

Sıçanlarda melatonin hormonunun tiroid folliküler hücreleri üzerine etkisi: AgNOR boyama ve elektron mikroskopik çalışma

İlter KUŞ*, Jale ÖNER**, Ahmet SONGUR*, Oğuz Aslan ÖZEN***, Mustafa SARSILMAZ*

* Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı,

** Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, ELAZIĞ

*** Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, ZONGULDAK

ÖZET

Bu çalışma, pinealektominin ve pinealektomi sonrası uygulanan melatoninin tiroid bezi üzerine etkisinin araştırılması amacıyla yapıldı. Bu amaçla 18 adet Wistar-Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar üç gruba ayrıldı. Grup I ve Grup II sırasıyla kontrol (Sham-pinealektomi) ve pinealektomili sıçanlar olarak düzenlendi. Grup III'deki sıçanlara da pinealektomi sonrası günlük olarak ve bir ay süresince melatonin enjeksiyonu yapıldı. Deney süresi sonunda hayvanlar vasküler perfüzyonla öldürüldü. Daha sonra sıçanlardan alınan tiroid doku örneklerinden bir kısmı AgNOR tekniği ile boyandı ve ışık mikroskopta incelenerek tiroid hücre çekirdeklerindeki AgNOR sayıları belirlendi. Tiroid doku örneklerinin bir kısmında da elektron mikroskopik inceleme yapıldı. Çalışmamızda, pinealektomi sonrası tiroid epitel hücre çekirdeklerindeki AgNOR taneciklerinin sayısında artışla birlikte mitoz aktivasyon artışını gösteren bulgular gözlemlendi. Ayrıca hücre sitoplazmalarındaki lizozom ve salgı granüllerinde artış görüldü. Melatonin enjekte edilen grupta ise, hücre çekirdeklerindeki AgNOR taneciklerinin sayısında düşüş olduğu belirlendi. Bununla birlikte, pinealektomi sonrası tiroid epitel hücrelerinde gözlenen ve hücre aktivasyon artışını gösteren ultrastruktürel değişikliklerin melatonin uygulaması ile kaybolduğu tespit edildi. Sonuç olarak, pinealektomi sonrası tiroid epitel hücre proliferasyonunda ve hücre aktivasyonunda artış meydana geldiği, melatonin enjeksiyonu ile de bu artışın gerilediği görüldü.

Anahtar Kelimeler: Sıçan, melatonin, tiroid bez, ışık ve elektron mikroskopu.

SUMMARY

Effects of melatonin hormone on the thyroid follicular cells in rats: AgNOR staining and electron microscopic study

This study was undertaken to examine effects of pinealectomy and pinealectomy followed by melatonin administration on thyroid gland. For this purpose 18 male Wistar rats were used. Animals were divided into three groups. Group I and II were designated as sham-pinealectomized (control) and pinealectomized, respectively. The rats in Group III were pinealectomized and daily injected with melatonin for 1 month. At the end of the experiment, all animals were killed by vascular perfusion. The thyroid glands of rats were removed, then some of the thyroid tissue specimens were stained with AgNOR technique and examined by light microscopy. AgNOR numbers in nuclei of thyroid follicular cells were counted. Some of the tissue specimens were examined by electron microscopy. In our study, some findings proving the increase of mitoz activation along with the increase in the number of AgNOR granules in cell nuclei of thyroid epithel were observed after pinealectomy. Furthermore, lizozomes and secretory granules in the cytoplasm of thyroid follicular cells were increased. In the melatonin injected group, the number of AgNOR granules in cell nuclei were decreased. Additionally, ultrastructural changes, which indicate the increase of cell activation and is visible in thyroid epithel cells after pinealectomy were disappeared following injection of melatonin. In conclusion, it was observed that there has been an increase in thyroid epithel cell proliferation and in cell activation after pinealectomy and this increase has been reversed by melatonin injection.

Key Words: Rat, melatonin, thyroid gland, light and electron microscopy.

Nöroendokrin bir organ olan pineal bez ışık ve karanlık ortamlara göre, başta endokrin sistem olmak üzere diğer birçok sistemin fonksiyonlarındaki değişiklikleri düzenler. Sirkadiyan bir ritimde ve karanlıkta salgıladığı melatonin hormonu vasıtasıyla vücudun diğer kısımlarına zaman sinyalleri gönderir. Böylece günün ve yılın farklı zamanlarına bağlı

fizyolojik siklusların düzenlenmesinde görev alır (1-4). Melatoninin hipotalamus-hipofiz-tiroid bez ekseninde inhibitör bir etkiye sahip olduğu kabul edilmektedir (1,2). Deneysel olarak yapılan çalışmalarda, melatonin hormonunun tiroid bez yapısında ve fonksiyonlarında değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (5-26).

Haberleşme Adresi: Dr. İlter KUŞ, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı, ELAZIĞ

Geliş Tarihi : 06.11.2002

Yayına Kabul Tarihi : 16.01.2003

Tiroid bez dokusu epitel hücreleri ile çevrili folliküllerden oluşur. Folliküler epitel hücrelerinin görünümü bezin fonksiyonuna göre yassı ile prizmatik arasında değişir ve bu hücreler mikrovilluslara sahiptir. Follikül lumeni ise kolloid adı verilen madde ile doludur. Folliküler epitel hücrelerinden metabolizmayı uyaran tiroksin (T3) ve triiodotironin (T4) hormonları salgılanır. Bez dokusunda bulunan diğer bir hücre tipi ise parafolliküler hücrelerdir. Bu hücreler tiroid follikülleri arasında izole gruplar halinde ya da follikül epitelinin bir parçası olarak yer alır. Parafolliküler hücreler, folliküler hücrelerden daha büyüktür ve daha açık boyanırlar. Bu hücrelerden kalsitonin salgılanır. Bez dıştan bağ dokusu karakterinde bir kapsül ile çevrilidir. Kapsülden ayrılan septumlar parankima içerisine uzanarak follikülleri birbirinden ayırır. Folliküller arasında ise kan ve lenf kapıllar ağı bulunur (27).

Çekirdekçik düzenleme bölgeleri (NOR) gümüşleme yöntemiyle boyanan bir grup argirofilik proteini içeren çekirdek yapıları olarak tanımlanır (28). Bunlar ribozomal gen alanlarını içeren DNA ilmekleridir (29). Yüksek şekilde proliferen olan hücrelerde birikirler, proliferen olmayan hücrelerde çok az sayıda bulunurlar (30, 31). Işık mikroskopunda, basit gümüş boyama tekniği ile çekirdek içinde küçük koyu benekler halinde görülürler (28, 29, 32). Miktarları ve yerleşimleri, çekirdeğin yapısı ve aktivitesi ile yakından ilişkilidir (32). Bu proteinler mitoz sırasında, çekirdekçik düzenleme bölgeleri ile birlikte bulunurlar (30).

Hücrelerde AgNOR miktarının tanımlanması, kalitatif olarak saptanması son yıllarda, özellikle tiroid lezyonlarının sınıflandırılması konusunda bir çok çalışmaya konu olmuştur ve AgNOR sayısının, hücre proliferasyonunun bir belirleyicisi olduğu düşünülmektedir (33).

Çalışmamızda, pinealektominin ve pinealektomi sonrası uygulanan melatonin hormonunun tiroid folliküler hücreleri üzerine etkisinin AgNOR boyama tekniği ve elektron mikroskopu düzeyinde incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada 180-200 gr ağırlığında toplam 18 adet Wistar-Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar üç gruba ayrıldı. Grup I (n=6) ve Grup II (n=6) sırasıyla kontrol (Sham-pinealektomi) ve pinealektomili sıçanlar olarak düzenlendi. Bu hayvanlara günlük olarak ve derialtı yolla fizyolojik tuzlu su (FTS)

ile sulandırılmış 0.1 ml %10'luk etanol enjekte edildi. Grup III'deki (n=6) sıçanlara da pinealektomi sonrası günlük dozu 3 mg/kg olan melatonin (Sigma Chemical Co.), FTS ile sulandırılmış 0.1 ml etanol içerisinde yine derialtı yolla enjekte edildi. Bir aylık deney süresi sonunda tüm sıçanlar Rompun/Ketamin kombinasyonu ile genel anestezi altına alındıktan sonra, 0.2 M fosfat tamponunda hazırlanmış %2.5'luk Gluteraldehit kullanılarak vasküler perfüzyonla öldürüldü. Bütün hayvanların tiroid bezleri çıkartıldıktan sonra rutin histolojik yöntemlerden geçirilerek parafin ve elektron mikroskopik blokları hazırlandı. Parafin bloklardan 5 mikron kalınlığında kesitler alınarak AgNOR tekniği ile boyandı ve Olympus BH-2 araştırma mikroskopunda incelendi. Her bir grupta 100 hücre incelendi ve 100 hücredeki AgNOR sayıları belirlendi. Gruplara ait AgNOR sayılarının istatistiksel değerlendirilmesi için, varyans analizi ve Tukey testi kullanıldı. Veriler aritmetik ortalama \pm standart hata şeklinde tabloya geçirildi. Elektron mikroskopik bloklardan ise ince kesitler alınarak Kurşun sitrat-Uranil asetat'la boyandı ve Carlzeiss-900 Elektron Mikroskopunda incelendi.

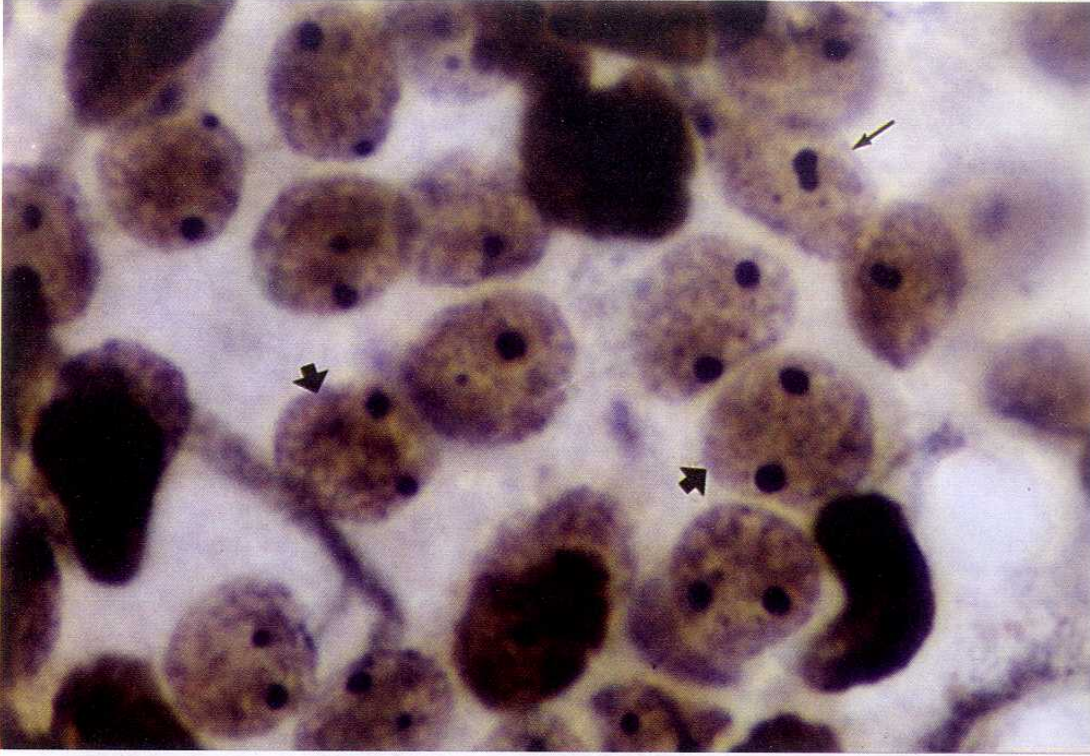
BULGULAR

Kontrol (Sham-pinealektomi), pinealektomi ve pinealektomi sonrası melatonin uygulanan gruplara ait tiroid bez dokuları AgNOR tekniği ile boyandı. Tiroid follikül hücrelerinin çekirdekleri içinde küçük koyu benekler şeklinde boyanmış alanlar gözlemlendi.

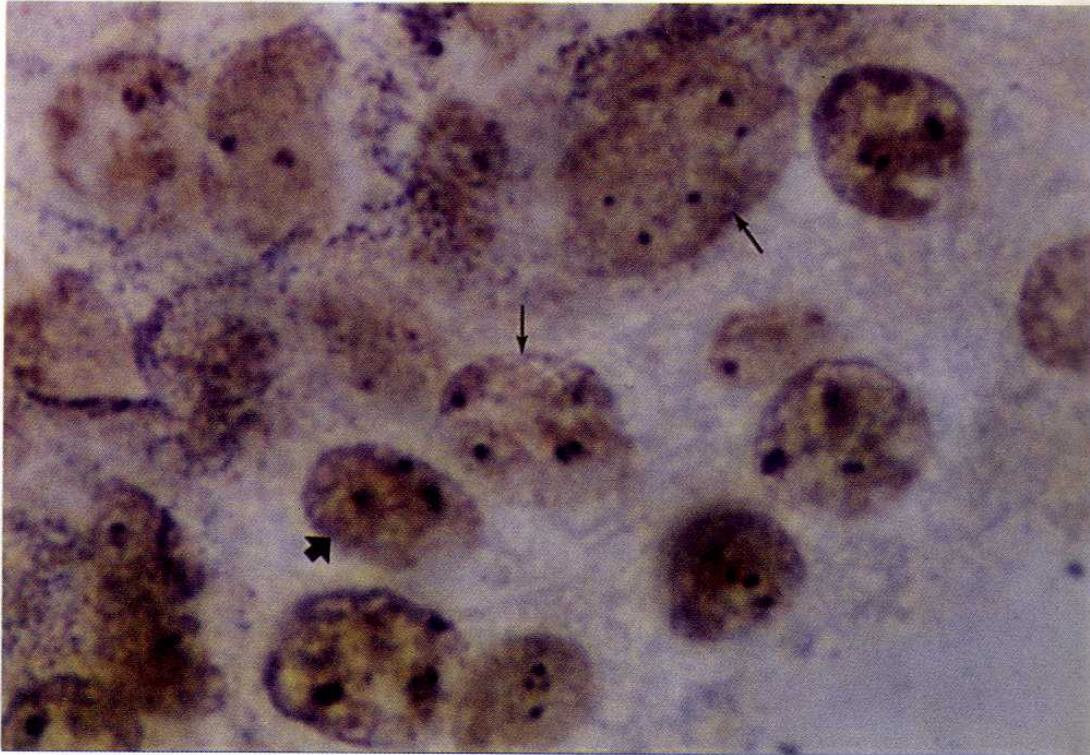
Kontrol (Sham-pinealektomi) grubuna ait tiroid bez dokusu incelendiğinde folliküler epitel hücre çekirdeklerinde AgNOR genellikle 2'li, seyrek olarak 3'lü gruplar şeklinde tanımlandı (Şekil 1).

Pinealektomi sonrası follikül epitel hücrelerindeki AgNOR miktarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olduğu ($p<0.001$) ve 4'lü, 5'li grupların daha yoğun olarak bulunduğu tespit edildi (Şekil 2, Tablo 1). Ayrıca pinealektomi sonrası tiroid folliküler epitel hücrelerinde mitoz aktivasyon artışını gösteren figürler yaygın olarak gözlemlendi (Şekil 3).

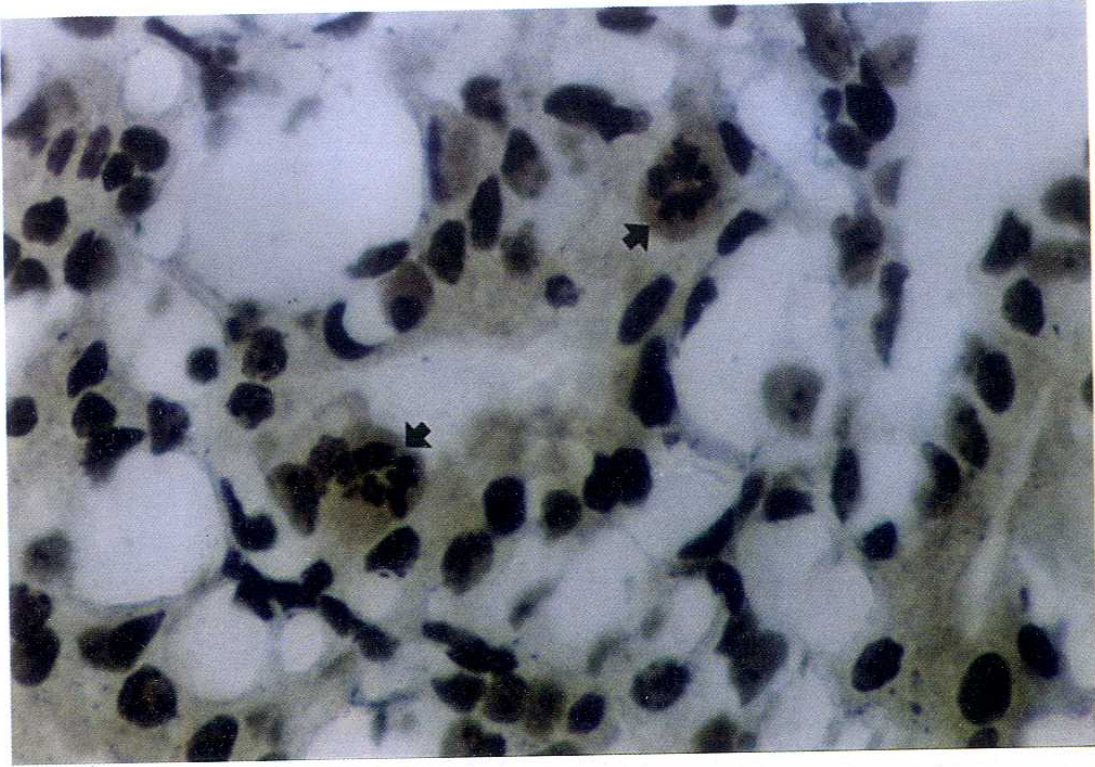
Pinealektomi sonrası melatonin uygulanan gruba ait tiroid dokusu incelendiğinde ise, folliküler epitel hücrelerindeki AgNOR miktarlarında bir düşüş olduğu ve 1'li, 2'li grupların sık olduğu tespit edildi (Şekil 4). Bu grupta AgNOR miktarlarındaki bu düşüşün, istatistiksel açıdan pinealektomi grubuna göre anlamlı ($p<0.001$), kontrol grubuna göre ise anlamsız olduğu ($p>0.05$) belirlendi (Tablo 1).



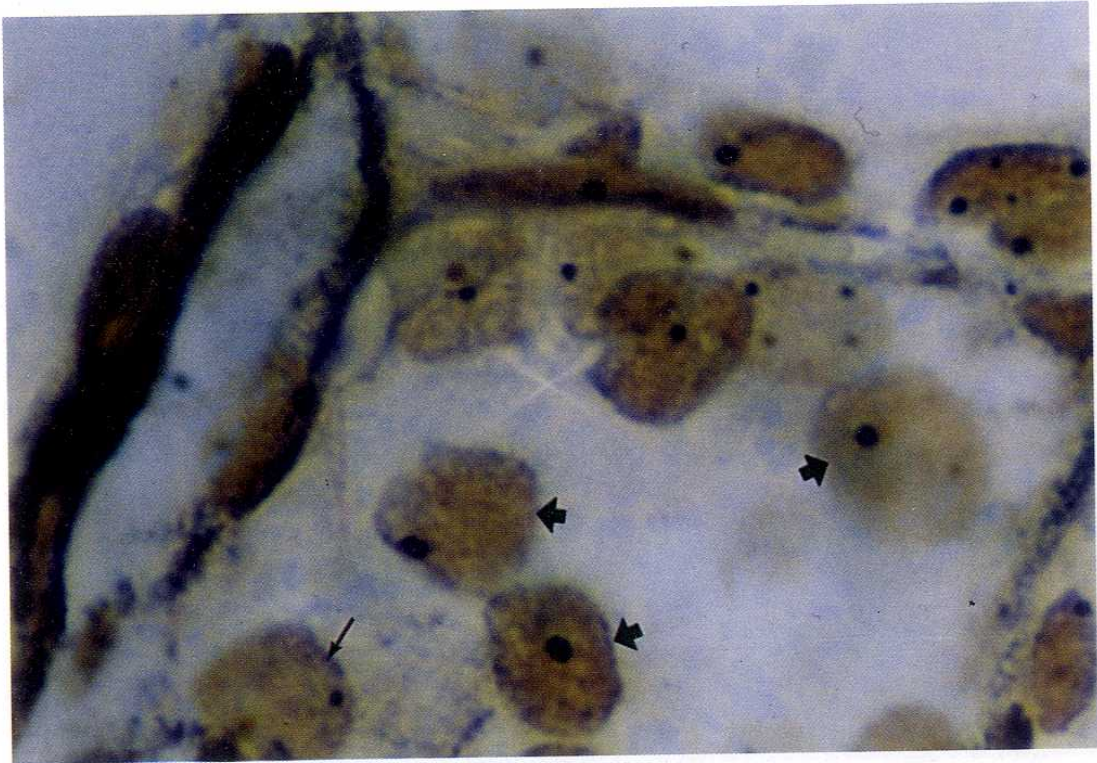
Şekil 1. Kontrol (Sham-pinealektomi) grubu tiroid epitel hücrelerinin AgNOR boyaması. Epitel hücrelerinde genellikle ikili (⇨) ve seyrek olarak üçlü (→) AgNOR tanecikleri görülmekte. AgNOR Boyama. X100.



Şekil 2. Pinealektomi grubuna ait AgNOR boyama. Epitel hücrelerinde dördlü (⇨) ve beşli (→) AgNOR tanecikleri görülmekte. X100.



Şekil 3. Pinealektomi sonrası tiroid folliküler epitel hücrelerinde artmış mitotik figürler (→) görülmekte. AgNOR Boyama. X40.



Şekil 4. Pinealektomi sonrası melatonin uygulanan gruba ait AgNOR boyama. Epitel hücrelerinde genellikle birli (→), seyrek olarak ikili (↔) gruplar gözlenmektedir. X100.

Tablo 1. Kontrol (Sham-pinealektomi), pinealektomi ve pinealektomi sonrası melatonin uygulanan gruplarda tiroid follikül epitel hücrelerindeki AgNOR sayılarının karşılaştırılması.

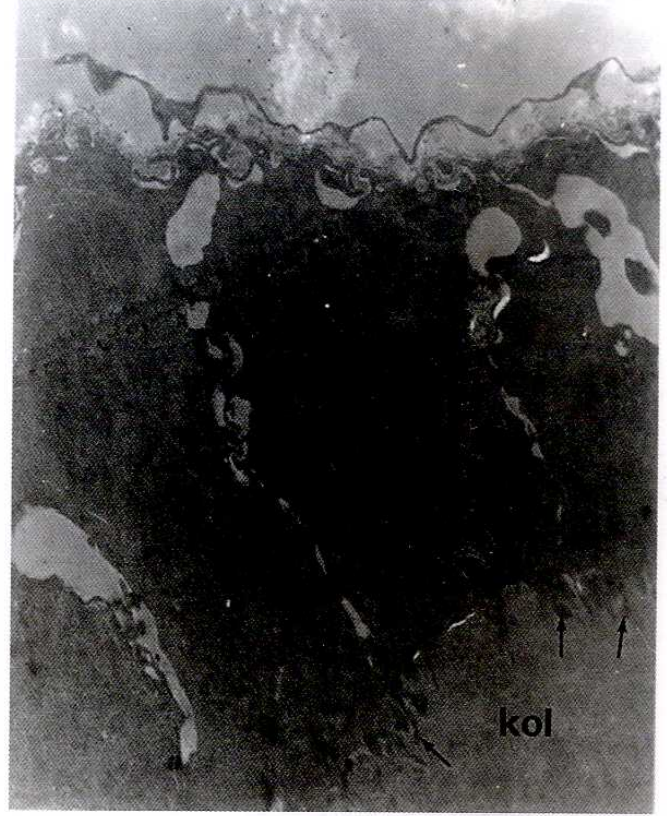
Gruplar	N	Ortalama \pm SEM
Kontrol	100	201.60 \pm 1.52
Pinealektomili	100	286.40 \pm 4.77 *
Pinealektomili + Melatonin	100	199.80 \pm 3.35 **

*: $p < 0.001$ (Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında);

** : $p < 0.001$ (Pinealektomili grup ile karşılaştırıldığında).

AgNOR boyaması ile elde edilen bulgulara dayanarak, pinealektomi sonrası tiroid folliküler hücre proliferasyonunda artış ile birlikte mitoz aktivasyonun arttığı ve bu artışın melatonin enjeksiyonu ile gerilediği sonucuna varıldı.

Elektron mikroskopik incelemede ise, kontrol grubu (Şekil 5) ile karşılaştırıldığında pinealektomi sonrası tiroid folliküler epitel hücrelerinin boylarında uzama, mikrovilluslarda belirginleşme ve kolloid miktarında azalma gözlemlendi (Şekil 6). Ayrıca pinealektomi sonrası folliküler hücre sitoplazmalarındaki lizozom ve salgı granüllerinde artış meydana geldiği tespit edildi (Şekil 7, 8). Pinealektomi sonrası



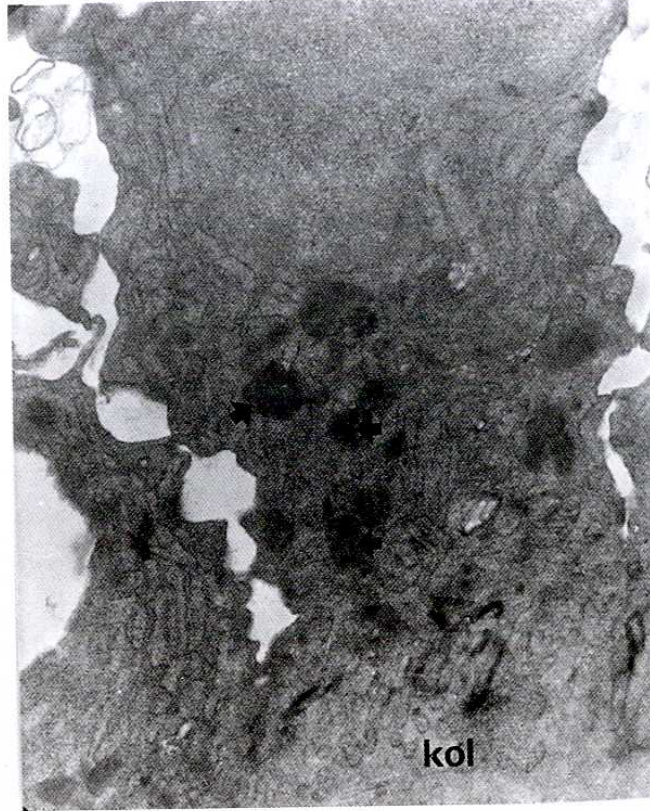
Şekil 6. Pinealektomi sonrası tiroid epitel hücrelerinin (*) boylarında uzama olduğu ve mikrovillusların uzayarak belirginleştiği (→) dikkati çekmekte. Ayrıca kolloid (kol) miktarında azalmanın olduğu göze çarpmakta. Kurşun sitrat-Uranil asetat. X7000.



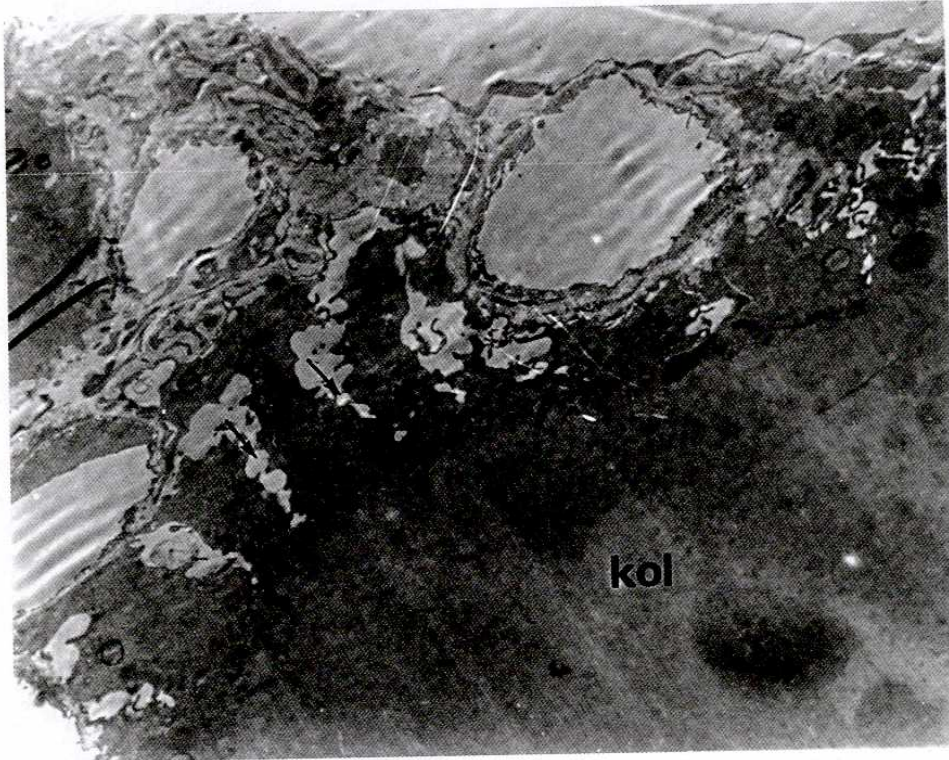
Şekil 5. Kontrol (Sham-pinealektomi) grubuna ait tiroid bezinin ince yapısı. Yassılaştırmış follikül epitel hücresi (*) ve kolloid madde (kol) görülmekte. Kurşun sitrat-Uranil asetat. X7000.



Şekil 7. Pinealektomi sonrası tiroid epitel hücre sitoplazmalarındaki lizozomlarda bir artış olduğu gözlenmekte (→). Kurşun sitrat-Uranil asetat. X3000.



Şekil 8. Pinealektomi grubuna ait tiroid epitel hücresinin elektron mikroskopik görünümü. Hücre sitoplazmalarındaki salgı granüllerinde (➔) belirgin bir artış olduğu dikkati çekmekte. (kol): kolloid madde. Kurşun sitrat-Uranil asetat. X12000.



Şekil 9. Pinealektomi sonrası melatonin uygulanan gruba ait tiroid dokusu incelendiğinde ise, follikül epitel hücrelerinin küçüldüğü (*) ve hücreler arası ayrılmaların (→) varlığı dikkati çekmekte. Ayrıca kolloid (kol) miktarında artış göze çarpmakta. Kurşun sitrat-Uranil asetat. X3000.

melatonin uygulanan grupta ise, tiroid folliküler epitel hücrelerinde küçülme ve hücreler arası ayrılmaların olduğu gözlemlendi. Yine bu grupta kolloid miktarında bir artışın olduğu göze çarptı (Şekil 9).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Melatonin hormonunun hipotalamus-hipofiz-tiroid bez eksenini üzerinde inhibitör bir etkiye sahip olduğu kabul edilmektedir (1,2,3). Deneysel olarak yapılan çalışmalarda, pinealektomi sonrası tiroid bez aktivasyonunda artış meydana geldiği bildirilmiştir (7-10,14-17,24,26). Ancak pinealektominin tiroid bezi üzerine etkisi ile ilgili az sayıda histolojik çalışma mevcuttur.

Deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda pinealektomi sonrası tiroid bezinde hipertrofi olduğu ve bez ağırlığında artış meydana geldiği bildirilmiştir (7-10,14,15). AgNOR boyama tekniği kullanılarak yapılmış olduğumuz çalışmada da pinealektomi sonrası tiroid folliküler epitel hücre proliferasyonunda artış gözlemledik. Bu bakımdan çalışmamız yukarıdaki çalışmalarla (7-10,14,15) uygunluk göstermektedir.

Yine yapmış olduğumuz çalışmada, pinealektomi sonrası tiroid folliküler hücrelerinde mitoz aktivasyon artışını gösteren bulgular tespit ettik. Daha önce Wajs ve ark. (16) sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmalarında da pinealektomi sonrası folliküler hücrelerde mitoz aktivasyonunun arttığını bildirmişlerdir.

Tiroid bezi aktif olduğu zaman folliküler epitel hücrelerinin yüksekliğinde bir artışın olduğu, mikrovilluslarda uzama ve kolloid maddesinin azaldığı bildirilmiştir (27). Çalışmamızın elektron mikroskopik bölümünde de, pinealektomi sonrası tiroid epitel hücrelerinin boylarında uzama, mikrovilluslarda belirginleşme ve kolloid miktarında azalma gözlemlendi.

Ayrıca elektron mikroskopik incelemede, pinealektomi sonrası folliküler epitel hücre sitoplazmalarındaki lizozom ve salgı granüllerinde artış meydana geldiğini gözlemledik. Benzer şekilde daha önce Csaba ve Barath (17) da sıçanlarda pinealektomi sonrası tiroid folliküler hücrelerindeki salgı granüllerinde artış olduğunu bildirmişlerdir.

Vriend ve ark. (26) hamsterler üzerinde yaptıkları çalışmalarında, pinealektomi sonrası tiroid epitel hücre aktivasyonunun arttığını ve serum tiroksin seviyelerinin yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda da pinealektomi sonrası tiroid epitel

hücre aktivasyon artışına dair bulgular olarak, hücre sitoplazmalarındaki lizozom ve salgı granüllerinde artış, mikrovilluslarda uzama ve belirginleşmenin olduğunu gözlemledik. Bu yönüyle çalışmamız Vriend ve ark. (26)'nın yaptıkları çalışmayla uygunluk göstermektedir. Relkin (24) ise, pinealektomili sıçanlarda kan TSH (tiroid sitümulan hormon) seviyelerinin yüksek olduğunu ifade etmiştir.

Pineal bez tarafından sirkadiyan bir ritimde ve karanlıkta salgılanan melatonin hormonunun endokrin sistem üzerinde genelde inhibitör bir etkiye sahip olduğu kabul edilir. Bununla ilgili olarak, melatoninin hipofiz ön lobundaki TSH sekresyonunu da baskıladığı bildirilmiştir (2, 3).

Pinealektomi sonrası melatonin enjeksiyonu ile ilgili olarak, Houssay ve ark. (15) fareler üzerinde yaptıkları çalışmalarında, pinealektomi sonrası gözlenen hipertrofinin melatonin enjeksiyonu sonucu engellendiğini bildirmişlerdir. Wajs ve ark. (16) da sıçanlarda pinealektomi sonrası tiroid folliküler hücrelerinde meydana gelen mitoz aktivasyon artışının melatonin enjeksiyonu ile gerilediğini göstermişlerdir.

Erkek sıçanlar üzerinde yaptığımız bu çalışmada da, pinealektomi sonrası tiroid epitel hücre proliferasyonunda ve mitoz aktivasyonundaki artışın melatonin uygulaması ile baskılandığını ve gerilediğini gözlemledik. Bu yönden bulgularımız, Houssay ve ark. (15) ile Wajs ve ark. (16)'nın yaptıkları benzer çalışmaların bulguları ile paralellik göstermektedir.

Yine Lewinski ve Sewerynek (11) ile Sewerynek ve arkadaşlarının (12) yaptıkları benzer çalışmalarda, dışardan uygulanan melatonin hormonunun tiroid folliküler hücre hacimlerinde ve mitoz aktivasyonunda azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Klencki ve ark. (5) da sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmalarında, melatonin enjeksiyonunun tiroid folliküler hücre çekirdeklerinin hacimlerinde azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir. Baschieri ve ark. (13) ise, melatonin enjeksiyonunun tiroid bez ağırlığında azalmaya yol açtığını ifade etmişlerdir. Hamsterler üzerinde yapılan benzer çalışmalarda da, melatonin uygulamasının kan TSH seviyelerinde (21, 23) ve serum tiroksin düzeylerinde (6, 20, 21, 25) düşüğe neden olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda sonuç olarak, AgNOR boyaması ile elde edilen bulgulara göre pinealektomi sonrası tiroid epitel hücre proliferasyonunda artışla birlikte mitoz

aktivasyonunun arttığı ve bu artışın melatonin enjeksiyonu ile gerilediği görüldü. Elektron mikroskopik incelemede ise, pinealektomi sonrası tiroid epitel

hücrelerinde gözlenen ve hücre aktivasyon artışını gösteren ultrastruktürel değişikliklerin melatonin uygulaması ile kaybolduğu tespit edildi.

KAYNAKLAR

1. Arendt J. Melatonin and the mammalian pineal gland. London, Chapman & Hall. 1995: 6-49.
2. Erlich SS, Apuzzo MLJ. The pineal gland: Anatomy, physiology and clinical significance. *J Neurosurg* 1985; 63: 321-41.
3. Keleştimur H. İnsanda pineal bezin fonksiyonları. *Fırat Üniv Sağlık Bil Dergisi* 1996; 10 (1): 141-7.
4. Kuş I, Sarsılmaz M. Pineal bezin morfolojik yapısı ve fonksiyonları. *T Klin Tıp Bilimleri Dergisi* 2002; 22 (2): 221-6.
5. Klencki M, Stowinska-Klencka D, Kunert-Radek J, Lewinski A. Melatonin induced decrease of the size of thyrocyte nuclei in rat thyroids incubated in vitro. *Cytobios* 1994; 78: 159-62.
6. Sewerynek E, Lewinski A, Webb SM, Vaughan MK, Reiter RJ. Karyometric studies of thyroid follicular cells and thyroid hormone secretion in the male syrian hamsters following melatonin and diazepam administration. *Neuroendocrinol Lett* 1991; 13: 393-99.
7. Houssay AB, Pazo JH. Role of pituitary in thyroid hypertrophy of pinealectomized rats. *Experientia* 1968; 24: 813-4.
8. Pazo JH, Houssay AB, Davidson PA, Chait RJ. On the mechanism of thyroid hypertrophy in pinealectomized rats. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam* 1968; 18: 332-40.
9. DeFronzo RA, Roth WD. Evidence for the existence of a pineal-adrenal and pineal-thyroid axis. *Acta Endocrinol* 1972; 70: 31-42.
10. Losoda J. Effects of experimental pinealectomy. *Ann Anat* 1987; 26: 133-53.
11. Lewinski A, Sewerynek E. Melatonin inhibits the basal and TSH-stimulated mitotic activity of thyroid follicular cells in vitro and in organ culture. *J Pineal Res* 1986; 3: 291-9.
12. Sewerynek E, Lewinski A, Szkudlinski M, Zerek-Melen G. The effect of melatonin and N-acetylserotonin on mitotic activity of thyroid and adrenal cortex in the rat. *Endokrynol Pol* 1988; 39: 269-75.
13. Baschieri L, DeLuca F, Cramarossa L, DeMartino C, Oliviero A, Negri M. Modifications of thyroid activity by melatonin. *Experientia* 1963; 19: 15-7.
14. Vriend J, Thliveris JA. Effects of pinealectomy and melatonin administration on thyroid follicles of blinded syrian hamsters. *Anat Rec* 1985; 211: 29-33.
15. Houssay AB, Pazo JH, Epper CE. Effects of the pineal gland upon the hair cycles in mice. *J Invest Dermatol* 1966; 47: 230-4.
16. Wajs E, Krotewicz M, Fryczak J, Kulak J, Sewerynek E, Szkudlinski M, Lewinski A. Melatonin suppresses the pinealectomy-induced increase of the mitotic incidence in the rat thyroid gland. *Med Sci Res* 1989; 17: 61-2.
17. Csaba G, Barath P. Effect of pinealectomy on the 3H-5HT uptake of mast cells in the thyroid gland of the rat. *Acta Anat* 1974; 89: 442-51.
18. Csaba G, Kiss J, Bodoky M. Uptake of radioactive iodine by the thyroid after pinealectomy. *Acta Biol Acad Sci Hung* 1968; 19: 35-41.
19. Csaba G, Nagy SU. The regulatory role of the pineal gland on the thyroid gland, adrenal medulla and islets of langerhans. *Acta Biol Med Germ* 1973; 31: 617-9.
20. Vriend J, Richardson BA, Vaughan MK, Johnson LY, Reiter RJ. Effects of melatonin on thyroid physiology of female hamsters. *Neuroendocrinol* 1982; 35: 79-85.
21. Vriend J, Reiter RJ, Anderson GR. Effects of the pineal and melatonin on thyroid activity of male golden hamsters. *Gen Comp Endocrinol* 1989; 38: 189-95.
22. Reiter RJ, Hoffman RA, Hester RJ. Inhibition of I131 uptake by thyroid glands of male rats treated with melatonin and pineal extracts. *American Zoologist* 1965; 5: 727-8.
23. Relkin R. Use of melatonin and synthetic TRH to determine site of pineal inhibition of TSH secretion. *Neuroendocrinol* 1978; 25: 310-8.
24. Relkin R. Effects of pinealectomy, constant light and darkness on thyrotropin levels in the pituitary and plasma of the rat. *Neuroendocrinol* 1972; 10: 46-52.
25. Vriend J, Reiter RJ. Free thyroxine index in normal, melatonin treated and blinded hamsters. *Hormone Metab Res* 1977; 9: 231-4.
26. Vriend J, Sackman JW, Reiter RJ. Effects of blinding, pinealectomy and superior cervical ganglionectomy on free thyroxine index of male golden hamsters. *Acta Endocrinol* 1977; 86: 758-62.
27. Jungueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Basic histology. California, Lange Medical Publications (Fifth edition). 1986: 457-62.
28. Trere D. AgNOR staining and quantification. *Micron* 2000; 31 (2): 127-31.
29. Szot W, Szybinski Z, Zaczek M, Kedro D, Dabros E, Piotrowska K, Chlap Z. Fine needle aspiration cytology combined with argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) in diagnosis of thyroid neoplasms. *Endocrinol Pol* 1993; 44 (4): 413-26.
30. Sirri V, Roussel P, Hernandez-Verdun D. The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. *Micron* 2000; 31 (2): 121-6.
31. Tuccari G, Giuffre G, Crisafulli C, Monici MC, Toscano A, Vita G. Quantitation of argyrophilic nucleolar organizer regions in regenerating muscle fibers in Duchenne and Becker muscular dystrophies and polymyositis. *Acta Neuropathol (Berl)* 1999; 97 (3): 247-52.
32. Zaczek M, Szot W, Chlap Z. Argyrophilic nucleolar organizer regions in proliferative lesions of the thyroid gland. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology* 1996; 18 (1): 1-8.
33. Sirri V, Roussel P, Hernandez-Verdun D. The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. *Micron* 2000; 31 (2): 121-6.