

Nöroglial Tümörlerde Proliferatif Aktivitenin AgNOR Yöntemi İle Değerlendirilmesi*

Ahmet Bayer**, Şahsine Tolunay***, Oktan Erol****, Sibel Altınok Bayer*****

ÖZET. Glial tümörlerde proliferatif aktivitenin bilinmesi, tümörün biyolojik davranışının tanınmasına yardımcı olur ve tedaviyi etkiler. Kaynaklarda AgNOR yöntemiyle tümörlerin proliferatif aktivitenin tahmin edilebileceğini bildiren çalışmalar mevcuttur. Bununla birlikte değişik tümör tiplerinde olduğu gibi glial tümörlerde de olumsuz sonuç bildiren yayınlar da bulunmaktadır.

Bu noktadan hareket ederek U. Ü. Tıp Fakültesi Patoloji A.B.D.'inde 1986-1993 yıllarında tam almış 175 glial tümör olgusu ile yedi adet otopsi olgusunun beyin dokularına AgNOR yöntemi uygulandı. 40 olgu glioblastoma multiforme, bir olgu gliomatozis serebri, 43 olgu anaplastik astrositoma, 35 olgu grad II astrositoma, yedi olgu grad I astrositoma, 12 olgu pilositik astrositoma, 13 olgu ependimoma, altı olgu anaplastik ependimoma, beş olgu oligodendroglioma, dört olgu anaplastik oligodendroglioma, yedi olgu mikst oligoastrocitoma, bir olgu anaplastik oligoastrocitoma ve bir olgu koroid pleksus karsinomunu idi. Ortalama AgNOR sayılar glioblastoma multiformede 2.65 (2.13 - 3.14), gliomatozis serebride 2.93, anaplastik astrositomada 2.50 (1.50 - 3.12), grad II astrositomada 1.73 (1.26 - 2.80), grad I astrositomada 1.39 (1.28 - 1.49), pilositik astrositomada 1.79 (1.33 - 2.38), oligodendrogliomada 1.88 (1.28 - 2.86), anaplastik oligodendrogliomada 2.70 (2.28 - 3.05), mikst oligoastrocitomada 2.04 (1.43 - 3.01), anaplastik oligoastrocitomada 2.92, ependimomada 1.67 (1.33 - 2.54), anaplastik ependimomada 2.73 (2.55 - 3.08), koroid pleksus karsinomunda 1.95, kontrol grubunda 1.37 (1.33 - 1.41) bulundu. Olgular tek tek değerlendirildiği düşük ve yüksek grad gliomalar arasında bazı karışmalar vardır. İki olgu dışında (bir anaplastik astrositoma ve bir koroid pleksus karsinomunu) yüksek grad glioma grubunda yer alan 94 olgunun AgNOR sayısı, Hara ve ark. malign karakterin göstergesi olarak önerdiği iki sayısının üzerindeydi. Diğer yandan düşük grad glioma grubunda yedisi grad II astrositoma, dördü mikst oligoastrocitoma, ikisi oligodendroglioma, ikisi pilositik astrositoma, ikisi ependimoma olmak üzere toplam 17 olgunun AgNOR sayısı ikinin üzerinde bulundu. Yüksek grad glioma grubunda olguların % 97'sinin AgNOR sayısının ikinin üzerinde olmasına karşın 17 düşük grad glioma olgusunun AgNOR sayısının da bu sınırın üzerinde olması nedeniyle AgNOR yönteminin düşük ve yüksek grad gliomaları net olarak ayıramadığı sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler .Glial tümör .AgNOR.

Evaluation of Propiferativa Activity of Glial Tumors With Agnor Technique

SUMMARY. Knowing about proliferative activity of glial tumors helps estimating their biological behavior and affects therapy. AgNOR technique may provide useful data about proliferative activity of the tumors. But the results of different reports of in the literature are controversial.

We applied AgNOR technique to 175 glial tumors diagnosed between 1986 1993 at Uludağ University Medicine Faculty Pathology Department. Normal brain tissues of seven autopsy cases were used as control group. Histopathological diagnosis of 175 glial tumors was made as 40 glioblastoma multiforme, one gliomatosis cerebri, 43 anaplastic astrocytoma, 35 grade II astrocytoma, seven grad I astrocytoma, 12 pilocytic astrocytoma, 13 ependymoma, six anaplastic ependymoma, five oligodendroglioma, seven mixed oligoastrocytoma, one anaplastic oligoastrocytoma and one choroid plexus carcinoma. Mean AgNOR scores were found 2.65 (2.133.14) in glioblastoma, 2.93 in gliomatosis cerebri, 2.50 (1.503.12) in anaplastic astrocytoma, 1.73 (1.262.80) in grade II astrocytoma, 1.39 (1.281.49) in grade I astrocytoma, 1.79 (1.332.38) in pilocytic astrocytoma, 1.88 (1.282.86) in oligodendroglioma, 2.70 (2.283.05) in anaplastic oligodendroglioma, 2.04 (1.433.01) in

* XI. Ulusal Patoloji Kongresi'nde yazılı bildiri olarak sunulmuştur.

** Uzm. Dr.; Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

*** Doç. Dr.; Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

**** Prof. Dr.; Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

***** Araş. Gör. Dr.; Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

mixed oligoastrocytoma, 2.92 in anaplastic oligoastrocytoma, 1.67 (1.332.54) in ependymoma, 2.73 (2.553.08) in anaplastic ependymoma, 1.95 in choroid plexus carcinoma and 1.37 (1.331.41) in control group. There were some overlapping between the scores of low and high grade gliomas. In high grade gliomas, AgNOR scores of all cases except one anaplastic astrocytoma and one choroid plexus carcinoma were above two, the score proposed by Hara et al. as indicator of malignant character. On the other hand in low grade gliomas AgNOR scores of 17 cases (seven grade II astrocytoma, four mixed oligoastrocytoma, two oligodendroglioma, two pilocytic astrocytoma and two ependymoma) were also above two. It was concluded that AgNOR technique could not separate exactly low and high grade gliomas because AgNOR scores of 17 cases of low grade gliomas overlapped with high grade gliomas although the scores of 97 % high grade gliomas were above two.

Key Words .Glial tumor .AgNOR.

NOR'lar (Nucleolar Organizer Region), ribozomal genleri kodlayan rDNA segmentlerinden oluşur¹, 18S ve 28S ribozomların üretimini kontrol ederler². İnsanda NOR'lar 13, 14, 15, 21 ve 22. akrosentrik kromozomların kısa kolları üzerinde lokalizedir^{2,3}. NOR'lar ilişkili oldukları proteinlerin argirofilik olması nedeniyle koloidal gümüş boyama tekniği ile gösterilebilirler ve AgNOR (Argyrophilic Nucleolar Organizer Region) adını alırlar¹. Elektron mikroskopik olarak AgNOR proteinleri fibriller merkezlerde ve interfazik nükleollerin yoğun fibriller komponentinde lokalizedir⁴. Sadece transkripsiyonel olarak aktif NOR'lar argirofilik olduğundan artmış AgNOR sayısı, artmış transkripsiyonu gösterir⁵. Lenfosit ve fibroblast kültürlerinde yapılan çalışmalarda total NOR sayısının net RNA sentezindeki gerçek farkları yansıtılabileceği gösterilmiştir⁶. Kültüre edilmiş neoplazik hücrelerde interfazik NOR miktarının direkt olarak hücre replikasyon hızı ile ilişkili olduğu, AgNOR proteinlerinin alanlarının tam değerinin, lezyonun doku orijinine bakılmaksızın proliferasyon hızının tam karşılığı olduğu bildirilmiştir⁷.

Malign hücreler, benign hücre karşılıklarına⁸ ve hiperplazik hücrelere göre daha yüksek AgNOR sayısına sahiptir ve NORların dağılımı daha düzensizdir⁹. Malign hücrelerde nükleolar değişikliklerin artmış ribozomal aktivite, artmış ribozomal gen sayısı ya da devamlı bölünme durumuyla ilişkili olması muhtemeldir⁸. Malign hücrelerde interfaz NOR sayısının artmış olması, kromozom sayısının artmasıyla da açıklanabilir⁹. Malign tümörlerde AgNORlar nükleus içinde saymayı güçleştirecek kadar dağılmıştır. AgNORların sayısal değeri nükleus içinde dağılmalarına ya da kümelenmelerine bağlıdır. Böylece benign ve malign tümörlerde histolojik AgNOR sayısı mutlak AgNOR sayısından çok dağılım indeksinin sayısal değeridir³. Diğer bir özellik NORların sayısı arttıkça, büyüklüklerinin azalmasıdır¹⁰.

Glial tümörlerde proliferatif aktivitenin bilinmesi, tümörün biyolojik davranışının tanınmasına yardımcı olur ve tedaviyi etkileyebilir¹¹. Biz de

gliam tümörlerde AgNOR yöntemini uygulayarak yöntemin glial tümörlerin proliferatif aktivitesinin tahmin edilmesinde faydalı olup olmayacağını incelemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem

U. Ü. Tıp Fakültesi Patoloji A.B.D.'ında 1986-1993 yıllarında tanı almış 175 glial tümör olgusu çalışma kapsamında tekrar değerlendirildi. 40 olgu glioblastoma multiforme, bir olgu gliomatozis serebri, 43 olgu anaplastik astrositoma, 35 olgu grad II astrositoma, yedi olgu grad I astrositoma, 12 olgu pilositik astrositoma, 13 olgu ependimoma, altı olgu anaplastik ependimoma, beş olgu oligodendroglioma, dört olgu anaplastik oligodendroglioma, yedi olgu mikst oligoastrocitoma, bir olgu anaplastik oligoastrocitoma ve bir olgu koroid plexus karsinomu idi. Gemistositik, protoplazmik ve subependimal dev hücreli astrositoma olguları, grad II astrositoma grubunda incelendi. Kontrol grubu olarak yedi otopsi olgusunun normal beyin dokuları alındı.

Tüm olgular % 10 formal solüsyonunda fikse edilerek rutin takip işlemlerinden sonra parafinde bloklandı. Her olgunun 1 ya da 2 kesiti ile kontrol grubu olguların birer kesitleri Crocker'ın tanımlamasına göre¹² AgNOR yöntemi ile boyandı. Değerlendirme işlemi x 1000 büyültme yapıldı. AgNOR benekleri nükleus içinde siyah noktalar halinde izlendi. Her tümörde nekrozu ya da artefaktı olmayan alanlardan rastgele seçilen 100 tümör hücresinin nükleusundaki AgNOR benekleri sayıldı. Tüm tümörlerde nükleus içinde mikrovida ile farklı düzlemlerde tespit edilen bütün AgNOR benekleri sayıma dahil edildi. Her olgu için elde edilen toplam AgNOR sayısı 100'e bölünerek her bir olgunun ortalama AgNOR sayısı bulundu. Sayım işleminde nükleolar organizasyon gösteren benekler toplam 1 olarak sayıldı. Nükleolus dışı AgNORları da olan olgularda bunlar

nükleolus sayısına eklendi. Kontrol grubu olarak alınan normal beyin dokularında sadece glial hücreler sayıldı.

Bulgular

Çalışmamızda incelenen 175 glioma olgusunun tümör tiplerine göre ortalama en düşük, en yüksek AgNOR sayıları şöyledi. Glioblastoma multiforme 2.65 (2.13 - 3.14), gliomatozis serebri 2.93, anaplastik astrositoma 2.50 (1.50 - 3.12), grad II astrositoma 1.73 (1.26 - 2.80), grad I astrositoma 1.39 (1.28 - 1.49), pilositik astrositoma 1.79 (1.33 - 2.38), oligodendroglioma 1.88 (1.28 - 2.88), anaplastik oligodendroglioma 2.70 (2.28 - 3.05), mikst oligoastrositoma 2.04 (1.43 - 3.01), anaplastik oligoastrositoma 2.92, ependimoma 1.67 (1.33 - 2.54), anaplastik ependimoma 2.73 (2.55 - 3.08), koroid pleksus karsinomu 1.95, kontrol grubu 1.37 (1.33 - 1.41). Glioblastoma multiforme, anaplastik oligodendroglioma, anaplastik oligoastrositoma, gliomatozis serebri ve anaplastik ependimoma olgularının tümü ile anaplastik astrositoma olgularının biri hariç tümünde nükleus içinde iki-dört tane, bir kısmı nükleolar organizasyon gösteren, bir kısmı nükleolus dışı AgNOR beneği görüldü (Resim: 1, 2). Grad II astrositoma, pilositik astrositoma, oligodendroglioma, mikst oligoastrositoma, ependimoma gruplarında AgNOR beneklerinin sayıları değişti. Yedi grad II astrositoma, dört mikst oligoastrositoma, iki oligodendroglioma, iki pilositik astrositoma ve iki ependimoma olgusunda yüksek grad gliomalar benzer şekilde nükleus içinde iki-dört tane nükleolus organizasyonunda ya da nükleolus dışı AgNOR beneği izlendi. Diğer grad II astrositoma, pilositik astrositoma, oligodendroglioma, mikst oligoastrositoma, ependimoma olguları ile bir anaplastik astrositoma, bir koroid pleksus karsinomu olgusu, grad I astrositoma olguları ve kontrol grubunda AgNOR beneği sayısı bir ya da iki nadiren üçtü (Resim: 3, 4, 5, 6).

AgNOR yöntemi ile incelenen glioma gruplarındaki olgu sayısı 1-43 arasında değişiyordu. Bu nedenle istatistiksel kıyaslama için yeterli sayıda olgu içeren glioblastoma multiforme, anaplastik astrositoma, grad II astrositoma, pilositik astrositoma, ependimoma grupları arasında tek yönlü varyans analiz testi uygulandı (Tablo: I). Bu grupların her birinin ortalama AgNOR sayıları kontrol grubundan anlamlı farklılık gösterdi ($p < 0.05$). Yüksek grad glioma grubunda yer alan glioblastoma multiforme ve anaplastik astrosi-

Tablo: I- İstatistiksel kıyaslama için yeterli sayıda olgusu bulunan gliomaların en düşük, en yüksek ve ortalama AgNOR sayıları

Tümör Tipi	Olgu Sayısı	En Düşük AgNOR Sayısı	En Yüksek AgNOR Sayısı	Ortalama AgNOR Sayısı	Standart Sapma
Glioblastoma multiforme	40	2.13	3.14	2.65	0.247
Anaplastik astrositoma	43	1.50	3.12	2.50	0.307
Grad II astrositoma	35	1.26	2.80	1.73	0.377
Pilositik astrositoma	12	1.33	2.38	1.79	0.302
Ependimoma	13	1.33	2.54	1.67	0.350
Kontrol Grubu	7	1.33	1.41	1.37	0.028



Resim: 1

Glioblastoma multiforme olgusunda nükleolus içi ve dışında AgNOR benekleri
(Prot. No: 1503/32 AgNOR x 1000)

toma gruplarının her birinin ortalama AgNOR sayıları pilositik astrositoma, grad II astrositoma ve ependimoma gruplarından anlamlı şekilde farklıydı ($p < 0.05$). Grad II astrositoma, pilositik astrositoma ve ependimoma gruplarının AgNOR sayıları arasında anlamlı farklılık yoktu ($p > 0.05$). Olgular aynı zamanda tümör tipine bakılmaksızın düşük (grad I ve II) ve yüksek (grad III ve IV) glioma olarak sınıflanıp (Tablo: II) kıyaslandığında fark anlamlıydı ($p < 0.05$). İstatistiksel kıyaslama için yeterli sayıda olgu içermemekle birlikte, yüksek grad glioma grubunda yer alan gliomatozis serebri, anaplastik oligodendroglioma, anaplastik oligoastrositoma ve anaplastik ependimoma gruplarının ortalama AgNOR sayıları (sırasıyla 2.93, 2.70, 2.92, 2.73), grad II astrositoma, grad I astrositoma, pilositik astrositoma, oligodendroglioma, mikst oligoastrositoma, ependimoma ve kontrol grubunun

ortalama AgNOR sayılarından (sırasıyla 1.73, 1.39, 1.79, 1.88, 2.04, 1.67, 1.37) daha yüksekti. Tek olgu olarak bulunan koroid pleksus karsinomunun AgNOR sayısı (1.95), mikst oligoastrozitoma dışındaki diğer düşük grad glioma gruplarının ortalama AgNOR sayılarından yüksekti.

Tablo: II- Tümör tipine bakılmaksızın düşük ve yüksek grad gliomalarda en düşük, en yüksek ve ortalama AgNOR sayıları

Tümör Tipi	Olgu Sayısı	En Düşük AgNOR Sayısı	En Yüksek AgNOR Sayısı	Ortalama AgNOR Sayısı	Standart Sapma
Yüksek grad gliomalar	96	1.50	3.14	2.61	0.288
Düşük grad gliomalar	79	1.28	2.80	1.74	0.402
Kontrol Grubu	7	1.33	1.41	1.37	0.028



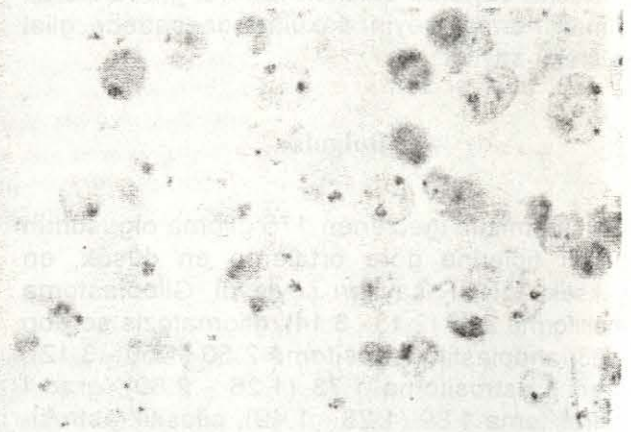
Resim: 2

Anaplastik astrozitoma olgusunda bir önceki olguya benzer özellikler taşıyan AgNOR benekleri (Prot. No: 1716/92 AgNOR x 1000)

Yüksek ve düşük grad glioma grupları arasında istatistiksel farklılıklar bulunmakla birlikte, gruplar ve olgular tek tek değerlendirildiğinde bazı karışmalar bulunduğu görüldü. Düşük grad glioma grubunda yer alan yedi grad II astrozitoma, dört mikst oligoastrozitoma, iki oligodendroglioma, iki ksilosilik astrozitoma, iki apendimoma olgusunun AgNOR sayıları yüksek grad grubunun sınırları içindeydi.

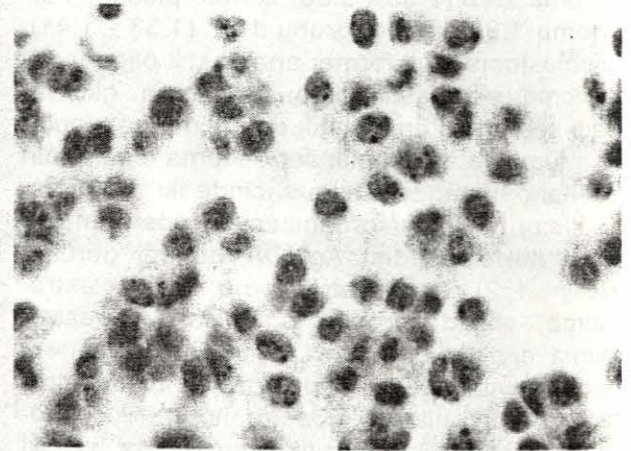
Tartışma

Hara ve ark. üç glioblastoma multiforme, altı anaplastik astrozitoma, beş grad II astrozitoma olgusunu AgNOR yöntemi ile incelemiş, ortalama



Resim: 3

Subependimal dev hücreli astrozitomada nükleolus organizasyonu gösteren 1 ya da 2 AgNOR beneki (Prot. No: 2142/89 AgNOR x 1000)

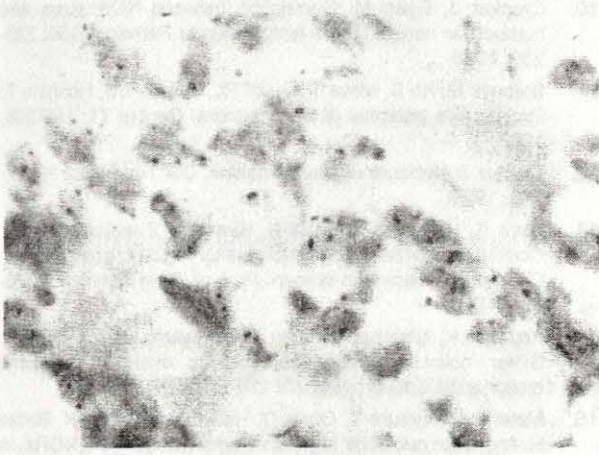


Resim: 4

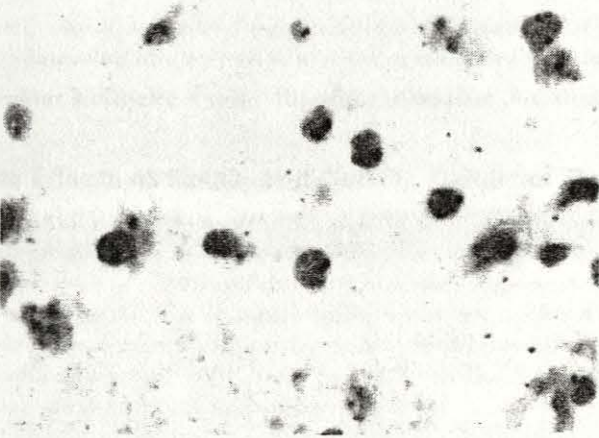
Oligodendroglioma olgusunda nükleolus organizasyonu gösteren 1-3 AgNOR beneki (Prot. No: 2414/91 AgNOR x 1000)

AgNOR sayılarını grad II astrozitomada 1.6 (1.3 - 1.9), anaplastik astrozitomada 2.5 (2.0 - 3.3), glioblastomada 2.8 (2.4 - 3.2), normal beyin dokusunda 1.2 bulmuştur. İkinci üzerindeki AgNOR sayılarının malign karakterin göstergesi olduğunu önermişlerdir¹³.

Shibuya ve ark. 18 glioblastoma, dört anaplastik astrozitoma, iki grad II astrozitoma, beş malign mikst glioma, iki ependimoma olgusuna AgNOR yöntemini uygulamış, ortalama AgNOR sayılarını, glioblastomada 2.58 (2.19 - 2.97), anaplastik astrozitomada 2.20 (2.06 - 2.34), grad II astrozitomada 1.71, mikst malign gliomada 1.95 (1.56 - 2.34), ependimomada 3.08 bulmuşlardır¹¹.



Resim: 5
Ependimoma olgusunda nükleolus organizasyonunda çoğunlukla tek, seyrek olarak da 2 ya da 3 AgNOR beneği (Prot. No: 966/86 AgNOR x 1000)



Resim: 6
Grad I astrositoma olgusunda nükleolus organizasyonu gösteren 1, 2 ya da 3 AgNOR beneği (Prot. No: 3902/92 AgNOR x 1000)

Kajiwara ve ark. 20 glioblastoma multiforme, 15 anaplastik astrositoma, 16 astrositoma olgusunu AgNOR yöntemiyle incelemiş, ortalama AgNOR sayılarını, glioblastomada 2.51 (1.77 - 3.33), anaplastik astrositomada 2.01 (1.45 - 2.60), astrositomada 1.76 (1.51 - 2.04) bulmuşlardır. AgNOR sayılarının aynı zamanda prognozla ilişkili olduğunu göstermiş ve AgNOR sayısı 1.80'den düşük olan olguların prognozunun, 1.80'den yüksek olanlardan daha iyi olduğunu belirtmişlerdir¹⁴.

Maier ve ark. inceledikleri 10 düşük grad gliomanın AgNOR sayısını 3.11, 24 yüksek grad gliomanın AgNOR sayısını 3.38 bulmuş ve farkın anlamlı olmadığını rapor etmişlerdir¹⁵.

Gliyal tümörlerde AgNOR yöntemi proliferatif aktiviteyi ölçen diğer yöntemlerle de kıyaslanmıştır. Hara ve ark. AgNOR sayılarının Ki-67 skorları ile orantılı olarak arttığını bildirmiştir¹³. Shibuya ve ark. çalışmasında AgNOR sayıları, Ki-67 skorları, BrdU indeksi ve DNA polimeraz alfa monoklonal antikor indeksi ile korelasyon göstermiştir¹¹. Kajiwara ve ark. AgNOR sayılarının BrdU indeksi ile korelasyon gösterdiğini bulmuştur¹⁴. Maler ve ark. ise AgNOR sayılarının BrdU ve Ki-67 indeksleri ile korelasyon göstermediğini bildirmiştir¹⁵.

Çalışmamızda incelenen 96 yüksek grad glioma olgusunun ikisinin dışında (bir anaplastik astrositoma ve bir koroid pleksus karsinomu) AgNOR sayısı 2.02'nin üzerindedir. Bu değer Hara ve ark. malign karakterin göstergesi olarak önerdikleri değere çok yakındır. Bununla birlikte yedi grad II astrositoma, dört mikst oligoastrocitoma, iki oligodendroglioma, iki pilositik astrositoma, iki ependimoma olgusunun AgNOR sayısı da ikinin üzerindedir. Kajiwara ve ark. prognostik faktör olarak önerdikleri 1.80 AgNOR sayısı çalışmamızda elde edilen sayılara göre düşük kalmaktadır. Ayrıca Kajiwara ve ark. çalışmasında gruplar arasında AgNOR sayıları açısından ayırt edici sınırlar yoktur. Maier ve ark. çalışmasında incelenen 10 düşük grad astrositomanın AgNOR sayısı 3.11 olup, bu değer aynı tümör tipi için çalışmamızda elde edilen ortalama AgNOR sayısının oldukça üzerindedir. Bu çalışmada incelenen yüksek grad gliomaların AgNOR sayılarının genellikle daha yüksek olmasına, yüksek ve düşük grad gliomalar arasında yukarıda belirtildiği şekilde anlamlı farklar bulunmasına karşın, olgular tek tek değerlendirildiğinde AgNOR yönteminin düşük ve yüksek grad gliomalarnet olarak ayıramadığı düşünüldü.

Uzm. Dr. Ahmet BAYER
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi
Patoloji ABD
Tel: 442 84 00
16059 Görükle / BURSA

Kaynaklar

1. Egan MJ, Crocker J: Evaluation of nucleolar organizer regions in pulmonary pathology. Thorax 45: 225-232, 1990.
2. Rushoff J, Plate K, Bittinger A, Thomas C: Basic concepts and practical application in tumor pathology. Path Res Pract 185: 878-885, 1989.
3. Underwood JCE, Giri DD: Nucleolar organizer regions as diagnostic discriminants for malignancy. J Pathology 155: 95-96, 1998.

4. Fakan S, Hernandez Verdun D: The nucleolus and nucleolar organizer regions. *Biology of Cell* 56: 189-206, 1986.
5. Egan M, Freeth M, Crocker J: Relationship between intraepithelial neoplasia of the cervix and the size and number of nucleolar organizer regions. *Gynecol oncol* 38: 30-33, 1990.
6. Morton CC, Brown JA, Holmes WM, Nance WE: Stain intensity of human nucleolar organizer region reflects incorporation of uridine into mature ribosomal RNE. *Exp Cell Res* 145: 405-413, 1983.
7. Trere D, Farabegelli F, Cancellieri A, Ceccarelli C, Eusebi V, Derenzini M: AgNOR area in interphase nuclei of human tumors correlates with the proliferative activity evaluated by bromodeoxyuridine labelling and Ki-67 immunostaining. *J Pathology* 165: 53-59, 1991.
8. Trere D, Pession A, Derenzini M: The silver stained proteins of interphasic nucleolar organizer regions as a parameter of cell duplication rate. *Exp Cell Res* 184: 131-137, 1989.
9. Derenzini M, Pession A, Farabegoli F, Trere D, Badiali M, Dehan P: Relationship between interphasic nucleolar organizer regions and growth rate in two neuroblastoma cell line. *Am J Pathol* 134: 925-935, 1989.
10. Crocker J, Egan M: Correlation between NOR sizes and numbers in nonHodgkin's lymphomas. *J Pathology* 156: 233-239, 1988.
11. Shibuya M, Ito S, Miwa T, Davis RL, Wilson CB, Hoshino T: Proliferative potential of brain tumors. *Cancer* 71: 199-206, 1993.
12. Crocker J: Nucleolar organizer regions. *Cur Top Pathol* 82: 91-148, 1990.
13. Hara A, Hirayama H, Sakai N, Hiromu Y, Tanaka T, Meri H: Correlation between nucleolar organizer region staining and Ki-67 immunostaining in human gliomas. *Surg Neurol* 33: 320-324, 1990.
14. Kajiwaru K, Nishizaki T, Orita T, Nakayama H, Acki H, Ito H: Silver colloid staining technique for analysis of glioma malignancy. *J Neurosurg* 73: 113-117, 1990.
15. Maler H, Morimura T, Ofner D, Hallbrucker C, Kitz K, Budka H: Argyrofilic nucleolar organizer region proteins (AgNORs) in human brain tumor relation with grade of malignancy and proliferation indices. *Acta Neuropathol* 80: 156-162, 1990.