

IWONA URBANOWICZ, JOLANTA STACHERZAK-PAWLIK, MIECZYSLAW WOŹNIAK

AgNOR w rozrostach układu chłonnego

AgNORs in Lymphoproliferative Disorders

Katedra i Zakład Analityki Medycznej AM we Wrocławiu

Streszczenie

Region organizujący jąderko (NOR) jest segmentem chromosomowym, w którym znajdują się geny dla głównych rybosomowych RNA u ssaków. Technika barwienia amoniakalnym srebrem stała się najbardziej powszechną metodą wykrywania miejsc chromosomowych zawierających regiony organizatorów jąderkowych i swoistych białek zasocjowanych z genami dla rRNA. Wybarwione srebrem NOR określa się jako AgNOR. Szczególne zainteresowanie wzbudza występowanie i zmiany ekspresji AgNOR w chorobach nowotworowych. Dane z piśmiennictwa wskazują, że AgNOR może być niezależnym czynnikiem prognostycznym w patologii układu chłonnego (**Adv Clin Exp Med 2005, 14, 6, 1225–1235**).

Słowa kluczowe: regiony organizujące jąderko wybarwione srebrem, choroby nowotworowe układu chłonnego.

Abstract

Nucleolar organizer regions (NORs) are chromosomal segments, which contain ribosomal genes. The NORs are defined as nucleolar components containing a set of argyrophilic proteins, which are selectively stained by silver methods. The NORs stained by silver are called "AgNORs". The importance of analysis of AgNORs for prognostic purposes in tumor pathology has been reviewed. Current available data from the literature demonstrate that the evolution of the quantity of AgNORs is an independent prognostic factor in lymphoproliferative disorders (**Adv Clin Exp Med 2005, 14, 6, 1225–1235**).

Key words: silver-stained nucleolar organizer regions, lymphoproliferative disorders.

Homeostaza wielokomórkowego organizmu jest regulowana za pomocą procesu wzrostu (namnażania i odnawiania) komórek, ich różnicowania i śmierci. Poznanie czynników regulujących aktywność podziałową komórki jest obecnie przedmiotem zainteresowania współczesnej biologii oraz nauk medycznych.

Od kilkunastu lat naukowcy koncentrują się na badaniu ultrastruktur komórkowych, do których należy m.in. jąderko tworzone przez region organizujący jąderko NOR (*nucleolar organizer region*).

Regiony organizujące jąderko – NOR

Jądro komórki eukariotycznej jest dynamiczną strukturą zawierającą kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA), histony i różne białka jąderkowe, które

uczestniczą w procesach: tworzenia „rusztowania” dla kompleksów DNA, w transkrypcji DNA oraz jego replikacji. Wewnątrz jądra znajduje się struktura znana jako jąderko, wewnątrz którego występują pętle DNA i duże skupiska genów dla rybosomalnego kwasu rybonukleinowego (RNA). W jąderku wyróżnia się osiem strukturalnych komponentów: 1) centra fibrylarne – FC, 2) gęsty składnik fibrylarny – DFC, 3) składnik granularny – GC, 4) wakuole (szpary lub rozstępy) jąderkowe – NI, 5) chromatynę zasocjowaną z jąderkiem – NAC, 6) nukleolonemę, 7) regiony organizujące jąderko – NOR, 8) macierz jąderkową [1]. W jąderku zachodzą procesy transkrypcji rRNA na matrycy rybosomalnego DNA przez polimerazę klasy I, pakowanie rRNA w kompleksy rybonukleinowe. Wielkość jąderka jest odbiciem aktywności komórkowej przejawiającej się intensywnością syntezy białek. Jest jedną z najmniej stabilnych orga-

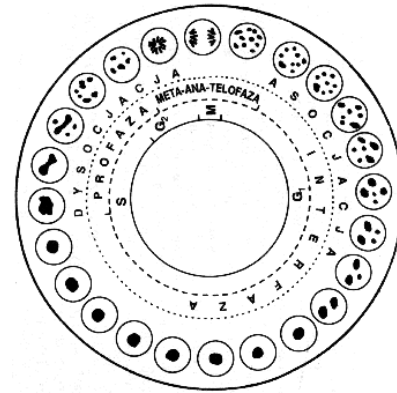
nelli komórkowych, której morfologia i ultrastruktura zmienia się wraz z gatunkiem, typem komórki, stopniem jej zróżnicowania oraz cyklem komórkowym, reagując błyskawicznie w odpowiedzi na różne stany fizjologiczne i patologiczne. Ostateczna liczba jąderek zależy od fazy cyklu komórkowego (największa na początku fazy G1), a nawet od płci osobnika, np. większa u kobiet (4 lub 5) niż u mężczyzny (3 lub 4). Jąderka wykazują silne powinowactwo do metali ciężkich, stosunkowo duże ich ilości (Ca, Zn, Cu, Mn, Cr) zostały odnalezione w tych organellach w komórkach prawidłowych i nowotworowych. Jąderka mają szczególne powinowactwo do jonów srebra, które barwią obszar NOR.

Regiony organizujące jąderko – NOR zostały po raz pierwszy opisane przez Heitza (1931 r.) i McClintock (1934 r.) jako słabo wybarwione regiony chromatyny, dookoła których pod koniec telofazy są odnawiane jąderka, po ich uprzednim zniknięciu w czasie mitozy komórki [2].

Region organizujący jąderko jest segmentem chromosomowym, w którym znajdują się geny dla głównych rybosomowych RNA u ssaków. Jest zasocjowany z formowaniem jąderka oraz identyfikowany jako wtórne przewężenie widoczne podczas mitozy na ramieniu chromosomu metafazowego w postaci regionu zwężonego lub o mniejszej gęstości elektronowej. Region ten zawiera pętle rDNA, w których geny dla rRNA są transkrybowane w szybkim tempie przez polimerazę RNA klasy I [1, 3, 4]. U człowieka NOR są umiejscowione na krótkich ramionach pięciu akrocentrycznych chromosomów 13–15, 21, 22 [4, 5].

Swoista grupa kwaśnych, silnie srebrochłonnych, niehistonowych kompleksów białkowych umiejscowionych w tych samych miejscach co NOR pozwala na dokładne i szybkie uwidocznienie regionów organizujących jąderko przez barwienie azotanem srebra [2, 4–6]. Wybarwione srebrem NOR określa się jako AgNOR, a srebrochłonne białka NOR jako białka AgNOR [2, 4].

Podczas interfazy chromatyna regionu NOR zostaje zagubiona w obrębie masy jąderkowej. W tym stadium chromatyna występuje prawdopodobnie w stanie bardzo rozciągniętym, który utrzymuje się do profazy. Ponownie staje się widoczna w chromosomach metafazowych. Jąderkowa chromatyna ma swoje cykle kondensacji i dekondukcji: w okresie interfazy jest rozproszona w jąderku, tworząc gęsty składnik jąderkowy, ale w chromosomach mitotycznych występuje w stanie skondensowanym w obszarze przewężenia wtórnego (NOR). Rezultatem tak dużej aktywności chromatyny regionu NOR są cykliczne zmiany w kształcie i objętości jąderek w różnych stadiach cyklu komórkowego, co sprawia, że



Ryc. 1. Jąderko a cykl komórkowy [1]

Fig. 1. Nucleolus and cell cycle [1]

organelle te uważa się za niezwykle dynamiczne (ryc. 1) [1].

Nie wykazano ilościowego związku między zawartością NOR w metafazie i interfazie: jedno NOR w metafazie może być przekształcone w kilka NOR w interfazie i odwrotnie, kilka metafazalnych NOR może być gromadzonych w jedno NOR interfazalne. Interfazalne NOR jest strukturalno-funkcjonalną jednostką odpowiedzialną za syntezę rRNA. Wszystkie składniki potrzebne do rybosomalnej transkrypcji są umiejscowione wewnątrz granic interfazalnego NOR. Fundamentalnymi składnikami interfazalnego NOR są białka AgNOR, należą do nich: nukleolina, białko B23, podjednostki polimerazy RNA klasy I i UBF (tab.1). Synteza rRNA nie jest możliwa bez obecności tych białek. Liczba i wielkość interfazalnych NOR są bardzo zróżnicowane wewnątrz jąderka, zgodnie z aktywnością transkrypcyjną RNA. Jąderka komórek o bardzo małej aktywności proliferacyjnej (np. w limfocytach spoczynkowych) charakteryzują się dużym pojedynczym NOR, podczas gdy jąderka komórek aktywnych (np. stymulowanych limfocytów) wykazują dużą liczbę małych interfazalnych NOR [2].

Proliferyjące komórki wytwarzają rybosomalne komponenty dla komórek potomnych, a to wiąże się ze skróceniem czasu trwania cyklu podziałowego i zwiększeniem syntezy rybosomów w jednostce czasu. Ekspresja białek AgNOR jest związana z fazami cyklu komórkowego: mała ekspresja występuje w fazie G1, większa w fazie S i G2 cyklu komórkowego [7]. Wykazano bezpośrednią zależność całkowitej ilości AgNOR w interfazie z aktywnością podziałową komórki. Liczba AgNOR w interfazie jest związana z aktywnością transkrypcyjną rRNA i bezpośrednio odpowiada okresowi podwojenia liczby komórek [2].

Liczba i wielkość AgNOR zależą również od dojrzałości komórki. Komórki mniej dojrzałe zawierają więcej i większe AgNOR w porównaniu

Tabela 1. Charakterystyka niektórych białek jąderkowych [1]**Table 1.** Nucleolar proteins characteristic [1]

Białko – symbol (Protein – symbol)	Pochodzenie (Origin)	Umiejscowienie Jąderko (Nucleolar – localization)	Mitoza (Mitosis)	Funkcja (Function)
Polimeraza klasy I	wątrobiak Morrisa	FC i DC	NOR	transkrypcja rDNA
B23-numatryna (B23-numatrin)	wątrobiak Novikoffa, limfocyty prawidłowe i nowotworowe	DFC i GC	rozproszenie w CP	dojrzwianie rRNP, regulacja komórkowej mitogenezy
C23-nukleolina (C23-nucleolin)	wątrobiak Novikoffa	FC i DFC	NOR	aktywacja transkrypcji rDNA, pakowanie pre-RNA, montowanie rybosomów
Fibrylaryna	komórki HeLa	DFC		dojrzwianie pre-RNA
Rybocharyna (Ribocharin)	komórki HeLa	GC i NP	powierzchnia chromosomów	dojrzwianie podjednostek 60S i transport ją- drowo-cytoplazma- tyczny
Białko S1 (Protein S1)	komórki HeLa	GC i CP	powierzchnia chromosomów	struktura podjednostek 40S
180 kDa (Protein 180 kDa)	<i>X. laevis</i> , <i>X. borealis</i> (oocyty, komórki somatyczne)	DFC	rozproszenie w CP	strukturalna podpora w transkrypcji rDNA i dojrzwianie jej pro- duktów
145 kDa (Protein 145 kDa)	<i>X. laevis</i> (oocyty, komórki somatyczne)	strefa korowa jąderka	rozproszenie w CP	magazynowanie pre-rRNP i transport jądrowo-cytoplazma- tyczny

z komórkami bardziej dojrzałymi (mieloblasty zawierają więcej AgNOR niż promielocyty) [8].

NOR – metody badania

Metoda dokładnej i szybkiej detekcji NOR jest związana z barwieniem azotanem srebra silnie srebrochłonnych, niehistonowych kompleksów białkowych, zlokalizowanych w tych samych miejscach co NOR [2, 6]. Białka te są bądź silnie ufosforylowane, bądź wzbogacone w grupy sulfhydrylowe i dwusiarczkowe, co tłumaczy ich srebrochłonność [9]. Stosując metodę barwienia azotanem srebra interfazalne NOR mogą być uwidaczniane zarówno w mikroskopie świetlnym, jak i elektronowym – występują jako czarne kropki wewnątrz jądra [5, 10, 11]. Zasadniczo wyróżnia się trzy główne typy konfiguracji AgNOR w komórkach prawidłowych i nowotworowych:

– pierwszy typ konfiguracji to w pełni zagregowane AgNOR, tworzące pojedynczą, okrągłą, srebrochłoną strukturę (ryc. 2). Tę konfigurację często obserwuje się w limfocytach spoczynkowych,

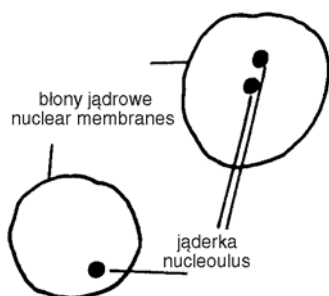
– drugi typ często obserwowany w komórkach

proliferyjących to AgNOR wyraźnie rozmieszczone wewnątrz jąderka (ryc. 3),

– trzeci typ stanowią małe AgNOR rozrzucone w karioplazmie, często obserwowane w komórkach bardzo złośliwych (ryc. 4) [10].

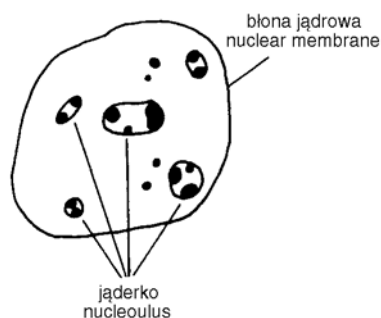
Pierwsza metoda zastosowana do uwidaczniania białek AgNOR składała się z dwóch faz: fazy impregnacji za pomocą azotanu srebra i fazy wywołania z zastosowaniem czynnika redukującego, np. amoniaku. Metodę tę zaproponowali w 1975 r. Goodpasture i Bloom. W 1980 r. Howell i Black przedstawili metodę barwienia srebrem, w której impregnacja i wywołanie były prowadzone jednocześnie. Zalecali barwienie srebrem w 70°C przez dwie minuty. Metodę tę ulepszył w 1986 r. Ploton, obniżając temperaturę i wydłużając czas barwienia. Szczegóły techniki jednostopniowego barwienia srebrem, opisaną przez Plotona przedstawia tabela 2. Niezawodność i swoistość tej metody sprawiły, że jest ona najczęściej stosowaną metodą do uwidaczniania białek AgNOR w rutynowym badaniu cytohistopatologicznym.

Duży wpływ na reakcję barwienia srebrem wywierają takie czynniki, jak: rodzaj użytego utrwalacza, temperatura i czas barwienia [12]. Utrwalacze zawierające etanol są bardziej swoiste



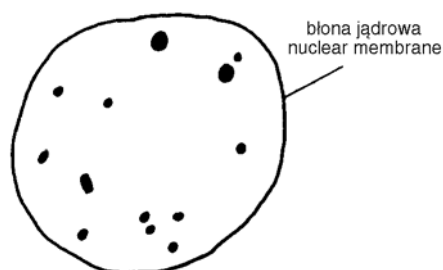
Ryc. 2. Zagregowane NOR, tworzące pojedynczą, okrągłą, srebrochłoną strukturę, np. w spoczywających limfocytach [10]

Fig. 2. The NORs are fully aggregated to form a solitary, rounded argyrophil structure in resting lymphocytes [10]



Ryc. 3. NOR wyraźnie rozmieszczone wewnątrz jąderka [10]

Fig. 3. NORs within the nucleolus [10]



Ryc. 4. Małe NOR rozrzucone w karioplazmie, obserwowane w komórkach bardzo złośliwych [10]

Fig. 4. The distribution of small NORs throughout the nucleoplasm observed in highly malignant cells [10]

niż zawierające formalinę i pozwalają na intensywniejszą wizualizację białek AgNOR. W przypadku utrwalaczy zawierających formalinę wynik reakcji barwienia zależy również od typu zastosowanej formaliny (buforowana czy nie). Utrwalacze zawierające rtęć działają niekorzystnie na proces barwienia, ponieważ jony rtęci konkurują z jonami srebra o miejsce wiążące. Czas utrwalania i stopień penetracji utrwalacza do tkanek również wpływają na reakcję barwienia [12, 13]. Wykazano, że im wyższa temperatura, tym krótszy jest czas potrzebny na wybarwienie NOR. Doniesiono również, że przedłużanie czasu barwienia powoduje, że miejsca, w których zdeponowano jony

Tabela 2. Jednostopniowa technika barwienia srebrem opisana przez Plotona et al. [12]

Table 2. The one-step silver-staining technique as described by Ploton et al. [12]

Jednostopniowa technika barwienia srebrem opisana przez Plotona (The one-step silver-staining technique as described by Ploton et al.)
Przygotowanie próbek (Samples preparation)
Rozmaz cytologiczny: rozmaz komórek, suszenie na powietrzu, utrwalanie w roztworze Carnoya, odwodnienie w szeregu alkoholowym, płukanie w wodzie destylowanej Skrawki histologiczne: przygotowanie skrawków parafinowych o grubości 3–4 μm , odparafinowanie skrawków w ksylenie i odwodnienie w szeregu alkoholowym, płukanie w wodzie destylowanej
Przygotowanie roztworu barwiącego (Preparation of the staining solution)
Potrzebne są dwa roztwory: pierwszy (roztwór A) stanowi 2% roztwór żelatyny rozpuszczonej w wodzie destylowanej, do którego jest dodawany kwas formalinowy, aby uzyskać roztwór 1%. Drugi roztwór (roztwór B) stanowi 50% roztwór azotanu srebra w wodzie destylowanej. Roztwór barwiący uzyskuje się natychmiast po szybkim zmieszaniu jednej objętości roztworu A z dwoma objętościami roztworu B
Barwienie srebrem NOR (Silver-staining of NOR)
Roztwór barwiący (około 0,3 ml) należy natychmiast wylać na każde szkielko mikroskopowe z materiałem biologicznym przygotowanym do barwienia. Barwienie trwa 14–20 min w temperaturze pokojowej. Nie jest konieczna ochrona przed światłem, aczkolwiek lepiej unikać bezpośredniego nasłonecznienia w czasie barwienia. Po zakończeniu barwienia roztwór barwiący powinien być zlany, a preparaty kilkakrotnie płukane wodą destylowaną, następnie umieszczone na 10 min w 5% roztworze tiosulfonowym i ponownie płukane w wodzie destylowanej, osuszone i oprawione

srebra zwiększają swój rozmiar i zlewają się ze sobą, co powoduje wybarwienie sąsiadujących struktur jądrowych w taki sposób, że są one liczone jako jedno AgNOR.

Do ilościowej analizy AgNOR zaproponowano dwie metody. Jedna z nich opiera się na liczeniu w mikroskopie świetlnym każdej wybarwionej srebrem kropki. Jeżeli kropki są tak zagregowane, że nie można ich rozdzielić i policzyć jako pojedyncze AgNOR, to każde takie skupisko kropek należy liczyć jako jedno AgNOR [10, 12]. Zaletą tej metody jest łatwość wykonania i małe koszty, chociaż, jeżeli kropki się pokrywają bądź skupiają w duże agregaty, metoda ta staje się subiektywna i charakteryzuje się małą powtarzalnością wyników. Poza tym metoda ta często nie uwzględnia rozmiaru każdej kropki, co ma szczególne znaczenie w komórkach nowotworowych. W celu omięcia wyżej wymienionych przeszkód opracowa-

no drugą metodę zwaną morfometryczną. Metoda ta polega na automatycznym lub półautomatycznym pomiarze powierzchni zajmowanej przez struktury wybarwione srebrem wewnątrz jądra i na analizie otrzymanego obrazu. Jest szybsza, bardziej dokładna i obiektywna [12, 14].

Nikicicz i Norback zastosowali jednostopniową technikę barwienia srebrem zaproponowaną przez Plotona do uwidocznienia NOR w komórkach prawidłowego szpiku kostnego, a następnie wykorzystali różnice w rozmiarze i kształcie AgNOR do identyfikowania komórek szpiku. AgNOR obserwowane w mikroskopie świetlnym podzielono na dwie grupy, biorąc pod uwagę strukturę AgNOR (kształt i rozmiary), a następnie na cztery podgrupy, uwzględniając ich rozmieszczenie (ryc. 5) [8]. Stosując tego typu klasyfikację AgNOR, wykazano, że komórki niedojrzałe zawierają więcej AgNOR w porównaniu z dojrzałymi, w komórkach niedojrzałych ponadto AgNOR bardzo często ma strukturę zaliczaną do II grupy tworzącej kompleksy. Wraz z dojrzewaniem komórek następuje zmiana konfiguracji AgNOR na coraz prostszą. W komórkach szpiku kostnego, w mieloblastach i promielocytach, obserwowano AgNOR o strukturze zaliczanej do grupy I tworzące kompleksy, w mielocytach natomiast strukturę AgNOR zakwalifikowano do grupy I, ale nie tworzyły one kompleksów tylko złożoną konfigurację. W metamielocytach AgNOR charakteryzowały się prostą konfiguracją. Powyższe obserwacje dowodzą, że kształt i rozmiar AgNOR koreluje z aktywnością transkrypcyjną i proliferacyjną komórek, oraz że każdy typ komórek w szpiku kostnym ma charakterystyczne dla siebie struktury AgNOR. Zastosowanie barwienia srebrem regionów organizujących jąderka w powiązaniu z konwencjonalnymi metodami badania komórek może być dodat-

kowym narzędziem wykorzystanym w różnicowaniu komórek na różnym stopniu ich dojrzałości, różnicowaniu komórek prawidłowych od patologicznych, może znaleźć zastosowanie także do określania rodzaju komórek podlegających transformacji nowotworowej [8].

Oprócz ilościowej histochemicznej analizy AgNOR, są podejmowane badania nad identyfikacją białek AgNOR. Sirri et al. wykryli w ekstraktach jąderek, jąder komórkowych i całych interfazalnych komórek oraz ekstraktach białek wchodzących w skład chromosomów, nukleolinę i białko B23 – dwa główne białka AgNOR, występujące w jąderkach podczas interfazy. W dalszej kolejności wyizolowano białka AgNOR – podjednostki polimerazy klasy I i UBF obecne w czasie mitozy. Badania przeprowadzone na hepatocytach wątroby szczurów pozwoliły zaobserwować, że ekspresja nukleoliny i białka B23 jest ściśle związana z fazami cyklu podziałowego (ryc. 6). Ekspresja nukleoliny wzrasta, kiedy komórka wchodzi w fazę S cyklu komórkowego. Ekspresja białka B23 wzrasta w chwili, gdy zwiększa się odsetek komórek w fazie G2 cyklu podziałowego [7].

AgNOR w patologii nowotworowej

Liczba interfazalnych AgNOR jest bezpośrednio powiązana z aktywnością transkrypcyjną rRNA, a więc również z szybkością proliferacji komórkowej. Ma to szczególne znaczenie w przypadku nowotworów, gdzie od stopnia proliferacji zależy czas podwojenia masy guza [2].

W wielu badaniach wykazano, że AgNOR są doskonałym wskaźnikiem prognostycznym w chorobach nowotworowych. Ilość AgNOR wzrasta

A. Struktura AgNOR

Grupa I

Kropki i skrawki

- regularne kropki: małe, średnie, duże
- nieregularne skrawki

Grupa II

Pęcherzyki

- regularne pęcherzyki: małe, duże
- nieregularne pęcherzyki: małe, duże



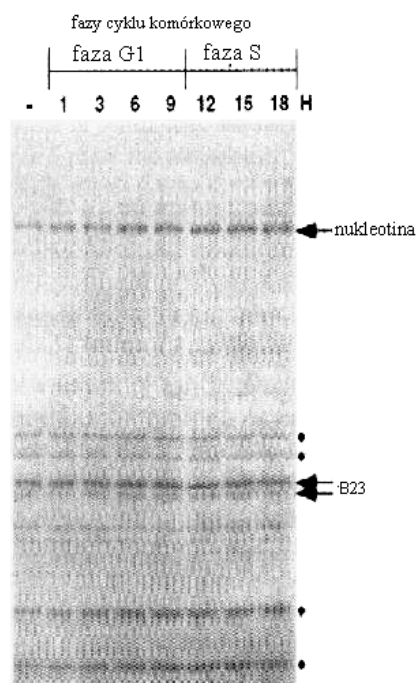
B. Konfiguracja AgNOR

- brak AgNOR, np. w neutrofilu
- AgNOR tworzące prostą konfigurację (obecność AgNOR o jednej strukturze z I lub II grupy), np. w limfocytach i mieloblastach
- AgNOR tworzący złożoną konfigurację (obecność AgNOR w więcej niż jednej strukturze, należące do jednej grupy), np. w promielocycie i polichromatofilnym normoblastie
- AgNOR tworzące kompleks (obecność AgNOR o strukturach należących do obu grup), np. w pronormoblastach



Ryc. 5. Struktury i konfiguracje AgNOR [8]

Fig. 5. AgNOR structures and configurations [8]



Ryc. 6. Ekspresja białek AgNOR: nukleoliny i B23 w hepatocytach szczura [7]

Fig. 6. AgNOR staining of nucleolin and protein B23 in stimulated hepatoma cell line [7]

wraz ze wzrostem biogenezy rybosomalnej, a to wiąże się ze zwiększoną aktywnością metaboliczną komórki 1) w prawidłowych, nieproliferujących komórkach obserwuje się słabą syntezę rRNA, co jest związane z występowaniem kilku interfazalnych AgNOR, podczas gdy wzmożona synteza rRNA koreluje z obecnością wielu AgNOR, 2) AgNOR są umiejscowione na krótkim ramieniu pięciu chromosomów akrocentrycznych, a wzrost liczby tych chromosomów jest często obserwowany w aneuploidalnych guzach, 3) ilość AgNOR jest również związana ze stopniem zróżnicowania histologicznego guza (rak pęcherza i prostaty) [2], 4) ilość AgNOR wykazuje bezpośrednią korelację z parametrami stosowanymi do oceny kinetyki komórki, np. ekspresja Ki-67, PCNA, odsetek komórek w fazie S cyklu komórkowego, ilość wbudowanej znakowanej tymidyny czy bromodeoksyurydyny [11].

Duża ilość AgNOR cechuje guzy o wzmożonej aktywności metabolicznej, które charakteryzują się nieprawidłową, dużą zawartością DNA, czy też słabym zróżnicowaniem histologicznym oraz szybką proliferacją. Ilość AgNOR może być zatem markerem złośliwości guza i niepomyślnego rokowania.

Przeprowadzono wiele badań mających na celu wykazanie związku między ilością AgNOR w komórce a czasem przeżycia pacjentów z chorobami nowotworowymi, jak również znalezienia

korelacji, jaka mogłaby istnieć między ilością AgNOR a wrażliwością komórek nowotworowych na stosowaną terapię. Badania przeprowadzone na materiale biopsyjnym pobranym od 80 pacjentów z rakiem krtani wykazały średnią ilość AgNOR w komórce – 11,16. W tej grupie 58% pacjentów z ilością AgNOR/komórkę mniejszą bądź równą 11,07 przeżyło co najmniej pięć lat, podczas gdy tylko 7% pacjentów z ilością AgNOR/komórkę wyższą niż 11,07 przeżyło pięć lat. Badania przeprowadzone na materiale pobranym od 34 pacjentek chorych na raka piersi, które poddano częściowej lub całkowitej mastektomii, średnia ilość AgNOR w komórce wynosiła 7,78. W tej grupie 75% pacjentek z ilością mniejszą lub równą 7,38 AgNOR/komórkę przeżyło co najmniej pięć lat, podczas gdy tylko 23% pacjentek z większą ilością AgNOR przeżyło zaledwie pięć lat. U pacjentów chorych na raka prostaty średnia ilość AgNOR w komórce wynosiła 8,28. W tym przypadku 74% pacjentów z AgNOR/komórkę mniejszą lub równą 7,84 przeżyło pięć lat, a wśród pacjentów z większą ilością AgNOR tylko 7%. Udowodniono, że pacjenci z chorobą nowotworową, w której stwierdza się większą zawartość AgNOR w komórce powinni być poddawani bardziej agresywnej terapii. Wspomniani wyżej pacjenci chorzy na raka krtani, u których ilość AgNOR/komórkę nie przekroczyła 11,07, byli poddawani jedynie konwencjonalnej radioterapii [15]. Podobnie było w przypadku pacjentów chorujących na raka jelita grubego i odbytu. U pacjentów z mniejszą ilością AgNOR w komórce terapia oparta na 5-fluorouracylu dawała lepsze wyniki niż u tych z większą ilością AgNOR w komórce [16]. W badaniach przeprowadzonych u pacjentów chorujących na ostrą białaczkę szpikową stwierdzono, że średnia ilość białek AgNOR w komórce mieloblastycznej wynosi 6,6, przy czym wartość ta była większa u pacjentów z typem białaczki mieloblastycznej M5b (8,98) w porównaniu z typem M1 (6,3), M2 (6,49) czy M4 (6,53) (według podziału FAB). Pacjenci, u których uzyskano remisję choroby wykazywali ponadto większą zawartość AgNOR w komórce (7) w porównaniu z chorymi, u których remisji nie osiągnięto (5,94). Ilość AgNOR była skorelowana z długością remisji: większa ilość AgNOR – dłuższy czas remisji. Wyniki te sugerują, że u pacjentów, u których klony białaczkowe charakteryzują się krótkim czasem podwojenia liczby komórek, a więc większą ilością AgNOR, łatwiej uzyskiwano odpowiedź na leczenie i wykazywano dużą chemowrażliwość. U pacjentów, u których klony białaczkowe charakteryzowały się długim czasem podwojenia liczby komórek (czemu odpowiadała mała ilość AgNOR), obserwowano oporność na chemioterapię [17].

Niektórzy naukowcy kwestionują znaczenie prognostyczne analizy białek AgNOR. Prawdopodobnie było to spowodowane błędami metodologicznymi, jak np. nieprawidłowym barwieniem preparatów, niepoprawnym liczeniem AgNOR czy też zbadaniem zbyt małej liczby komórek [15, 18]. Toikkanen i Joensuu uzyskali bardzo małą ilość AgNOR w komórce u pacjentów chorych na raka piersi, ponieważ każde grono AgNOR traktowali jako pojedyncze AgNOR, a nie ich skupisko [19]. Podobny błąd popełnili Nagatani et al. prowadzący badania na materiale od pacjentów chorych na czerniaka [20].

AgNOR w rozrostach układu chłonnego

W wielu badaniach wykazano, że ilość AgNOR, a także ich rozmieszczenie są zróżnicowane w komórkach plazmatycznych u pacjentów chorujących na szpiczaka mnogiego (MM – *multiple myeloma*) [21, 22]. W niedojrzałych komórkach plazmatycznych szpiku (plazmoblastach) obserwowano większą zawartość AgNOR niż w plazmocytach.

U pacjentów, u których rozpoznano typ plazmoblastyczny szpiczaka mnogiego zawartość AgNOR była większa niż w plazmocytach u chorych na klasyczną postać MM. Stwierdzono, iż większa zawartość AgNOR w plazmocytach szpiczakowych w porównaniu z prawidłowymi plazmocydami może być powiązana z nieprawidłową ilością DNA w plazmocytach szpiczakowych. Stąd też barwienie srebrem NOR uznano za dobrą metodę do identyfikowania klonów komórek plazmatycznych o różnej aktywności proliferacyjnej, które mogą występować we wszystkich fazach choroby i zawierać nieprawidłową zawartość DNA [21, 22]. Pich et al. wykazali związek między ilością AgNOR w komórkach plazmatycznych w materiale biopsyjnym pacjentów chorych na szpiczaka mnogiego a cechami histologicznymi badanego szpiku oraz korelację między ilością AgNOR a stopniem zróżnicowania komórek plazmatycznych, udziałem procentowym tych komórek w szpiku kostnym, rodzajem nacieczenia szpiku kostnego oraz występowaniem zwłóknienia szpiku. Wykazanie zależności między ilością AgNOR a stopniem proliferacji komórek plazmatycznych zwiększa wartość diagnostyczną tej metody w ustaleniu stopnia zaawansowania szpiczaka mnogiego [23, 24].

Umieszczenie AgNOR w plazmocytach pacjentów chorujących na MM była różna. W plazmoblastach i niedojrzałych plazmocytach były rozproszone w karioplazmie lub występowały

w pobliżu błony jądrowej, w dojrzałych komórkach plazmatycznych NOR natomiast były zagregowane i centralnie ulokowane w jądrze. U pacjentów chorych na szpiczaka mnogiego w zaawansowanym stadium klinicznym AgNOR były umiejscowione w pobliżu błony jądrowej albo rozrzucone w karioplazmie [21, 22]. Wykazano również związek między zawartością AgNOR i ich rozmieszczeniem a czasem przeżycia pacjentów chorych na MM. Czas przeżycia pacjentów z ilością AgNOR/komórkę mniejszą lub równą 4,62 wynosił średnio 51,3 miesiąca, podczas gdy u pacjentów z ilością AgNOR/komórkę większą niż 4,62 średni czas przeżycia wynosił 16 miesięcy. W przypadku pacjentów, u których AgNOR były rozmieszczone w postaci centralnie umieszczonego w jądrze grona zbudowanego z dwóch lub trzech dużych kropek, silnie związanych ze sobą, czas przeżycia wynosił 71,67 miesiąca, a u pacjentów, u których AgNOR występowały w postaci centralnie umieszczonego grona składającego się z czterech lub pięciu średniej wielkości kropek lub dwóch gron utworzonych z dwóch lub trzech średniej wielkości kropek, czas przeżycia wynosił zaledwie 16,26 miesiąca. U chorych na MM, u których AgNOR były umiejscowione w postaci pojedynczych kropek rozproszonych w jąderku lub rozciągniętych w jądrze, czas przeżycia wynosił jedynie 11,74 miesiąca. Okazuje się, że zarówno ilość, jak i rozmieszczenie AgNOR w komórkach plazmatycznych może być przydatne do rozpoznawania, ale przede wszystkim do prognozowania przebiegu szpiczaka mnogiego. Dane te mogą być również pomocne w doborze odpowiedniej, skuteczniejszej terapii [21, 22].

Pich et al. badając grupę 36 pacjentów chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną (o.b.l.) wykazali średnią zawartość AgNOR w komórce blastycznej wynoszącą – 3,1. Wartość ta była wyższa u pacjentów z nieprawidłowym kariotypem – obecny chromosom Philadelphia i wynosiła 3,47. U pacjentów chorych na o.b.l. z prawidłowym kariotypem wartość ta była niższa. Ilość AgNOR była większa u pacjentów, u których wykazano obecność rearanżacji BCR/ABL i wynosiła 3,2 w porównaniu z grupą pacjentów bez zmian w kariotypie (2,87). Wśród pacjentów, którzy osiągnęli całkowitą remisję większość stanowili ci, u których ilość AgNOR w komórce nie przekraczała 3,1. W tej samej grupie chorych wykazano również związek między ilością AgNOR/komórkę a czasem przeżycia chorych. Pacjenci, u których ilość AgNOR/komórkę była mniejsza lub równa 3,1 przeżywali średnio 17 miesięcy, podczas gdy czas przeżycia chorych z większą zawartością AgNOR/komórkę wynosił zaledwie 10,2 miesiąca. U pacjentów, którzy osiągnęli całkowitą re-

misję, a ilość AgNOR/komórkę nie przekroczyła 3,1, czas wolny od choroby wynosił 13,7 miesiąca, podczas gdy u chorych, u których ilość AgNOR/komórkę wynosiła więcej niż 3,1, czas ten wynosił już tylko 4,2 miesiąca [25]. Sreelekha et al. przeprowadzili podobne badania obejmujące grupę 70 dzieci chorych na o.b.l. i wykazali większą zawartość AgNOR w limfoblastach chorych na o.b.l., w porównaniu z komórkami limfoblastycznymi osobników zdrowych. Na podstawie przeprowadzonych badań wyciągnięto wnioski, że duża zawartość AgNOR może być jednym z markerów aktywności proliferacyjnej komórek blastycznych szpiku i koreluje z krótszym czasem przeżycia chorych na o.b.l. oraz krótszym czasem wolnym od choroby u pacjentów, którzy osiągnęli wcześniej remisję całkowitą [26].

Duża zawartość AgNOR odzwierciedla wzmożoną aktywność proliferacyjną komórek blastycznych. W przypadku komórek o dużej aktywności proliferacyjnej znacznie szybciej rozwija się oporność na leki. Związane jest to z powstawaniem klonów komórkowych opornych na stosowaną chemioterapię, co może tłumaczyć skrócenie czasu przeżycia pacjentów chorych na o.b.l., a także krótszy czas wolny od choroby u pacjentów, którzy osiągnęli wcześniej remisję całkowitą [25, 26].

W badaniach przeprowadzonych na limfocytach chorych na przewlekłą białaczkę limfatyczną (p.b.l.) wykazano związek między zawartością AgNOR a czasem podwojenia liczby limfocytów.

Lorand-Metze i Metze w grupie obejmującej 48 pacjentów chorych na p.b.l. stwierdzili występowanie czterech typów komórek, różniących się wybarwieniem AgNOR: 1) komórki, w których AgNOR występowały jako pojedyncze grono, 2) komórki, w których AgNOR tworzyły zwarte jąderko, 3) komórki charakteryzujące się AgNOR w postaci dwóch zwartych jąderek, 4) komórki z AgNOR rozrzuconymi w postaci kilku kropek w karioplazmie. Spośród tych typów komórek, procent komórek z AgNOR w postaci grona najlepiej korelował z czasem podwojenia liczby limfocytów [27].

Uważa się, że limfocyty zawierające AgNOR w postaci gron należą do frakcji komórek proliferujących. Limfocyty z AgNOR jako jednym lub dwoma zwartymi jąderkami stanowią frakcję limfocytów nieproliferujących, znajdujących się w fazie G₀ cyklu komórkowego. Tego typu ustalenia pozwoliły oszacować, że jeżeli więcej niż 13% limfocytów stanowią limfocyty z AgNOR w postaci grona, to prawdopodobnie rozpoczęła się faza progresywna choroby [27, 28].

W badaniach przeprowadzonych przez Metze et al. na grupie 52 pacjentów wykazano podobne zależności. Sugeruje to, że zmiana konfiguracji

AgNOR koreluje ze zmianami kinetycznymi komórek w czasie rozwoju choroby. W przypadku pacjentów, u których rozwinęła się faza progresywna choroby i u których zastosowano chemioterapię, uzyskiwano zmniejszenie całkowitej liczby limfocytów, co było skorelowane z obniżeniem odsetka limfocytów zawierających AgNOR w postaci grona. Fakty te sugerują, że konfiguracja AgNOR może być wykładnikiem skuteczności prowadzonej terapii [29].

W badaniach przeprowadzonych przez Freeman et al. u 46 pacjentów chorych na ziarnicę złośliwą (z.z.) wykazano w jądrach komórek Sternberga-Reeda obecność wybarwionych srebrem regionów organizujących jąderko w liczbie przynajmniej piętnastu. Większość AgNOR występowała w pobliżu błony jądrowej, tylko kilka było umiejscowionych wewnątrz jąderek. Białka AgNOR wykryto również w jednojądrzastych komórkach Hodgkina w nieco mniejszych liczbach (7–10). Inne komórki z linii limfocytowej zawierały znacznie mniejszą liczbę AgNOR (1–4). Średnia liczba AgNOR, obserwowana w komórkach Sternberga-Reeda i w komórkach Hodgkina, była podobna we wszystkich tego typu komórkach, niezależnie od odmiany histologicznej z.z. Wyniki te sugerują, że liczba obserwowanych AgNOR w ziarnicy złośliwej nie jest wskaźnikiem diagnostycznym i nie może być wykorzystana jako badanie pomocnicze w różnicowaniu poszczególnych typów histologicznych tej choroby. Określenie liczby AgNOR może być użytecznym wskaźnikiem prognostycznym, gdyż komórki nowotworowe w z.z. zawierające dużą liczbę AgNOR, czyli charakteryzujące się dużą aktywnością proliferacyjną, wykazywały większą wrażliwość na leki cytotoksyczne stosowane w terapii [30].

W przeciwieństwie do poprzednich autorów, Mamaev et al. badając 32 pacjentów chorych na z.z. stwierdzili występowanie związku liczby AgNOR z typem histologicznym z.z. Większa liczba AgNOR charakteryzowała komórki typu NS (*nodular sclerosis* – stwardnienie guzkowe) ziarnicy złośliwej, w porównaniu z typem histologicznym MC (*mixed cellularity* – mieszanokomórkowy). W tym wypadku także większa liczba AgNOR w NS była związana z większą aktywnością podziałową komórek, a w rezultacie z większą chemiowrażliwością tych komórek na stosowaną chemioterapię i lepszą odpowiedzią na leczenie [31].

W przypadku z.z., określenie liczby AgNOR ma przede wszystkim wartość prognostyczną: większa liczba AgNOR koreluje z obecnością komórek o większej wrażliwości na leki, a to warunkuje bardziej skuteczną odpowiedź na zastosowaną terapię.

Najwięcej badań dotyczących wybarwionych

srebrem regionów organizujących jąderko wykonano u pacjentów chorych na nieziarnicze chłoniaki złośliwe (NHL – *non-Hodgkin lymphoma*). Było to podyktowane poszukiwaniem skutecznej metody, pozwalającej na różnicowanie chłoniaków o małym i dużym stopniu złośliwości.

W przypadku nieziarniczych chłoniaków złośliwych o małym stopniu złośliwości liczba i rozmiary obserwowanych AgNOR są mniejsze w porównaniu z nieziarniczymi chłoniakami o wysokim stopniu złośliwości [3, 32–35]. Badania Crockera et al. przeprowadzone w grupie 36 pacjentów chorych na NHL wykazały, że jądra komórkowe komórek pacjentów chorujących na NHL o dużym stopniu złośliwości zawierają większe ilości AgNOR (średnio 5,93) w porównaniu z jądrami komórek pacjentów chorujących na NHL o małym stopniu złośliwości (średnio 1,29 AgNOR/komórkę). W przypadku nieziarniczych chłoniaków złośliwych o dużym stopniu złośliwości, średnica obserwowanych AgNOR wynosiła średnio 0,41 μm , a powierzchnia 0,13 μm^2 i były to wartości mniejsze niż obserwowane w chłoniakach o małym stopniu złośliwości, w których średnica AgNOR wynosiła średnio 1,17 μm , a powierzchnia 1,11 μm^2 . Wykazano ponadto, że wraz ze zmniejszonym zróżnicowaniem komórek i ze zwiększoną złośliwością komórek chłoniaka liczba AgNOR wzrastała [36]. W przypadku nieziarniczych chłoniaków złośliwych wykazano dodatnią korelację między liczbą AgNOR a liczbą komórek znajdujących się w fazie S cyklu komórkowego. [5, 37–39]. Badania Jakić-Razumowicza et al. obejmujące grupę 61 pacjentów chorych na NHL wykazały ponadto związek między liczbą AgNOR w komórce a czasem przeżycia chorych, wystąpieniem remisji i długością jej trwania. W przypadku nieziarniczych chłoniaków złośliwych o małym stopniu złośliwości jądra komórkowe zawierały średnio 1,54 AgNOR/komórkę, o średnim stopniu złośliwości średnia liczba AgNOR/komórkę wynosiła 2,92, a w przypadku NHL o dużym stopniu złośliwości obserwowano średnio 4,57 AgNOR/komórkę. U pacjentów, którzy osiągnęli remisję, czas jej trwania korelował z liczbą AgNOR/komórkę. Najdłużej (37,5 miesiąca) remisja trwała u pacjentów z najmniejszą liczbą AgNOR/komórkę (1,54), czyli w przypadku chłoniaków o małym stopniu złośliwości, najkrócej (14 miesięcy) u pacjentów z największą liczbą AgNOR/komórkę (4,57), co odpowiadało chłoniakom o dużym stopniu złośliwości. Uważa się, że jest to spowodowane słabą odpowiedzią komórek bogatych w AgNOR na stosowaną terapię. Może to być związane z powstawaniem klonów komórkowych opornych na stosowane leczenie w guzach charakteryzujących się dużą aktywnością proliferacyjną. Większa liczba AgNOR charakteryzuje ko-

mórki o dużej aktywności proliferacyjnej, stąd też pacjenci chorzy na NHL o dużym stopniu złośliwości powinni być poddawani agresywniejszej terapii [35].

Liczba AgNOR w komórce w przypadku nieziarniczych chłoniaków złośliwych może być dodatkowym wskaźnikiem diagnostycznym pozwalającym różnicować chłoniaki o różnym stopniu złośliwości, a także dodatkowym czynnikiem decydującym o zastosowaniu najbardziej skutecznego leczenia.

Podsumowanie

Wielu autorów, wykorzystując technikę AgNOR do oceny liczby i konfiguracji regionów organizatorów jąderek, wykazuje istnienie związku między wielkością, liczbą jąderek oraz ilością białek zawartych w AgNOR a stopniem złośliwienia komórki. Białka AgNOR stanowią parametr o udokumentowanej wartości diagnostycznej w przebiegu wielu nowotworów, np. płuca, pęcherza moczowego, prostaty, okrężnicy [40–43]. Pomimo że określenie wielkości i liczby jąderek jest wyznacznikiem stopnia transformacji nowotworowej, mechanizm, w jaki sposób uczestniczą one w regulacji ekspresji genów komórki nowotworowej, nie jest jeszcze poznany.

Wiadomo, że im większa jest liczba regionów organizujących jąderko w komórce, tym większa jej aktywność proliferacyjna, a więc również krótszy czas podwojenia liczby komórek guza i czas podwojenia masy guza. Liczba i konfiguracja AgNOR w komórkach jest skorelowana z ich aktywnością proliferacyjną. Liczba i konfiguracja AgNOR odzwierciedlają ponadto stopień zróżnicowania histologicznego guza. Komórki słabo zróżnicowane zawierają więcej AgNOR niż bardziej dojrzałe. W licznych badaniach prowadzonych wśród różnych grup pacjentów z chorobami nowotworowymi wykazano, że liczbę i konfigurację AgNOR można wykorzystywać jako wskaźnik diagnostyczny w chorobach nowotworowych, ale przede wszystkim jest on bardzo użyteczny w monitorowaniu i prognozowaniu ich przebiegu. Uważa się bowiem, że liczba AgNOR jako marker aktywności proliferacyjnej komórek może dostarczyć informacji o kinetyce komórki, co wiąże się z jej wrażliwością na prowadzoną terapię.

W chorobach rozrostowych układu chłonnego, takich jak: szpiczak mnogi, ostra białaczka limfoblastyczna, przewlekła białaczka limfatyczna, ziarnica złośliwa i złośliwe chłoniaki nieziarnicze, udało się wykazać związek między liczbą AgNOR w komórce i ich rozmieszczeniem. We wszystkich wspomnianych chorobach, mniejsza ilość AgNOR

w komórce wiązała się z bardziej pomyślnym rokowaniem dla pacjenta. Pacjenci z najmniejszą zawartością AgNOR w komórce charakteryzowali się dużą chemiowrażliwością na prowadzoną terapię, łatwiej i szybciej osiągnęli remisję, której czas trwania był również skorelowany z liczbą AgNOR w komórce (im mniejsza liczba AgNOR, tym dłuższy czas remisji).

W związku z ogromnym zainteresowaniem naukowców ludzkim genomem, a także intensywnymi poszukiwaniami terapii pozwalającej skutecznie leczyć choroby nowotworowe należy oczekiwać badań, które skupiałyby się na poszukiwaniu sposobu prowadzącego do zablokowania ekspresji genów umiejscowionych w AgNOR, na

upośledzeniu aktywności enzymatycznej białek AgNOR, które są niezbędnym składnikiem jąderka komórkowego do syntezy prekursorów rRNA. Ostatnie doniesienia wskazują, że wzrost zawartości pewnych białek: p120, p145, No55 i Ki-67 w jąderkach może być markerem określającym stopień zezłośliwienia komórki [14, 26, 44–46].

Opracowanie metody, która umożliwiłaby blokowanie aktywności enzymatycznej białek AgNOR niezbędnych do syntezy rRNA, a w następstwie do zahamowania niekontrolowanej proliferacji, prowadzącej do nowotworzenia mogłaby być znaczącym krokiem naprzód w terapii chorób nowotworowych, a także w ich zapobieganiu.

Piśmiennictwo

- [1] **Klyszejko-Stefanowicz L:** Cytobiochemia. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1998, 401–426.
- [2] **Derenzini M:** The AgNORs. *Micron* 2000, 31, 117–120.
- [3] **Kunishio K, Ohmoto T, Matsuhisa T, Maeshiro T, Furuta T, Matsumoto K:** The significance of nucleolar organizer region (AgNOR) score in predicting meningioma recurrence. *Cancer* 1994, 73, 8, 2200–2205.
- [4] **Underwood JCE, Giri DD:** Nucleolar organizer regions as diagnostic discriminants for malignancy. *J Pathol* 1988, 155, 95–96.
- [5] **Egan MJ, Crocker J:** Nucleolar organizer regions in pathology. *Br J Cancer* 1992, 65, 1–7.
- [6] **Lee W, Kim Y, Lee KY, Kang ChS, Lee W, Lee KS, Shim SI, Han K:** AgNOR of human interphase cells in relation to acrocentric chromosomes. Elsevier Science Ltd. 1999.
- [7] **Sirri V, Roussel P, Hernandez-Verdun D:** The AgNOR proteins, qualitative and quantitative changes during the cell cycle. *Micron* 2000, 31, 121–126.
- [8] **Nikicicz EP, Norback DH:** Argyrophilic nucleolar organiser region (AgNOR) staining in normal bone marrow cells. *J Clin Pathol* 1990, 43, 723–727.
- [9] **Kawiak J, Zabel M:** Seminaria z cytofizjologii. Wydawnictwo Medyczne Urban i Partner Wrocław 2002.
- [10] **Crocker J, Boldy DAR, Egan MJ:** How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. *J Pathol* 1989, 158, 185–188.
- [11] **Trere D, Farabegali F, Cancellieri A, Ceccarelli C, Eusebi V, Derenzini M:** AgNOR area in interphase nuclei of human tumours correlates with the proliferative activity evaluated by bromodeoxyuridine labelling and Ki67 immunostaining. *J Pathol* 1991, 165, 53–59.
- [12] **Trere D:** AgNOR staining and quantification. *Micron* 2000, 31, 127–131.
- [13] **Smith PJ, Skilbeck N, Harrison A, Crocker J:** The effect of a series of fixatives on the AgNOR technique. *J Pathol* 1988, 155, 109–112.
- [14] **Rüschhoff J, Plate KH, Contractor H, Kern S, Zimmermann R, Thomas C:** Evaluation of nucleolus organizer regions (NORs) by automatic image analysis: A contribution to standardization. *J Pathol* 1990, 161, 113–118.
- [15] **Pich A, Chiusa L, Margaria E:** Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology. *Micron* 2000, 31, 133–141.
- [16] **Öfner D:** *In situ* standardised AgNOR analysis: a simplified method for routine use to determine prognosis and chemotherapy efficiency in colorectal adenocarcinoma. *Micron* 2000, 31, 161–164.
- [17] **Pich A, Chiusa L, Audisio E, Marmont F:** Nucleolar organizer region counts predict complete remission, remission duration and survival in adult acute myelogenous leukemia patients. *J Clin Oncol* 1998, 16, 4, 1512–1518.
- [18] **Ceccarelli C, Trere D, Santini D, Taffurelli M, Chieco P, Derenzini M:** AgNORs in breast tumours. *Micron* 2000, 31, 143–149.
- [19] **Toikkanen S, Joensuu H:** AgNOR counts have no prognostic value in breast cancer. *J Pathol* 1993, 169, 251–254.
- [20] **Nagatani T, Iemoto G, Miyakawa K, Ichiyama S, Takahashi Y, Uchiyama M, Nakajima H:** AgNOR (nucleolar organizer regions) staining in malignant melanoma. *J Dermatol* 1991, 18, 731–735.
- [21] **Pich A, Marmont F, Chiusa L, Capello N, Resegotti L, Navone R:** Argyrophilic nucleolar organizer region counts and prognosis in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1992, 82, 681–688.
- [22] **Underwood JCE, Giri DD:** Nucleolar organizer regions as diagnostic discriminants for malignancy. *J Pathol* 1988, 155, 95–96.
- [23] **Baatout S:** Staining of the nucleolar organizer regions: relevance in hematology. *Blood Rev* 1996, 10, 185–188.
- [24] **Pich A, Chiusa L, Marmont F, Cappello N, Navone R:** Argyrophilic nucleolar organizer region counts in multiple myeloma: a histopathological study on bone marrow trephine biopsies. *Virchows Arch (A)* 1992, 421, 143–147.
- [25] **Pich A, Chiusa L, Ceretto C, Fornari A, Audisio E, Marmont F, Navone R:** Prognostic value of the rapidity of bone marrow blast cell proliferation in adult acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004, 18, 1, 172–174.

- [26] **Sreelekha TT, Kusumakumary P, Srinivas G, Rajesh Kumar S, Pushpakumary S, Krishnan Nair M, Radhakrishna Pillai M:** Argyrophilic nuclear organizer regions (AgNORs) in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Lett* 1996, 108, 87–91.
- [27] **Lorand-Metze I, Metze K:** AgNOR clusters as a parameter of cell kinetics in chronic lymphocytic leukaemia. *J Clin Pathol, Mol Pathol* 1996, 49, 357–360.
- [28] **Metze K, Lobo AM, Lorand-Metze I:** Nucleolus organizer regions (AgNORs) and total tumour mass are independent prognostic parameters for treatment – free period in chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer* 2000, 89, 440–443.
- [29] **Metze K, Chiari AC, Andrade FL, Lorand-Metze I:** Changes in AgNOR configurations during the evolution and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Cell Ther* 1999, 41, 205–210.
- [30] **Freeman J, Kellock DB, Yu CC-Wu, Crocker J, Levison DA, Hall PA:** Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and nucleolar organizer regions in Hodgkin's disease: Correlation with morphology. *J Clin Pathol* 1993, 46, 446–449.
- [31] **Metze K, Chiari AC, Andrade FL, Lorand-Metze I:** Changes in AgNOR configurations during the evolution and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Cell Ther* 1999, 41, 205–210.
- [32] **Cibull ML, Heryet A, Gotter KC, Mason DY:** The utility of Ki67 immunostaining, nucleolar organizer region counting, and morphology in the assessment of follicular lymphomas. *J Pathol* 1989, 158, 189–193.
- [33] **Crocker J, Nar P:** Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J Pathol* 1987, 151, 111–118.
- [34] **Goodlad JR, Cocker J, Macartney JC:** Nucleolar ultrastructure in low- and high-grade non-Hodgkin's lymphomas. *J Pathol* 1991, 163, 233–237.
- [35] **Jakić-Razumović J, Tentor D, Petrovečki M, Radian I:** Nucleolar organiser regions and survival in patients with non-Hodgkin's lymphomas classified by the working formulation. *J Clin Pathol* 1993, 46, 943–947.
- [36] **Crocker J, Egan MJ:** Correlation between NOR sizes and numbers in non-Hodgkin's lymphomas. *J Pathol* 1988, 156, 233–239.
- [37] **Crocker J, Macartney C, Smith PJ:** Correlation between DNA flow cytometric and nucleolar organizer region data in non-Hodgkin's lymphomas. *J Pathol* 1988, 154, 151–156.
- [38] **Smith FG, Murray PG, Crocker J:** Correlation between PCNA and AgNOR scores in non-Hodgkin's lymphomas using sequential staining technique. *J Clin Pathol* 1993, 46, 28–31.
- [39] **Woźniak ZM, Bonnefoix T, Zheng X, Seigneurin D, Sotto JJ:** Interest of argyrophilic proteins nucleolar organizer regions (AgNOR) to estimate the reactivity of T cell clones against autologous malignant B-NHL cells. *Anal Cell Pathol* 1995, 9, 123–133.
- [40] **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, 1956–1963.
- [41] **Kaneko S, Ishida T, Rugio K, Yokoyama H, Sugimachi K:** Nucleolar organizer regions as a prognostic indicator for stage I non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1991, 51, 4008–4011.
- [42] **Lipponen PK, Eskelinen MJ, Nordling S:** Nucleolar organiser regions (AgNORs) as predictors in transitional cell bladder cancer. *Br J Cancer* 1991, 64, 1139–1144.
- [43] **Öfner D, Riedmann B, Maier H, Hittmair A, Rumer A, Totsh M, Spechtenhauser B, Bocker W, Schmid KW:** Standardized staining and analysis of argyrophilic nucleolar organizer region associated proteins (AgNORs) in radically resected colorectal adenocarcinomas-correlation with tumour stage and long-term survival. *J Pathol* 1995, 175, 441–448.
- [44] **Endl E, Gerdes J:** The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell Res* 2000, 257, 231–237.
- [45] **Fossa A, Siebert R, Aasheim HC, Maeldandsmo GM, Berner A, Fossa SD, Paus E, Smeland EB, Gaudernack G:** Identification of nucleolar protein No55 as a tumour-associated autoantigen in patients with prostate cancer. *Br J Cancer* 2000, 83, 743–749.
- [46] **Freeman JW, McRorie DK, Bush RK, Gyorkey F, Gyorkey P, Ross BE, Spohn WH, Bush H:** Identification and partial characterisation of a nucleolar antigen with a molecular weight of 145,000 found in a broad range of human cancers. *Cancer Res* 1996, 46, 3593–3598.

Adres do korespondencji:

Iwona Urbanowicz
Katedra i Zakład Analityki Medycznej AM
Wybrzeże L. Pasteura 4
50-367 Wrocław

Praca wpłynęła do Redakcji: 11.01.2005 r.

Po recenzji: 21.02.2005 r.

Zaakceptowano do druku: 7.03.2005 r.

Received: 11.01.2005

Revised: 21.02.2005

Accepted: 7.03.2005