

¹ Recep ERÖZ

² Nurhan CÜCER

³ Murat OKTAY

⁴ Yusuf AYDIN

Nodüler Guatr Tanısı Almış Hastaların Tiroid Hücrelerinin AgNOR Sayısı / Çekirdek ve Toplam AgNOR Alanı / Çekirdek Alanı Oranının Değerlendirilmesi

Evaluation of “AgNOR Count / Nucleus” and “Total AgNOR Area / Nuclear Area” Proportions in Thyroide Cells of Cases with Nodular Goiter

ÖZET

Amaç: Çekirdekçik organize edici bölgeler (NORs) çekirdekçik içerisinde preribozomların işlenerek sitoplazmada olgun ribozom parçalarını oluşturan, ribozomal RNA (rRNA)’lara transkribe edilen ve tandem olarak tekrarlanan DNA ilmekleridir. Bu merkezler gümüş boyama sonrasında incelendiğinde, interfaz çekirdeğinde görülebilirler. Bu çalışmanın amacı, nodüler guatr tanısı almış bireylerin tiroid hücrelerindeki ortalama AgNOR sayısı (herbir kişide toplam AgNOR sayısı / incelenen çekirdek sayısı oranı) ve “Toplam AgNOR alanı / çekirdek alanı” (TNA / ÇA) oranlarının cinsiyet ve yaşa göre değişip değişmediğinin araştırılmasıdır.

Gereç Yöntem: Çalışmaya ince iğne aspirasyon biyopsisi (İİAB) nodüler guatr ile uyumlu olan (kistik olmayan) 15 Kadın (yaş aralığı 38–68) ve 15 erkek (yaş aralığı 38–68) birey dahil edildi. İİAB ile elde edilen biyopsi materyalleri, AgNOR’ların tespiti için spesifik bir protokole göre boyandı. Her bir birey için 100 çekirdek değerlendirilerek, ortalama AgNOR sayısı ve “TNA / ÇA” oranları tespit edildi.

Bulgular: Nodüler guatr’lı erkek hastaların ortalama AgNOR sayısı ($2,06 \pm 0,46$), kadın hastaların ortalama AgNOR sayısından ($1,97 \pm 0,49$) anlamlı derecede yüksek değildi ($p = 0,62$). Erkek hastaların ortalama “TNA / ÇA” oranı ($6,00 \pm 1,11$) ile Kadın hastaların ortalama “TNA / ÇA” oranı ($5,34 \pm 1,13$) arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p = 0,12$). Buna ilaveten Kadın hastalarda ve erkek hastalarda hem ortalama AgNOR sayısı ile yaş ($r = 0,11$ $p = 0,56$) hem de “TNA / ÇA” oranı ile yaş arasında anlamlı bir korelasyon yoktu ($r = 0,30$; $p = 0,11$).

Sonuç: Nodüler guatr tanılı hastaların tiroid hücrelerindeki AgNOR proteinlerinin sentez hızı, yaş veya cinsiyetten etkilenmemektedir. Bundan dolayı, bu proteinlerin hastalarda artışı hastalığa bağlıdır.

Anahtar Kelimeler: AgNORs, NOR, nodüler guatr, tiroid ince iğne aspirasyon sitolojisi

ABSTRACT

Aim: NORs are loops of DNA, tandemly repeated that transcribed into ribosomal RNA (rRNA) processed into preribosomes in the nucleoli, and which eventually become part of mature ribosomes in the cytoplasm. These centers are visible in interphase nuclei when examined after a silver staining. The aim of this study was the comparison of the AgNOR count/nucleus and “Total AgNOR area/ nuclear area” (TNA / NA) proportions to different age and sex in cases with nodular goiter.

Materials and Methods: Fifteen female (age range 38–68) and male (age range 38–68) whose fine needle aspiration biopsy (FNAB) were compatible with non-cystic nodular goiter were included in the study. Those biopsy materials obtained by FNAB were stained for AgNOR detection according to a specific protocol. One hundred nuclei per individual have been evaluated, and both mean AgNOR count and TNA / NA values of individual cells were detected for each cases.

Results: Male patients with nodular goiter had not significantly higher mean AgNOR count (2.06 ± 0.46 %) than mean AgNOR count of females (1.97 ± 0.49) ($p = 0.62$). There is not any differences between mean TNA / NA ratio of males (6.00 ± 1.11) and females (5.34 ± 1.13) ($p = 0.12$). Additionally, there is not any correlation between age and mean AgNOR count ($r = 0.11$ $p = 0.56$) and TNA / NA ratio ($r = 0.30$; $p = 0.11$) in both of females and males.

Conclusion: The rate of AgNOR proteins synthesis is not effected by age or sex in thyroid cells of cases with nodular goiter. Therefore, the increment of these proteins in patients is due to disease.

Keywords: NOR, AgNORs, nodular goiter, thyroid fine needle aspiration cytology

¹ Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Düzce, Türkiye

² Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

³ Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Düzce, Türkiye

⁴ Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Endokrinoloji Bölümü, Düzce, Türkiye

Submitted/Başvuru tarihi:
14. 09. 2012

Accepted/Kabul tarihi:
05. 10. 2012

Registration/Kayıt no:
12 09 252

Corresponding Address /Yazışma Adresi:

Dr. Recep Eröz
Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD.
81820, Düzce
e-posta:
receperoz@duzce.edu.tr

© 2012 Düzce Medical Journal
e-ISSN 1307- 671X
www.tipdergi.duzce.edu.tr
duzcetipdergisi@duzce.edu.tr

GİRİŞ

Çekirdekçik organize edici bölgeler (NORs), ribozomal DNA (rDNA) ve bazıları arjirofilik olan proteinlerden oluşan akrosentrik kromozomlar üzerindeki genetik bölgelerdir. İnsan interfaz hücrelerinde, çekirdekçik içerisinde birarada bulunan gümüşle boyanmış NOR kümeleri (AgNORs) ribozomal RNA sentez bölgelerini ve transkripsiyonel olarak aktif NOR ları göstermektedir. Işık mikroskobu altında gümüş boyamaları değerlendirildiğinde, AgNORlar çekirdekçik alanında yerleşen AgNOR bölgelerini oluştururlar ve hematoksil-eosin ve Nissl boyama ile görülenlere göre daha küçüktürler (1). Bununla beraber, rDNA'nın transkripsiyonel aktivitesine göre hücre aktivitesi, indirekt olarak AgNOR parametrelerinin (AgNOR alanı, AgNOR sayısı, çekirdekçik çapı veya bu değerlerin toplamının, incelenen çekirdek sayısına oranı ve AgNOR alanının çekirdek alanına bölünmesiyle elde edilen AgNOR oranı) sayım ya da ölçümü ile değerlendirilebilir (2-7). AgNORlar ile çoğalan hücre nükleer antijeni (PCNA) (2) ve Ki 67, (8,9) gibi diğer hücre proliferasyon markırları arasında önemli bir ilişki vardır. Bu nedenle AgNOR boyama interfaz çekirdeğindeki çekirdekçiği (10) ve metafazda kromozomlar üzerindeki aktif NOR bölgelerini göstermek için kullanılan en önemli metodlardan biridir (11). Bu özelliğinden dolayı AgNOR boyama yönteminin çeşitli dokulara başarılı bir şekilde uygulandığı bir çok çalışma vardır (12–18). AgNOR'ların proliferasyon indeksinin iyi bir göstergesi olması özelliğinden dolayı, tümör patolojisinde interfaz AgNOR miktarının çeşitli hastalıklardaki değişimi ve bunların çeşitli kanser tiplerindeki prognostik karakterizasyonu ile ilgili birçok araştırmalar vardır (8,9,19,20).

Tiroid nodülleri ultrason incelemesi ya da diğer tarama teknikleri ile erişkin popülasyonunda tespit edilebilmektedir. Morfolojik özelliklerine ilave olarak, doğru tanı için bu nodüllerin daha fazla incelenmesi gerekebilir. İnce iğne aspirasyonu (İİA) mikroskobik inceleme için gerekli olan doku örneklerinin elde edilmesinde oldukça yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (13). İİA ile elde edilen biyopsi materyallerinin tanı doğruluğunu artırmak için, morфометrik çalışmalar (21,22), DNA ölçümleri (21,23), immünohistokimyasal ve enzim tekniklerini (24,25) kapsayan ve kanser tanısı için farklı başarı derecesine sahip olan birçok denemeler yapılmıştır. Bu parametrelerin çoğu istatistiksel öneme sahip olmasına rağmen selim ve habis lezyonlar arasındaki örtüşme göz önünde bulundurulduğunda, bunlar daha

Tablo 1. Nodüler guatrli hastalarda AgNOR sayısı ve “TNA / ÇA” oranları.

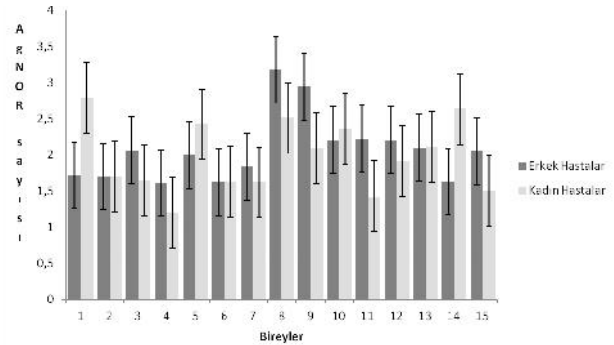
Grup (NG)	N	n	AgNOR sayısı Ortalama $\pm$ SS	“TNA / ÇA” oranı (%) Ortalama $\pm$ SS	P
Kadın	15	1500	1,97 $\pm$ 0,19	5,34 $\pm$ 1,13	0,62 ^a
Erkek	15	1500	2,06 $\pm$ 0,16	6,00 $\pm$ 1,11	0,12 ^b

N:Birey sayısı, n:İncelenen hücre sayısı, SS:Standart sapma, NG: Nodüler Guatr. (α ve β sırasıyla AgNOR sayısı ve “TNA / ÇA” oranı için cinsiyete göre karşılaştırma p değerleri).

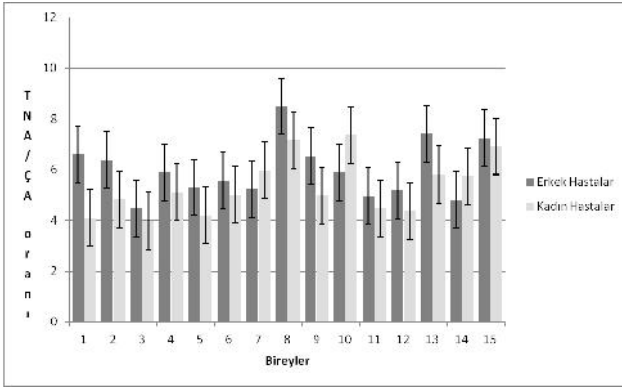
az pratik öneme sahiptir. Bu nedenle AgNOR gibi ilave değerlendirme yöntemlerine gereksinim duyulmaktadır. AgNOR boyama tekniğinin selim ve habis lezyonları ayırmak için patolojik materyaller üzerindeki neoplastik lezyonların büyük çoğunluğuna başarılı bir şekilde uygulandığı bilinmektedir (26,27). Bu bilgiler ışığında, çalışmamızla tiroid nodüllerinden İİA yapılmış nodüler guatrli olguların tiroid hücrelerindeki ortalama AgNOR sayısı ve “TNA / ÇA” oranları ile yaş ve cinsiyet arasında bir ilişkinin olup olmadığını belirlemeyi amaçladık.

MATERYAL ve METOD

Nodüler guatrli (kistik olmayan) 15 Kadın ve 15 erkek olgu bu çalışmaya dahil edildi. Çalışma için yerel etik kuruldan izin alındı. Bir endokrinoloji uzmanı tarafından bu hastaların tiroid nodüllerinden ultrason eşliğinde İİA ile uygun örnekler alındı. Elde edilen bu materyaller temiz bir lama yayıldı ve yaklaşık olarak 15 dakika oda sıcaklığında havada kurutuldu. Kurutulan bu preparatlar saf metanolde yaklaşık olarak 5 dakika fikse edilerek, Benn & Perle (28) ve Lindner (29) protokolünün hafif modifikasyonu ile AgNOR boyama işlemi uygulandı. Gümüş ile boyama yapıldıktan sonra, preparatlar distile suda çalkalandı ve ksilolde bekletildikten sonra entellan yardımı ile lamel kullanılarak kapatıldı.



Şekil 1. Kadın ve erkek hastaların ortalama AgNOR sayısı oranları.



Şekil 2: Kadın ve erkek hastaların ortalama "TNA / ÇA" oranları.

Her bir bireye ait 100 çekirdek kamera ataçmanlı bir bilgisayara aktararak bu hücrelerin hem ortalama AgNOR sayısı, hem de "TNA / ÇA" oranları, bir bilgisayar programında ölçülerek hesaplandı (30). Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediği Kolmogorov-Smirnov testi ile belirlendi. İstatistiksel analiz bağımsız Student't testi ve Pearson korelasyon testi kullanılarak yapıldı (SPSS programı, versiyon: 11.0). İstatistiksel anlamlılık için $p < 0.05$ kabul edildi.

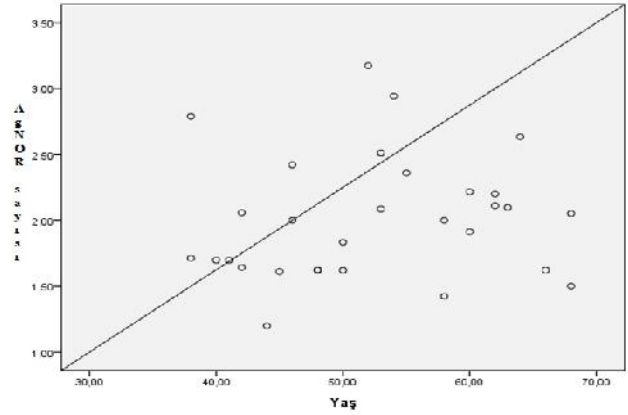
SONUÇLAR

Kadınların ve erkeklerin sırasıyla yaş ortalaması $52,13 \pm 9,05$ ve $52,80 \pm 9,68$ idi ($p = 0,85$). Çalışmaya dahil edilen nodüler guatrırlı kadın hastaların ortalama AgNOR sayısı ($1,97 \pm 0,49$) erkek hastaların ortalama AgNOR sayısı ($2,06 \pm 0,46$) oranından önemli derecede farklı değildi ($p = 0,62$) (Şekil 1). Benzer şekilde kadın nodüler guatrırlı hastaların ortalama "TNA / ÇA" oranı ($5,34 \pm 1,13$) erkek hastaların ortalama "TNA / ÇA" oranından ($6,00 \pm 1,11$) anlamlı derecede farklı değildi ($p = 0,12$) (Tablo 1) (Şekil 2).

Buna ilaveten yapılan korelasyon testi sonunda erkek hastalarda ve kadın hastalarda hem ortalama AgNOR sayısı ile yaş ($r = 0,11$ $p = 0,56$) hem de ortalama "TNA / ÇA" oranı ile yaş arasında anlamlı bir korelasyon tespit edilemedi ($r = 0,30$; $p = 0,11$) (Şekil 3,4). Gümüşle boyanmış olan nodüler guatrırlı erkek (a,b) ve kadın (c,d) hastaların AgNOR görüntüleri Şekil 5'de verilmiştir.

TARTIŞMA

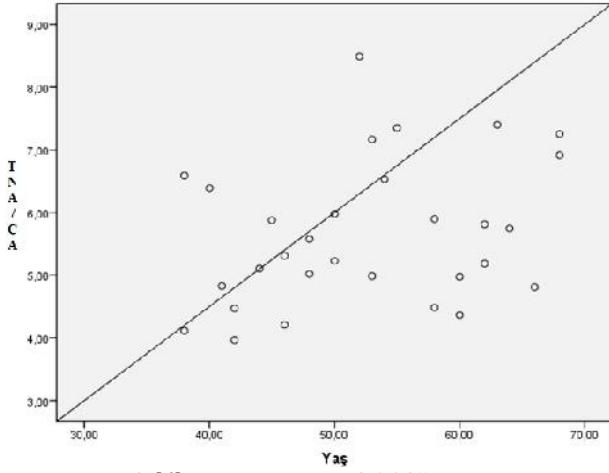
NOR'lar ribozomal genleri içeren kromozomal segmentlerdir. NOR'lar aynı zamanda gümüş iyonlarını bağlayabilme özelliğine sahip olması nedeniyle, rutin işleme tabi tutulan sitolojik ve histolojik örneklerde gümüş boyama metodu ile seçici olarak görülebilmektedir (31). Bu yöntem kullanılarak



Şekil 3: Yaşa göre AgNOR sayısı oranı.

yapılmış çeşitli çalışmalar vardır (12–18). AgNOR sayısı ve hücre proliferasyonu arasındaki korelasyon tümör hücrelerinde geniş bir şekilde incelenmiştir (13, 32). Bu nedenle AgNOR parametresi hücrelerin neoplastik doğasını yansıtabilir ve tümör patolojisinde önemli bir prognostik indikatör olarak karşımıza çıkar (32–34). AgNOR parametrelerinin hesaplanması (sayı, büyüklük ve dağılım) tümör patolojisinde hem prognostik hemde tanı amacıyla kullanılır. Çekirdek içerisindeki AgNOR sayısı ve dağılımı böbrek, mesane, yutak, tiroid kanseri, çoklu miyeloma ve deri melanositik lezyonları gibi bazı neoplazilerin prognozu ve tanısında kullanılmaktadır (13, 19). AgNOR düzeylerinde görülen değişiklikler aynı zamanda protein sentezindeki değişiklikleri yansıtmaktadır. AgNOR proteinlerinin sayısı ve hacmindeki artışların hücre çoğalması, farklılaşma vb. hücre aktivitesindeki artış ile ilişkili olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar yapılmıştır (13, 35, 36). Tiroid dokusundan İİAB yapılması tiroid nodüllerinin klinik incelemesi için kabul edilen bir metot olmasına rağmen, tekniğin en büyük kısıtlaması, çeşitli foliküler lezyonlar arasındaki ayrımının zor olmasıdır (37, 38).

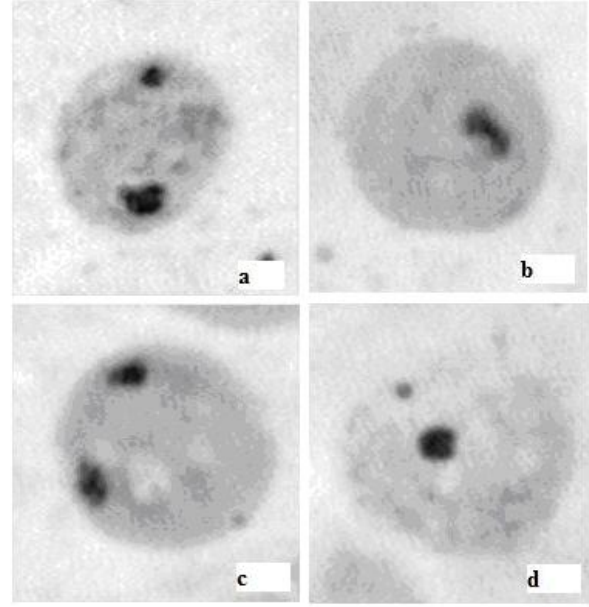
Daha önce yapmış olduğumuz bir çalışmada, tiroid papiller karsinom ve normal tiroid hücre çekirdeklerinde ortalama AgNOR sayısını değerlendirdik ve kanser gurubunda ortalama AgNOR sayısının normal tiroid hücrelerindeki kadar anlamlı derecede yüksek olduğunu tespit ettik (14). Yine yapmış olduğumuz bir başka çalışma da kistik nodüler guatr tanısı almış hastalarda hem cinsiyet hem de yaş ile AgNOR protein sentezi arasında bir ilişki olmadığını tespit ettik (17). Bunlara ilaveten, selim ve habis lezyonları ayırmak için AgNOR sayısı ve "TNA / ÇA" oranları için cutoff değerleri tanımladık ve bu metodun habis ve selim tiroid lezyonlarındaki hücrelerin proliferasyon aktivitesini değerlendirmek için güvenilir bir metod olduğunu ve rutin sitopatolojiye katkı sağlayabileceğini tespit ettik (13).



Şekil 4. Yaşa göre "TNA / ÇA" oranı.

Çekirdekçik statik bir yapıda değildir ve onun kompozisyonu hücrenin metabolik aktivite durumuna bağlı olarak oldukça değişkenlik gösterebilir (39). Yapılan çalışmalarda yaşı ilerlemesine bağlı olarak, hücrelerin çoğalma oranı, protein sentezi, enerji kullanımı vb. fonksiyonlarında azalmaların olduğu tespit edilmiştir. Örneğin; NORların aktivitesinin insan lenfositleri (40, 41), fibroblastlar (42) ve kemik iliğinde (43) yaşı ilerlemesine bağlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Tüm bunları göz önünde bulundurarak, çalışmamızda nodüler guatr tanısı konmuş bireylerin, gümüşle boyanmış tiroid hücrelerindeki ortalama AgNOR sayısı ve "TNA / ÇA" oranları ile cinsiyet ve yaş arasında bir ilişkinin bulunup bulunmadığını tespit etmeye çalıştık.

AgNOR boyama tekniği uygulanarak yapılmış çok çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (40–46). Bu yöntemlerle kıyaslandığında bizim kullandığımız yöntemin, diğer yöntemlerden üstün yönleri bulunmaktadır. Yöntemimiz de "TNA / ÇA" oranının her bir hücre için ayrı ayrı ölçümü, her bir hücrenin NOR protein sentez kapasitesinin tespit edilmesine izin verir. Bilindiği gibi hücrenin metabolik aktivitesine bağlı olarak yalnızca üretilen biyomoleküllerin miktarı değil aynı zamanda hücre ve çekirdeğin hacminde de değişiklikler meydana gelmektedir. Bu nedenle, "TNA / ÇA" oranının tespiti ile her bir hücrenin proliferasyon kapasitesi hakkında daha net bilgiler elde edilmiş olur. Kullandığımız yöntemin habis ve selim tiroid lezyonlarını ayırmadaki başarı oranı bu nedenle diğer yöntemlerden daha yüksektir. Bu yöntemin uygulamasının basit ve ucuz oluşu ise yöntemin diğer avantajlarından (13). Bildiğimiz kadarıyla nodüler guatr tanısı konmuş (kistik olmayan) bireylerin tiroid hücrelerindeki AgNOR sayısı ve "TNA / ÇA" oranı ile yaş ve cinsiyet arasında bir ilişkinin olup olmadığı ile ilgili bir çalışmaya literatürde rastlayamadık. Daha



Şekil 5. Değerlendirilen hücrelerin mikroskopik görüntüsü: (a, b) erkek, (c,d) kadın nodüler guatr hastası olan bireylere ait tiroid hücreleri.

önce kistik nodüler guatr tanısı almış hastalarla ilgili yapmış olduğumuz çalışmada, yine selim lezyon olan nodüler guatrlı bireyler arasında yapıldığında sonucun değişip değişmeyeceğini sorgulamıştık (17). Çünkü kistik nodüler guatrlı hastalarda nodül içerisinde bulunan sıvının etkileşimde olduğu tiroid hücrelerine yapmış olduğu fiziksel basıncın, AgNOR protein sentezine olası herhangi bir etkisinin olabileceği ihtimalini düşünerek, bu parametreyi dışlamak istedik.

Bu nedenle nodüler guatr tanısını almış bireylerin tiroid hücrelerindeki AgNOR protein sentezinin yaş ve cinsiyet ile herhangi bir ilişkisinin olup olmadığını belirlemek için, AgNOR sayısı ve "TNA / ÇA" oranlarını tespit ettik. Yaptığımız çalışma sonucu hem AgNOR sayısı hemde "TNA / ÇA" ile cinsiyet ve yaş arasında anlamlı bir ilişki bulamadık. Sonuç olarak nodüler guatr tanısı almış bireylerin AgNOR protein sentezinin yaş ve cinsiyetten bağımsız olduğunu tespit ettik.

KAYNAKLAR

1. Mennel HD, Müller I. Morphometric investigation on nuclear and nucleolar arrangement and AgNOR content in the rat hippocampus under normal and ischemic conditions. *Exp. Toxicol. Pathol.* 46:491–501, 1994.
2. Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem. J.* 18:5–14, 1986.
3. Derenzini M. The AgNORs. *Micron* 31:117–120, 2000.

4. Garcia-Moreno LM, Conejo NM, Pardo HG, Gomez M, Martin FR., Alonso MJ, Arias JL. Hippocampal AgNOR activity after chronic alcohol consumption and alcohol deprivation in rats. *Physiol. Behav.* 72:115–121, 2001.
5. Raska I, Shaw PJ, Cmarko D. New insights into nucleolar architecture and activity. *Int. Rev. Cytol.* 255:177–235, 2006.
6. Sirri V, Urcuqui-Inchima S, Roussel P, Hernandez-Verdun D. Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem. Cell Biol.* 129:13–31, 2008.
7. Hayashida M, Miyaoka T, Tsuchie K, Yasuda H, Wake R, Nishida, A, Inagaki T, Toga T, Nagami H, Oda T, Horiguchi J. Hyperbilirubinemia-related behavioral and neuropathological changes in rats: a nucleolar organizer regions in tissue sections and cellular smears. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 14:14–23, 2009.
8. Canepa M, Gambini C, Sementa AR, Borgiani L, Rovida S. Nucleolar organizer regions and Ki-67 immunostaining in ductal breast cancer: a comparative study. *Pathologica* 82:125-32, 1990.
9. Soomro IN, Whimister WF. Growth fraction in lung tumors determined by Ki-67 immunostaining and comparison with AgNOR scores. *J Pathol* 162:217–22, 1990.
10. Trere D. AgNOR staining and quantification. *Micron* 31:127–131, 2000.
11. Imamoglu N, Demirtas H, Donmez-Altuntas H, Hamurcu Z, Ilten A. NORs Expression increases on metaphase chromosomes of Down syndrome lymphocytes, in concordance with the mitogen concentration in the culture medium. *Cytometry Part B-Clin Cytom.* 66B:36–39, 2005b.
12. Cucer N, Imamoglu N, Tozak H, Demirtas H, Sarac F, Tatlisn A, Ozturk F. Two-dimensional agnor evaluation as a prognostic variable in urinary bladder carcinoma: A different approach via total agnor area/nucleus area per cell. *Micron* 38:674–679, 2007.
13. Eroz R, Cucer N, Karaca Z, Unluhizarci K, Ozturk F. The Evaluation of Argyrophilic Nucleolar Organizing Region Proteins in Fine-Needle Aspiration Samples of Thyroid. *Endocr. Pathol.* 22:74–78, 2011.
14. Eroz R, Cucer N, Unluhizarci K, Ozturk F. Evaluation of AgNOR spot number in thyroid papillary carcinoma and normal cells nuclei. *Journal of Health Sciences.* 19(2):102-107, 2010.
15. Eroz R, Okur M, Berik O. Down sendromlu çocuklarda AgNOR sayısı ile gelişim arasında bir ilişki var mı? *Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 1(1):8-11, 2011.
16. Eroz R, Okur M, Ozkan A, Berik O, Gunes C. Does higher NORs expression affect the developmental stages of down syndrome infants? *Genetic Counseling* 23(2):249-253, 2012.
17. Eroz R., Unluhizarci K, Cucer N, Baltaci D, Oktay M. Kistik Nodüler Guatrli Olguların Tiroid Hücrelerindeki AgNOR Sayısı ve AgNOR Yüzey Alanı/Çekirdek Alanı Oranının Yaş ve Cinsiyete göre Karşılaştırılması *Konuralp Tıp Dergisi* 4(2):31-35, 2012.
18. Eroz R, Tasdemir S, Dogan H. Is there any relationship between decreased AgNOR protein synthesis and human hair loosing? *Biotechnic & Histochemistry Early Online*:1–5, 2012.
19. Pich A, Chiusa L, Margaria E. Role of the argyrophilic nucleolar organizer regions in tumor detection and prognosis. *Cancer Detect Prev* 19:282-91, 1995.
20. Pich A, Chiusa L, Margaria E. Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology. *Micron* 31:133-41, 2000.
21. Montironi R, Bracischi A, Scarpelli M, Matera G, Alberti R. Value of quantitative nucleolar features in the preoperative cytological diagnosis of follicular neoplasias of the thyroid. *J Clin Pathol* 44:509-514, 1991.
22. Crissmann JD, Drozdowicz S, Johnson C, Kini SR. Fine needle aspiration diagnosis of hyperplastic and neoplastic follicular nodules of the thyroid: a morphometric study. *Anal Quant Cytol Histol* 13:41-52, 1991.
23. Salmon I, Gasperin P, Remmelink M, Rahier I, Rocmans P, Pasteels JL, Heimann R, Kiss R. Ploidy level and proliferative activity measurements in a series of 407 thyroid tumors or other pathologic conditions. *Hum Pathol* 24(8):912-920, 1993.
24. De Micco C, Ruf J, Chrestian MA, Gros N, Henry JF, Carayon P. Immunohistochemical study of thyroid peroxidase in normal, hyperplastic and neoplastic human thyroid tissues. *Cancer* 67(12):3036-3041, 1991.
25. Kotani T, Asada Y, Aratake Y, Umeki K, Yamamoto I, Tokudome R, Hirai K, Kuma K, Konoe K, Araki Y, et al. Diagnostic usefulness of dipeptidyl aminopeptidase IV monoclonal antibody in paraffin-embedded thyroid follicular tumours. *J Pathol* 168(1):41-45, 1992.
26. Ploton D, Visseaux-Coletto B, Canellas J-C, Bourzat C, Adnet JJ, Lechki C, Bonnet N. Semiautomatic quantification of silver-stained nucleolar organizer regions in tissue sections and cellular smears. *Anal Quant Cytol Histol* 14(1):14- 23, 1992.
27. Rüschoff J. Nucleolar organizer regions in pathomorphologic tumor diagnosis. *Veroff Pathol* 139: 1-144, 1992.
28. Benn PA & Perle M. Chromosome staining and banding techniques. In: Rooney D.E. Czepulkowski BH. (eds). *Human Cytogenetics, Constitutional Analysis, actical approach*, Vol 1. Oxford Univ. Press 91-118, 1986.
29. Lindner LE. Improvements in the silver-staining technique for nucleolar organizer regions (AgNOR). *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 41:439-445, 1993.
30. Demirtas H, Imamoglu N, Donmez H, Cucer N, Yilmaz A, Candemir Z. Condensed chromatin surface and NOR surface enhancement in mitogen-stimulated lymphocytes of Down syndrome patients. *Ann Genet-Paris* 44:77-82, 2001.
31. Howell WM. Selective staining of nucleolus organizer regions (NORs). In: Busch, H., Rothblum, L. (Eds.). *The Cell Nucleus*, Academic Press, New York, pp. 89–143, 1982.
32. Pich A, Chiusa L, Navone R. Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumours. *Annals of Oncology* 15:1319-1329, 2004.
33. Jones AS, Roland NJ, Caslin AW, Cooke TG, Cooke LD, Foster G. A comparison of cellular proliferation markers in squamous cell Carcinoma of head and neck. *J Laryngol Otol* 108:859-64, 1994.
34. Underwood JCE. AgNOR measurements as indices of proliferation, ploidy and prognosis. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 48 M:239-40, 1995.
35. Hall P, Crocker J, Watts A, Stansfeld A. A comparison of nucleolar organizer region staining and Ki 67 immunostaining in non Hodgkin' s lymphoma. *Histopathology* 12:373-381, 1988.
36. Jan Mohamed M, Armstrong J, Crocker J, Leyland J, Hulten M. The relationship between number of interphase NOR and NOR bearing chromosomes in non Hodgkin's lymphoma. *J Pathol.* 158 (1): 3-7, 1989.
37. Kini SR, Miller JM, Hamburger JI, Smith-Purslow MJ. Cytopathology of follicular lesions of the thyroid gland. *Diagn Cytopathol* 1:123-132, 1985.
38. Hamburger JI, Hamburger SW. Fine needle biopsy of thyroid nodules: avoiding the pitfalls. *NY State J Med* 86: 241-249, 1986.
39. Andersen JS, Lyon CE, Fox AH, Leung AKL, Lam YW, Steen H et al. Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr. Biol.* 12 (1):1–11, 2002.

40. Denton TE, Liem SL, Cheng KM, Barrett JV. The relationship between aging and ribosomal gene activity in humans as evidenced by silver staining. *Mech. Ageing Dev.* 15 (1):1-7, 1981.
41. Das BC, Rani R, Mitra AB, Luthra UK. The number of silver-staining NORs (rDNA) in lymphocytes of newborns and its relationship to human development. *Mech. Ageing Dev.* 36 (2):117-123, 1986.
42. Buys CH, Osinga J, Anders GJ. Age-dependent variability of ribosomal RNA-gene activity in man as determined from frequencies of silver staining nucleolus organizing regions on metaphase chromosomes of lymphocytes and fibroblasts. *Mech. Ageing Dev.* 11 (1):55-75, 1979.
43. Pedrazzini E, Mamaev N, Slavutsky I. Age related decrease of NOR activity in bone marrow metaphase chromosomes from healthy individuals. *Mol. Pathol.* 51(1): 39-42, 1998.
44. Thomas S, Mukherjee AB. A longitudinal study of human age-related ribosomal RNA gene activity as detected by silver-stained NORs. *Mech. Ageing Dev.* 92(2-3):101-109, 1996.
45. Camargo RS, Shirata NK, di Loreto C, Garcia EA, Castelo A, Longatto Filho A. Significance of AgNOR measurement in thyroid lesions. *Analysis and Quantitative Cytology and Histology* 28:188-192, 2006.
46. Slowinska-Klencka D, Klencki M, Popowicz B, & Levinski A. Multiparameter analysis of AgNOR in thyroid lesions: comparison with PCNA expression. *Histol Histopathol* 19:785-792, 2004.