

مقایسه میانگین شمارش AgNORs در اسمیر سیتولوژی مخاط سالم دهانی در افراد سیگاری و غیر سیگاری

دکتر شکوفه شهرابی*⁺ - دکتر بهناز عبداللهی** - دکتر حکیمه احدیان*** - دکتر حسین فلاح زاده****

*استادیار گروه آموزشی آسیب شناسی فک و دهان دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

**دندانپزشک

***استادیار گروه آموزشی بیماریهای دهان دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

****استادیار گروه آمار و اپیدمیولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

Title: Comparison of AgNORs count in exfoliative cytology of normal oral mucosa in smokers and non- smokers

Authors: Shahrabi Sh. Assistant Professor*, Abdolahi B. Dentist. Ahadian H. Assistant Professor**, Fallahzadeh H. Assistant Professor

Address: * Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Faculty of Dentistry, Shahid Sadoughi Yazd University of Medical Sciences

** Department of Oral Medicine, Faculty of Dentistry, Shahid Sadoughi Yazd University of Medical Sciences

*** Department of Epidemiology, Faculty of Public Health, Shahid Sadoughi Yazd University of Medical Sciences

Background and Aim: A strong causal relationship exists between cigarette smoking and development of oral squamous cell carcinoma, so oral screening using exfoliative cytology has been recommended to facilitate the early diagnosis of cellular alterations in oral mucosa and silver staining (AgNOR technique) has been proven to be of value in the detection of incipient cellular alterations. The purpose of this study was to compare the argyrophilic nucleolar regions (AgNORs) count of cells collected from normal mucosa of cigarette smokers with that obtained from non- smokers.

Materials and Methods: In this cross-sectional study, cytologic smears of normal tongue, buccal mucosa and floor of the mouth from 19 smokers and 19 non- smokers were stained for AgNORs. The AgNORs count was established on 100 cells. The count value of groups were compared and analyzed using the Levens, Paired T, Student and Factorial tests. Using $P < 0.05$ as the limit of significance.

Results: The AgNORs were round and had a clustered distribution in both groups. The mean AgNORs count was statistically higher in cells of smokers than non- smokers ($P < 0.05$). There was a significant difference between smears from the floor of the mouth and other anatomical sites in both groups. In this study, no correlation was found between AgNORs count and gender.

Conclusion: Analysis of AgNORs suggests that there might be a correlation between the smoking habit and an increased rate of cellular proliferation in the oral mucosal cells.

Key Words: AgNOR staining; Oral exfoliative cytology; Smoking; Nucleolar organizer regions

Journal of Dentistry. Tehran University of Medical Sciences (Vol. 18; No. 3; 2005)

چکیده

⁺ مؤلف مسؤول: آدرس: یزد- دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد- دانشکده دندانپزشکی- گروه آموزشی آسیب شناسی دهان، فک و صورت
تلفن: ۰۳۵۱-۶۲۵۵۸۸۱-۳ دورنگار: ۰۳۵۱-۶۲۵۰۳۴۴ پست الکترونیکی: shokufeh_shahrabi@yahoo.com

زمینه و هدف: از آنجا که رابطه علت و معلولی آشکاری بین مصرف سیگار و ایجاد سرطان دهان وجود دارد؛ اخیراً سیتولوژی دهانی به عنوان روشی در غربالگری افراد high risk برای تشخیص زودرس تغییرات سلولی در مخاط دهان مطرح شده است و رنگ آمیزی نقره (تکنیک AgNOR) می تواند به عنوان روشی ارزشمند جهت کشف تغییرات اولیه سلولی محسوب گردد. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی و مقایسه میانگین شمارش AgNORs در سلول های اسمیرهای تهیه شده از مخاط نرمال دهانی افراد سیگاری و غیر سیگاری انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه مقطعی، اسمیرهای سیتولوژی از مخاط نرمال ۱۹ فرد سیگاری و ۱۹ فرد غیرسیگاری، از سه ناحیه آناتومیک زبان، گونه و کف دهان گرفته شد و با استفاده از روش AgNORs رنگ آمیزی گردید. شمارش AgNORs در هر اسمیر بر روی ۱۰۰ سلول انجام شد و اختلاف شمارش AgNORs در هر دو گروه توسط آزمون های آماری Levens, Paired t, Student t و Factorial مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

یافته ها: AgNORs در هر دو گروه به صورت نقاطی گرد و با طرح تجمعی (خوشه ای) دیده شد. اختلاف شمارش AgNORs در گروه سیگاری در مقایسه با گروه غیرسیگاری از نظر آماری معنی دار بود ($P < 0.05$)؛ همچنین تفاوت معنی داری بین شمارش AgNORs در کف دهان و دو ناحیه دیگر از نظر آماری وجود داشت. در این مطالعه، ارتباطی بین جنس و شمارش AgNORs یافت نشد.

نتیجه گیری: بررسی AgNORs در این مطالعه نشان داد که ممکن است رابطه ای بین مصرف سیگار و افزایش میزان پرولیفراسیون سلولی در سلول های مخاط دهان وجود داشته باشد.

کلید واژه ها: رنگ آمیزی AgNORs؛ سیتولوژی اکسفولیاتیو دهانی؛ استعمال سیگار؛ Nucleolar Organizer Region (NOR)

مجله دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران (دوره ۱۸، شماره ۳، سال ۱۳۸۴)

مقدمه

AgNOR* می باشد (۶-۷). در این روش نواحی موسوم به NORs در هسته رنگ آمیزی می شوند (۷۶). NORs معرف حلقه هایی از DNA هستند که به طور فعال از آنها RNA ریبوزومال نسخه برداری می شود و در نهایت منجر به سنتز پروتئین می شود. NoRs در ارتباط با پروتئین هایی اسیدیک، نقره دوست و غیر هیستونی هستند که با استفاده از روش رنگ آمیزی نقره (AgNOR) قابل مشاهده می باشند (۷۶)؛ در حقیقت این نقاط در هسته، خود شاخصی جهت فعالیت پرولیفراتیو سلولی محسوب می شوند (۷۶).

نتایج مطالعات متعددی نشان داده اند که آنالیز کمی و کیفی AgNORs می تواند در تشخیص و تخمین پیش آگهی بسیاری از نئوپلاسم ها سودمند باشد (۶-۱۳). با توجه به این که تاکنون مطالعات بسیار معدودی در زمینه استفاده از روش AgNORs در سیتولوژی اکسفولیاتیو دهان گزارش شده

Squamous Cell Carcinoma (SCC)، شایع ترین تومور بدخیم دهان و ششمین سرطان شایع در انسان محسوب می شود (۱، ۲) و تنباکو و سیگار یکی از مهمترین عوامل اتیولوژیک آن به شمار می آیند (۱).

به طور ایده آل اولین گام جهت درمان هر بیماری، تشخیص زودرس آن می باشد (۳)؛ بنابراین جهت تشخیص به موقع و زودرس سرطان دهان، بهترین شیوه غربالگری (screening) افراد مستعد به سرطان دهان و نیز به کارگیری روش سیتولوژی به عنوان روشی ساده، سریع، ارزان، کم خطر و غیر تهاجمی است (۴)؛ همچنان که استفاده از این روش جهت تشخیص زودرس دیسپلازی و کارسینوم گردن رحم افزایش یافته است (۴).

برای رنگ آمیزی اسمیر می توان از روش های مختلفی استفاده نمود؛ از جمله روش هایی که اخیراً در سیتولوژی کاربرد پیدا کرده است، رنگ آمیزی با محلول نیترا نقره یا روش

* Argyrophilic nucleolar organizer region

† Nucleolar organizer regions

مخاط پدیدار شدند تا اطمینان حاصل شود که تقریباً تا ناحیه غشای پایه، سلول‌های اپیتلیالی جمع‌آوری شده‌اند. در هیچ کدام از نمونه‌برداری‌ها خونریزی ایجاد نشد؛ سپس هر Oribrush مربوط به ناحیه آناتومیکی خود، بر روی لام شیشه‌ای خشک و تمیزی که از قبل دارای برچسب و شماره بود، گسترده شد و بلافاصله سلول‌های موجود در سطح لام توسط اسپری Pathofix (حاوی اتانول ۹۵٪، تهران- ایران Padtan Teb) به فاصله ۲۵ سانتیمتری و با حداکثر ۲ بار فشار اسپری ثابت شدند.

لازم به توضیح است این عمل بر روی بیماران داوطلب مراجعه‌کننده به بخشهای بیمارهای دهان و آسیب‌شناسی فک و دهان دانشکده دندانپزشکی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد انجام شد.

اسمیرهای ثابت‌شده، طبق روش استاندارد و مطالعات قبلی تحت رنگ‌آمیزی AgNOR قرار گرفتند (۷،۵). محلول نهایی جهت رنگ‌آمیزی شامل یک حجم ژلاتین ۲٪ در محلول اسیدفرمیک ۱٪ و دو حجم محلول نیترا نقره ۵۰٪ بود؛ به این صورت که اسلایدها ابتدا به صورت افقی در داخل یک ظرف پتری قرار داده شدند و توسط پیپت، ۳ یا ۴ قطره از محلول مورد نظر بر روی سطح آنها ریخته شد؛ سپس اسلایدها توسط یک درپوش شیشه‌ای پوشانده شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت ۴۵ درجه سانتیگراد و در تاریکی نگهداری شدند؛ پس از آن درپوش شیشه‌ای به آرامی برداشته شد؛ اسلایدها در آب مقطر شسته شدند و توسط Xylene دهیدراته و در یک synthetic medium، مانع شدند.

شمارش AgNOR برای هر اسمیر، بر روی ۱۰۰ سلول و با بزرگنمایی ۱۰۰ برابر عدسی چشم توسط روغن immersion و طبق روش Crocker انجام شد (۷)؛ به این صورت که در همه اسمیرها، سلول‌هایی که در هسته آنها حداقل ۵ عدد AgNOR (به صورت نقاط سیاه رنگ) وجود

است (۱۴،۷)، مطالعه حاضر با هدف ارزیابی و مقایسه شمارش AgNORs در سلول‌های اسمیرهای تهیه‌شده از مخاط سالم گونه، زبان و کف دهان افراد سیگاری و غیر سیگاری انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه همگروهی تاریخی، در مجموع ۳۸ بیمار سیگاری و غیرسیگاری انتخاب شدند که هر گروه به دو زیر گروه شامل گروههای مردان و زنان تقسیم شدند. ۲۰ بیمار مرد و ۱۸ بیمار زن بودند. تعداد بیماران زن در گروه سیگاری و غیرسیگاری با هم برابر (۹ نفر) بود. دامنه سنی در گروه سیگاری ۴۰-۴۸ سال (با میانگین ۴۵ سال) و در گروه غیرسیگاری ۴۲-۵۲ سال (با میانگین ۴۵ سال) بود.

گروه مردان سیگاری شامل ۱۰ نفر با دامنه سنی ۳۵-۵۵ سال (با میانگین سنی ۴۴ سال) بود. افراد سیگاری حداقل ۲۰ نخ سیگار در روز و به مدت حداقل ۱۵ سال استفاده می‌کردند. در هر دو گروه، هیچ یک از بیماران بیمارهای سیستمیک نداشتند و در معاینه بالینی داخل دهانی مخاط دهان، هیچ ضایعه پاتولوژیکی مشاهده نشد و به ظاهر سالم و طبیعی به نظر می‌رسید. هر دو گروه از نظر جنس و سن با هم مطابقت داشتند.

قبل از تهیه اسمیر، برای بیماران هدف از این مطالعه و فواید آن توضیح داده شد. پس از کسب رضایت شفاهی از بیمار و شستشوی دهان بیماران توسط آب معمولی و کشیدن یک قطعه گاز به آرامی روی نواحی مورد نظر و بررسی نواحی مورد نظر و اطمینان از عدم وجود ذرات غذایی، توسط سه عدد Oribrush یکبار مصرف (ساخت سوئد) از هر یک از نواحی مخاط گونه، زبان و کف دهان، به طور جداگانه و مجزا اسمیر تهیه شد. روش کار به این صورت بود که Oribrush در محل مورد نظر ۱۰-۱۵ بار چرخش داده شد و فشار دست به قدری بود که نقاط ریز و سرسوزنی قرمز رنگی بر سطح

داشت، انتخاب گردید و جهت شمارش نقاط سیاه رنگ، نقاط منفرد و مستقل و نیز آنهایی که به صورت تجمعی و متصل به هم بودند، هر کدام به صورت یک واحد در نظر گرفته شدند؛ سپس میانگین تعداد AgNOR در ۱۰۰ سلول برای هر اسلاید محاسبه و نتایج شمارش به صورت میانگین و انحراف معیار بیان شد؛ داده‌های این مطالعه با استفاده از آزمونهای Leven's t، Paired t، Student t و Factorial مورد تحلیل آماری قرار گرفتند. $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

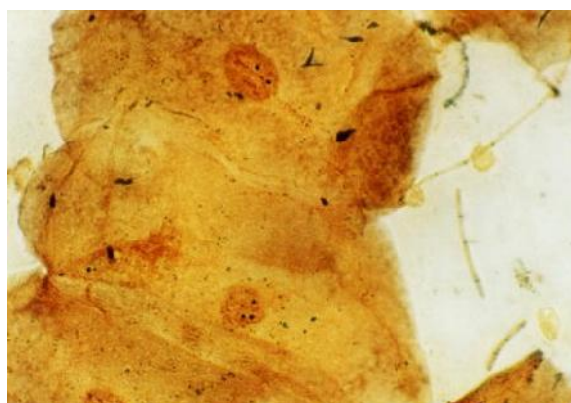
یافته‌ها

در بررسی میکروسکوپی همه اسلایدها، AgNORs در داخل هسته و به صورت نقاط سیاه رنگ و با حاشیه گرد قابل رؤیت بودند. AgNORs در بعضی سلول‌ها به صورت منفرد و مجزا و در برخی دیگر (بخصوص در گروه سیگاری) به صورت تجمعی (clustered) و یا متصل به هم بودند (شکل‌های ۱-۳).

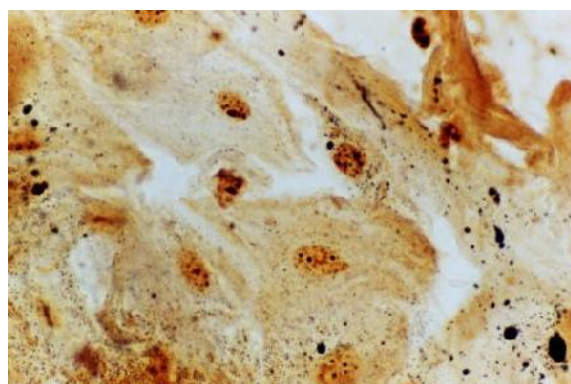
میانگین شمارش AgNORs در هسته سلول‌های مخاطی گروه سیگاری مخاط زبان $7/318 \pm 7/8661$ ، مخاط گونه $8/1453 \pm 7/307$ و مخاط کف‌دهان $9/8311 \pm 1/0296$ بود که در مقایسه با میانگین شمارش AgNORs در هسته سلول‌های مخاطی گروه غیرسیگاری (مخاط زبان: $6/2544 \pm 4/933$ ، مخاط گونه: $6/2147 \pm 6/140$ ، مخاط کف دهان $6/222 \pm 6/7926$) به طور معنی‌داری بیشتر بود ($P=0/001$)، (جدول ۱).

در مقایسه گروه‌های سیگاری و غیرسیگاری به تفکیک جنس نیز رابطه معنی‌داری بین میانگین تعداد AgNORs در هسته سلول‌های مخاطی دهان مردان سیگاری و غیرسیگاری و نیز زنان سیگاری و غیرسیگاری یافت شد ($P=0/001$).

شکل ۱- AgNORs در نمونه سیتولوژی سلول‌های مخاط سالم کف دهان در یک زن سیگاری (AgNOR stain, $\times 1000$)

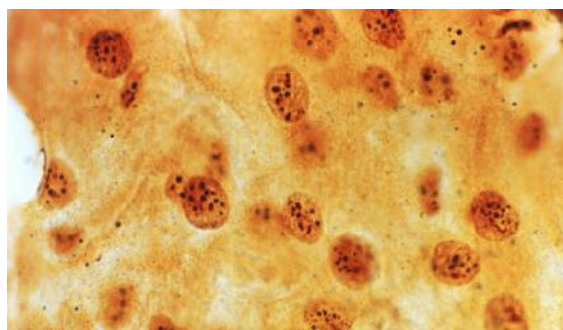


شکل ۲- AgNORs در نمونه سیتولوژی سلول‌های مخاط سالم گونه در مرد غیرسیگاری. نقاط محدود و گرد می‌باشند. (AgNOR stain, $\times 1000$)



شکل ۳- AgNORs در نمونه سیتولوژی سلول‌های مخاط سالم گونه در یک مرد سیگاری. نقاط به صورت تجمعی است و برخی از آنها به صورت متصل به هم دیده می‌شوند. (AgNOR stain, $\times 1000$)

با استفاده از آنالیزهای Factorial، عوامل سیگار و محل آناتومیکی چه به صورت انفرادی و چه با همدیگر، تأثیر



سلول در ضایعات پاتولوژیک مختلف مثل تومورهایی با منشأ اپیتلیالی و ملانوسیتیک گزارش شده است (۱۰-۱۳).
تعداد AgNOR در هسته، منعکس کننده پرولیفراسیون سلولی، ترانسفورماسیون بدخیمی، tumor grading، متاستاز تومور، عود تومور و وضعیت پروگنوستیک آن می باشد (۹، ۱۲)؛ همچنین در مطالعه‌ای، شمارش AgNOR به عنوان روشی objective در درجه بندی بافت شناختی Actinic Keratosis که یک ضایعه پیش سرطانی است، به کار گرفته شده است (۱۳).

از مزایای روش رنگ آمیزی نقره، ساده بودن و یک مرحله ای بودن آن است (۵) و دیگر این که می توان آن را در اسلایدهای سیتولوژی که قبلاً با تکنیک های معمولی رنگ آمیزی شده اند، به کار برد؛ همچنین امکان استفاده از double staining و نشانگرهای ایمونوهیستوشیمیایی نظیر estrogen receptor (ER) و نشانگرهای پرولیفراتیو دیگر نظیر PCNA و Ki-67 از مزایای دیگر این روش می باشد

معنی داری بر شمارش AgNORs در هسته سلول ها نشان دادند؛ همچنین برای بررسی آماری میانگین شمارش AgNORs در نواحی آناتومیکی مختلف نمونه برداری زبان، گونه و کف دهان نواحی مخاطی مختلف به صورت دو به دو با استفاده از آزمون Paired t مورد تحلیل قرار گرفتند که در گروه افراد سیگاری، میانگین تعداد AgNORs در هسته به طور معنی داری در ناحیه کف دهان بیشتر از نواحی دیگر بود و در گروه افراد غیرسیگاری نیز همین رابطه وجود داشت ($P=0/0001$)، (جدول ۱).

در بررسی رابطه بین جنس و میانگین شمارش AgNORs توسط آنالیز factorial، عامل جنس چه به تنهایی و چه همراه با عوامل سیگار، محل و ناحیه آناتومیکی، فاقد تأثیر بر میانگین شمارش AgNORs در هسته سلول های مخاطی هر دو گروه سیگاری و غیرسیگاری بود.

بحث و نتیجه گیری

در تحقیقات متعدد با استفاده از تکنیک AgNOR (۹، ۱۵).

همبستگی بین تعداد AgNOR در هسته و فعالیت پرولیفراتیو

جدول ۱- مقایسه میانگین شمارش AgNORs در هسته سلول های اسمیر افراد سیگاری و غیرسیگاری بر حسب نواحی مختلف آناتومیکی نمونه برداری شده

گروه های مورد بررسی	نواحی آناتومیکی مورد مقایسه	میانگین و انحراف معیار	t-test	P-value
سیگاری	مخاط زبان	$7/8661 \pm 0/7318$	۲/۳۰۲	۰/۰۳۴ *
	مخاط گونه	$8/1453 \pm 0/7307$		
	مخاط کف دهان	$9/8311 \pm 1/0296$	۷/۹۳۹	۰/۰۰۰۱ *
غیر سیگاری	مخاط زبان	$6/2544 \pm 0/4933$	۰/۱۰۵	۰/۹۱۷
	مخاط گونه	$6/2147 \pm 0/6140$		
	مخاط کف دهان	$6/7926 \pm 0/6222$	۵/۱۹۸	۰/۰۰۰۱ *
غیر سیگاری	مخاط زبان	$6/2544 \pm 0/4933$	۲/۸۲۷	۰/۰۱۱ *
	مخاط گونه	$6/2147 \pm 0/6140$		
	مخاط کف دهان	$6/7926 \pm 0/6222$		

تاکنون روش رنگ آمیزی AgNOR در اسمیرهای سیتولوژیکی چندان مورد استفاده قرار نگرفته است.

(۱۸). در مطالعه حاضر، سطح هورمونی، فعالیت پرولیفراتیو سلول‌های اپیتلیالی را تحت تأثیر قرار نداد و هیچ تفاوتی بین تعداد AgNORs در مردان و زنان مشاهده نشد که این یافته با مطالعات مشابه مطابقت می‌کند (۱۴،۷).

طبق نتایج این مطالعه، میانگین شمارش AgNORs در کف دهان از سایر نواحی در هر دو گروه سیگاری و غیرسیگاری بیشتر بود. Cancado و همکاران نیز در بررسی خود روی مخاط زبان و کف دهان به همین نتیجه رسیدند (۱۴).

مطالعات kinetic سلولی نشان داده‌اند که اپیتلیوم غیرشاخی دارای میزان پرولیفراسیون بیشتری نسبت به اپیتلیوم شاخی است (۱۲)؛ همچنین مخاط کف دهان تغییرات بدخیمی و پیش بدخیمی بیشتری از سایر نواحی دهان دارد (۱)؛ بنابراین چندان دور از انتظار نمی‌باشد که شمارش AgNORs در سلول‌های کف دهان از سایر نواحی بیشتر باشد.

Zimmermann و همکاران در تحقیق خود گزارش کردند که سن، عادت سیگار کشیدن و بیماری دهانی و سیستمیک می‌توانند درجه شاخی شدن مخاط دهان را در برخی نواحی تغییر دهند (۱۹)؛ البته در مطالعه حاضر، بیماران همگی از نظر سنی وضعیت مشابهی داشتند و هیچ کدام از بیماران، بیماری دهانی یا سیستمیک نداشتند.

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که روش سیتولوژی اکسفولیاتیو دهانی می‌تواند به عنوان روشی ساده و بی‌خطر به کار گرفته شود و بخصوص نتیجه تحلیل AgNORs می‌تواند حداقل هشدار برای افراد high risk باشد. در هر صورت می‌توان به ارزش روش AgNOR در کشف تغییرات بسیار اولیه سلولی که با روش‌های معمول نمی‌توان به وجود آنها پی برد، اعتقاد داشت؛ همچنان که از این روش در کشف تغییرات سلول‌های طبیعی مجاور SCC دهان استفاده شده است (۲۰).

Sujathan و همکاران از این روش جهت افتراق سلول‌های فعال مزوتلیال از سلول‌های بدخیم در serous effusions در اسمیرهای سیتولوژی استفاده کردند (۱۶)؛ همچنین Cardillo همبستگی بین AgNOR را در سلول‌های خوش‌خیم و بدخیم در سیتولوژی FNA ضایعات غدد بزاقی نشان داد (۶).

در این مطالعه، روش AgNOR به طور موفقیت‌آمیزی در اسمیرهای سیتولوژیک مخاط سالم دهان در نواحی زبان، گونه و کف دهان به کار گرفته شد. در این مطالعه نقاط AgNOR در هسته سلول‌ها به صورت گرد و به‌جز در برخی نمونه‌های گروه سیگاری (دارای توزیع تجمعی)، به صورت مجزا بود که این خود از مشخصات سلول‌های خوش‌خیم است و با نمای بالینی مخاط سالم افراد سیگاری و غیرسیگاری مطابقت می‌کند؛ در ضمن میانگین شمارش AgNOR در اسمیر افراد سیگاری بیشتر از افراد غیرسیگاری بود که این امر خود بیانگر افزایش فعالیت پرولیفراتیو سلول‌های مخاط نرمال و سالم در افراد سیگاری می‌باشد.

نتایج این مطالعه با مطالعات مشابه دیگر که تاکنون در این زمینه انجام یافته‌اند، مطابقت می‌کند؛ از جمله مطالعه Sampaio و همکاران که در آن با استفاده از اسپاتول چوبی از مخاط گونه، نمونه سیتولوژی گرفته شد (۷) و مطالعه Cancado و همکاران که در آن نمونه‌های سیتولوژی از دو ناحیه کف دهان و حاشیه زبان گرفته شده بود (۱۴)؛ البته نتایج برخی مطالعات نشان داده‌اند که استفاده از انواع cytobrush مؤثرتر از اسپاتول چوبی می‌باشد (۱۷)؛ بنابراین مطالعه حاضر، اولین مطالعه‌ای است که در آن از سه ناحیه آناتومیکی به طور مجزا نمونه‌برداری شده است.

Iusem توزیع و بلوغ سلول‌های اپیتلیالی مخاط دهان را در سیتولوژی مشاهده نمود و نتیجه گرفت که توزیع و بلوغ سلول‌ها در زنان، تحت تأثیر سطح استروژن قرار می‌گیرد

امید است که این مطالعه بتواند استفاده از سیتولوژی دهان را همانند سیتولوژی گردن رحم، به عنوان روشی جهت معاینات معمول دندانپزشکی مطرح سازد و روشی برای غربالگری افراد high risk جهت سرطان دهان فراهم نماید؛ البته، مطالعات بیشتری لازم است تا اهمیت یافته‌های تحقیق حاضر را در ایجاد سرطان دهان و چگونگی شکل‌گیری آن ارزیابی نماید.

منابع:

- 1- Neville BW, Dam DD, Allen CM, Bouquot JE. Oral and Maxillofacial Pathology. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 2002: 356-58.
- 2- Ogden GR, Leigh I, Chisholm DM, Cowpe JG, Lane EB. Exfoliative cytology of normal oral mucosa. Assessing the basal cell keratin phenotype. Acta Cytol 1996; 40 (5): 933-36.
- 3- Ellis E, Hupp J, Tucker M, Peterson LJ. Contemporary Oral and Maxillofacial Surgery. 3rd ed. Philadelphia: Mosby; 1998: 511.
- 4- Sugerman PB, Savage NW. Exfoliative cytology in clinical oral pathology. Aust Dent J 1996; 41 (2): 71-74.
- 5- Barsotti P, Ascoli V, Nardi F, Marinozzi V. Silver staining of interphase nucleolar organizer regions in cytologic smears previously stained by the Papanicolaou and May-Grunwald-Giemsa techniques. Diagn Cytopathol 1990; 6 (4): 289-96.
- 6- Cardillo MR. Ag-NOR technique in fine needle aspiration cytology of salivary gland masses. Acta Cytol 1992; 36 (2): 147-51.
- 7- Sampaio Hde C, Loyola AM, Gomez RS, Mesquita RA. AgNOR count in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. Acta Cytol 1999; 43 (2): 117-20.
- 8- Cabrini RL, Schwint AE, Mendez A, Femopase F, Lanfranchi H, Itoiz ME. Morphometric study of nucleolar organizer regions in human oral normal mucosa, papilloma and squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med 1992; 21 (6): 275-79.
- 9- Costa Ade L, de Araujo NS, Pinto Ddos S, de Araujo VC. PCNA/AgNOR and Ki-67/AgNOR double staining in oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med 1999; 28 (10): 438-41.
- 10- de Rosa I, Staibano S, Lo Muzio L, Delfino M, Lucariello A, Coppola A, et al. Potentially malignant and malignant lesions of the lip. Role of silver staining nucleolar organizer regions, proliferating cell nuclear antigen, p53, and c-myc in differentiation and prognosis. J Oral Pathol Med 1999; 28 (6): 252-58.
- 11- Lee YC, Chang DB, Lee JM, Luh SP, Kuo SH, Chang YL, et al. Nucleolar organizer regions as a prognostic factor in surgically treated lung cancer patients. Thorac Cardiovasc Surg 1996; 44 (4): 204-207.
- 12- Pillai KR, Sujathan K, Kannan S, Abraham EK, Mathew B, Amma NS, Nair MK, Menon VP. Argyrophilic nucleolar organizer regions in the evaluation of tumour progression in the oral mucosa: correlation with tissue pathology. J Cancer Res Clin Oncol 1994; 120 (12): 723-26.
- 13- Tuccari G, Giuffre G, Catalano A, Lentini M, Batolo D. Standardized AgNOR analysis in actinic keratosis. Am J Dermatopathol 2001; 23 (5): 407-12.
- 14- Cancado RP, Yurgel LS, Filho MS. Evaluation of the nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. Oral Oncol 2001; 37 (5): 446-54.
- 15- Gunther L, Hufnagl P. Technique and feasibility of a dual staining method for estrogen receptors and AgNORs. Anal Cell Pathol. 2000; 20 (4): 151-54.
- 16- Sujathan K, Kannan S, Pillai KR, Chandralekhya B, Amma NS, Nair MK. Significance of AgNOR count in differentiating malignant cells from reactive mesothelial cells in serous effusions. Acta Cytol 1996; 40 (4): 724-28.
- 17- Ogden GR, Cowpe JG, Green M. Cytobrush and wooden spatula for oral exfoliative cytology. A comparison. Acta Cytol 1992; 36 (5): 706-10.

- 18- Iusem R. A cytology study of the cornification of the oral mucosa in women. A preliminary report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1950; 3 (12): 1516-20.
- 19- Zimmermann ER, Zimmermann AZ. Effect of race, age, smoking habits, oral and systemic disease on oral exfoliative cytology. *J Dent Res* 1965; 44: 627-631.
- 20- Ielmini MV, Heber E, Schwint AE, Cabrini RL, Itoiz ME. AgNOR are sensitive markers of radiation lesions in squamous epithelia. *J Dent Res* 2000; 79 (3): 850-56.