

Ekspresi AgNOR dan Ekspresi Ki-67 pada Grading Adenokarsinoma Prostat

Roza Rita, Delyuzar, Lidya Imelda Laksmi

Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara
Medan

Penulis korespondensi: Dr. dr. Delyuzar, SpPA(K)

Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sumatera Utara
Jl. Universitas No. 1
Medan 20155.

e-mail: dr_delyuzar@yahoo.com tabsroza82@gmail.com HP: 0823 9111 1981

ABSTRAK

Latar belakang

Kanker prostat merupakan kanker terbanyak kedua dan penyebab kematian terbanyak kelima pada laki-laki. Biopsi jaringan merupakan standar baku dalam menegakkan diagnosis kanker prostat. Salah satu ciri khas kanker adalah aktivitas proliferasi sel yang meningkat. Aktivitas proliferasi ini dapat dilihat dengan menggunakan penanda Ki-67 dan AgNOR (*Argyrophilic nucleolar organizing region*). Tujuan penelitian ini untuk menganalisis ekspresi AgNOR dan ekspresi Ki-67 pada grading adenokarsinoma prostat.

Metode

Penelitian ini merupakan studi uji analitik dengan desain potong lintang (*cross sectional*) yang dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara/RSUP H. Adam Malik Medan. Tiga puluh sampel blok parafin yang diagnosis sebagai adenokarsinoma prostat dari pewarnaan haematoksilin & eosin dan imunohistokimia p63, dinilai grading berdasarkan gleason grade group dan diperiksa dengan pewarnaan AgNOR dan Ki-67.

Hasil

Ekspresi AgNOR yang diperoleh pada grading adenokarsinoma prostat *group* 1, 2, 3, 4, dan 5 berturut-turut adalah 43; 32,40 ($\pm 14,54$); 64,29 ($\pm 28,2$); 59,5 ($\pm 28,32$); 69,22 ($\pm 29,26$). Ekspresi Ki-67 pada setiap grading adenokarsinoma prostat *group* 1, 2, 3, 4, dan 5 secara berurutan adalah 43; 32,4 ($\pm 14,53$); 64,29 ($\pm 28,2$), 59,5 ($\pm 28,31$); 69,22 ($\pm 29,26$). Analisis statistik menunjukkan korelasi yang tidak signifikan antara *grading* adenokarsinoma prostat dan ekspresi AgNOR ($p=0,07$), dan ekspresi Ki-67 ($p=0,18$). Namun, terdapat hubungan yang signifikan antara ekspresi Ki-67 dan *grading* adenokarsinoma prostat ($p=0,34$).

Kesimpulan

Ki-67 dapat digunakan sebagai penanda prognostik untuk adenokarsinoma prostat.

Kata kunci: AgNOR, Ki-67, gleason *grade group*, adenokarsinoma prostat.

Correlation between AgNOR Expression and Ki-67 Expression with Prostate Adenocarcinoma Grading

ABSTRACT

Background

Prostate cancer is the second most common cancer and fifth most common cancer cause of death in males. Tissue biopsy is a gold standard examination to diagnose prostate cancer. One of the hallmarks of cancer is increased activity of cell proliferation. This activity can be detected with Ki-67 and AgNOR (*Argyrophilic nucleolar organizing region*). The aim of this study is to analyzed correlation between AgNOR and Ki-67 expression in grading of prostatic adenocarcinoma.

Methods

This analytic cross-sectional study was held in Laboratory of Anatomical Pathology of Medical Faculty of USU/ RSUP H. Adam Malik Medan. Thirty paraffin blocks diagnosed with prostate adenocarcinoma were stained with H&E and p63 immunohistochemistry then evaluated based on Gleason's histopathological grading and stained with Agnor and Ki 67.

Results

AgNOR expression yang diperoleh pada grading adenokarsinoma prostat *group* 1, 2, 3, 4, dan 5 berturut-turut adalah 43; 32,40 ($\pm 14,54$); 64,29 ($\pm 28,2$); 59,5 ($\pm 28,32$); 69,22 ($\pm 29,26$). Ekspresi Ki-67 pada setiap grading adenokarsinoma prostat *group* 1, 2, 3, 4, dan 5 secara berurutan adalah 43; 32,4 ($\pm 14,53$); 64,29 ($\pm 28,2$), 59,5 ($\pm 28,31$); 69,22 ($\pm 29,26$). Statistical analyses showed that there was no significantly correlation between grading of prostate adenocarcinoma and AgNOR expression ($p=0.065$), and Ki-67 expression ($p=0.18$). Nevertheless, a significantly correlation between KI-67 expression and grading of prostate adenocarcinoma was found ($p=0.34$).

Conclusion

Ki-67 could be used as prognostic indicator for prostate adenocarcinoma.

Key words: AgNOR, Ki-67, Gleason grade group, prostate adenocarcinoma.

PENDAHULUAN

Kanker prostat merupakan kanker terbanyak kedua dengan perkiraan 1,1 juta kasus baru dan juga penyebab kematian terbanyak kelima pada laki-laki. Insidensinya meningkat dari 20% pada laki-laki berusia 50 tahun menjadi sebesar 70% pada laki-laki berusia 70-80 tahun.¹ Adenokarsinoma prostat merupakan jenis kanker yang paling sering, dimana insidensi tertinggi dijumpai di Amerika Utara, Karibia, Brazil, negara Eropa tertentu, Australia dan New Zealand, sedangkan insidensi terendah dijumpai di Asia, beberapa negara di Timur Tengah dan Afrika.^{2,3}

Beberapa upaya dapat dilakukan dalam mendiagnosis adenokarsinoma prostat dan salah satunya adalah pemeriksaan histopatologi.⁴ Pada umumnya diagnosis histopatologi, dibuat berdasarkan kumpulan temuan arsitektur kelenjar, morfologi sel, dan gambaran spesifik lainnya.² Arsitektur kelenjar yang dijumpai akan menentukan *gleason grade group* adenokarsinoma prostat dan hal ini berkaitan dengan prognosis, di mana semakin tinggi *grade group* menunjukkan prognosis yang semakin buruk.³

Peningkatan aktivitas proliferasi sel yang juga merupakan salah satu ciri khas kanker. Aktivitas proliferasi sel kanker pada prostat menjadi bukti adanya cedera dari sel epitel yang berhubungan dengan karsinogen, estrogen, atau oksidan yang dapat dipicu oleh peradangan kronis.^{5,6} Melalui pemeriksaan histopatologi, aktivitas proliferasi sel tersebut dapat dinilai dengan beberapa metode, diantaranya adalah dengan menggunakan pulasan histokimia AgNOR (*Argyrophilic nucleolar organizing region*) dan pulasan imunohistokimia Ki-67.⁴

Nucleolar organizing regions (NORs) merupakan lokus genetik pada kromosom yang terdiri dari DNA ribosom (rDNA) dan protein, yang memiliki karakteristik argirofilik.⁷⁻⁹ Oleh karena ribosom merupakan lokasi utama biosintesis protein, maka jumlah ekspresi AgNOR mungkin mencerminkan aktivitas nukleus dan seluler, serta berkaitan dengan lamanya siklus sel pada sel yang berproliferasi.^{10,11} Semakin pendeknya siklus sel, semakin tinggi sintesis rRNA untuk masing-masing unit waktu, sehingga kuantitas AgNOR yang ada pada nukleolus menjadi lebih banyak.¹² Pulasan AgNOR sebelumnya sudah pernah dilakukan untuk mengevaluasi aktivitas proliferasi pada ameloblastoma dan tumor odontogenik keratistik, kanker oral, kanker serviks, karsinoma musino-

sum ovarium, mesotelioma, dan lain-lain.¹³⁻¹⁵ Pada lesi prostat, AgNOR sangat membantu dalam membedakan lesi *benign* dan *malignant*.^{16,17}

Ki-67 merupakan suatu protein berbasis nuklear telah digunakan selama 2 dekade untuk menilai pertumbuhan seluler, dan mempunyai prediksi prognostik pada sejumlah penyakit keganasan. Ki-67 adalah suatu antigen diekspresikan oleh nukleus sel yang sedang menjalani sintesis DNA sehingga merupakan penanda sensitif terhadap proliferasi sel.⁵ Banyak peneliti merekomendasikan penggunaan Ki-67 sebagai penanda prognostik dibandingkan angka mitosis.¹⁸

Oleh karena sistem *grading* adenokarsinoma prostat dengan menggunakan *Gleason grade group* tidak dapat mengukur aktivitas proliferasi sel, besar kemungkinan bahwa pengukuran laju proliferasi sel pada adenokarsinoma prostat dapat memberikan informasi prognostik tambahan.¹⁹ Dengan mempertimbangkan hal-hal yang telah diuraikan, maka peneliti tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis ekspresi AgNOR dan ekspresi Ki-67 pada *grading* adenokarsinoma prostat.

METODE

Penelitian ini merupakan studi uji analitik dengan desain potong lintang (*cross sectional*) yang dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara/RSUP H. Adam Malik Medan. Sampel pada penelitian ini adalah blok parafin jaringan prostat yang berasal dari *transurethral resection of prostate* (TURP) dengan diagnosis histopatologi adenokarsinoma prostat dan dikonfirmasi dengan IHC p63 sebagai suatu lesi *malignant*. Pengambilan sampel dilakukan dengan metode *consecutive sampling*.

Pada pulasan AgNOR, dipersiapkan larutan A (25% *silver nitrate solution*) dan larutan B (2% larutan gelatin dalam asam format 1%). Dua bagian dari larutan A dicampur dengan satu bagian larutan B untuk membuat *working solution*. Blok parafin dideparafinisasi dengan *xylene* sebanyak 3 kali, masing-masing 3 menit. Rehidrasi *slaid* dengan menggunakan etanol 100%, etanol 95%, dan etanol 70% masing-masing selama dua menit, dua menit, satu menit dan terakhir dengan air selama satu menit. Imersikan *slaid* dalam buffer natrium sitrat (pH6). Inkubasi *slaid* di dalam autoklaf pada

suhu 120°C (tekanan 1,1-1,2 bar) selama 20 menit. Dinginkan slaid sampai suhu 37°C. Imersikan slaid ke dalam larutan pengecatan perak yang telah dipersiapkan dalam suhu 37°C selama 1 menit. Reaksi pemulasan dihentikan dengan mencuci slaid menggunakan *aqua bidestilata* untuk menghilangkan presipitat perak non spesifik. Dehidrasi slaid menggunakan etanol dengan konsentrasi yang dinaikkan secara bertingkat (50%, 70%, 95%). Slaid dibersihkan dengan *xylene* dan kemudian slaid ditutup dengan *coverslip*.⁸ Ekspresi atau indeks proliferasi AgNOR dinilai dengan menentukan persentase nukleus yang memiliki lima atau lebih titik AgNOR per 100 sel.²⁰

Pada pulasan Ki-67, blok parafin dipotong dengan mikrotom dengan ketebalan 4µm, kemudian slaid dideparafinisasi dengan *xylol*, direhidrasi dengan etanol konsentrasi menurun, dan diikuti dengan *phosphat buffer saline* (PBS) selama 3x5 menit. Slaid kemudian diinkubasi pada DAKO *Buffer antigen Retrieval* pada *microwave* suhu 94°C selama 20 menit dan dilanjutkan dengan pendinginan selama 20 menit pada suhu ruangan dan dicuci dengan PBS 3x5 menit, kemudian diinkubasi pada blok peroksidase Dako Cytomotion, PBS 3x5 menit dan inkubasi dengan antibodi Ki-67 selama *overnight* suhu 400°C. Setelah inkubasi dengan Ki-67, sediaan diinkubasi lagi dengan antibodi kedua sistem HRP, DakoCytomotion selama 60 menit pada temperatur ruang, dicuci dengan PBS 3x5 menit, di-*counterstain*, didehidrasi dengan etanol konsentrasi meningkat dimulai dari 70% sampai 100%. Slaid dibersihkan dengan *xylene* dan kemudian slaid ditutup dengan *coverslip*. Ekspresi Ki-67 dinilai dengan menentukan persentase jumlah sel yang terpulas positif pada 100 sel tumor dalam 5 lapangan pandang besar.²¹

Data yang diperoleh pada penelitian ini akan dianalisis menggunakan bantuan perangkat lunak statistik. Distribusi data pada setiap *Gleason grade group*, serta *mean* dan standar deviasi (SD) ekspresi AgNOR dan Ki-67 akan dihitung menggunakan analisis univariat. Korelasi AgNOR dan Ki-67 dengan *grading* adenokarsinoma prostat akan diuji menggunakan uji korelasi Spearman. p-value <0,05 dianggap signifikan secara statistik.

HASIL

Sebanyak 30 blok parafin dengan diagnosis

adenokarsinoma prostat dari TURP yang diperiksa dengan pulasan H&E dan p63. Semua blok parafin tersebut diambil menjadi sampel penelitian dan dinilai *grading*-nya berdasarkan *gleason grade group*. Sampel diperiksa dengan pulasan AgNOR dan Ki-67 untuk menilai aktivitas proliferasi.

Tabel 1. Ekspresi pulasan AgNOR pada setiap *grading* adenokarsinoma prostat dan korelasinya.

Grade group	AgNOR			r	p-value
	Frek	Mean	SD		
Grade group 1	1	43.00	.	0,28	0,07
Grade group 2	5	32.40	14.53		
Grade group 3	7	64.29	28.20		
Grade group 4	8	59.50	28.32		
Grade group 5	9	69.22	29.26		
Total	30	58.47	28.16		

Keterangan: Grade group 1: Gleason score 6; Grade group 2: Gleason score 7 (3+4); Grade group 3: Gleason score 7 (4+3); Grade group 4: Gleason score 8 (4+4), (3+5), (5+3); Grade group 5: Gleason score 9-10.

Mean (±SD) ekspresi AgNOR yang diperoleh pada *grade group* 1, 2, 3, 4, dan 5 berturut-turut adalah 43; 32,40 (±14,54); 64,29 (±28,2); 59,5 (±28,32); 69,22 (±29,26). Nilai r kemudian dianalisis dengan uji Spearman untuk melihat korelasi kedua variabel dan diperoleh sebesar 0,28, dengan p-value yaitu 0,07. Hasil ini menunjukkan bahwa *grading* adenokarsinoma prostat tidak mempunyai hubungan yang signifikan dengan nilai AgNOR.

Tabel 2. Ekspresi pulasan Ki-67 pada setiap *grading* adenokarsinoma prostat dan korelasinya

Grade group	Ki-67			r	p-value
	Frek	Mean	SD		
Grade group 1	1	43.00	.	0.34	0.03
Grade group 2	5	32.40	14.53		
Grade group 3	7	64.29	28.20		
Grade group 4	8	59.50	28.32		
Grade group 5	9	69.22	29.26		
Total	30	58.47	28.16		

Keterangan: Grade group 1: Gleason score 6; Grade group 2: Gleason score 7 (3+4); Grade group 3: Gleason score 7 (4+3); Grade group 4: Gleason score 8 (4+4), (3+5), (5+3); Grade group 5: Gleason score 9-10.

Nilai *mean* (±SD) ekspresi Ki-67 pada setiap *grade group* 1, 2, 3, 4, dan 5 secara berurutan adalah 43; 32,4 (±14,53); 64,29 (±28,2), 59,5 (±28,31); 69,22 (±29,26). Hasil *grading* berdasarkan Gleason dan hasil Ki-67 kemudian dicari korelasinya dengan menggunakan uji korelasi Spearman. Nilai korelasi adalah 0,34 dan nilai p-value 0,03, yang menunjukkan adanya korelasi yang signifikan antara kedua

variabel tersebut dengan kekuatan hubungan sedang (*moderate*).

Tabel 3. Korelasi antara ekspresi histokimia AgNOR dengan ekspresi imunohistokimia Ki-67.

	Ki-67	AgNOR	r	P-value
Mean (SD)	58,47(28,16)	58,2(27,58)	0,17	0,18
Minimum (%)	10	11		
Maksimum (%)	100	100		

Pada pemeriksaan Ki-67 dan AgNOR juga dinilai korelasi keduanya. Dari analisis uji Spearman, diperoleh nilai r sebesar 0,17 dan p-value sebesar 0,18. Hasil ini menunjukkan tidak terdapat korelasi antara kedua variabel tersebut.

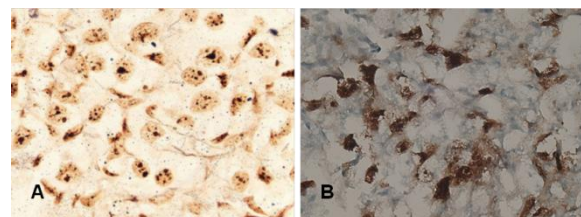
DISKUSI

Pada penelitian ini, *gleason grade group* 1 mempunyai jumlah frekuensi paling sedikit (3,3%), dan *grade group* 5 mempunyai frekuensi paling banyak (30%). Hal ini diduga karena keterbatasan jumlah pemeriksaan skrining baik terhadap individu asimtomatis maupun individu dengan risiko kanker prostat, serta lesi Adenokarsinoma prostat *grade group* bersifat asimtomatis sehingga tidak mudah dideteksi pada stadium awal.

Metode pulasan AgNOR telah digunakan untuk tujuan diagnosis tumor dan telah secara luas digunakan sebagai metode alternatif untuk menilai proliferasi sel tumor. Pada sel tumor, hubungan antara proliferasi sel dan jumlah AgNOR telah banyak diteliti, dimana AgNOR dilaporkan dapat membantu menilai proliferasi tumor. Nilai AgNOR pun dilaporkan secara bermakna lebih tinggi pada adenokarsinoma prostat dibandingkan *benign prostate hyperplasia* (BPH). Distribusi AgNOR pada sel yang lambat dan cepat berproliferasi dapat dijelaskan dengan fungsi strukturnya dan protein AgNOR pada sintesis rRNA. Sel-sel yang cepat membelah harus mengumpulkan biogenesis ribosom mereka dalam jangka waktu yang lebih pendek daripada sel-sel yang lambat membelah karena aktivitas selularnya. Hal ini dapat dilakukan dengan mengaktifkan sejumlah besar rDNA *sequence* untuk transkripsi. Karena itu, lebih banyak jumlah protein AgNOR harus disintesis yang akan meningkatkan jumlah AgNOR *interphase*, yang memiliki unit struktural-fungsional untuk sintesis rRNA.

Pada penelitian ini diduga ekspresi AgNOR tidak mempunyai hubungan yang

signifikan dengan *Gleason grade group*. Beberapa penelitian sebelumnya menyatakan bahwa p53, Bcl-2 dan AgNOR dapat digunakan untuk memprediksi karakteristik kanker prostat, dan AgNOR menunjukkan korelasi dengan *Gleason score*, stadium AJCC, dan kadar PSA; serta pulasan AgNOR tidak menunjukkan korelasi signifikan dengan ketiga komponen tersebut.²² Penelitian terdahulu juga menyatakan bahwa AgNOR berguna untuk membedakan BPH dan adenokarsinoma prostat, namun tidak dapat digunakan sebagai indikator untuk *grading* adenokarsinoma prostat.²³



A. Histokimia AgNOR 1000x; B. Imunohistokimia Ki-67 400x

Pulasan imunohistokimia Ki-67 merupakan pemeriksaan yang relatif baik dan dapat digunakan untuk mengetahui fraksi pertumbuhan populasi sel neoplastik. Penyakit neoplastik dikarakteristikan dengan pertumbuhan sel yang tidak terkoordinasi. Aktivasi protoonkogen dan inaktivasi *tumor supressor gene* merupakan kejadian utama genetik dan epigenetik yang menyebabkan transformasi neoplastik. Selama beberapa tahun terakhir, laju proliferasi kanker telah dinilai menggunakan *mean* penanda imunohistokimia dan dimanfaatkan sebagai penanda prognostik potensial.²³

Hasil penelitian ini mengenai korelasi antara ekspresi Ki-67 dan *grading* adenokarsinoma prostat menunjukkan adanya hubungan signifikan (p=0,033) dengan kekuatan korelasi sedang (r=0,34). Hasil ini sejalan dengan penelitian terdahulu yang menyatakan adanya korelasi positif antara ekspresi Ki-67 dan *Gleason grade group*, serta ekspresi Ki-67 yang tinggi merupakan suatu penanda prognostik independen untuk kegagalan biokimia, *gleason grade group* yang tinggi, dan ukuran tumor yang lebih besar.²⁴ Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa ekspresi Ki-67 dan *Gleason score* pada kanker prostat menunjukkan hubungan kuat yang tinggi.^{25,26} Sedangkan, peneliti lainnya menyatakan bahwa ekspresi Ki-67 dan *grading*

adenokarsinoma prostat secara kualitatif menyatakan adanya hubungan signifikan antara kedua variable,²⁵ juga membentuk suatu pola linear dan meningkat dari *grading group* rendah ke tinggi;⁷

Hasil penelitian ini melaporkan bahwa ekspresi Ki-67 dan AgNOR, serta Ki-67 dan gleason *grade group* menunjukkan korelasi yang tidak signifikan yang diduga disebabkan karena keterbatasan AgNOR. Pada penelitian sebelumnya menyatakan bahwa hal ini diduga disebabkan adanya *overlapping* perhitungan pada beberapa *grade*. Selain itu, AgNOR sebagai suatu penanda proliferasi murni harus diinterpretasikan dengan teliti, karena ekspresi AgNOR *interphase* cenderung dipengaruhi oleh aktivitas transkripsional lain, seperti adanya temuan yang menunjukkan bahwa kuantitas AgNOR dapat mencerminkan diferensiasi selular ataupun bahwa AgNOR dapat diturunkan dari siklus sel sebelumnya.

KESIMPULAN

Ki-67 dapat digunakan sebagai penanda prognostik untuk adenokarsinoma prostat.

DAFTAR PUSTAKA

1. Verma R, Gupta V, Singh J, Verma M, Gupta G, Gupta S, *et al*. Significance of p53 and Ki-67 expression in prostate cancer. *Urol Annals*. 2015; 7(4):488-93.
2. Epstein JI. The lower urinary tract and male genital system. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC, editors. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. China: Saunders Elsevier; 2010. p.993-1001.
3. Humphrey PA, Amin MB, Berney DM, Billis A, Cao D, Cheng L, Delahunt B, *et al*. Acinar adenocarcinoma. In: Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE, editors. *WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs*. 4th Edition. Lyon: IARC; 2016. p.138-61.
4. Kurnia I, Bintari SH, Khaisuntaha M. Tingkat keganasan kanker serviks pasien pra-radiasi melalui pemeriksaan AgNORs, Mib-1 dan Cas- 3. *Biosantika*. 2012; 4(2):53-61.
5. Tollefson MK, Karnes RJ, Kwon ED, Lohse CM, Rangel LJ, Mynderse LA, *et al*. Prostate cancer Ki-67 (MIB-1) expression, perineural invasion, and Gleason score as biopsy-based predictors of prostate cancer

- mortality: The Mayo model. *Mayo Clin Proc*. 2014; 89(3):308-8.
6. Caliskan S, Koca O, Akyuz M, Ozturk M, Karaman M. Clinical significance of single microscopic focus of adenocarcinoma at prostate biopsy. *Prostate Int*; 2015, 3:132-4.
7. Rajeshwari K, Damle R, Dravid N, Karibasappa GN. Argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) as proliferative marker in various prostatic lesions. *Indian J Pathol and Oncol*. 2015; 2(3):126-30.
8. Eroz R. Argyrophilic nucleolar organizing regions associated proteins in oncocytopology. *Oncocytol*. 2015; 5:21-4.
9. Torabi-Nezhad S, Kheradmand P. Differentiation between prostatic carcinoma and benign prostatic hyperplasia by AgNOR staining. *MJIRI*. 1999; 12(4): 333-8.
10. Hendrianto, Lubis HMND, Lukito JS. Perbedaan tampilan imunohistokimia p63 antara neoplasia intraepitel prostat dengan adenokarsinoma prostat. *Maj Patologi Indonesia*. 2012; 2(1):8-13.
11. Khanna A, Patil R, Deshmukh A. Assessment of the potential of pathological stains in human prostate cancer. *J Clin Diag Res*. 2014; 8(1):124-8.
12. Elemam IBY, Elsheikh MA, Elnour AMA, Elhaleem HMMA, Alobaid AEA. Assessment of proliferation activity by using nucleolar organiser regions count among Sudanese patients with prostate cancer and benign prostate hyperplasia. *J Pharm Biomed Sci*. 2015; 5(11):863-6.
13. Goel T, Garg S. Role of AgNOR count and its correlation with serum PSA levels in prostatic lesions. *Urol Int*. 2009; 82: 286-90.
14. Gulia SP, Sitaramam E, Reddy KP. The role of silver staining nucleolar organiser regions (AgNORs) in lesions of the oral cavity. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2011; 5(5):1011-5.
15. Akhtar K, Mehdi G, Maheshwari V, Siddiqui SA, Sharma R. Diagnostic and prognostic significance of AgNOR counts in radiotherapy treated squamous cell carcinoma of the cervix. *J Obstet Gynecol India*. 2005; 55(2):163-6.
16. Subathra K, Sangeetha N. Histopathological study of prostatic lesions and assessment with AgNOR index. *Int J Pharm Bio Sci*. 2014; 5(2):253-60.

17. Rita R, Delyuzar, Laksmi LI. AgNOR histochemical expression in benign prostatic hyperplasia and prostatic adenocarcinoma. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. 2018; 125(1):012220.
18. Li LT, Jiang G, Chen Q, Zheng JN. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review). Mol Med Reports. 2015; 11:1566-72.
19. Fisher G, Yang ZH, Kudahetti S, Moller H, Scardion P, Cuzick J, et al. Prognostic value of Ki-67 for prostate cancer death in a conservatively managed cohort. British J Cancer. 2013; 108: 271-7.
20. Hossain MI, Hassan MQ, Bhattacharjee P, Ahamad MSU, Rahman Z. Role of multiparameter analysis of AgNORs in FNA smears of thyroid swellings in differentiating benign and malignant lesions. Pathology Res Int. 2012; 2012:908106.
21. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. J Cell Physiol. 2000; 182:311-22.
22. Munda M, Hajdinjak T, Kavalar R, Stiblar MD. p53, Bcl-2 and AgNOR tissue markers: model approach in predicting prostate cancer characteristics. J Int Med Res. 2009; 37(6):1868-76.
23. Gupta V, Garg M, Chaudhry M, Singh S, Sen R, Gill M, et al. Role of cyclin D1 immunoreactivity and AgNOR staining in the evaluation of benign and malignant lesions of the prostate. Prostate Int. 2014; 2(2):90-6.
24. Richardsen E, Andersen S, Al-Saad S, Rakae M, Nordby Y, Pedersen MI, et al. Evaluation of the proliferation marker Ki-67 in a large prostatectomy cohort. PloS One. 2017; 12(11): e0186852.
25. Sulik M, Guzinska-Ustymowicz K. Expression of Ki-67 and PCNA as proliferating markers in prostate cancer. Roczn Acad Med Bialymst. 2002; 47:262-9.
26. Mesko S, Kupelian P, Demanes DJ, Huang J, Wang PC, Kamrava M. Quantifying the Ki-67 heterogeneity profile in prostate cancer. Prostate Cancer. 2013; 2013:717080.