

ARAŞTIRMA

Recep Eröz¹
Kürşad Ünlühizarcı²
Nurhan Cücer³
Davut Baltacı⁴
Murat Oktay⁵

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

²Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Endokrinoloji Bölümü, Kayseri, Türkiye

³Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

⁴Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, Aile Hekimliği Anabilim Dalı, Düzce, Türkiye

⁵Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Düzce, Türkiye

Yazışma Adresi

Dr. Recep Eröz
Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Genetik AD. 81820, Düzce
E-mail: receperez@duzce.edu.tr
Tel: +90 5055832347
Faks: 90 380 5421302

Konuralp Tıp Dergisi

e-ISSN1309-3878
konuralptipdergi@duzce.edu.tr
konuralpgeneltip@gmail.com
www.konuralptipdergi.duzce.edu.tr

Kistik Nodüler Guatrılı Olguların Tiroid Hücrelerindeki AgNOR Sayısı ve AgNOR Yüzey Alanı/Çekirdek Alanı Oranının Yaş ve Cinsiyete göre Karşılaştırılması

ÖZET

Amaç: Gümüş seven çekirdekçik organize edici bölgeler ile ilişkili proteinler (AgNORs) akrosentrik kromozomların ikincil boğumlarındaki rDNA genleri tarafından sentezlenirler ve tiroid rahatsızlıkları dahil çeşitli hastalıklarda çeşitli rollere sahiptirler. Bizim amacımız kistik nodüler guatrılı bireylerin tiroid hücrelerindeki AgNOR sayısı ve AgNOR yüzey alanı/çekirdek alanı oranının yaş ve cinsiyete göre karşılaştırılmasıdır.

Gereç Yöntem: Bu çalışmaya ince iğne aspirasyon biyopsisi (İİAB) kistik nodüler guatr ile uyumlu olan 18 bayan (yaş aralığı 26-78) ve 17 erkek (yaş aralığı 26-79) birey dahil edildi. Bu biyopsi materyalleri AgNOR ların tespiti için spesifik bir protokole göre boyandı. Her bir birey için 100 çekirdek değerlendirildi ve her bir hücrenin AgNOR sayısı ve AgNOR yüzey alanı/çekirdek alanı (NORa/TÇa) oranı her bir grup için tespit edildi.

Bulgular: Kistik nodüler guatr'lı bayan hastaların AgNOR sayısı (%2,05±0,46) ile erkek hastaların AgNOR sayısı (%2,35±0,66) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (p=0.131). Bayan hastaların NORa/TÇa oranı (%6,53±1,21) ile erkek hastaların NORa/TÇa oranı (%7,03±1,12) arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p=0.211). Buna ilaveten erkek hastalarda ve bayan hastalarda hem AgNOR sayısı ile yaş (r=0.085 p=0.627) hem de NORa/TÇa oranı ile yaş arasında anlamlı bir korelasyon yoktu (r=0.286; p=0.096).

Sonuç: Kistik nodüler guatrılı hastalarda hem cinsiyet hem de yaş ile AgNOR protein sentezi arasında bir ilişki yoktur.

Anahtar Kelimeler: NOR, AgNORs, kistik nodüler guatr, tiroid, rDNA

Comparison of AgNOR Count and AgNOR Surface Area/Total Nuclear Surface Area Proportions to Sex and Age in Cases with Cystic Nodular Goitre

Abstract

Aim: Different proteins have different roles in various diseases. Argyrophilic nucleolar organising region associated proteins (AgNORs) are synthesized from secondary constriction of acrocentric chromosome interested in a variety of diseases including thyroid disorders.

Our aim was the comparison of the AgNOR count and AgNOR surface area/total nuclear surface area (NORa/TNa) proportions to different sex and age in cases with cystic nodular goitre.

Materials and Methods: Twenty female (age range 26-78) and male (age range 26-79) whose fine needle aspiration (FNA) materials were compatible with cystic nodular goitre were included in the study. Those biopsy materials were stained for AgNOR detection according to a specific protocol. 100 nuclei per individual have been evaluated, and both AgNOR count and NORa/TNa values of individual cells were detected for each group.

Results: Female patients with cystic nodular goitre had not significantly (p=0.131) higher AgNOR count (2.05±0.46%) and NORa/TNa (6.53±1.21%) than in males (2.35±0.66% and 7.03±1.12%) (p=0.211), respectively. Additionally, there is not any correlation between age and AgNOR number (r=0.085 p=0.627) and NORa/TÇa ratio (r=0.286; p=0.096) in both of male and female.

Conclusion: There is not any relationship between AgNOR protein synthesis and both of age and sex in cases with cystic nodular goitre.

Keywords: NOR, AgNORs, cystic nodular goitre, thyroid, rDNA

GİRİŞ

Çekirdekçikler interfaz çekirdeğinin iyi bir şekilde tanımlanmış yapısal fonksiyonel üniteleridir ve ribozomal genler burada yerleşerek ribozomal RNA (rRNA) sentezini gerçekleştirirler (1). Çekirdekçiğin morfolojisi hücre aktivitesine bağlı olarak büyük değişkenlik gösterir (2). Çekirdekçik organize edici bölge (NOR), beş çift akrosentrik kromozomun (13,14,15,21 ve 22. kromozomlar) ikincil boğumlarında yerleşmiş olan ve aktif oldukları zaman gümüş ile boyanabilen ribozomal gen bölgeleridir (3). Bu rRNA genleri, RNA polimeraz I tarafından transkripsiyon süresince çekirdekçikte yerleşirler. İnsan rDNA genlerinin yaklaşık olarak her bir diploit genomdaki 400 kopyası akrosentrik kromozomların kısa kollarındaki tandem tekrar kümeleri ile ilişkilidir (4).

Bunun için AgNOR boyama interfaz çekirdeğindeki çekirdekçiği (3) ve metafazdaki kromozom üzerindeki aktif NOR bölgelerini göstermek için kullanılan en önemli metodlardan biridir (5). Tümör patolojisinde interfaz AgNOR miktarının önemi ve bunların farklı kanser tiplerindeki prognostik karakterizasyonu ile ilgili çeşitli araştırmalar vardır (6-9). AgNOR'lar lenfoma, genetik rahatsızlıklar, ve tiroid rahatsızlıkları gibi çeşitli hastalıklar ile ilişkilidir (9-13).

Erişkin populasyonunda, tiroid nodülleri yaygındır ve ultrason incelemesi ya da diğer tarama teknikleri ile artan bir şekilde saptanmaktadır. Bunların morfolojik özelliklerine bağlı olarak, nodüllerin tanı için daha fazla incelenmesi gerekebilir. İnce iğne aspirasyonu (İİA) mikroskopik analiz yapılabilmesi için gerekli olan dokuların elde edilmesinde yaygın olarak kullanılan bir metod olmuştur (9).

Bu çalışmada biz tiroid nodüllerinden İİA yapılmış kistik nodüler guatrli olguların tiroid hücrelerindeki AgNOR sayısı ve NORa/TÇa oranı ile yaş ve cinsiyet arasında bir ilişkinin olup olmadığını karşılaştırmayı amaçladık.

MATERYAL ve METOD

Kistik nodüler guatrli 18 bayan ve 17 erkek olgu bu çalışmaya dahil edildi. Öncelikle bir endokrinoloji uzmanı tarafından bu hastaların tiroid nodüllerinden ultrason eşliğinde İİAB ile uygun örnekler alındı. Elde edilen bu aspirasyon mateyalleri temiz bir lama damlatılarak yayma yapıldı ve oda sıcaklığında yaklaşık olarak 15 dakika havada kurutuldu. Havada kurutulan preparatlar absolute metanolde yaklaşık olarak 5 dakika fikse edildi. Daha sonra Benn ve Perle (14) ve Lindner (15) protokolunun hafif modifikasyonu ile AgNOR boyama işlemi yapıldı. Bu işlem sırasında sıcaklık 37°C' ye çekildi ve boyama süresi 15 dakika ile sınırlandırıldı. Gümüş ile boyama işlemi sonrası, preparatlar bi-distile suda çalkalandı ve 2 dakika ksilolde bekletildikten sonra entellan

yardımı ile lamel kullanılarak kapatıldı. Her bir birey için 100 çekirdek değerlendirilerek bu hücrelerin hem AgNOR sayısı hem de NORa/TÇa oranları bir bilgisayar programında ölçülerek hesaplandı (16).

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 hesaplandı (SPSS software, version: 11.0). İstatistiksel anlamlılık için $p < 0,05$ kabul edildi. Güven Aralığı %95 olarak alındı.

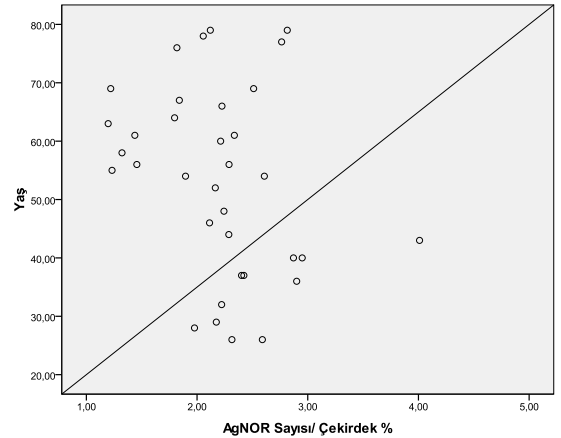
BULGULAR

Bayanların ve erkeklerin sırasıyla yaş ortalaması $50,67 \pm 14,32$ ve $56,12 \pm 17,94$ idi ($p=0,330$). Bu çalışmada kistik nodüler guatrli bayan hastaların AgNOR sayısı ($2,05 \pm 0,46$) erkek hastaların AgNOR sayısından ($2,35 \pm 0,66$) önemli derecede farklı değildi ($p=0,131$). Benzer şekilde bayan kistik nodüler guatrli hastaların NORa/TÇa oranı ($6,53 \pm 1,21$) erkek hastaların NORa/TÇa oranından ($7,03 \pm 1,12$) önemli derecede farklı değildi ($p=0,211$).

Tablo 1. Kistik nodüler guatrli hastalarda AgNOR sayısı/çekirdek ve NORa/TÇa oranı.

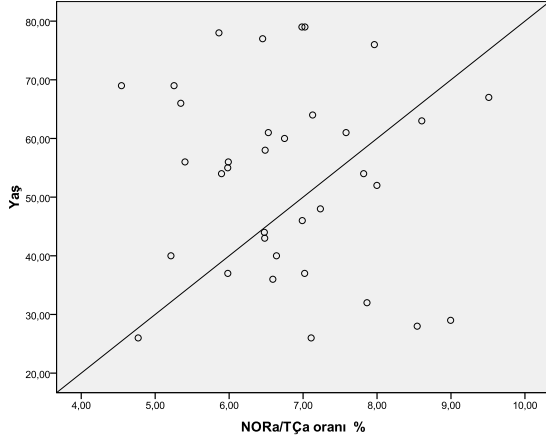
Grup (KNG)	N	n	AgNOR sayısı/çekirdek Ort \pm SS	NORa/TÇa oranı (%) Ort \pm SS	p
Bayan	18	1800	2,05 \pm 0,46	6,53 \pm 1,21	0.131 ^a
Erkek	17	1700	2,35 \pm 0,66	7,03 \pm 1,12	0.211 ^b

N: Birey sayısı n: İncelenen hücre sayısı SS: Standart sapma KNG: Kistik Nodüler Guatrli, α = NOR sayısı için p değeri β = NORa/TÇa oranı için p değerini göstermektedir.

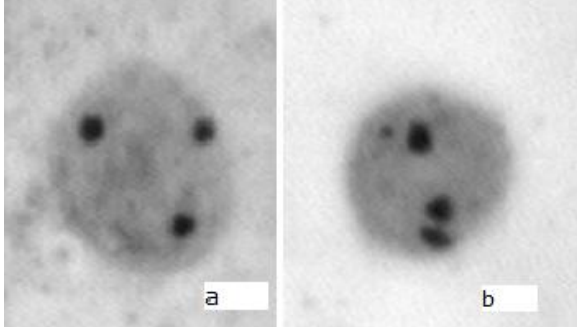


Şekil 1. Yaş ile AgNOR sayısı/çekirdek oranı arasındaki korelasyonu gösteren grafik

Buna ilaveten yapılan korelasyon testi sonunda erkek hastalarda ve bayan hastalarda hem AgNOR sayısı ile yaş ($r=0.286$ $p=0.096$) hem de NORa/TÇa oranı ile yaş arasında anlamlı bir korelasyon tespit edilemedi ($r=0.085$; $p=0.627$) (Şekil 1,2). Gümüş ile boyanmış olan bayan (a) ve erkek (b) hastalara ait olan NORs'ın görüntüleri şekil 3'de verilmiştir.



Şekil 2. Yaş ile NORa/TÇa oranı arasındaki korelasyonu gösteren grafik



Şekil 3. Değerlendirilen hücrelerin mikroskopik görüntüsü: (a) 37 yaş erkek, (b) 37 yaş bayan kistik nodüler guatr hastası olan bireylere ait tiroisit hücreleri.

TARTIŞMA

NOR'lar, Ribozomal RNA (rRNA) 'nın transkripsiyonunu kodlamak için RNA polimeraz I enzimini kullanan rDNA olarak adlandırılan spesifik DNA parçalarıdır. Ribozom içerisindeki bu rRNA'lar hücrenin protein sentezinden sorumludur. Protein sentezi hücre çoğalma prosesi için gerekli bir basamaktır. Bu nedenle AgNOR proteinleri hücre çoğalmasının göstergesi olarak kullanılır (17,18).

İnterfaz çekirdeğinde gözlenen AgNOR proteinlerinin miktarlarındaki değişikliklerin tümör patolojisi ve farklı kanser türlerinin tanısal ve prognostik karakterizasyonu ile ilgili çeşitli çalışmalar yayınlanmıştır (7-9). AgNOR düzeylerinde görülen değişiklikler protein sentezindeki değişiklikleri yansıtmaktadır. AgNOR

proteinlerinin sayısı ve hacmindeki artışların hücre çoğalması, farklılaşma ve salgı aktiviteleri gibi hücre aktivitesindeki artış ile ilişkili olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar vardır (9,19,20). Tiroid dokusundan İİAB yapılması tiroid nodüllerinin klinik incelemesi için kabul edilen bir metottur. Bu tekniğin en büyük kısıtlaması, çeşitli folüküler lezyonlar arasındaki ayrımının zor olmasıdır (21,22).

Belirli hastalarda, lenfositik tiroiditis ile ilişkili bir tiroid neoplazmasının sitolojik teşhisi (22,23) ve karakteristik olmayan papiller kısımlı yaymalar ile ilgili doğru yorumlamanın yapılması zordur. Biz daha önceki yapmış olduğumuz çalışmada, şu anki yöntemi kullanarak benign ve malign lezyonları ayırmak için cut-off değerleri tanımladık ve bu metodun malign ve benign tiroid lezyonlarındaki hücrelerin proliferasyon aktivitesini değerlendirmek için güvenilir bir metod olduğunu ve rutin sitopatolojiye katkı sağlayabileceğini tespit ettik (9). AgNOR proteinleri hücre çoğalmasına ilaveten, hücre metabolizması ile de ilişkilidir (24). Çekirdekçiğin kompozisyonu statik değildir ve hücrenin metabolik durumuna bağlı olarak önemli derecede değişkenlik gösterebilir (25). Yaşlanmaya bağlı olarak, hücre çoğalma oranı ve protein sentezi, enerji kullanımı vb. içeren metabolizması azalmaktadır. NOR (rDNA) aktivitesinin insan lenfositlerinde (26,27), fibroblastlarda (28) ve kemik iliğinde (29) yaşa bağlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Bu azalma yaşlı bireylerde açık bir şekilde dikkat çekmektedir. Ortalama AgNOR+ kromozom sayısının fibroblastlarda yaşa bağlı olarak önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir (30). Şimdiki çalışmada da bu yöntemi kullanarak kistik nodüler guatrli bireylerin tiroid hücrelerindeki AgNOR sayısı ve AgNOR yüzey alanı/çekirdek alanı oranı ile yaş ve cinsiyet arasında bir ilişkinin olup olmadığını tespit etmeye çalıştık.

Literatürde AgNOR yöntemi uygulanarak yapılmış çeşitli çalışmalar vardır (23-33). Bizim kullandığımız yöntemin diğer yöntemlere göre üstünlüğü vardır. Bu yöntem de NORa/TÇa oranının her bir hücre için ölçümü her bir tiroisit hücresinin NOR protein sentez kapasitesinin tespit edilmesine izin verir. Böylece her bir hücrenin proliferasyon kapasitesi hakkında daha gerçekçi sonuçlar elde edilmiş olur. Bunun için malign ve benign tiroid lezyonlarını ayırmada bizim kullandığımız yöntemin başarı oranı daha yüksektir. Bu yöntemin uygulamasının basit ve ucuz oluşu ise yöntemin diğer avantajlarından (9). Bildiğimiz kadarıyla kistik nodüler guatrli bireylerin tiroid hücrelerindeki AgNOR sayısı ve NORa/TÇa oranı ile yaş ve cinsiyet arasında bir ilişkinin olup olmadığı ile ilgili bir çalışmaya literatürde rastlayamadık.

Hızlı ve yavaş çoğalan hücrelerdeki interfaz AgNORs'ların farklı miktarlarda dağılımı rRNA

sentezindeki AgNOR proteinleri ve bu yapıların rolü göz önüne alınarak açıklanabilir (34). Hızlı bölünen hücreler yavaş bölünen hücrelerden daha kısa bir sürede ribozom biyogenezlerini yoğunlaştırmak zorundadırlar. Bu çok miktarda rDNA sekansının transkripsiyon için aktivasyonu ile başarılabilir. Bu sebeple, rRNA sentezi için yapısal fonksiyonel üniteler olan, çok miktarda interfaz AgNOR proteinlerinin sayısını artıracak olan büyük miktarda AgNOR proteininin sentez edilmesi gerekir (35). Bizde aynı tanıyı almış bireylerin tiroisit hücrelerindeki bu proteinlerin sentezinin yaş ve cinsiyet ile herhangi bir ilişkisinin olup olmadığını tespit etmek için hem AgNOR sayısını hem de NORa/TÇa oranını belirledik. Daha

önce benign ve malign lezyonları ayırmak için yapmış olduğumuz çalışmada her iki değerinde iyi çalıştığını fakat NORa/TÇa oranının, AgNOR sayısına göre daha duyarlı olduğunu bulmuştuk (9). Bu çalışmada hem NORa/TÇa oranı hem de AgNOR sayısı ile yaş ve cinsiyet arasında anlamlı bir ilişki bulamadık. Buda bize erişkin guatrli bireylerdeki AgNOR protein sentezinin yaş ve cinsiyetten bağımsız olduğunu göstermektedir. Eğer biz bu çalışmayı yine benign lezyon olan nodüler guatrli bireyler arasında yapmış olsaydık acaba bu sonuç değişirmiydi? Bu konu daha sonraki çalışmalar için araştırılmayı bekleyen bir konu olarak değerlendirilebilir.

KAYNAKLAR

1. Hadjiolov AA. The nucleolus and ribosome biogenesis. Cell Biology Monographs. New York: Springer, 1995;1-267
2. Busch H, Smetana K. Nucleoli of tumor cells. The Nucleolus. Edited by Busch H, Smetana K. London: Academic Press, 1970; 448-471
3. Treere D. AgNOR staining and quantification. Micron 2000;31(2):127-131.
4. Hernandez-Verdun D, Louvet E. The nucleolus: structure, functions and associated diseases. Medical Sciences 2004;20(1):37-44.
5. 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. 2005b;66B(2):36-39.
6. Pich A, Chiusa L, Margaria E. Role of the argyrophilic nucleolar organizer regions in tumor detection and prognosis. Cancer Detect Prev 1995;19(3):282-91.
7. Pich A, Chiusa L, Margaria E. Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology. Micron 2000;31(2):133-41.
8. Cucer N, Imamoglu N, Tozak H, 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):674-679.
9. 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 2011;22(2):74-78.
10. Imamoglu N, Demirtas H, Donmez-Altuntas H, Ilten A. Higher NORs-expression in lymphocyte of trisomy 21 babies/children: in vivo evaluation. Micron 2005a;36(6):503-507.
11. Nairn ER, Crocker J & MCGovern J. Limited value of AgNOR enumeration in assesment of thyroid neoplasms. Journal of Clinical Pathology 1988;41(10):1136.
12. Crocker J, Nar P. Nucleolar organizer regions in lymphomas. Journal of Pathology 1987;151(2):111-118.
13. 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 2010;19(2):102-107.
14. Benn PA, Perle M. Chromosome staining and banding techniques. In: Rooney D.E. Czepulkowski BH. (eds). Human Cytogenetics, Constitutional Analysis, actual approach, Vol 1. Oxford Univ. Press 1986; 91-118.
15. Lindner LE. Improvements in the silver-staining technique for nucleolar organizer regions (AgNOR). Journal of Histochemistry and Cytochemistry 1993;41(3):439-445.
16. 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 2001;44(2):77-82.
17. Pich A, Chiusa L, Navone R. Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumours. Annals of Oncology 2004;15(9):1319-1329.
18. Underwood JC. AgNOR measurements as indices of proliferation, ploidy and prognosis. Clinical Molecular Pathology 1995;48(5):239-240.
19. 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 1988;12(4):373-381.

20. 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.* 1989;158(1):3-7.
21. Kini SR, Miller JM, Hamburger JI, Smith-Purslow MJ. Cytopathology of follicular lesions of the thyroid gland. *Diagn Cytopathol* 1985;1(2):123-132.
22. Hamburger JI, Hamburger SW. Fine needle biopsy of thyroid nodules: avoiding the pitfalls. *NY State J Med* 1986;86(5):241-249.
23. Ravinsky E, Safneck J.R. Differentiation of Hashimoto's thyroiditis from thyroid neoplasms in fine needle aspirates. *Acta Cytol* 1988;32(6):854-861.
24. Dayan D, Vered M, Sivor S, Hiss Y, Buchner A. Age-related changes in proliferative markers in labial salivary glands: a study of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) and Ki-67. *Exp Gerontol* 2002;37(6):841-50.
25. Andersen JS, Lyon CE, Fox AH, et al. Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr. Biol.* 2002;12(1):1-11.
26. 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.* 1981;15(1):1-7.
27. 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.* 1986;36(2):117-123.
28. 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.* 1979; 11(1):55-75.
29. Pedrazzini E, Mamaev N, Slavutsky I. Age related decrease of NOR activity in bone marrow metaphase chromosomes from healthy individuals. *Mol. Pathol.* 1998; 51(1):39-42.
30. Thomas S, Mukherjee AB. A longitudinal study of human age-related ribosomal RNA gene activity as detected by silver-stained NORs. *Mech. Ageing Dev.* 1996; 92(2-3):101-109.
31. 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* 2006;28(4):188-192.
32. Slowinska-Klencka D, Klencki M, Popowicz B, Levinski A. AgNOR quantification in the diagnosis of follicular pattern thyroid lesions. *Analysis and Quantitative Cytology and Histology* 2003;25(6):347-352.
33. Slowinska-Klencka D, Klencki M, Popowicz B, Levinski A. Multiparameter analysis of AgNOR in thyroid lesions: comparison with PCNA expression. *Histol Histopathol* 2004;19(3):785-792.
34. Bukhari MH, Niazi S, Hashmi I, et al. Use of AgNOR index in grading and differential diagnosis of astrocytic lesions of brain. *Pak J Med Sci* 2007;23(2):206-210.
35. Derenzini M, Trere D, Pession A, Govoni M, Sirri V, Chieco P. Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissues. *J Pathol* 2000;191(2):181-186.