بررسی ارتباط شاخص های AgNOR, Ki-67 با درجه بدخیمی کارسینوم موکواپیدرموئید غدد بزاقی

دکتر جهانشاه صالحی نژاد*

استادیار و مدیرگروه آسیب شناسی دهان و فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

دکتر کامران غفارزادگان

استادیار گروه آسیب شناسی بیمارستان قائم دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

دکتر نصرالله ساغروانیان

استادیار گروه آسیب شناسی دهان و فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

دکتر نوشین محتشم

استادیار گروه آسیب شناسی دهان و فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

تاریخ ارائه مقاله : ۸۳/۴/۵ – تاریخ پذیرش : ۸۳/۵/۶

چکیده

مقدمه :

موکواپیدرموئید کارسینوما شایع ترین بدخیمی غدد بزاقی می باشد ، که طبق گروه بندی های رایج به سه گرید پایین ، بینابینی و بالا تقسیم می گردد. به خاطر وجود تفاوت فراوان در رفتارهای بیولوژیک، تشخیص دقیق وضعیت بیمار از نظر بافت شناسی و قرار دادن در یکی از گروههای مورد نظراز اهمیت ویژه ای در درمان و نهایتا پیش آگهی بیمار برخوردار است .

مواد و روش ها :

در یک مطالعه تحلیلی گذشته نگر ۲۰ نمونه از بلوک های پارافینی بیماران با تشخیص قبلی موکواپیدرموئید کارسینوما در گرید های مختلف از بایگانی بخش آسیب شناسی دانشکده دندانپزشکی و بیمارستانها ی قائم و امید مشهد تهیه گردید که شامل ۵ نمونه گرید پایین ، ۷ نمونه گرید متوسط و ۸ نمونه گرید بالا می گردیدند. از هر نمونه ۳ برش تهیه شد که یکی با H&E رنگ آمیزی گردید و دو برش دیگر به ترتیب تحت رنگ آمیزی های هیستوشیمیایی AgNOR و ایمنوهیستوشیمیایی Ki-67 قرار گرفتند. در نمونه AgNOR تعداد نقاط به طور میانگین در هسته های یکصد سلول و در نمونه Ki- 67 نیز همچنین تعداد هسته های قهوه ای رنگ در یکصد سلول شمارش گردیدند و سپس به کمک آزمون آماری ضریب همبستگی رتبه ای اسپیرمن (Spearman) بررسی ارتباط بین گریدهای بافتی کارسینوم موکواپی درموئید با نقاط AgNOR و میزان بروز Ki-67 انجام پذیرفت.

یافته ها :

۱- ارتباط و همبستگی واضحی بین گرید های بافت شناسی کارسینوم موکواپیدرموئید و نقاط AgNOR وجود دارد.
(rs= 0.791,P value = 0.00)

۲- وجود ارتباط بین گرید های بافت شناسی کارسینوم موکواپیدرموئید غدد بزاقی با بروز Ki-67 تایید می گردد.
(rs= 0.893,P value = 0.00)

۳- یافته های فوق در بین دو گرید اول (پایین و بینابینی) به هم نزدیک بوده ولی ناگهان در گرید بالا دستخوش تزاید قابل توجهی می گردد.

نتیجه گیری :

می توان هر یک از دو روش فوق را جهت تایید درجه بدخیمی بافت شناسی بیمار مورد استفاده قرار داد و همچنین پیشنهاد می گرددکه بواسطه هم پوشانی نقاط AgNOR در گریدهای پایین و بینابینی و نزدیکی بروز Ki-67 در این دو گرید، این دو گروه را در هم ادغام کرده و کلا برای این بدخیمی دو گروه درجه بدخیمی پایین و درجه بدخیمی بالا را فرض کرد.

کلید واژه ها :

ایمنوهیستوشیمی Ki-67، رنگ آمیزی AgNOR، کارسینوم موکواپیدرموئید

*مولف مسئول ، آدرس : مشهد، دانشکده دندانپزشکی، بخش پاتولوژی دهان، فک و صورت، تلفن ۱۷ – ۸۸۲۹۵۰۱ - ۰۵۱۱

Evaluation of Ki- 67 experssion and AgNOR counts in Mucoepidermoid carcinoma of salivary gland

Salehinezhad J,* DDS
Assistant Professor, Dept. of Oral & Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Mashhad University of Medical Sciences , Mashhad , Iran.
Ghafarzadegan K,
Assistant Professor, Ghaem Hospital Dept. of Pathology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences , Mashhad , Iran.
Saghravanian N,
Assistant Professor, Dept. of Oral & Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Mashhad University of Medical Sciences , Mashhad , Iran.
Mohtasham N,
Assistant Professor, Dept. of Oral & Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Mashhad University of Medical Sciences , Mashhad , Iran.

Abstract

Introduction:
Mucoepidermoid carcinoma is the most common salivary gland malignancies, classified into three categories as low, intermediate and high.
Because of its highly variable biologic potential, identification of patient's status histologically and proper classification is of high importance in treatment and finally prognosis.
Materials and Methods:
20 samples with the diagnosis of MEC were selected from the archive of the oromaxillofacial pathology department of Mashhad dental school and Ghaem and Omid hospitals which included five samples of grade I, seven samples of grade II and 8 samples of grade III mucoepidermoid carcinoma.
Three sections were taken from each specimen. The first section was stained with H & E, the second one by AgNOR technique and the last one with Ki-67 immunohistochemically.
In each sample, the number of AgNOR dots in the nuclei of 100 cells and the number of brown nuclei which expressed Ki-67 in 100 cells were studied.
Results:
1. There was a significant correlation between salivary gland MEC histological grades and number of AgNOR dots. (rs=0.791 , P value=0.00)
2. A significant correlation was detected between salivary gland MEC histological grades and ki-67 expression. (rs=0.893 , P value=0.00)
3. The findings in our study (AgNOR dots & ki-67 expression) were slightly different between grades I and II but the difference between the first two grades and the last grade was highly significant.
Conclusion:
Use of any of the two proliferating markers mentioned above (AgNOR and Ki-67) is suitable in detection of histological grades of salivary gland MEC. Considering the highly significant difference between the last grade and the first two grades, MEC classification as low grade and high grade is suggested.
Key words:
Ki-67 Immunohistochemistry, AgNOR staining, mucoepidermoid carcinoma.

* Corresponding Author

مقدمه :

موکـــواپی درموئیـــد کارســـینوما یکـــی از شـــایعترین بدخیمی های غدد بزاقی است. بخاطر وجود تفـاوت فـراوان در رفتارهـای بیولوژیـک، آنـرا قـبلاً موکـواپی درموئیـد تومـور می نامیدند، که این بیانگر نمای هیستولوژیک بدخیم تومـور از یکسو و رفتار نسبتاً خوش خیم با پیش آگهی مطلـوب از سـوی دیگـر مـی باشـد. اگـر چـه قـبلاً آنـرا یـک بـدخیمی بـا درجـهٔ پائین(Low Grade) می پنداشتند، اما از آنجا که برخی اوقـات رفتـار نسـبتاً بـدخیمی را نشـان مـی دهـد، لـذا اصـطلاح موکو اپی درموئید کارسینوما برای آن بهتر است[۱].

با توجه به آنچه گفته شد، تشخیص دقیق وضـعیت بیمـار از نظر بافتی و قرار دادن وی در یکی از گروههـای مـورد نظـر از دیـد تـوان بـدخیمی از اهمیـت ویـژه ای در درمـان و نهایتـاً پیش آگهی برخوردار است.

در این مطالعه سعی شـده اسـت بـا انجـام روشـهای نـوین رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی و تلفیق آن با رنگ آمیزی هـای هیستوشـیمیایی بـه تشـخیص هـر چـه سـریعتر و دقیقتـر ضـایعه دست یافته شود، چرا که اساس هـر رشـد نئوپلاسـتیک، فقـدان پاسخ طبیعی به کنترل رشد است و رشد تومورال براساس تکثیر سلولی استوار است و بخصوص وقتی این تکثیر از نـوع بـدخیم هم باشد، بدیهی است که حضور بیشتر سلولهای فعال و در حال تقسیم قابل پیش بینی است[۲].

اگرچـــه بـــرای ضـــایعه موکـــواپی درموئیدکارســـینوما تقسیم بندی هایی از نظر بافتی برمبنای معیارهای خاصی ازجمله ایجـاد فضـاهای کیسـتیک، غلبـه سلولی(موکوسـی – بینـابینی– اپیدرموئید) وتغییرات بدخیمی هسته ای وسلولی انجام گردیـده است[۱و۳]، ولی گاهی اوقات هم پوشانی این معیارها از تشخیص دقیق وضعیت بافتی بعلت تنوع سـلولی ممانعـت بعمـل آورده و روشهای دیگر برای دستیابی به این مهم مورد نیاز می باشد.

در این مطالعه ما با بررسی مارکر Ki-67 از نظر ایمنوهیستوشیمیایی و ارزیابی کمی نقاط AgNOR از دید هیستوشیمیایی که هر دو نشانگری برای میزان پرولیفراسیون سلولی هستند[۴] به ارزیابی چرخه سلولی و نهایتاً میتوز از نظر تعداد یا مورفولوژی آن پرداختیم، که از عوامل مهم تشخیص بدخیمی ها میباشند. البته این شمارشها بطور معمول با مشکلاتی همراه است، لذا در صدد بر آمدیم که با تشخیصی دقیق، راه سریعتر، بهتر و مقرون به صرفه تر را جهت ارزیابی شاخصهای بافتی کارسینوم موکواپی درموئید غدد بزاقی بدست آورده و از این منظر گامی هر چند ناچیز در جهت بهبود بیماران برداریم.

مواد و روش ها :

تعداد ۲۰ نمونه با تشخیص قبلی موکو اپی درموئید کارسینوما از بایگانی بخش آسیب شناسی دانشکده دندانپزشکی، بیمارستان قائم و بیمارستان امید مشهد جمع آوری گردید که ۵ نمونه آن با درجه بدخیمی پایین، ۷ نمونه درجه بدخیمی متوسط و ۸ نمونه درجه بدخیمی بالا را داشته است سپس از هر یک از بلوکهای پارافینی مورد نظر، سه برش ٤ میکرونی مجدداً تهیه گشته و تحت رنگ آمیزی های H & E ، AgNOR و Ki-67 قرار گرفتند. هر یک از لامهای H & E بطور جداگانه توسط دو پاتولوژیست مورد بازبینی و تعیین درجه بدخیمی (Grading) مجدد قرار گرفتند. در خاتمه نیز به کمک آزمون آماری ضریب همبستگی رتبه ای اسپیرمن ارتباط واضحی بین گریدهای بافتی مذکور و نقاط AgNOR و میزان بروز Ki-67 دیده شد که نتایج بدست آمده در بخش یافته ها ارائه گردیده است.

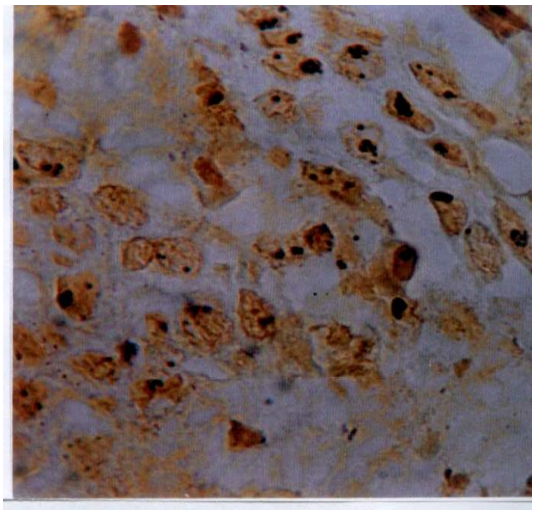
روش رنگ آمیزی AgNOR :

اول برشهای بافتی به ضخامت ٤ میکرون از بلوکهای پارافینی تهیه می کنیم. این لامها را در گزیلن دپارافینه کرده و سپس توسط محلول اتانل و آب مقطر هیدراته می کنیم. محلولهای رنگ آمیزی AgNOR تازه تهیه شده را برروی لامها ریخته و لامها را بمدت ٤٠ دقیقه در دمای ۳۷^{oc} انکوبه می کنیم.

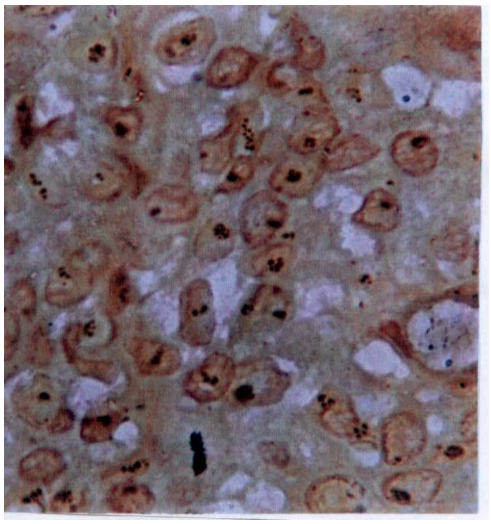
نهایتاً لامها را با آب مقطر شستشو داده و بدنبال آن به ترتیب در الکل ۷۰٪ و ۹۶٪ مطلق هر یک به مدت ۲ دقیقه تحت آبگیری قرار داده و در هوا خشک می کنیم.

روش ارزیابی نتایج رنگ آمیزی AgNOR :

پس از رنگ آمیزی نقاط NOR بصورت نقاط سیاه مشخص درون هسته قابل روئیت می‌شوند و هسته ها نیز رنگ قهوه ای روشن را به خود می گیرند. اسلاید ها توسط میکروسکوپ نوری با درشتنمائی ۱۰۰۰ برابر و با استفاده از روغن ایمرسیون تحت مطالعه قرار گرفتند. لازم به ذکر است که برای تمامی گروهها از نمونه های مورد مطالعه بطور جداگانه میانگین شمارش AgNOR، دامنه شمارش AgNOR و متوسط درصد سلولهای با ۳ نقطه و ۵ نقطه و بیشتر تعیین گردید.



تصویر ۱- ۱: نقاط AgNOR در انواع با گرید کم



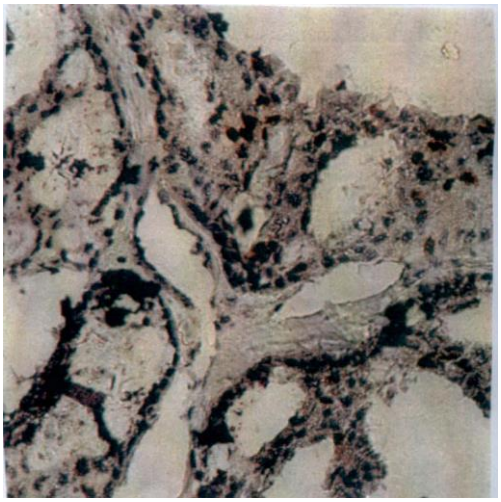
تصویر ۲-۱: نقاط AgNOR با گرید بالا

روش رنگ آمیزی Ki-67 :

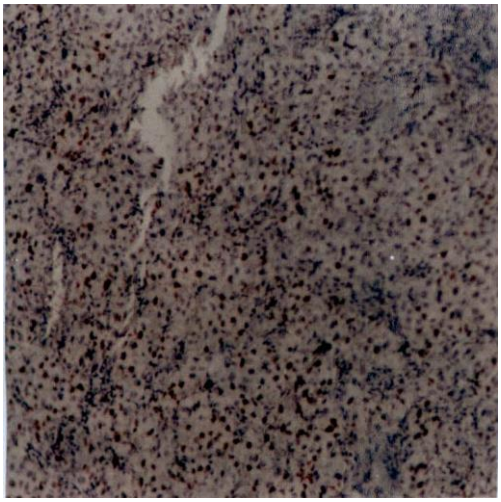
پس از برش بلوکهای پارافینی به ضخامت ۵-۳ میکرون آنها را بمدت ۲٤ ساعت در حرارت اتاق قرار می دهیم و سپس مراحل رنگ آمیزی را به ترتیب زیر براساس دستورالعمل کارخانه سازنده (DAKO Corporation) انجام می دهیم. ابتدا لام را دپارافینه کرده و جهت بازیافت آنتی ژنی در محلول سیترات در مایکروفر قرار می دهیم و پس از آن به ترتیب محلولهای بلوک کننده پراکسید از اندوژن، آنتی بادی اولیه، محلول Link، استرپتواویدین، کروموژن و هماتوکسیلین، پس از شستشوی محلول های قبلی با آب مقطر طی ۲ دقیقه در بین مراحل، به لام مورد نظر می افزائیم. لازم به ذکر است که آنتی بادی مورد استفاده Anti Ki-67 می‌باشد. (Rabit antihuman, Ki-67, Clone MIB-1, N 1574).

روش ارزیابی نتایج رنگ آمیزی Ki-67 :

اسلاید های تهیه شده با میکروسکوپ نوری با درشت نمایی ۱۰۰× ۱۰ و ٤٠ × ۱۰تحت مطالعه قرار گرفته و هسته های قهوه ای رنگ شده بطور میانگین در یکصد سلول شمارش گردیده و عدد آن بعنوان درصد فعالیت پرولیفراسیون نمونه مربوطه لحاظ گشت.



تصویر ۱-۲ : بروز Ki-67 در انواع با گرید کم



تصویر ۲- ۲ : بروز Ki-67 در انواع با گرید بالا

یافته ها :

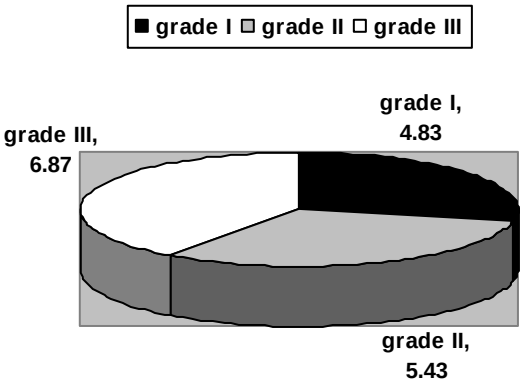
نتایج AgNOR :

پس از شمارش نقاط AgNOR در یکصد سلول از هر نمونه، میانگین نقاط بدست آمده در ۲۰ نمونه (٥/٠٤) بوده است که در این بین از یافته های دیگر می توان به تعداد سلولهایی که سه یا بیشتر نقطه داشته اند (٨٥/٢٪) و تعداد سلولهایی که پنج یا بیشتر نقطه را نشان می داده اند (٦٣/٩٪) اشاره کرد.

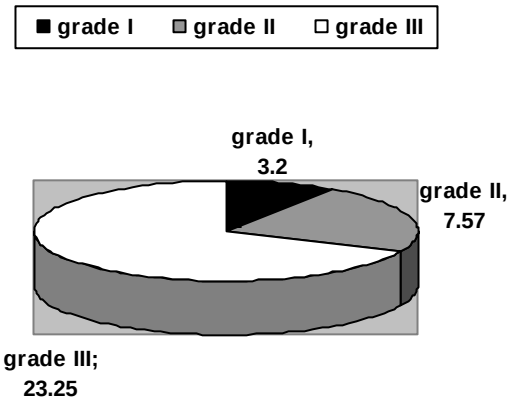
بهرحال پس از شمارش نقاط AgNOR، به کمک آزمون های آماری ضریب همبستگی رتبه ای اسپیرمن(Spearman) معلوم گشت که ارتباط واضحی بین گریدهای بافتی کارسینوم موکواپی درموئید و نقاط AgNOR وجود دارد زیرا نه تنها rs = ۰/۷۹۱ بوده بلکه با توجه به P= 0.00 وجود ارتباط تأئید می گردد.

جدول ۱ : ارتباط نقاط AgNOR با گرید بافتی در کارسینوم موکواپی در موئید غدد بزاقی

	گرید بافتی	تعداد	میانگین نقاط	بازه اطمینان ۹۵٪
AgNOR	I	٥	٤/٨٣	٣/٧١-٥/٩٥
	II	٧	٥/٤٣	٥/٠٢ – ٥/٨٤
	III	٨	٦/٨٧	٦/٣٩ -٧/٥٩
	مجموع	٢٠	٥/٧١	٦/٣٩-٥/٣٢



نمودار ۱ : درصد نقاط AgNOR



نمودار ۲ : درصد بروز Ki-67

نتایج Ki-67 :

میزان رنگ پذیری در نمونه ها از ۳۵-۱٪ متغیر بود، که با مراجعه به گرید در می یابیم که در پنج نمونه گرید پائین این اندکس ٦-۱٪ و در ۷ نمونه گرید بینابینی بروز ۱۵-۱٪ و انواع (۸ نمونه) گرید بالا بیانی مثبت بین ۳۵-۱۹٪ داشته اند.

میانگین درصد سلولهای مثبت از نظر Ki-67 در ۲۰ نمونه مذکور = ۱۲/۷٪ می باشد. و با مراجعه مجدد به آزمونهای فوق در می یابیم که ارتباط مشخصی بین انواع گریدهای بافتی کارسینوم موکواپی درموئید غدد بزاقی با میزان بروز Ki-67 وجود دارد، زیرا ضریب همبستگی اسپیرمن ۰/۸۹۳ = rs و P.value = 0.00 می باشد.

جدول ۲: ارتباط Ki67 با گریدبافتی در کارسینوم موکواپی درموئید غدد بزاقی

	گرید بافتی	تعداد	درصد مثبت بودن	بازه اطمینان ٪۹۵
Ki- 67	I	۵	۳/۲۰	۰/۵۰-۵/۸۹
	II	۷	۷/۵۷	۳/٦۸-۱۱/۵
	III	۸	۲۳/۲۵	۱۸/۰٤-۲۸/۵
	مجموع	۲۰	۱۲/۷۵	۸/۰٤-۱۷/۵

بحث :

روش AgNOR روش نوینی است که اول بار توسط Plonton و همکارانش ارایه گشت[۵] و در سالهای اخیر برای تعیین فعالیت تکثیری سلولهای نئوپلازیک در بافتهای مختلف مورد استفاده قرار گرفته است و مزایایی از جمله آسان و قابل اعتماد بودن و توانایی استفاده از بلوکهای پارافینی را نیز داراست. با توجه به یافته های این مطالعه، می توان اشاره داشت که نتایج حاصله را از یک سو با مطالعات پایه در مورد AgNOR که مؤید شمارش بیشتر آن در سلولهای نئوپلازیک می باشد هم خوانی دارد[٦و ۷]، و هم از سوی دیگر با یافته های قبلی در مورد تفاوت معنی دار بین تعداد نقاط AgNOR غده بزاقی طبیعی، آدنوم این غده و کارسینوم های غده بزاقی نیز هماهنگی کامل دارد[۸و۹].

ولی بهرحال در این مطالعه دیده شد که تفاوت نقاط بین گریدهای یک و دو آن چنان قابل توجه نیست و با نزدیک شدن به گرید سه(High grade) تعداد سلولهای اپی درموئید و فعالیت پرولیفراسیون دستخوش تزاید می گردد.

یافته های این مطالعه را می توان جهت مقاصد تعیین پیش آگهی نیز بکار برد، زیرا گرید بالاتر با شمارش بیشتر همراه است و از این نظر با نتایج بدست آمده در مطالعه تعیین

پیش اگهی که برای S.C.C های دهانی با گرید بالا و پائین انجام گردید است مطابقت دارد[۱۰].

از طرفی دیگر با توجه به اینکه با افزایش گرید شمارش نقاط هم افزایش می یابد و در نظر گرفتن معیارهای بافتی گریدهای بالا که می گوید جزایر سلولهای سنگفرشی اپی درموئید در این مواقع افزایش می یابند می توان به نتیجه حاصله در مطالعه بررسی AgNOR در پلئومورفیک آدنوما اشاره کرد که در آن مطالعه نیز دیده شد که در جزایر توپر میزان AgNOR از سلولهای پراکنده در استروما بیشتر می باشد و لذا کاهش در توانایی تکثیر همراه با تشکیل ماتریکس خارج سلولی می باشد[۱۱].

در مطالعه ای دیگر که با استفاده از AgNOR جهت تعیین پیش آگهی تومور غدد بزاقی انجام گردیده است دیده شده بود که تعداد متوسط این نقاط در کارسینوم بیشتر از آدنوم است و حالا ما با بررسی این نقاط دریک کارسینوم با گریدهای مختلف، شاهد افزایش تعداد متوسط نقاط با افزایش گرید بافتی تومورهستیم و لذا می توان نتایج این مطالعه را با وضعیت گرید بافتی تومور نیز ربط داد[۱۲].

آنتی بادی Ki67 در اصل آنتی ژن های هسته ای وابسته به تکثیر سلول انسانی را که در فازهای G1 و S و G2 و M فعال بوده رنگ کرده و هسته های واقع در فاز استراحت G0 را رنگ نمی کند. باید دانست که میزان آن در طی فازهای S و G2 افزایش یافته و پس از میتوز تخریب می گردند[۱۳].

نکته جالب در مطالعه ما بروز اندک Ki-67 در برخی نمونه ها بود بطوریکه این بروز در برخی از گریدهای یک و دو حدود یک درصد بود و در گرید یک از ۵٪ و در گرید دو از ۱۵٪ بیشتر نشد. اما در مطالعات دیگر مثلاً در مطالعه ای که از HER 2/Neu و Ki-67 بعنوان شاخص پیش آگهی در رابطه با موکواپی درموئید کارسینوم غدد بزاقی استفاده شده نیز مشاهده گشت که رنگ آمیزی مثبت برای HER 2/Neu و مثبت قوی برای Ki-67 در انواع گرید بالا تومور دیده می شود، حال آنکه انواع گرید پایین یا اصلاً از نظر رنگ آمیزی منفی بودند و یا رنگ پذیری ضعیفی داشته اند[۱۴].

و همچنین در بررسی ایمنوهیستوشیمی لنفوم بورکیت دیده می شود که تقریباً تمامی سلولها واقع در سیکل سلولی از نظر Ki-67 مثبت هستند و این مطلب آنقدر جالب توجه است که یک معیار تشخیصی برای تومور منظور می گردد[۳].

این اختلاف بروز در مطالعه ای دیگر در رابطه با موکواپی درموئیدکارسینوم غدد بزاقی بچه ها نیز صادق است[۱۵] بطوریکه در این مطالعه دیده شده میزان بروز برای گریدهای کم و متوسط و بالا به ترتیب ۷٪ – ۱۲٪ و ۲۶٪ است که با یافته های مطالعه حاضر (این مقادیر به ترتیب ۳/۲ – ۷/٤٪ و ۲۲٪ می باشد) تقریباً هماهنگی دارد.

اما اختلاف وسیع بین میزان بروز Ki-67 از ۱۵–۱٪ در دو گرید اولیه نشان دهنده دامنه وسیع این تغییرات در مطالعه حاضر است که شاید بروز همین عامل سبب شده که در یک مطالعه مشابه که از شاخصهایی از قبیل Ki-67 جهت بررسی پیش آگهی موکواپی درموئید کارسینومای غدد بزاقی فرعی استفاده گردیده، دیده شده است که بروز Ki-67 را نمی توان بعنوان یک عامل خطر مستقل به اندازه دیگر نشانگر های مورد مطالعه در آن تحقیق با اهمیت دانست[۱۶].

نتیجه گیری :

با توجه به یافته های این مطالعه می توان نتیجه گیری کرد که همچنانکه گرید بافتی در کارسینوم موکواپی درموئید افزایش می یابد میزان نقاط شمارش شده هستکی AgNOR نیز افزایش یافته و همچنین مقدار Ki67 نیز قوی تر می گردد. البته از این نظر اختلاف چندانی بین دو گروه اولیه گرید متوسط و کم نیست ولی این مقادیر با رسیدن به گرید بالاتر دچار افزایش قابل توجهی می گردد.

با توجه به ارتباط مستقیم هر دو روش رنگ آمیزی با افزایش درجه بد خیمی (گرید) در این کارسینوم نمی توان برتری نسبی خاصی بین این دو روش قایل گردید و حتی در

شرایطی می توان ایندو را مکمل دانست کما اینکه این ارتباط در مطالعات دیگر نیز که از این روشها سود جسته اند نیز صدق می کند[۱۷و۱۸و۱۹].

در خاتمه بنظر می رسد، با توجه به هم پوشانی مقادیر AgNOR در گریدهای متوسط و کم و اختلاف اندک میزان بروز Ki-67 در این دو گروه، تقسیم بندی موکواپی درموئید کارسینوما به انواع گرید بالا و پایین از نظر گرید بافتی جهت تعیین پیش اگهی و انتخاب مراحل درمان بهتر باشد.

تشکر و قدردانی:
از حمایت مادی و معنوی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه سرکار خانم دکتر فضلی بزاز در انجام این طرح پژوهشی قدردانی می گردد.

****

منابع :

1. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Oral & Maxillofacial pathology. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 2002. P. 406.

2. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Basic Pathology. 7th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 2003. P. 144.

3. Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan Rck. Orad pathology-clinical pathologic correlation. 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 2003. P. 203, 268, 333, 409.

4. Eissa S, Tumor Marker, 2nd ed, London: Champon & Hall; 1998. P. 131.

5. Plonton D, Menager M, Jeannesson P, et al. Improvement in the staining and invisualization of the argyrophilic proteins of the nuclear organizer regions at the optical level. Histochem J 1986; 8: 5-14.

6. Ishii K, Nakajimia T. Evaluation of malignant grade of salivary gland tumors Study by cytofleuometric nuclear DNA analysis, histochemistry for NOR and immunuhistochemistry for P53. Pathol Int 1994; 4: 287-96.

7. Takahashi H, Fujita S, Cheng J. NORs in lymphoproliferative disorder of the human salivary gland. Annal cell pathol 1994 ; 6: 51-63.

8. Mehrotra A, Goel MM, Singh K. Ki67 and AgNOR proliferation, Markers as diagnostic adjuncts to fine aspiration cytology of thyroid follicular lesions. Annal Quant Cyto Hystol 2002; 24: 205-11.

9. Deren ZM, Pession A. The quantity of nucleolar silver stained proteins is related to proliferating activity in cancer. Labin Vest 1990; 63: 137-140.

10. Sono K, Takaheshi H, Fujita S. Prognostic implication of silver binding 2: nuclear organizer regions in oral SCC. J Oral Pathol Med 1991; 1: 53-5.

11. Fajita S, Takahashi H, Okabe H. Proliferation activity in normal salivary gland and pleomorphic adenoma a study by AgNOR staining. Acta. Pathol JPN 1992; 8: 573-78.

12. Epivatianos A, Trigonidis G. Salivary gland tumors studied by means of AgNOR technique. Ann Dent 1994; 53 : 21-5.

13. Rosai J. Ackerman's Surgical pathology. 8th ed. St. Louis: Mosby; 1996. P. 29.

14. Nguyen LH, Black M, Hier M. HER2/neu and Ki67 as pragnostic indicators in mucoepidermoid carcinoma of salivary glands. Otolaryngol 2003 ; 32: 328-31.

15. Hicks J, Flaitz C. Mucoepidermoid carcinoma of salivary glands in children and adolescent: assessment of proliferation markers. Oral Onchol 2000; 36: 454-60.

16. Inagaki H, Muroset T. Prognostic significance of P27 and Ki67 expression in mucoepidermoid carcinoma of the intraoral minor salivary gland. J Oral Pathol Med 2001; 14: 1008-14.

17. Ozdemir BH, Sertecelik A. The prognostic importance of ignoye Ki-67 and PCNA in primary non-orachal Bladder Adeno Carcinoma. J Oral Pathol Med 2001; 6: 427-34.

18. Allison RT. Best T. P53, PCNA and Ki67 expression in oral SCC, the vagaries of Fixation and microware enhancement of Immunohistochemistry. J Oral Pathol Med 1998; 9: 434-39.