مجله گوش، گلو، بینی و حنجره ایران
شماره سی و نهم

The Iranian Journal of Oto rhinolaryngology

دانشگاه علوم پزشکی مشهد

بررسی تشخیصی و ارزش رنگ‌آمیزی Agnor ، در ضایعات نئوپلاستیک و غیرنئوپلاستیک تیروئید

Diagnostic value of AgNOR staining in neoplastic and non neoplastic lesions of thyroid

1. H.Ayatollahi. MD(Resident of pathology, Mashhad university of Medical Sciences))
2. N.Sharifi. MD ((Assistant Professor of pathology, Mashhad university of Medical Sciences))
3. MR. Kalantari. MD ((Assistant Professor of pathology, Mashhad university of Medical Sciences))
4. A. Omidi. MD ((Professor of pathology, Mashhad university of Medical Sciences))
Department of pathology, Mashhad University of Medical science, Mashhad, Iran.

Abstract

Background: The aim of this study was to determine the value of the argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) as a proliferative marker in neoplastic and non-neoplastic lesions of the thyroid i-r Methods : AgNOR count were evaluated in paraffn. Embeded tissue of resection specimens of the thyroid from 100 patients was retrieved from files of the Pathology Department of the Ghaem Hospital Medical Center including :

Normal thyroid gland (N = 8)
Nadular Goiter (N=19)
Follicular Adenoma (N = 34)
Follicular carcinoma (N=10)
Medullary carcinoma (N = 4)
Papillary carcinoma (N = 15)
Anaplastic carcinoma (N = 4)
Thyroiditis (N = 6)

The investigated parameters included the number, size, shape and localization of AgNOR dots in nucleoli of hundred cells and percentage ofnucleoli with at least 3 and 5 or more AgNOR dots per cell (distribution score).

Results: The mean AgNOR dots and 3^ dot per cell were statistically signifi tf cantly higher in malignant lesions in comparison to benign lesions. No clear separation statically between groups about parameter 5 or more dots per cells. Total discrimination between follicular adenoma and carcinoma was achieved by quantification of AgNOR dot tumor uncleolous cell (AgNOR distribution score) Conclusion : The AgNOR and AgNOR distribution score proved to be the most valuable diagnostic criterion for the differentiation between follicular adenoma and carcinoma of the thyroid .

Key words: Thyroid , Neoplasms ,Non neoplastic lesion ,AgNOR,.

عنوان مقاله:
بررسی تشخیصی و ارزش رنگ‌آمیزی AgNor، در ضایعات نئوپلاستیک و غیر نئوپلاستیک تیروئید

مؤلفین
آقای دکتر حسین آیت اللهی - دستیار پاتولوژی
خانم دکتر نوریه شریفی - استادیار پاتولوژی
آقای دکتر محمدرضا کلانتری - استادیار پاتولوژی
آقای دکتر امیدی A - استاد پاتولوژی

مقدمه (Introduction)

یکی از مشکلات تشخیصی تومور پاتولوژی تمایز نئوپلاسمهای خوش‌خیم و بدخیم فولیکولر تیروئید است بیماریهای تیروئید از بیماریهای شایع در کشور ما به‌شمار می‌روند و متفاوت‌بودن اشکال درمان در ضایعات مختلف تیروئید اهمیت تشخیص صحیح به خصوص افتراق آدنوم فولیکولار از کارسینوم فولیکولر را بیش از پیش یادآوری می‌کند. معیارهای تشخیصی از جمله بررسی architecture و آتی‌پی سلولی قابل اعتماد نبوده و در مواردی با اعمال معیارهای متفاوت چون تهیه برش مکرر به خصوص از ناحیه کپسول و مشاهده تهاجم عروقی و کپسولی تصمیم‌گیری قاطع درمورد افتراق نئوپلاسم خوش‌خیم و بدخیم تیروئید را ممکن نمی‌سازد. گستره‌های سیتولوژی تهیه شده از FNA تیروئید هم تمایز مشخصی بین آدنوم و کارسینوم فولیکولر ایجاد نمی‌کند (۲۴، ۲۳، ۱۹، ۱).

مطالعات و تلاشهای مداوم محققین جهت دستیابی به روشهای نوین در رابطه با تصمیم‌گیری قاطع در مورد نئوپلاسم‌های تیروئید در حال انجام است. از آن جمله شناخت هستک به‌عنوان معیار تشخیصی نئوپلاسمهای بدخیم - بررسی تعداد و اندازه هستکهای موجود در هسته سلول و اتصال به ماميران هسته را می‌توان نام برد (۴).

اندازه گیری کمیت AgNOR انترفاز روشی است که در رابطه با ارزیابی کینتیک سلولی در طول دهه‌های گذشته معرفی شده است. این روش به‌عنوان مارکر مهم تشخیصی در افتراق نئوپلاسمهای خوش‌خیم و بدخیم و یکی از روشهای آسانی است که اجازه می‌دهد اطلاعاتی در رابطه با سرعت پرولیفراسیون سلولی در نمونه‌هایی که به‌طور روتین تهیه می‌شوند به‌دست آورد (۳).

NOrs نواحی کروماتینی هستکی رنگ‌پذیر هستند که در انتهای تلوفاز تشکیل می‌شوند (۳). این نواحی حلقه‌هایی از DNA هستکی ریبوزومی بوده و حامل ژن‌های کدکننده RDNA می‌باشند. تعداد و نقاط AgNOR با میزان پرولیفراسیون یا تقسیم سلولی ارتباط مستقیم داشته و به‌عنوان یکی از روشهای قابل اعتماد در بررسی معیارهای نئوپلازیک در تومور پاتولوژی مطرح می‌باشد (۲).

مطالعات متعدد محققین در ارتباط با ضایعات تیروئید و AgNOR که راهگشای مشکلات تشخیصی در تمایز نئوپلاسم و ضایعات خوش‌خیم و بدخیم تیروئید می‌تواند باشند انگیزه‌ای شد برای ما تا ضمن بررسی ضایعات تیروئیدی نسبت به رنگ‌آمیزی با تکنیک AgNOR آنها اقدام و نتایج و ارزش پیشگویی و تشخیصی آنها را مورد تجزیه و تحلیل قرار دهیم (۴، ۷، ۱۰، ۱۷، ۱۸، ۲۲).

مواد و روش‌ها

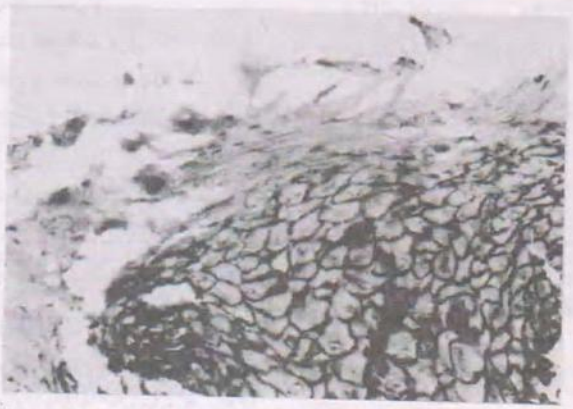
نمونه‌ها: ۱۰۰ نمونه بلوک پارافینی بخش پاتولوژی بیمارستان قائم (عج) (۱۳۸۰-۱۳۷۰) شامل ۸ مورد تیروئید طبیعی، ۶ مورد تیروئیدیت، ۱۹ مورد گواتر ندولر، ۳۴ مورد آدنوم فولیکولر، ۱۰ مورد کارسینوم فولیکولر، ۱۵ مورد پاپیلری کارسینوم، ۴ مورد مدولری کارسینوما و ۴ مورد آناپلاستیک کارسینوم انتخاب شدند. پس از بازبینی آناپلاستیک کارسینوم انتخاب شدند. پس از بازبینی از هر بلوک دو برش به ضخامت ۴-۳ میکرون تهیه و به‌روش H&E و AgNOR رنگ‌آمیزی شد.

روش رنگ‌آمیزی

پس از پارافین‌گیری اسلایدها و هیدراته‌نمودن آنها محلول تازه AgNOR که مخلوطی از دو محلول ۱- محلول دو درصد ژلاتین، ۱٪ اسیدفرمیک در آب مقطر ۲- محلول نیترات نقره ۵۰٪ در آب مقطر به نسبت یک قسمت از محلول اول و ۲ قسمت از محلول دوم می‌باشد، بر روی اسلایدها ریخته و به‌مدت ۶۰ دقیقه در تاریکی قرار میدهیم پس از رنگ‌آمیزی زمینه با نوترال رد و قراردادن در گزیلل و استفاده از چسب آنتلان اسلایدها مورد بررسی میکروسکپی قرار گرفند.

روش ارزیابی

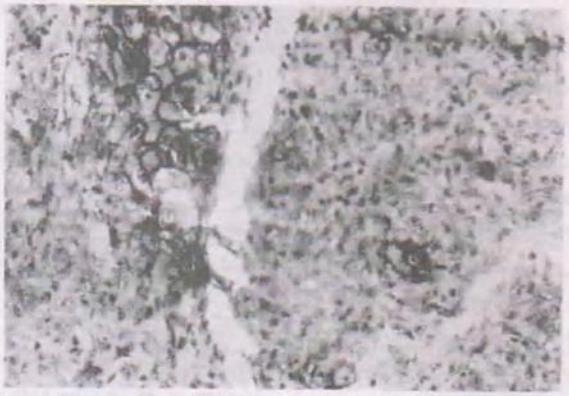
یک صد سلول از تمام نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده به‌روش AgNOR به‌طور راندوم (تصادفی) انتخاب و با درشت‌نمایی ۱۰۰۰ نقاط AgNOR آنها شمارش شده و برای تعیین Distribution score یک صد سلول از تمام نمونه‌ها انتخاب و سلولهایی که سه عدد و ۵ عدد یا بیشتر نقطه AgNOR داشتند شمارش و درصدهریک محاسبه شد. ضمناً نقاط AgNOR از نظر اندازه شکل و توزیع در هسته مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۵،۴،۳،۲،۱).



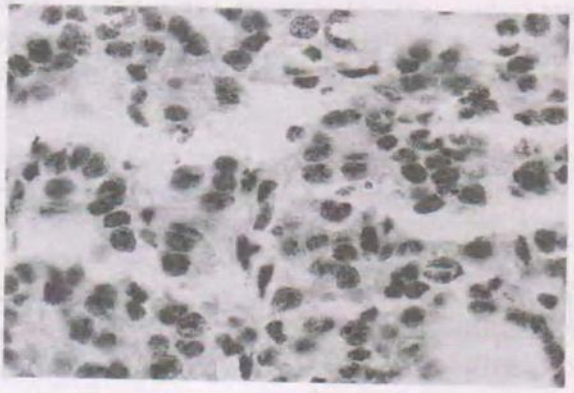
تصویر شماره ۱ بروز غشایی و هموژن نشانگر E-Cadherin در اپی‌تلیوم سنگفرشی طبیعی، به منفی‌بودن مواد کراتینی دقت شود.

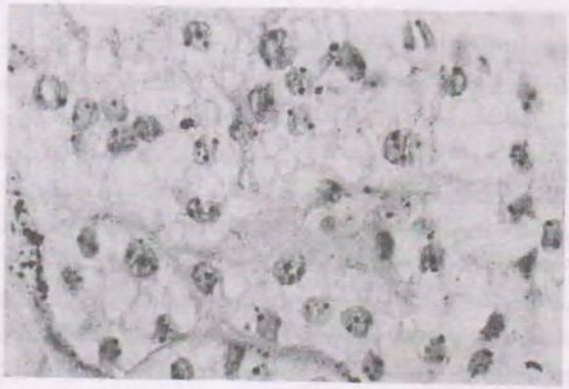


تصویر شماره ۲ بروز غشایی و هموژن نشانگر E-Cadherin در اپی‌تلیوم طبیعی و کارسینوم سلول سنگفرشی مهاجم.



تصویر شماره ۳ کاهش بروز، و بروز غیریکنواخت نشانگر E-Cadherin در کارسینوم سلول سنگفرشی مهاجم.





ارزیابی اطلاعات

جهت تجیه و تحلیل نتایج و اطلاعات حاصله از آزمون t-student و گاه ANOVA استفاده شد که با $P<0.05$ اختلاف معنی‌داری از نظر میانگین تعداد نقاط و تعداد سه نقطه یا بیشتر در هر هسته بین گروههای مورد مطالعه وجود داشت.

نتایج

دامنه و میانگین شمارش شده AgNOR در یک صد سلول به‌روش تصادفی و تعیین Distribution Score در یکصد عدد سلول که سه نقطه و ۵ نقطه و بیشتر را داشته‌اند در گروههای مورد مطالعه انجام و نتایج آن به شرح زیر اعلام می‌شود (جدول ۱،۲،۳،۴،۵).

جدول ۱ میانگین شمارش AgNOR در ۱۰۰ سلول و مقایسه آن در ضایعات نئوپلاستیک و غیرنئوپلاستیک تیروئید.

AgNOR Mean in 100 Cells

نوع	تعداد	حداقل	حداکثر	متوسط	انحراف معیار
نرمال	۸	۱/۰۱	۲/۰۱	۱/۳۹۵۰	۰/۴۰۱۷
تیروئیدیت	۶	۱/۳۱	۱/۸۵	۱/۶۰۶۷	۰/۲۲۰۳
گواتر	۱۹	۱/۰۴	۲/۸۳	۱/۶۳۸۴	۰/۴۲۴۸
آدنوم فولیکولر	۳۴	۱/۲۱	۳/۲۳	۲/۳۵۷۶	۰/۵۰۲۱
کارسینوم فولیکولار	۱۰	۲/۳۲	۴/۶۲	۳/۸۲۱۰	۰/۶۷۶۵
پاپیلاری کارسینوم	۱۵	۱/۱۶	۳/۴۰	۱/۹۸۰۰	۰/۶۵۵۶
کارسینوم مدولاری	۴	۱/۴۰	۳/۴۷	۲/۳۱۷۵	۰/۸۵۶۵
کارسینوم آناپلاستیک	۴	۱/۸۸	۴/۱۵	۳/۰۳۲۵	۱/۱۶۷۸
مجموع	۱۰۰	۱/۰۱	۴/۶۲	۲/۲۲۴۲	۰/۸۶۲۳

جدول ۲ میانگین تعداد نقاط AgNOR در ۱۰۰ سلول و مقایسه آماری آن در تیروئید نرمال، ضایعات غیرنئوپلاستیک و ضایعات نئوپلاستیک تیروئید

نوع	تعداد	حداقل	حداکثر	متوسط	انحراف معیار
نرمال	۸	۱/۳۹۵۰	۱/۰۱	۲/۰۱	۰/۴۰۱۷
غیرنئوپلاستیک	۲۵	۱/۶۳۰۸	۱/۰۴	۲/۸۲	۰/۳۹۰۰
نئوپلاستیک	۶۷	۲/۵۴۴۶	۱/۱۶	۴/۶۲	۰/۸۵۱۲
مجموع	۱۰۰	۲/۲۲۲۲	۱/۰۱	۴/۶۲	۰/۸۶۳۳

بحث

نئوپلاسمهای تیروئید به خصوص کارسینومهای دیفرانسیه آن یکی از سرطانهای انسانی با رشد آهسته و ظرفیت و توانایی تهاجم کم به‌شمار می‌رود ولی عود مکرر این تومورها از معضلات درمانی آنها می‌باشد و ارزیابی و پیشگویی خطر عود نئوپلاسمهای تیروئید تنها با بررسی کلینیکوپاتولوژیک مشکل و گاه ناممکن است، از سوی دیگر تمایز نئوپلاسمهای خوش‌خیم از نئوپلاسمهای بدخیم برخی از بافتها از جمله تیروئید همیشه موجب دغدغه خاطر پاتولوژیست‌ها بوده است. پژوهشگران تاکنون تدابیر و تلاشهای عمده‌ای را به کار بسته‌اند تا به این معضل حیاتی پاسخ دهند Pianse در انتهای قرن گذشته حضور هسته حجیم در تومورهای بدخیم را مورد توجه قرار داده است پس از آن مقالات متعدد منتشره نوکلئول بزرگ را در سلولهای سرطانی با محدوده وسیعی از تغییرات مرفولوژیک تائید کرده است (۱۵ و ۱۴).

مطالعات Drenzini و پس از آن انتشار بیش از چند صد مقاله اهمیت AgNOR و ارتباط مستقیم آن با فعالیت نسخه‌برداری rRNA و پرولیفراسیون سلولی را مورد تأیید قرار داده است (۲۵،۲۱،۱۸،۱۷،۱۳،۱۱،۹،۸،۶،۵،۲).

در این مطالعه ما با تکیه بر مزایای تکنیک AgNOR مبنی بر سهولت، ارزان و سریع‌بودن و نتایج قابل اعتماد آن ۶ پارامتر میانگین تعداد نقاط AgNOR، میانگین درصد اندازه نقاط AgNOR، میانگین درصد نقاط برحسب موقعیت انترانوکلئار، میانگین نقاط AgNOR برحسب حدود دو شکل، میانگین سلولهای با بیش از ۳ نقطه AgNOR، میانگین سلولهای با بیش از ۵ نقطه AgNOR را در تیروئید نرمال - گواتر ندولر نئوپلاسم خوش‌خیم و بدخیم بررسی نموده‌ایم (تصویر شماره ۱، ۲، ۳، ۴) و مشخص گردید که میانگین توزیع نقاط AgNOR در سلولهای با بیش از سه نقطه AgNOR در تیروئید نرمال و بعد به ترتیب در تیروئیدیت‌ها، آدنوم فولیکولار، گواتر، پاپیلری کارسینوما، فولیکولار کارسینوما، مدولری و آناپلاستیک کارسینوما افزایش می‌یابد. بیشترین درصد نقاط بزرگ در آناپلاستیک کارسینوما و بیشترین درصد نقاط کوچک AgNOR در فولیکولر آدنوما می‌باشد. جایگزینی نقاط

جدول ۳ میانگین تعداد سلولهایی که بیش از ۳ نقطه AgNOR را نشان می‌دهند و مقایسه آماری آن در تیروئید نرمال، ضایعات غیرنئوپلاستیک و نئوپلاستیک تیروئید

نوع	تعداد	حداقل	حداکثر	متوسط	انحراف معیار
نرمال	۸	۰/۶۳	۰	۲	۰/۷۴
غیرنئوپلاستیک	۲۵	۱۰/۸۴	۱	۴۸	۱۱/۱۰
نئوپلاستیک	۶۷	۲۰/۵۴	۱	۸۰	۱۹/۶۳
مجموع	۱۰۰	۱۶/۵۲	۰	۸۰	۱۸/۰۶

AgNOR (محیطی یا مرکزی) در فولیکولر آدنوما از همه بیشتر محیطی و در پاپیلری کارسینوما از همه بیشتر مرکزی بودند. بیشترین نامنظمی AgNOR dots مربوط به آناپلاستیک کارسینوما و کمترین مربوط به گواتر مولتی ندولر بود و نهایتاً با بررسی‌های مختلف آماری اختلاف معنی‌دار در میانگین تعداد AgNOR (جدول ۲ و ۱) میانگین درصد سلولها با بیش از ۳ دانه AgNOR (جدول ۳) و میانگین درصد سلولهای با بیش از ۵ نقطه AgNOR در گروههای مورد بررسی مشخص گردید (جدول ۴) و در سایر پارامترهای بررسی شده اختلاف معنی‌دار وجود نداشت با دستیابی به نتایج فوق همگام با سایر مطالعات و بررسی‌ها اعلام می‌داریم که با انجام تکنیک AgNOR می‌توانیم آدنوم فولیکولار را از کارسینوم فولیکولار متمایز نماییم (جدول ۵) (۲۰،۱۶،۱۵،۱۴،۱۲) اما با این روش تداخل و همپوشانی (overlap) قابل توجهی بین سایر گروهها وجود دارد. قابل ذکر است که در سایر بررسی‌ها تکنیک AgNOR با تکنیکهای ایمنوهیستوشیمی و رنگ‌آمیزی و استفاده از مارکر Ki-67 و نشان‌دارکردن توسط برمودزوکسی یوریدین هم مورد تأیید واقع شده و مشخص گردیده است که AgNOR روش ساده، ارزان و قابل اعتماد برای تخمین فعالیت تکثیری نمونه‌های نئوپلازیک می‌باشد (۲۲). در مطالعه دیگر بر روی ۵۶ مورد آزار تیروئیدی با FNA و AgNOR میزان

جدول ۴ میانگین تعداد سلولهایی که بیش از ۵ نقطه AgNOR را نشان می‌دهند و مقایسه آن در ضایعات غیرنئوپلاستیک و نئوپلاستیک تیروئید

نوع	تعداد	حداقل	حداکثر	متوسط	انحراف معیار
نرمال	۸	۰	۰	۰/۰۰	۰/۰۰
تیروئیدیت	۶	۰	۱	۰/۳۳	۰/۵۲
گواتر	۱۹	۰	۱۴	۱/۶۸	۳/۶۸
آدنوم فولیکولار	۲۴	۰	۹	۰/۷۶	۱/۸۱
کارسینوم فولیکولار	۱۰	۰	۵	۲/۸۰	۱/۷۵
پاپیلاری کارسینوم	۱۵	۰	۱۸	۲/۸۰	۶/۰۴
کارسینوم مدولاری	۴	۰	۲۲	۷/۰۰	۱۰/۱۳
کارسینوم آناپلاستیک	۴	۳	۳۴	۱۶/۵۰	۱۵/۰۳
جمع	۱۰۰	۰	۳۴	۲/۲۴	۵/۴۴

جدول ۵ مقایسه آماری با استفاده از تست t-student در افتراق آدنوم فولیکولار و از کارسینوم فولیکولار در ۵ پارامتر ارزیابی شده در رنگ‌آمیزی AgNOR.

	تست Levene's برای معادل بودن واریانسها		تست T برای معادل‌بودن متوسطها		
	F	SIG	T	Df	Sig
متوسط در ۱۰۰ سلول	۲۶۷	۰/۶۰۸	-۷/۲۲۱	۴۲	۰/۰۰۰
			-۶/۲۱۶	۱۲/۰۶۷	۰/۰۰۰
سلولها با تعداد > ۳۰	۱/۸۶۸	۰/۱۷۶	-۵/۹۵۳	۴۲	۰/۰۰۰
			-۸/۲۹۰	۳۰/۷۴۷	۰/۰۰۰
سلولها با تعداد > ۵۰	۰/۵۵۹	۰/۴۵۹	-۳/۱۴۷	۴۲	۰/۰۰۳
			-۳/۲۰۶	۱۵/۱۲۷	۰/۰۰۶
مرکزی ٪	۴/۱۴۹	۰/۰۴۸	۰/۳۰۴	۴۲	۰/۷۶۲
			۰/۴۸۱	۴۰/۲۱۶	۰/۶۳۳[a]
محیطی ٪	۴/۱۴۹	۰/۰۴۸	-۰/۳۰۴	۴۲	۰/۷۶۲
			-۰/۴۸۱	۴۰/۲۱۶	۰/۶۳۳[a]
نامنظم ٪	۱/۱۸۶	۰/۲۸۲	-۲/۵۲۶	۴۲	۰/۰۱۵
			-۲/۲۹۲	۱۲/۹۶۷	۰/۰۳۹
منظم ٪	۱/۱۸۶	۰/۲۸۲	۲/۵۲۶	۴۲	۰/۰۱۵
			۲/۲۹۲	۱۲/۶۹۷	۰/۰۳۹

a بدون اهمیت

پراکندگی AgNOR بیشترین ارزش تشخیصی را در افتراق آدنوم از کارسینوم فولیکولار تیروئید داشته است(۷).

مطالعات بعدی تفاوت قابل ملاحظه AgNOR dots را بین آدنوم و کارسینوم فولیکولار در FNA تیروئید نشان داده است (۸).

باوجود مسائل فوق معتقدیم استانداردکردن با آنالیز مورفومتریک، حذف مسائل جانبی که درنحوه رنگ‌پذیری و تفسیر نتایج رنگ‌آمیزی AgNOR دخیل هستند می‌تواند این تکنیک ساده، ارزان و معتبر را در افتراق تومورهای خوش‌خیم از بدخیم توانایی بیشتری بخشد.

خلاصه مقاله

زمینه: هدف از این مطالعه بررسی ارزش تشخیصی رنگ‌آمیزی AgNOR (Argyrophilic organizer region) به‌عنوان یک مارکر پرولیفراتیو در ضایعات نئوپلاستیک و غیرنئوپلاستیک تیروئید می‌باشد.

روش: نقاط Ag NOR هستکی در ۱۰۰ نمونه بلوکهای پارافینی مربوط به تیروئید نرمال و ضایعات تیروئید که از آرشیو بخش پاتولوژی بیمارستان قائم (عج) تهیه شده بود، شمارش گردید که این نمونه‌ها شامل: تیروئید نرمال (۸ مورد)، انواع تیروئیدیت (۶ مورد)، گواتر مولتی ندولار (۱۹ مورد)، آدنوم فولیکولر (۳۴ مورد)، فولیکولار کارسینوم (۱۰ مورد)، پاپیلاری کارسینوم (۱۵ مورد)، مدولاری کارسینوم (۴ مورد)، آناپلاستیک کارسینوم (۴ مورد)، می‌باشد.

پارامترهای مورد بررسی شامل تعداد، سایز، شکل و موقعیت نقاط AgNOR هستکی در ۱۰۰ سلول و درصد هستکهایی که بیش از سه و پنج یا بیشتر نقطه AgNOR را در هر سلول نشان می‌دهند، بوده است.

نتایج: متوسط نقاط AgNOR و تعداد نقاط AgNOR بیشتر یا مساوی ۳ عدد در هسته هر سلول در ضایعات خوش‌خیم تیروئید در مقایسه با موارد بدخیم تفاوت آماری مشخص دارند، این تفاوت در سایر پارامترهای مورد بررسی مشخص و بارز نیست و با استفاده از تکنیک AgNOR و ارزیابی کمی آن در هسته سلولها می‌توان فولیکولار آدنوما از فولیکولار کارسینوما را متمایز نمود.

سرانجام: AgNOR و AgNOR distribution score ارزش تشخیصی بالا و ارزشمندی جهت افتراق بین فولیکولار کارسینوم و فولیکولار آدنوم تیروئید دارد.

کلمات کلیدی: تیروئید - نئوپلاسم - ضایعات غیرنئوپلاستیک - AgNOR.

References

1. David C. Bostwich in "Anderson's pathology" ; (Damjanov) 10th ed, Mosby U.S.A 2203-2222, 1996.
2. Derenzini, M: the AgNOR, Micron, 2000, 31, 117-120.
3. Drenzini M, sirri V, Trere D: Nucleolar organizer regions in tumor cell, the cancer Journal volume 7, N2, 1-9, 1994.

4. Duskova-J: Nuclear size and character of the nucleolar organizer in benign and Malignant follicular tumors of the thyroid gland, cesk-pathol, 1992, 28(4): 201-6.

5. Gupta-S, etal: Morphological and immunohistochemical spectrum in anorectal malignancies, Indian-J-Med-Res, 1994, 99: 173-8.

6. Ishii-K, etal: Evaluation of malignant grade of salivary gland tumors, pathol-Int, 1994, 44(4): 287-96.

7. Iuele-R: thyroid pathology, evaluation of the average value of NORS and its potential diagnostic and prognostic application, pathologica, 1994, 86(5): 525-7.

8. Karmaker-T, etal: Role, of AgNOR in diagnosis of thyroid follicular neoplasm on fine-needle aspiration smears, Diag-cytopathol, 1995, 12 (2): 148-9: discussion 149-151.

9. Kobayashi-I, etal: The proliferative activity in dysplasia and carcinoma insitu the uterine immunostaining and silver-binding argyrophilic nucleolar organizer region staining, Hum - Pathol, 1994, 25(2): 198-202.

10. Matias-Guin-x,etal: proliferative activity in c-cell hyperplasia and MTC, Evaluation by PCNAimmunohistochemistry and AgNOR, staining Pathol-Res-Pract, 1996, 191(1): 42-7.

11. Miller - B, etal: Nors a potential prognostic factor in adenocarcinoma of the endometrum, Gynecol-oncol, 1994, 54(2): 137-141.

12. Mehrottra A, Goel MM, Singh K: Ki-67 and AgNOR proliferative markers as diagnostic adjuncts to fine needle aspiration cytology of thyroid follicular lesions. Anal Quant cytol Histol. 2002 Aug; 24(4): 205-11.

13. Miyanguchi-M etal: A correlation of Ag NORs-otorhinolargngal, 1994, 251(4): 229-32.

14. Montorini R, Braccischi A, scarpelli M, etal: Value of quantitative nucleolar features in the preoperative cytological diagnosis of follicular neoplasias of the thyroid. J clin pathol, 1999; 44: 509-14.

15. Montroni R, scerpelli M, Braccischi A, etal: Quantitative analysis of nucleolar margination in diagnostic cytopathology. Virch Arch[A] 1991; 419:505-12.

16. Musiatowicz B, Dzieciol J, Augustynowicz A, et al: Over expression of the nucleolar arganizer regions (NORS) in the thyroid follicullar tumors. comparison of the cytological and histopathological examination. ROCZ Akad Med Bialymst. 1998; 43: 186-93.

17. Pfragner-R, et al: Biologic and cytogenetic charaterization of three human MTC in culture, henry-ford-hosp-med-J, 1992, 40(3-4): 299-302.

18. Pich. A, chiusa. L, Margaria. E: Prognostic relevance of AgNOR in Tumor pathology. Micron, 2000, 31: 133-141.

19. Ruschoff J, Prasser c, cortez T: Diagnostic value of AgNOR staining in follicular cell neoplasm of the thyroid, A.J surgical path. 17(2): 1281-1288, 1993.

20. Slowinska - Klencka D, Klencki M, popwcz B, Lewinski A: AgNOR quantification in the diagnosis of follicular pattern thyroid lesion. Anal Quant cytol Histol. 2003 Dec; 25(6): 347-52.

21. Timon-cl, et al: Acinic cell carcinoma of salivary gland, Arch otolargngol - Head-Neck - surg, 1994, 120(7): 227-33.

22. Trere-D, et al: AgNOR area in interphase nuclei of human tumors corelates with the proliferative activity evaluated by bromode-oxyuridine labeling and Ki-67 immunostaining, J-pathol, 1999, 165(1): 53-9.

23. Virginia A, Montana L, sack M in "diagnostic surgical pathology" sternberg stephens, third ed lippincot Williams and willkins. USA, 545-547, 1999.

24. Yamashima M: Follicular neoplasm of the thyroid. Total circumferential evaluation on the fibrous capsule, Am J surgical path, 16: 392-400, 1994 .

25. Yoshida-Y, etal: Predictors of post operative distant recurrences in esophageal carsinoma, Ann-Thorac-surg, 1994, 54(4): 888-9.