

## The frequency of AgNOR (Argyrophilic Nucleoli Organizer Region) points in differentiation between the benign prostatic hyperplasia and prostatic adenocarcinoma

Niazi A<sup>1</sup>, Sheikhzadeh A<sup>2\*</sup>, Narouie B<sup>2</sup>, Moradi H<sup>2</sup>

1- Department of Pathology, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran  
2- Clinical Research Development Center, Zahedan Ali-ebne Abitaleb Hospital, Zahedan, Iran

Received December 1, 2008; Accepted September 21, 2009

### **Abstract:**

**Background:** While the differentiation of prostatic adenocarcinoma and benign prostatic hyperplasia (BPH) is not often a difficult task, sometimes it is not the case even for the experienced pathologists. In this study the efficacy of AgNOR staining technique for differentiating between the prostatic adenocarcinoma and BPH were evaluated.

**Materials & Methods:** Using a descriptive study 15 prostatic adenocarcinoma samples (without spot to histologic grade) and 15 BPH samples were selected and stained with AgNOR method. Specimens were taken from paraffin block in Pathology laboratory archive.

**Results:** The average AgNOR points in BPH and prostatic adenocarcinoma were 1.39 and 2.48 per cell, respectively. In BPH there was one or two points of AgNOR with specific margin but in prostatic adenocarcinoma numerous arranged AgNOR points were seen. While the number of cells in BPH with three or more AgNOR points were 4.7, in prostatic adenocarcinoma it was 41.47.

**Conclusion:** AgNOR is a useful method to differentiate between benign prostatic hyperplasia and prostatic adenocarcinoma.

**Keywords:** AgNOR; Adenocarcinoma; Prostatic Hyperplasia

\* Corresponding Author.

Email: vaheid2002005@gmail.com

Tel: 0098 915 543 6523

Fax: 0098 541 341 4103

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, Autumn 2009; Vol 13, No 3, Pages 214-218

# بررسی فراوانی نقاط AgNOR در افترات هایپرپلازی پروستات از آدنوکارسینوم پروستات

عباسعلی نیازی<sup>۱</sup> ، عبدالصمد شیخ زاده<sup>۲\*</sup> ، بهزاد نارویی<sup>۲</sup> ، حمیدرضا مرادی<sup>۲</sup>

## خلاصه

سابقه و هدف: تمایز کارسینوم پروستات و هایپرپلازی خوش خیم آن در بسیاری از موارد حتی برای پاتولوژیست‌های با تجربه مشکل آفرین می‌شود. در این مطالعه مفید بودن به کارگیری تکنیک رنگ‌آمیزی AgNOR (Argyrophilic Nucleoli Organizer Region) جهت تمایز آدنوکارسینوم پروستات و هایپرپلازی خوش خیم پروستات (Benign Prostate Hyperplasia) در نمونه‌های موجود در آرشیو پاتولوژی بیمارستان خاتم الانبیاء (ص) زاهدان در سال ۱۳۸۷ آن بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در یک مطالعه توصیفی تعداد ۱۵ مورد آدنوکارسینوم پروستات (بدون در نظر گرفتن درجه هیستولوژیک) و ۱۵ مورد هایپرپلازی خوش خیم آن انتخاب و به وسیله رنگ‌آمیزی AgNOR رنگ‌آمیزی شد. نمونه‌ها از بلوك‌های پارافینی پروستات بایگانی شده تهیی شد. داده‌ها با نرم افزار SPSS ویرایش ۱۱ و با استفاده از آزمون  $\chi^2$  و من ویتنی آنالیز گردید و  $P < 0.05$  معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج: تعداد متوسط AgNOR در هایپرپلازی خوش خیم پروستات ۱/۳۹ در هر سلول و در آدنوکارسینوم پروستات ۲/۴۸ در هر سلول بود و در هایپرپلازی خوش خیم یک یا دو نقطه AgNOR با حاشیه مشخص وجود داشت، ولی در آدنوکارسینوم پروستات تعداد متعددی نقاط AgNOR منظم وجود داشت. در هایپرپلازی خوش خیم پروستات تعداد سلول‌هایی که سه یا بیشتر نقاط AgNOR داشتند، ۷/۴ بود، در حالی که در آدنوکارسینوم تعداد آنها ۱/۴۷ بود ( $P < 0.05$ ).

نتیجه گیری: با توجه به اختلاف معنادار بین تعداد نقاط AgNOR در هایپرپلازی خوش خیم پروستات و آدنوکارسینوم پروستات می‌توان از رنگ‌آمیزی AgNOR در تمایز بین هایپرپلازی خوش خیم پروستات و آدنوکارسینوم پروستات استفاده کرد.

واژگان کلیدی: رنگ‌آمیزی AgNOR، آدنوکارسینوم، هایپرپلازی پروستات

۱- استادیار گروه پاتولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

۲- پزشک عمومی مرکز توسعه تحقیقات بالینی بیمارستان علی ابن ابی طالب(ع) زاهدان

\* نویسنده مسؤول: عبدالصمد شیخ زاده

آدرس: زاهدان ابتدای خیابان دانشگاه بیمارستان علی ابن ابی طالب(ع)، طبقه دوم، مرکز توسعه تحقیقات بالینی

پست الکترونیک: vaheid2002005@gmail.com

تاریخ دریافت: ۸۷/۹/۱۱

تلفن: ۰۹۱۵ ۵۴۳ ۶۵۲۳

تاریخ پذیرش نهایی: ۸۸/۶/۳۰

دورنوبیس: ۰۵۴۱ ۳۴۱ ۴۱۰۳

فصلنامه علمی - پژوهشی فیض، دوره سیزدهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۸، صفحات ۲۱۸-۲۱۴

پروستات حتی توسط پاتولوژیست مجرب به سادگی و با اطمینان ممکن نیست و در نتیجه مجبور به استفاده از روش‌های دیگری نظری ایمنوہیستوشیمی توسط کراتین با وزن مولکولی بالا (E12-B-34) جهت رنگ‌آمیزی سلول‌های بازال [۲،۱] و ارزیابی میزان تکثیر سلولی می‌باشیم. در سال‌های اخیر نشان‌گرهای متعددی مثل اندازه‌گیری محتوای DNA و AgNOR (Argyrophilic nucleoli organizer region) برای نشان دادن فعالیت هسته‌ای و به منظور ارزیابی میزان تکثیر سلولی معرفی شده‌اند. در این میان

## مقدمه

سرطان پروستات شایع ترین سرطان در مردان و دومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان پس از سرطان ریه می‌باشد. بیشتر از ۹۵ درصد موارد سرطان پروستات از نوع آدنوکارسینوم است. و بقیه موارد را کارسینوم سلول‌های ترانزیشنال، کارسینوم نرواندوکرین و سارکوم تشکیل می‌دهد [۲،۱]. در بسیاری از موارد تشخیص آدنوکارسینوم پروستات آسان است، ولی در بعضی موارد تمایز بین آدنوکارسینوم پروستات از هایپرپلازی خوش خیم

نهایت لام‌ها در الكل ۷۰ درصد و ۹۶ درصد هر کدام به مدت ۲ دقیقه آب‌گیری شدند. تمام ظرف‌ها کاملاً تمیز و پس از شستشو با اسید، با آب مقطر سه بار تقطیر شده آب‌کشی شدند. برای تهیه کردن محلول رنگ آمیزی AgNOR ۵ سی سی نیترات نقره را در ۱۰ سی سی آب مقطر حل نموده و پس از چند بار صاف کردن، ۱۰ سی سی اسید فورمیک (شرکت مرک آلمان) غلیظ شده به آن اضافه می‌شود (محلول شماره ۱). سپس ۰/۳ گرم پودر ژلاتین را در ۱۰ سی سی آب مقطر با حرارت ملایم حل کرده (محلول شماره ۲) و در نهایت ۱۰ سی سی از محلول شماره یک را با ۵ سی سی از محلول شماره ۲ مخلوط نموده و روی لام‌ها ریخته می‌شود. برای ارزیابی لام‌ها پس از رنگ آمیزی، نواحی NOR به صورت نقاط سیاه رنگ مشخص داخل هسته‌ای نمایان می‌شوند. و سیتوپلاسم رنگ تهوای روشن به خود می‌گیرد. لام‌های رنگ آمیزی شده توسط میکروسکوپ نوری با بزرگ نمایی ۱۰۰۰ به کمک روغن ایمرسیون مورد مطالعه قرار می‌گیرند. در هر لام تعداد ۱۰۰ سلول در چند میدان میکروسکوپی انتخاب شد و هسته‌ها بر اساس تعداد مناطق AgNOR شمارش شدند. داده‌ها با نرم افزار SPSS ویرایش ۱۱ و با استفاده از آزمون  $\chi^2$  و من ویتنی آنالیز گردید و  $P < 0.05$  معنادار در نظر گرفته شد.

#### نتایج

تعداد متوسط نقاط AgNOR در BPH ۱/۳۹ عدد در هسته با دامنه تغییرات ۱/۲-۱/۸ در هسته بود و همچنین در آدنوکارسینوم پروستات بدون توجه به درجه هیستولوژیک، ۲/۴۸ عدد در هر هسته و دامنه تغییرات ۱/۲-۴/۱۴ بود. برای مقایسه میانگین تعداد نقاط AgNOR در BPH و آدنوکارسینوم از آزمون  $\chi^2$  استفاده شد که اختلاف معناداری داشت ( $P < 0.05$ ). درصد متوسط سلول‌هایی که ۳ یا بیش از ۳ نقطه AgNOR داشتند و دامنه تغییرات آن در ضایعات مختلف بدین شرح بود: در ۷/۴ درصد سلول‌ها ۳ یا بیش از ۳ نقطه AgNOR داشتند که این مقدار در آدنوکارسینوم (بدون در نظر گرفتن درجه هیستولوژیک) ۴۱/۴۷ درصد بود. با توجه به تعداد لازم ( $n < 30$ ) و نابرابری واریانس بین گروه‌های ( $P = 0.029$ ) از آزمون ناپارامتری من ویتنی استفاده شد و نتیجه آزمون اختلاف آماری معنی‌داری را بین دو گروه نشان داد ( $P < 0.05$ ) (جدول شماره ۱). هیچ کدام از سلول‌های از گروه BPH بیش از ۴ نقطه نداشتند و این در حالی بود که در آدنوکارسینوم تا ۹ نقطه نیز دیده شد. نکته جالب اینکه نقاط AgNOR در هیپرپلازی پروستات، کوچک و با حاشیه منظم و یک شکل بودند، در حالی که در آدنوکارسینوم پروستات، بزرگ و

رنگ آمیزی AgNOR، روش ساده و ارزان و دارای صحبتی بیشتر از سایر روش‌ها می‌باشد [۳]. همچنین AgNOR به عنوان یک نشان‌گر پیشگویی کننده پیش آگاهی تومورهای مثانه می‌باشد [۴, ۵]. NOR، مالتیپل مایلوما و تومورهای مثانه می‌باشد [۵, ۶]. مناطقی از کروماتین و منطقه سازمان‌دهنده هستکی می‌باشد که در انسان در روی بازوی کوتاه کروموزوم‌های آکروسترتیک یعنی کروموزوم‌های ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۲۱ و ۲۲ قرار دارند و حاوی ژن‌های کد کننده RNA ریبوزومی می‌باشند [۶, ۷]. تعداد و ویژگی‌های NOR معنکس کننده فعالیت هسته‌ای و سلولی است [۷] و در برخی از مطالعات انجام شده میانگین شمارش AgNOR افتراق دهنده بین ضایعات خوش‌خیم و بدخیم پروستات می‌باشد [۸-۱۵]. و در برخی دیگر این مارکر افتراق دهنده بین این دو بیماری نمی‌باشد [۱۶-۲۰]. همچنین AgNOR به عنوان یک نشان‌گر پیش‌گویی کننده برای عود تومورهای مثانه گزارش شده است [۲۱]. Ploton و همکاران اش برای اولین بار روش AgNOR را برای بلوک‌های پارافینی فیکس شده در فرمالین ابداع کردند [۲۲] و سپس Crocher کاربرد این روش را در تشخیص پاتولوژی تومورها گزارش کرد. با توجه به اختلاف‌های موجود مبنی بر این که AgNOR می‌تواند در افتراق آدنوکارسینوم پروستات از هیپرپلازی خوش‌خیم پروستات کمک کننده باشد یا نه [۵]، هدف ما از این مطالعه ارزیابی توانایی رنگ آمیزی AgNOR در تمایز آدنوکارسینوم از هیپرپلازی خوش‌خیم پروستات بود.

#### مواد و روش‌ها

در یک مطالعه توصیفی تعداد ۳۰ عدد از بلوک‌های پارافینی نمونه‌های بایگانی شده پروستات در بخش پاتولوژی بیمارستان خاتم الانبیا (ص) زاهدان جمع آوری شد. نمونه‌ها شامل ۱۵ مورد آدنوکارسینوم و ۱۵ مورد هیپرپلازی خوش‌خیم پروستات بودند. آنها مجدداً ارزیابی پاتولوژیک شدند، سپس از بلوک‌ها لام تهیه شد و به روش AgNOR رنگ آمیزی گردیدند. جهت رنگ آمیزی AgNOR از نیترات نقره، پودر ژلاتین اسید فورمیک غلیظ، آب مقطر سه بار تقطیر شده و اتانول استفاده گردید. برای رنگ آمیزی AgNOR ابتدا از نمونه‌های باقی بلوک‌ها پارافینی برش-هایی به ضخامت ۴ میکرون تهیه شد. سپس لام‌های تهیه شده در گزیلول دپارافین زدائی (شرکت کردان کرج) شدند. در مرحله بعد لام‌ها توسط محلول اتانول و آب مقطر آب دهی شدند. سپس محلول تازه تهیه شده نیترات نقره (شرکت مرک آلمان) روی لام‌ها ریخته شد. لام‌ها در دمای ۳۷ درجه به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه شدند. و در مرحله بعد لام‌ها با آب مقطر شستشو داده شدند. در

حداکثر تعداد نقاط AgNOR در آدنوکارسینوم کمتر از مطالعه مذکور بود. در مطالعات دیگر از جمله مطالعه Hansen و همکاران [۲۰] و مطالعه Ohki و همکاران [۱۱] نیز نتایج نشان داد که بین تعداد نقاط AgNOR و درجه آدنوکارسینومی پروستات ارتباط معنا داری وجود دارد، ولی ارتباطی با پیش آگاهی تومور گزارش نشد. در بررسی Deschênes و همکاران نیز نتایج نشان داد که میانگین تعداد نقاط AgNOR در ضایعات خوش خیم پروستات، هایپرپلازی آتبیک پروستات، ایترداکتال کارسینوما و آدنوکارسینومای درجه گلیسون ۲، ۳، ۴ و ۵ به ترتیب ۴/۵۱، ۵/۶۴، ۵/۳۵، ۷/۳۵، ۸/۸۷ و ۱۰/۴۲ است که به طور معناداری در آدنوکارسینوما و ایترداکتال کارسینوما بالاتر از ضایعات خوش خیم پروستات بود، ولی با هایپر پلازی غیر معمول پروستات ارتباط معناداری نداشت [۱۷]. مطالعه نتایج این مطالعات نیز منطبق با نتایج مطالعه ما بود، ولی در مطالعه ما ارتباط بین تعداد نقاط AgNOR با درجه های مختلف تومورهای پروستات بررسی نگردید و نیاز به مطالعات تکمیلی تر در این زمینه می باشد. در زمینه ارتباط بین میانگین تعداد نقاط AgNOR و درجه تومور بر اساس سیستم گلیسون نیز مطالعات مختلفی صورت گرفته است. به عنوان مثال مطالعه Sentinel و همکاران نشان داد که در آدنوکارسینومای پروستات به طور معناداری تعداد نقاط AgNOR از بافت نرمal پروستات تا درجه گلیسون پنج افزایش می یابد. این افراد بیان کردند که AgNOR می تواند در افتراق درجه های سیستم Gleason مفید باشد [۱۳]. همچنین در مطالعه Ghazizadeh [۱۴] میانگین تعداد نقاط AgNOR در ضایعات خوش خیم پروستات  $4/34 \pm 1/53$  بود  $1/58 \pm 0/26$  و در ضایعات بدخیم پروستات  $P < 0/01$  و میانگین AgNOR با افزایش درجه Gleason و مرحله بالینی تومور نیز به طور معناداری افزایش نشان داد  $(P < 0/01)$ .

### نتیجه گیری

با توجه با نتایج مطالعه حاضر و سایر مطالعات ذکر شده می توان نتیجه گیری کرد که تعداد نقاط AgNOR می تواند برای افتراق ضایعات خوش خیم و بدخیم سرطان پروستات مفید باشند. همچنین گرید و رفتار تومور را نیز می توان به وسیله آن تعیین نمود، ولی در زمینه ارتباط آن با پیش آگاهی و بقاء بیماران بایستی مطالعات تکمیلی صورت گیرد.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری مرکز توسعه تحقیقات بالینی

نامنظم و چند شکل و غیرمعمول بودند.

جدول شماره ۱- توزیع فراوانی تعداد نقاط AgNOR در دو گروه مورد مطالعه

تعداد نقاط AgNOR	گروه های مطالعه		
	آدنوکارسینوم	BPH	
تعداد	درصد	درصد	
۵۸/۵۳	۸۷۸	۹۰/۳	۱۴۲۹
۴۱/۴۷	۶۲۲	۴/۷	۷۱
			سه یا بیشتر از سه
۱۰۰	۱۵۰۰	۱۰۰	۱۵۰۰
			جمع

### بحث

سرطان پروستات شایع ترین بدخیمی در مردان را تشکیل می دهد تمایز آن از هایپرپلازی پروستات بسیار مشکل است و اینجا است که حتی پاتولوژیست مجبوب نیز در تمایز این دو دچار تردید می شود. در چنین مواردی روش های تشخیص اضافه ضروری به نظر می رسد و این روش ها عبارتند از: فلوسیتوتمتری ایمنو هیستوشیمی و رنگ آمیزی AgNOR. در این میان رنگ آمیزی AgNOR یک روش ساده، ارزان و در دسترس است. NOR مناطقی از کروماتین هستند که حاوی ژن های کد کننده NOR بوده و به دلیل داشتن پروتئین های اسیدی، با رنگ آمیزی NOR نقره به رنگ سیاه در می آیند. هدف از این مطالعه مقایسه تعداد نقاط AgNOR در آدنوکارسینوم و هایپرپلازی خوش خیم پروستات بود. طبق نتایج مطالعه ما، تعداد متوسط AgNOR در ۱/۳۹ BPH عدد در هسته با دامنه تغییرات ۱/۲-۱/۸ بود و همچنین در آدنوکارسینوم پروستات بدون توجه به درجه هیستولوژیک،  $2/48$  عدد در هر هسته با دامنه تغییرات  $1/2-4/14$  بود. ( $P < 0/05$ ). در مطالعه ای که Pavlakis و همکاران انجام شد میانگین نقاط AgNOR در  $2/95 \pm 0/42$  BPH و در درجه یک هایپرپلازی پروستات  $7/31 \pm 0/81$  و در درجه ۲ و آن  $4/97 \pm 0/74$  و آن  $P < 0/001$ . [۹]. همچنین نتایج مطالعه Mamaeva و همکاران نشان داد که بافت آدنوماتوز پروستات تعداد کمتری نقاط AgNOR (با میانگین ۱۳ نقطه در هر سلول) نسبت به آدنوکارسینوم پروستات (با میانگین ۲۴ نقطه در هر سلول) دارد [۱۰]. آدنوکارسینومای با درجه تمایز زیاد تعداد کمتری نقاط AgNOR نسبت با تومورهای کمتر تمایز یافته داشتند و تومورها با تمایز متوسط تعداد نقاط بیشتری نسبت به تومورهای غیر بدخیم داشتند، ولی تعداد نقاط آن کمتر از موارد با تمایز خیلی کم بود؛ به طوری که در تومورهای با تمایز کم تعداد نقاط AgNOR بیشتر از  $60$  نقطه در هر سلول بود [۱۰]. نتایج این تحقیق با مطالعه ما هم خوانی دارد؛ با این تفاوت که

بیمارستان علی این ابی طالب (ع) شهر زاهدان کمال تشكیر را داریم.

## References:

- [1] Rosai J. Ackerman's Surgical Pathology. 8<sup>th</sup> ed. St. Louis: Mosby; 1996. p. 1221-46.
- [2] Brawer MK, Peehl DM, Stamey TA, Bostwick DG. Keratin immunoactivity in benign and neoplastic human prostate. *Cancer Res* 1985; 45(8): 3663-7.
- [3] Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson genetics in medicine. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Sanders; 2001. p. 137.
- [4] Picha A, Chiusa L, Margaria E. Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology. *Micron* 31(2); 2000: 133-141.
- [5] Cucer N, Imamoglu N, Tozak H, Demirtas H, Sarac F, Tatlisen A, et al. Two-dimensional agnor evaluation as a prognostic variable in urinary bladder carcinoma: A different approach via total agnor area/nucleus area per cell. *Micron* 2007; 38(6): 674-9.
- [6] Derenzini M. The AgNORs. *Micron* 31(2); 2000: 117-120.
- [7] Bostwick DG, Myers RP, Oesterling JE. Staging of prostate cancer. *Semin Surg Oncol* 1994; 10(1): 60-72.
- [8] Pich A, Chiusa L, Margaria E. Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology. *Micron* 2000; 31(2): 133-41.
- [9] Pavlakis K, Alivizatos G, Mitropoulos D, Constantinides C, Skopelitou A, Kittas C, et al. Silver-binding nucleolar organizer regions in benign and malignant prostatic lesions. *Urol Int* 1992; 49(3): 137-40.
- [10] Mamaeva S, Lundgren R, Elfving P, Limon J, Mandahl N, Mamaev N, et al. AgNOR staining in benign hyperplasia and carcinoma of the prostate. *Prostate* 1991; 18(2): 155-62.
- [11] Ohki T, Akakura K, Ueda T, Akimoto S, Yatani R, Shimazaki J. Changes in histologic grade and argyrophilic nucleolar organizer regions during progression of prostate cancer. *Jpn J Clin Oncol* 1996; 26(2): 82-7.
- [12] Sakr WA, Sarkar FH, Sreepathi P, Drozdowicz S, Crissman JD. Measurement of cellular proliferation in human prostate by AgNOR, PCNA, and SPF. *Prostate* 1993; 22(2): 147-54.
- [13] Sentinelli S, Pizzuti V, Rondanelli E, Viggiani F, Paolini R. [Correlation between the nucleolar organizer region in adenocarcinoma of the prostate and the Gleason system]. *Pathologica* 1992; 84(1089): 49-55.
- [14] Ghazizadeh M, Sasaki Y, Oguro T, Aihara K. Silver staining of nucleolar organizer regions in prostatic lesions. *Histopathology* 1991; 19(4): 369-72.
- [15] Lundgren R. Cytogenetic studies of prostatic cancer. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 1991; 136: 1-35.
- [16] Pavlakis K, Alivizatos G, Mitropoulos D, Constantinides C, Skopelitou A, Kittas C, Dimopoulos C. Silver-binding nucleolar organizer regions in benign and malignant prostatic lesions. *Urol Int* 1992; 49(3): 137-40.
- [17] Deschênes J, Weidner N. Nucleolar organizer regions (NOR) in hyperplastic and neoplastic prostate disease. *Am J Surg Pathol* 1990; 14(12): 1148-55.
- [18] Chiusa L, Galliano D, Formiconi A, Di Primio O, Pich A. High and low risk prostate carcinoma determined by histologic grade and proliferative activity. *Cancer* 1997; 79(10): 1956-63.
- [19] Konishi N, Nakaoka S, Tsuzuki T, Kitahori Y, Nishii K, Kitamura M, et al. Progressive activity in latent prostate carcinoma defined by argyrophilic staining of the nucleolar organizer regions (AgNOR). *Pathol Int* 1994; 44(4): 297-302.
- [20] Hansen AB, Ostergård B. Nucleolar organiser regions in hyperplastic and neoplastic prostatic tissue. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1990; 417(1): 9-13.
- [21] Tomobe M, Shimazui T, Uchida K, Hinotsu S, Akaza H. Argyrophilic nucleolar organizer region in proliferating cell has a predictive value for local recurrence in superficial bladder tumor. *J Urol* 1999; 162(1): 63-8.
- [22] 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* 1986; 18(1): 5-14.