişikliklere ek olarak epitelin papiller veya mikropapiller yapılar oluşturması (Resim 2).



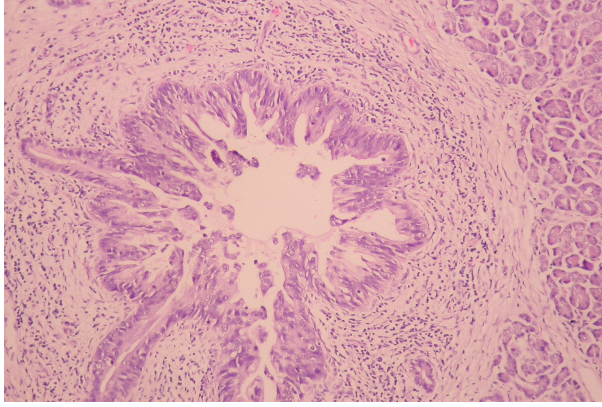
Resim 2. PanIN 1B'nin histolojik görünümü (Hematoksilen eozin x 100)

PanIN 2: Düz veya papiller proliferasyon ile birlikte fokal veya hafif nükleer değişiklikler, kabalaşma, hiperkromatizm, psödostratifikasyon izlenmesi (Resim 3).



Resim 3. PanIN 2'nin histolojik görünümü (Hematoksilen eozin x 200)

PanIN 3: Belirgin papiller veya mikropapiller yapı yanı sıra kribriiform patern ve nekroz, sitolojik olarak polarite kaybı, distrofik goblet hücreleri, büyük düzensiz nukleuslar ve nukleol belirginliği, atipik mitoz varlığı (Resim 4).



Resim 4. PanIN 3'ün histolojik görünümü (Hematoxilen eozin x 200)

İHK yöntemle p53 ve Ki67'nin varlığının gösterilmesi için en az 1 gece 55°C etüvde bekletilen kesitler ksilol ve alkol solüsyonlarından geçirilerek deparafinize ve rehidrate edildikten sonra sodyum sitrat tamponunda (pH:6.0) ve mikrodalga fırında bekletilip ardından Endojen Peroksidaz aktivitesi,%0,3'lük metil alkol ile hidrojen peroksit ile 5 dakika tutularak bloke edildi. Tüm yıkamalar tris tampon solüsyonu (TBS, pH:7,6) ile yapıldı. Primer antikor olarak p53 proteini [klon DO-7, 1/100 dilüe (Dako)] ve Ki67 (Klon MIB-1, Dako) kullanıldı. p53, 1:100 dilüsyonda, Ki67 ise 1:150 dilüsyonda 30 dakika 24 derecede inkübe edilerek uygulandı. Üç basamaklı immunoperoksidaz tekniği ve ardından avidin-biotin kompleks yöntemi (Dako, LSAB-2) ile İHK boyanma tamamlandı. Ki67 ve p53 immunoreaktivitesinin değerlendirilmesi için standart ışık mikroskopunda x40 büyük büyütmede pozitifliğin minimum ve maksimum olduğu beşer alan seçilerek 10 alanda toplam 1000 hücre sayıldı. Tüm nükleer boyanmalar, boyanma şiddetindeki farklılığa bakılmaksızın pozitif kabul edildi. Sonuçlar pozitif hücrelerin yüzdesi olarak ifade edildi. İstatiksel olarak Mann-Whitney U testi, ANOVA testi, ki-kare testi ve Pearson korelasyonu uygulandı.

BULGULAR

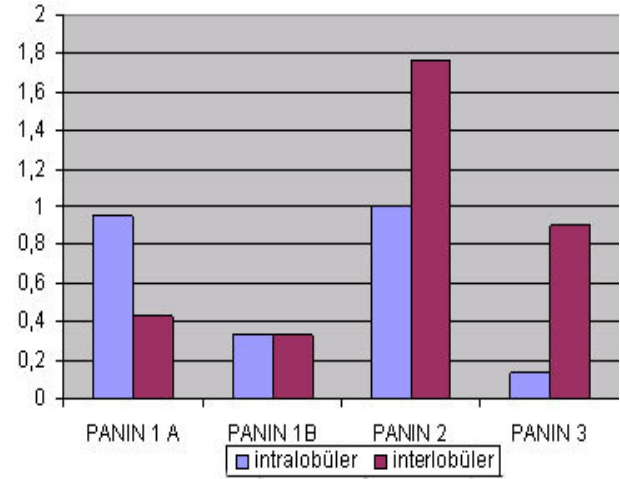
1. Olgularda panIN lezyonlarının dağılımı;

PanIN 1A, 12 olguda (%57.14); PanIN 1B, 8 olguda (%38.9); PanIN 2, 18 olguda (%85.71); PanIN 3, 9 olguda (%42.85) görüldü.

2. PanIN lezyonlarının pankreatik duktuslardaki dağılımı;

Yirmibir olguda izlenen toplam 122 PanIN lezyonunun 27'si 1A (%22.13), 16'sı PanIN 1B (%13.11), 56'sı (%45.90) PanIN 2, 23'ü (%18.85) PanIN 3 idi.

Yirmiyedi PanIN 1A lezyonunun 20'si (%74.07) intralobüler, 7'si (%25.93) interlobüler duktuslarda; 16 PanIN 1B lezyonunun 7'si (%43.75) intralobüler, 8'i (%56.25) interlobüler duktuslarda; 56 PanIN 2 lezyonunun 21'i (%37.5) intralobüler, 35'i (%62.5) interlobüler duktuslarda; 23 PanIN 3 lezyonunun 3'ü (%13.04) intralobüler, 20'si (%86.96) interlobüler duktuslarda lokalize idi. Genel olarak PanIN lezyonlarının %41.80'i intralobüler, %58.20'si interlobüler duktuslarda izlendi (Şekil I).



Şekil I: İntralobüler ve interlobüler alanlara göre ortalama PANIN sayıları

İnterlobüler alanlarda intralobüler alanlara göre daha çok PanIN 2 ve 3 lezyonu izlenirken (Mann-Whitney U testi) ($p=0.026$ ve $p=0.006$), interlobüler ile intralobüler alanlarda PanIN 1A ve 1B görülmesi arasında istatistiksel bir fark yoktu.

3. PanIN lezyonlarında Ki67 ve p53 indeksleri;

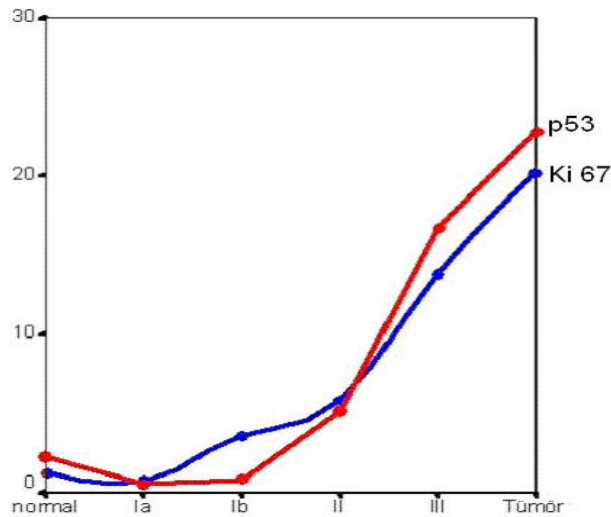
PanIN lezyonlarında ortalama Ki67 ve p53 indeksleri PDA alanlarına göre anlamlı şekilde düşüktü (Mann-Whitney U testi) ($p=0.00002$ ve $p=0.0045$) (Tablo I).

PanIN 1'de Ki67 ve p53 indeksleri PanIN 2 ve 3'e göre anlamlı şekilde düşüken ($p=0.0007$ ve $p=0.0013$) (Mann-Whitney U testi), PanIN 2 ve 3 arasında fark yoktu. Ki67 ve p53 boyanma yüzdeleri göz önünde tutulduğunda, normal-PanIN-PDA arasında belirgin farklılık vardı ($p<0.0001$) (Şekil II). Gruplar arasındaki farklılıklar ANOVA testi ile de desteklendi.

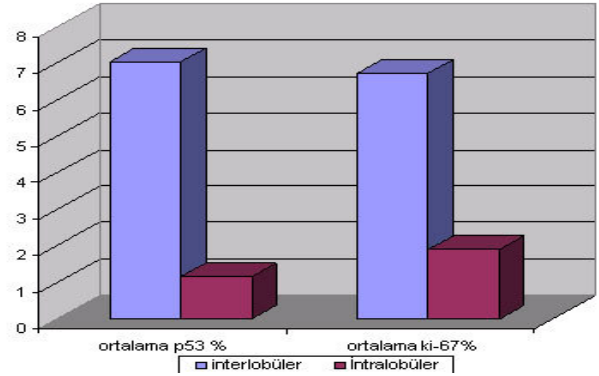
İntرالobüler ve interlobüler lokalizasyona göre Ki67 ($p=0.0001$) ve p53 ($p=0.011$) boyanmaları arasında belirgin farklılık vardı (Mann-Whitney U testi). Ayrıca korelasyon testlerine göre de (Pearson Correlation) belirgin pozitif korelasyon gösteriyordu ($p<0.0001$) (Şekil III).

Tablo I. PanIN ve PDA 'larda Ki67 ve p53 indeksleri

İstatistiki anlam (Mann-Whitney U testi)	İstatistiki anlam (Mann-Whitney U testi)	
	Ki67	p53
PANIN 1a – 1b arasında	0,022	p>0,05
PANIN 1a – 2 arasında	0,0003	0,02
PANIN 1a – 3 arasında	0,0001	0,02
PANIN 1a – tümör arasında	0,0002	0,004
PANIN 1a – normal arasında	p>0,05	p>0,05
PANIN 1b – 2 arasında	p>0,05	0,02
PANIN 1b – 3 arasında	0,002	0,02
PANIN 1b – tümör arasında	0,0010	0,003
PANIN 1b – normal arasında	0,002	p>0,05
PANIN 2 – 3 arasında	0,004	p>0,05
PANIN 2 – tümör arasında	0,0006	p>0,05
PANIN 2 – normal arasında	0,00003	0,001
PANIN 3 – tümör arasında	p>0,05	p>0,05
PANIN 3 – normal arasında	0,00001	0,002
tümör – normal arasında	0,000009	0,00019



Şekil II . Normal- PanIN- PDA'larda Ki67 ve p53 ortalama boyanma yüzdeleri



Şekil III . Lokalizasyona göre Ki67 ve p53 boyanma yüzdeleri.

TARTIŞMA

Birçok organın invaziv tümörlerine öncülük eden prekürsör lezyonlarına yönelik yoğun çalışmalar, o lezyonların standart klasifikasyon sistemlerinin oluşturulmasına neden olmuştur (18,19, 20). Önerilen histolojik klasifikasyon sistemleri, neoplastik progresyonun daha iyi anlaşılması için yapılan klinik, patolojik ve moleküler çalışmalara ışık tutmaktadır.

İlk kez Sommers ve arkadaşları, 45 yıl önce pankreasın duktus ve duktullerindeki epitelyal lezyonlarını tanımladılar (8). Bu lezyonlar için duktal hiperplazi, displazi, atipik duktal hiperplazi, intraduktal karsinom, karsinoma in situ gibi değişik tanımlamalar kullanılmış ancak standart bir klasifikasyon sistemi oluşturulamamıştır (8). Pankreasın intraduktal lezyonlarının 'PanIN' olarak tanımlanması ilk kez Klimstra ve Longnecker tarafından yapılmıştır (21). Bu klasifikasyon sistemi, morfolojik ve klinik gözlemlere ve bu lezyonların ve eşlik ettikleri PDA'ların moleküler genetik çalışmalarının sonuçlarına dayanılarak yapılmıştır. Hruban ve arkadaşları, 2001 yılında bu sınıflamayı tekrar gözden geçirerek standart bir sistem haline getirmişlerdir (7). Ancak, 2004 yılında yine Hruban ve arkadaşları bu klasifikasyon sisteminde bazı tanımlamalarda revizyonlar yaptılar (22). Diğer klasifikasyon sistemi ile çok büyük farklılıklar olmamakla birlikte PanIN'lerin tanımlanmasına boyut dahil edildi. Buna göre PanIN lezyonları 5 milimetreden küçük duktusları tutmaktadır. Ancak, 5 milimetreden büyük duktuslarda da görülme olasılığı, düşük de olsa vardır. Ayrıca nonneoplastik, hiperplastik ve belirgin atipi göstermeyen neoplastik lezyonların örtüşmesini önlemek amacıyla klasifikasyondaki antiteler modifiye edilerek 'lezyon' (özellikle PanIN 1A/lezyon) terimi de kullanılmıştır. PanIN 1A'nın neoplastik doğası henüz kesinlik kazanmadığı için bu yeni terim lezyonu daha iyi tanımlamaktadır.

PanIN lezyonlarının neoplastik doğası ve invaziv karsinoma ilerleme yetisi ile ilgili pek çok çalışma yapılmış ve bunun ile ilgili birçok kanıt gösterilmiştir (22, 23).

Örneğin, PDA izlenen pankreaslarda, çoğunlukla invaziv karsinom çevresinde PanIN lezyonlarına rastlanırken benign pankreasta bu lezyonların görülme sıklığı oldukça düşüktür (23, 24). PanIN 1A ve PanIN 1B sık görülen rastlantısal bir bulgu iken daha yüksek dereceli PanIN lezyonları invaziv kanserle birliktelik göstermektedir (24, 25, 26). Ayrıca PanIN 1 lezyonlar invaziv kanser olmayan erişkin pankreasların %40'ında görülürken PanIN 3 lezyonlar ancak %5 veya altındaki bir oranda izlenmektedir (24, 25, 26). Bunun aksine, PanIN 3 lezyonlar PDA bulunan pankreasların %30-50'sinde bulunmaktadır (24, 25, 26).

Bu morfolojik bulguların yanı sıra PDA'larda gözlenen çeşitli genetik değişikliklerin prekürsör lezyonlarda da görülmesi, bunların öncü lezyonlar olduğunun güçlü kanıtıdır. İHK olarak HER2/neu, p16, p53, K-ras gibi gen ürünleri çalışılmış ve sonuçta PDA ile çoğu PanIN lezyonunun boyanma paternlerinin birbirine benzer oldukları görülmüştür (9, 11, 12, 13, 27, 28, 29). Tümör supresör gen olan p53 insan kanserlerinde en sık değişikliğe uğrayan genidir (27). PDA'ların %50-70'inde p53 mutasyonları görülmektedir (27-30). Ancak, yapılan çalışmalar p53 ekspresyonunun daha çok tümör progresyonunun geç döneminde olduğunu göstermektedir (26). K-ras ve HER2/neu ekspresyonu ise tümörögenizde erken fenomen olarak tanımlanmaktadır (2).

Çalışmamızda, PanIN lezyonlarının standardize yeni sınıflaması kullanılarak derecelendirmeleri yapıldı. Ayrıca, bu lezyonların sayısı ve lokalizasyonları belirtildi. Normal PanIN- PDA içeren preparatlara İHK olarak uygulanan p53 ve Ki67 lerin boyanma paternleri ve yoğunlukları değerlendirildi. Özellikle, PanIN 2 ve 3 lezyonlarının interlobüler duktuslarda lokalize olma eğiliminde olduğu görüldü. PanIN lezyonlarının dereceleri arttıkça p53 ve Ki67 indeksleri anlamlı şekilde farklılık göstermekteydi.

p53 ekspresyonunun PDA ve PanIN 2 ve 3 lezyonlarında daha yüksek oranlarda olması, Apple ve arkadaşlarının (29) çalışmasında olduğu gibi p53'ün karsinogeneze geç fenomen olduğu yönündeki hipotezleri ile benzerlik göstermektedir.

Ki67 ekspresyonu hücre büyümesinin direkt ölçümünü sağlamaktadır. Bazı çalışmalarda prognoz ile Ki67 arasındaki ilişki tam olarak gösterilmemekle birlikte (31, 32), PDA'larda karsinogenez progresyonu ile birlikte Ki67 ekspresyonunun arttığı gösterilmektedir (16,17).

Ki67 ve p53 ekspresyonu pankreasın prekanseröz lezyonlarının tanısında ek bir yarar sağlayıp invaziv kansere dönüşebilecek riske sahip bu lezyonların identifiye edilmesine yardımcı olacaktır. Daha geniş hasta gruplarında, PDA'nın prekürsör lezyonu olarak kabul edilen PanIN lezyonlarının sıklığı ve moleküler genetik değişikliklerinin araştırılması pankreatik karsinogeneze ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

1. Johnson LD, Nickerson RJ, Easrerdar CL et al. Epidemiological evidence for the spectrum of change from dysplasia through carcinoma in situ to invasive cancer. *Cancer* 1968; 22: 901-14.
2. Dupont WD, Page DL. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med* 1985; 312: 146-151.
3. Hamilton SR. Molecular genetics of colorectal carcinoma. *Cancer* 1992; 70:1216-1221.
4. Carter D. Squamous cell carcinoma of the lung. An update. *Semin Diagn Pathol* 1985; 2: 226- 234.
5. Epstein JI. Pathology of prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma of the prostate. Prognostic influences of stage, tumor grade, and margins of resection. *Semin Oncol* 1994; 21 : 527-541.
6. Hruban RH, Van Der Riet P, Erozan YS, Sidransky D. Molecular biology and the early detection of carcinoma of the bladder- the case of Hubert H Humprey. *N Engl J Med* 1994; 330: 1276-1278.
7. Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 579-586.
8. Sommers SC, Murphy SA, Warre S. Pancreatic duct hyperplasia and cancer. *Arch Pathol* 1954; 27:629-640.
9. Day JD, Digioseppe JA, Yeo C et al. Immunohistochemical evaluation of HER-2 neu expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasms. *Hum Pathol* 1996; 27: 119-124.
10. Goggins M, Hruban RH, Kern SE. BRCA2 is inactivated late in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence and implications. *Am J Pathol* 2000; 156: 1767-1771.
11. Wilentz RE, Geradts J, Maynard R et al. Inactivation of the p16 (INK4A) tumor-suppressor gene in pancreatic duct lesions: loss of intranuclear expression. *Cancer Res* 1998; 58: 4740 - 4744.

12. Rosty C, Geradts J, Sato N et al. P16 inactivation in pancreatic intraepithelial neoplasias arising in patients with chronic pancreatitis. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 1495-1501.
13. Sessa F, Solcia E, Capella C et al. Intraductal papillary mucinous tumors represent a distinct group of pancreatic neoplasms: An investigation of tumour cell differentiation and K-ras, p53 and c-erbB-2 abnormalities in 26 patients. *Virchows Arch* 1994; 425: 357 - 67.
14. Key G, Becker MH, Maron B et al. New Ki-67 – equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. *Lab Invest* 1993; 68: 629 - 36.
15. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2002; 182: 311 - 22.
16. Terada T, Ohta T, Kitamura Y et al. Cell proliferative activity in intraductal papillary-mucinous neoplasms and invasive ductal adenocarcinomas of the pancreas. An immunohistochemical study. *Arch Pathol Lab Med* 1998; 122: 42-6.
17. Klein WM, Hruban RH, Klein-Szanto JP, Wilentz RE. Direct correlation between proliferative activity and dysplasia in pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN); additional evidence for a recently proposed model of progression. *Mod Pathol* 2002 ; 15: 441 – 7
18. Brennall TA, Crispin DA, Rabinovitch PS et al. Mutations in the p53 gene: an early marker of neoplastic progression in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1994; 107: 369 - 78.
19. Ellis IO, Pinder SE, Lee AH et al. A critical appraisal of existing classification systems of epithelial hyperplasia and in situ neoplasia of the breast with proposals for future methods of categorization: where are we going? *Semin Diagn Pathol* 1999; 16: 202 - 8.
20. Haggitt RC. Barrett's esophagus, dysplasia and adenocarcinoma. *Hum Pathol* 1994; 25: 982 - 93.
21. Klimstra D, Longnecker DS. K-ras mutations in pancreatic ductal proliferative lesions. *Am J Pathol* 1994; 145: 1547 - 50.
22. Hruban RH, Takaori K, Klimstra DS et al. An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2004; 28 (8) : 977-87.
23. Kozuka S, Sassa R, Taki T et al. Relation of pancreatic duct hyperplasia to carcinoma. *Cancer* 1979; 43: 1418 - 28.
24. Cubilla A, Fitzgerald PJ. Morphologic lesions associated with human primary invasive nonendocrine pancreas cancer. *Cancer Res* 1976; 36: 2690 - 8.
25. Andea A, Sarkar F, Adsay NF. Clinicopathological correlates of pancreatic intraepithelial neoplasia: a comparative analysis of 82 cases with and 152 cases without pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mod Pathol* 2003; 16: 996-1006.
26. Lüttges J, Reinecke-Luthge A, Mollmann B, et al. Duct changes and K-ras mutations in the disease-free pancreas: analysis of type, age relation and spatial distribution. *Virchows Arch* 1999; 435: 461 - 468.
27. Berrozpe G, Schaeffer J, Peinado MA et al. Comparative analysis of mutations in the p53 and K-ras genes in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 1994; 58: 185 - 91.
28. Motojima K, Urano T, Nagata Y et al. Detection of point mutations in the Kirsten-ras oncogene provides evidence for the multicentricity of pancreatic carcinoma. *Ann Surg* 1993; 217: 138 - 43.
29. Apple SK, Hecht JR, Lewin DN et al. Immunohistochemical evaluation of K-ras, p53, and HER2/neu expression in hyperplastic, dysplastic and carcinomatous lesions of the pancreas: Evidence for multistep carcinogenesis. *Hum Pathol* 1999; 30: 123 - 9.
30. Greenbalt MS, Bennet WP, Hollstein M et al. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 4855-78.
31. Makinen K, Hakala T, Lipponen P, Alhava E. Clinical contribution of bcl-2, p53 and Ki67 proteins in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Anticancer Res* 1998; 18: 615-18.
32. Lundin J, Nordling S, Von Boguslowsky K, Roberts PJ. Prognostic value of Ki67 expression, ploidy and S-phase fraction in patients with pancreatic cancer. *Anticancer Res* 1995; 15: 2659 - 68.