

갑상선 결절의 Telomerase 활성도에 대한 분석*

연세대학교 의과대학 외과학교실, 병리학교실**

박정수 · 정웅윤 · 이미경** · 장항석

= Abstract =

Telomerase Activity in Benign and Malignant Thyroid Diseases

Cheong Soo Park, M.D., Woong Youn Chung, M.D.,
Mi Kyung Lee, M.D.,** Hang Suk Chang, M.D.

*Department of Surgery and Pathology,** Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea*

Objective : Telomerase, a specialized ribonucleoprotein polymerase associated with cellular immortality, is expressed by most malignant cells and is inactive in most normal somatic cells. The assays of telomerase activity in various tumors have provided both diagnostic and prognostic information. This study was carried out to determine whether telomerase activity could be useful in distinguishing benign and malignant thyroid diseases.

Materials & Methods : Telomerase activity was determined using Oncor TRAP_{EZE}TM ELISA Telomerase Detection Kit for performing PCR-based telomeric repeat amplification protocol (TRAP) assay followed by ELISA detection in both normal and tumor tissues of 23 adenomatous hyperplasias, 12 follicular adenomas, 4 follicular carcinomas, 16 papillary carcinomas, 4 Hashimoto's thyroiditises and 3 malignant lymphomas. We also examined all cases microscopically to review the status of lymphoid infiltrate.

Results : Of the 62 cases, extensive lymphoid infiltrates were contained in 20 tumor tissues(4 Hashimoto's thyroiditises, 3 malignant lymphomas, 6 adenomatous hyperplasias and 7 papillary carcinomas), all of which showed positive telomerase activity. All the normal tissues without lymphoid infiltrates(n=43) did not express telomerase activity. Of 42 tumor tissues without lymphoid infiltrates, 37(88.0%) showed positive telomerase activity ; 13 of 17 adenomatous hyperplasias(76.5%), 11 of 12 follicular adenomas(91.7%), 4 of 4 follicular carcinomas(100.0%) and 9 of 9 papillary carcinomas(100.0%).

Conclusions : Our methods showed high sensitivity in the detection of telomerase activity and the exclusion of lymphoid infiltrates may be important in telomerase assay. In our work, the measurement of telomerase activity was not useful in distinguishing benign and malignant thyroid diseases.

KEY WORDS : Thyroid disease · Telomerase activity.

*연구비 : 본 논문은 1997년도 연세대학교 의과대학 학술연구비 보조로 이루어졌음.

서 론

갑상선 결절은 임상가가 접하게 되는 내분비질환 중 가장 높은 빈도를 보이는 병변이지만 다른 내분비 질환과 마찬가지로 수술전 진단방법의 정확도가 낮고 증생성 병변(hyperplastic lesion)과 신형성성 병변(neoplastic lesion)의 진단에 대한 병리학적 기준이 불명확하고 관찰자간에 차이를 보여 수술검체에서조차도 감별진단을 내리기 어려운 경우가 종종 있어 이에 따른 부적절한 치료가 현재까지 상당수 시행되고 있는 실정이다. 따라서 갑상선 결절의 정확한 진단 및 적절한 치료방법을 찾아내기 위해서는 갑상선 질환의 근원적 특성을 알아내려는 노력이 필요할 것으로 생각된다.

Telomere는 체세포 염색체의 말단에 존재하여 genomic DNA의 퇴화나 결손을 방지하는 기능을 가지고 있는 DNA의 한 구조로서 만일 세포가 지속적으로 안정된 telomere의 길이를 유지할 수 있다면 그 세포는 영구히 생존할 수 있는데 이런 현상이 간세포(stem cell)와 일부 종양 세포에서 증명된 바 있다. 이런 세포들에는 telomerase라는 ribonucleoprotein이 있어 이것이 telomere를 일정 길이 이상으로 유지하게 하여 세포가 영구히 생존할 수 있게 한다. 이미 난소암¹⁾이나 전립선암²⁾, 유방암³⁾, 대장암⁴⁾등 여러 종양세포에서 PCR을 이용하여 telomerase 활성도를 발견함으로써 telomerase의 재활성이 대부분의 종양발생에 있어서 필수적임이 밝혀지고 있으며, 일부에서는 갑상선 종양세포에서의 telomerase 활성도에 대한 보고들⁵⁻¹⁰⁾도 있다.

이에, 본 연구자들은 갑상선 종양세포가 telomerase의 활성도를 가지고 있음을 밝히고 각 질환별 그 활성도의 차이를 확인하여 여러 갑상선 질환의 정의 및 진단에 필요한 기초자료를 제공함으로써 갑상선 결절에 대한 적절한 치료법을 찾아내는데 도움이 되고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 연구대상

연구대상은 1997년 5월부터 1997년 12월까지 갑상선 결절의 수술후 -70°C에서 냉동보관된 수술검체들 중 62예의 병소 및 정상조직으로 하였으며, 조직의 채

취 및 보관은 수술로 적출한 즉시 신속한 육안검사후 과사부위가 없는 조직을 선별채취하여 보관하였다.

2. 광학현미경적 검색

신선한 조직채취와 아울러 파라핀 포매조직을 채취하여 정확한 병리적 진단은 물론 질환별로 대상환자의 조직표본을 검색하여 림파구의 오염도를 측정하였다.

3. Telomerase assay

Telomerase 활성도는 Oncor TRAP_{EZE}TM ELISA Telomerase Detection Kit를 이용하여 TRAP(PCR-based telomeric-repeat amplification protocol)¹¹⁾ 및 ELISA 분석법을 사용하였다.

1) 세포 추출물의 준비

-70°C에 보관된 각 조직표본을 40~100mg 정도 준비하여 tissue grinder로 갈아서 1.5ml microcentrifuge tube에 옮긴 후 CHAPS Lysis Buffer 200μl를 분주한다. 얼음에서 30분간 방치한 후 4°C, 12000×g에서 20분간 원심분리한다. 상층액 160μl를 분리하여 새로운 microcentrifuge tube에 옮긴다. 단백질 정량은 Branford Assay(Bio-rad)법에 시행한 다음 0.01~0.05μg/μl로 희석하여 표본을 준비한다.

2) TRAP assay

각 표본당 PCR mixture(5×TRAP Reaction Mix 10μl, Taq polymerase 2 units, dH₂O 48μl)를 48μl씩 준비하여 표본액 2μl 및 각 표본 추출물 10μl를 85°C에서 열처리하여 만든 heat inactivation control 2μl를 각각 첨가한다. 그외 매 실험마다 positive control cell(telomerase positive cell) 2μl, TSR 8(PCR/ELISA positive control) 2μl, CHAPS Lysis Buffer (primer/dimer contamination control) 2μl를 표본액 대신에 첨가하여 대조실험을 한다. 총 50μl인 PCR product를 thermocycler block에서 30°C, 30분간 방치한 후 94°C에서 30초, 60°C에서 30초간 반응하는 cycle을 35회 반복시켜 PCR amplification 시행했다.

3) ELISA detection

Microfilter plate를 counting 한 후 각 well에 blocking buffer 250μl를 넣은 후 parafilm으로 덮고 37°C에서 30분간 방치한다. Blocking buffer를 제거하고 1X wash buffer 250μl로 well을 씻는다. Blocking buff-

er 100μl을 well에 넣고 PCR product 5μl을 첨가한 후 parafilm으로 덮고 37°C 에서 60분간 방치한다. 용액을 모두 제거한 후 1X wash buffer 250μl로 5회 씻는다. DNP-Ab를 1 : 250으로 희석한 후 각 well에 100μl씩 분주한 후 실온에서 30분간 방치한다. DNP-Ab 용액을 제거하고 1X wash buffer 250μl로 5회 씻는다. TMB solution 100μl를 넣고 실온에서 5분간 반응시킨 후 Stop solution 100μl를 첨가하여 30분 이내에 Microfilter Plate Reader를 이용하여 450nm와 690nm에서 absorbance(A450-A690)를 측정한다.

4. 결과 판독 및 분석

매 실험마다 heat inactivation control의 absorbance가 0.250 미만, positive control cell(telomerase positive cell)은 telomerase 양성, PCR/ELISA positive control(TSR 8)의 absorbance가 0.800 이상, primer/dimer contamination control(CHAPS Lysis Buffer)의 absorbance가 0.200 미만의 조건을 만족한 상태에서 telomerase 양성의 판정은 측정값인 ΔA (ΔA : net increase of absorbance = $A_{\text{sample}} - A_{\text{heat treated sample}}$)가 0.150보다 큰 경우로 하였다. 각 표본에 대해 기본적으로 2차례의 실험을 시행하였으며 결과가 상이한 경우는 2차례의 추가실험을 통해 검증하였다.

림파구의 오염여부 및 병리학적 진단에 따른 telomerase 활성도를 분석하여 telomerase 활성도 분석에서 림파구 오염이 끼치는 영향 및 telomerase 활성도의 차이가 갑상선 결절의 감별진단에 유용한지를 알아보았다.

5. 통계분석

Chi-square test 및 Mann-Whitney 법으로 분석하였으며, 통계학적 유의수준은 95% 이상($p < 0.05$)으로 정하였다.

결 과

1. 질환별 분류

총 62예 중 선종성 갑상선종이 23예, 여포상 선종 12예, 여포상암 4예, 유두상암 16예, 하시모토 갑상선염 4예, 갑상선 악성 림프종 3예이었다.

2. 림파구 침윤과 telomerase 활성도

악성 림프종(n=3) 및 하시모토 갑상선염(n=4)는

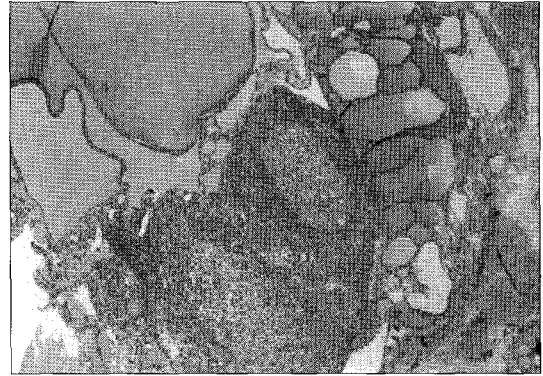


Fig. 1. An adenomatous hyperplasia showing marked lymphocyte infiltrates with a germinal center formation (×100).

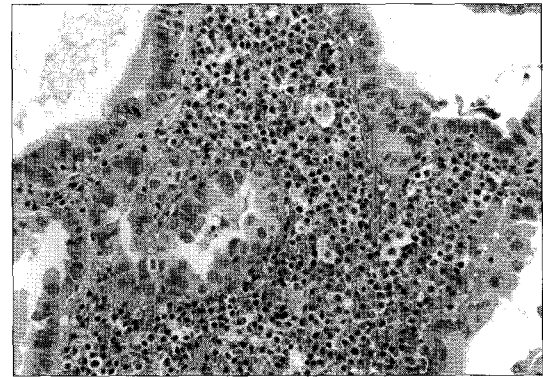


Fig. 2. A papillary carcinoma showing marked lymphocyte infiltration in the papillary structure (×200).

모두 telomerase 양성이었으며, 이를 제외한 55예 중 림파구 침윤이 병소에서 확인된 경우는 13예(선종성 갑상선종 6예, 유두상암 7예)로(Fig. 1, 2) 모두 telomerase 양성이었다. 정상조직에서는 12예(선종성 갑상선종 4예, 여포상 선종 5예, 여포상암 1예, 유두상암 2예)에서 림파구 침윤이 확인되었으며 이 중 9예(75.0%)에서 telomerase 양성을 보였다.

3. 질환별 telomerase 활성도

림파구 침윤이 없었던 43예의 정상조직은 모두 telomerase 음성을 보였으며, 림파구 침윤이 없었던 42예의 병소조직에서는 37예(88.0%)에서 telomerase 양성을 보였다. 질환별로는 선종성 갑상선종은 76.5%, 여포상 선종은 91.7%, 여포상암과 유두상암은 모두 100.0%의 telomerase 양성도를 보였는데 각 질환간에 통계학적으로 유의한 차이는 없었다($p > 0.1$)(Table 1).

Table 1. Telomerase activity in thyroid tissues

Pathology	Telomerase activity			
	Total	Positive	Negative	Positive(%)
Normal	43	0	43	0.0
Adenomatous hyperplasia	17	13	4	76.5
Follicular adenoma	12	11	1	91.7
Follicular carcinoma	4	4	0	100.0
Papillary Carcinoma	9	9	0	100.0

고 찰

갑상선 결절은 거의 모든 갑상선질환에서 볼 수 있는 임상증상이나 이들 모두가 치료의 대상이 되는 것은 아니다. 임상에서 가장 중요한 것은 악성결절을 진단 및 치료하는 것인데 전체 결절 중 갑상선암이 차지하는 비율은 5% 내외이다.

갑상선 결절은 세침흡인술 및 침생검 등의 병리조직학적 검사상 5~20%가 악성 결절로, 80% 이상이 양성 결절로 판정되지만, 악성 결절 진단의 위양성율(false positive rate)은 낮은 반면 위음성율(false negative rate)이 7~25%로 높게 보고되고 있다¹²⁾¹³⁾. 이처럼 세침흡인검사가 높은 위음성율을 보이는 이유는 중앙부괴사(central necrosis)를 흔히 보이는 악성결절의 낭종액(cystic fluid)이 천자될 경우 양성결절로 오진될 수 있다는 점과, 여포성 병소(follicular lesion) 혹은 여포성 증식(follicular proliferation)으로 명명되는 진단군인 선종성 갑상선종, 여포상 선종, 여포상 암은 모두 갑상선세포의 집괴(dump)만 보여 감별진단에 한계가 있다는 점으로 설명된다. 대부분 악성 결절은 수술적 치료를, 양성 결절은 경과관찰 혹은 내과적 치료를 시행하게 되는데, 이처럼 높은 위음성율을 보이는 수술적 검사는 양성 결절에 대한 비적절한 수술적 절제를 유발하고 및 악성 결절의 치료에 저해요인이 되고 있는 실정이다.

양성결절에 대한 내과적 치료로는 갑상선 결절의 주 성장인자인 TSH 분비를 억제하기 위한 갑상선 흡분제 투여가 전통적인 치료법으로 시행되고 있으나 최근에는 치료효과에 대한 회의적 의견들이 제시되고 있으며, 기존의 연구결과를 종합하여 볼때 양성결절에 대한 갑상선호르몬 치료요법의 치료효과는 단지 10~20% 정도일 것으로 추정되고 있다¹⁴⁾. 이처럼 치료효과가 낮은

이유는 갑상선결절의 성장인자로서 TSH 외에 epidermal growth factor, insulin like growth factor I, II, thyroid stimulating immunoglobulin(TSI)등도 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀짐으로써 일부 설명될 수 있으며, 양성 결절중 자율성 성장을 보이는 신형성성 질환(neoplastic disease)인 여포상 선종과 비교적 TSH 의존성이 큰 선종성 갑상선종간에 치료효과에 대한 차이의 유무를 확인하지 않고 일률적인 억제요법을 적용하고 있다는 사실도 고려해야할 것으로 생각된다.

이와 같이 현재 사용되는 갑상선 결절에 대한 진단방법의 정확도가 낮고 이에 따른 부적절한 치료가 시행되고 있다는 문제점을 개선하기 위해서는 결절의 근원적 특성을 알아내어 정확한 진단 및 적절한 치료방법을 찾아내려는 다각적인 노력이 필요할 것으로 생각되는데, 최근 중앙 세포의 특징인 불멸생존에 관여하는 telomerase의 구조 및 특성이 밝혀짐에 따라 갑상선 질환에서도 그 임상적 의의를 확인할 필요가 있다고 생각된다.

Telomere는 유핵염색체의 말단에 존재하여 genomic DNA의 퇴화나 결손을 방지하는 기능을 가지고 있는 DNA의 한 구조로 세포가 유사분열을 거듭 할 수록 그 길이가 짧아져 어느 한계 이상 telomere가 짧아지면 세포는 사망에 이른다. 인간과 모든 다른 척추동물들에 있어서 telomeric DNA는 TTAGGG sequence의 반복으로 되어있으며 정상 체세포는 매 복제(replication)마다 50~100bp가 소실되며, 정상 체세포에서 연속적인 비복제 telomeric sequence는 세포 분열시 정상 염색체의 말단부 소실을 방지하는 완충 지대 역할을 한다. 또한 telomere의 길이로 유사분열의 횟수를 알 수 있으며 여러 차례 유사분열을 한 노후 세포에 있어 prograded cell death를 유발시켜 정상 체세포가 여러번의 복제로 인해 축적된 유전자의 변화나 염색체의 불안정성으로 인해 암세포로 변하는 것을 방지한다¹⁵⁾¹⁷⁾. Telomere 길이의 감소는 위험기(crisis phase)

에 다달아 세포의 수명이 끝날 때까지 복제시 마다 계속 일어나며 이 시기가 되면 염색체의 말단과 말단 사이에 융합이 일어나 세포는 사망하게 된다. 이 시기의 telomere 길이는 매우 짧으나 만일 어떤 세포가 이 위험기를 극복할 수 있다면 영구히 생존할 수 있으며 그러한 경우 정상에 비해 짧지만 안정된 telomere 길이를 유지하고 무제한적인 복제 능력을 가지게 되는데, 이미 대장암, 백혈병, 자궁내막 선암, 신경모세포종, 신세포암, 난소암 등 몇몇 인간의 종양세포에서 증명되었으며 이것은 세포의 불멸생존이 정상세포에서 종양세포로의 진행에 중요한 사건임을 제시한다.

짧지만 안정된 telomere의 길이는 telomerase라는 효소에 의해 유지되는데, telomerase는 telomeric sequence에 상보적인 mRNA 주형을 포함하는 역전사효소로서 이 RNA 주형은 새로 복제된 DNA 말단의 telomeric sequence에 telomerase가 작용하게 하여 말단 DNA 분자가 복제되지 않아 발생하는 telomere의 소실을 보상한다¹⁸⁾¹⁹⁾. 최근, 난소암이나 전립선암 등 몇몇 인간의 종양세포에서 PCR을 이용하여 telomerase 활성도를 발견함으로써 telomerase의 재활성이 종양발생에 필수적임이 밝혀지고 있으며¹⁻⁴⁾, 영구 생존 세포에 있어서 telomerase의 활성도가 계속 입증되고 있다.

또한, 갑상선 종양세포에서도 telomerase 활성도를 증명하고 임상적인 의의를 확인하려는 연구들이 계속되고 있는데, 1997년 Saji 등⁵⁾은 세침흡인술에서 유두상암이 의심되는 경우에 55.0% telomerase 양성도를 확인함으로써 감별진단에 유용하다고 하였으며, Brousset 등⁶⁾은 유두상암에 비해 악성도가 높은 여포상암과 미분화암에서 높은 telomerase 양성도를 확인함으로써 악성 종양의 진행과 연관이 있을 것으로 보고하였다. Umbricht 등⁷⁾은 여포상 선종과 여포상암간에 유의한 telomerase 양성도의 차이를 확인함으로써 두 질환의 감별진단에 유용할 것으로 보고하였으며, 1998년 Cheng 등⁸⁾은 양성 갑상선 질환과 악성 종양의 telomerase 양성도의 유의한 차이를 확인하여 갑상선암의 발생과 연관성이 있음을 주장하였다. 또한 Haugen 등⁹⁾은 분화성 갑상선암 중 유두상암에서 높은 telomerase 양성도를 보였으며, 특히 진행암인 경우에서 telomerase 양성도가 높아 진단적, 예후적 가치가 있을 것으로 보고하였다.

비록, 이같은 연구들이 모두 연구대상예가 적어 단편적인 결과만을 제시하였지만, 본 저자들은 만일 telomerase 활성도 분석을 통해 갑상선 결절의 근원 및 종양형성기전을 이해하게 되고 갑상선 결절에 대한 정확한 진단이 가능하게 되면 세침흡인세포검사에서 얻어진 세포 및 조직에 대해 PCR을 이용하여 telomerase 분석을 시도하여 수술전 정확한 진단이 가능하게 되므로 악성결절은 물론 양성결절에 대한 보다 적절한 치료가 이루어질 것이며, 갑상선 결절외에 병리학적 진단기준이 마찬가지로 불명확한 여러 가지 내분비계질환에 대한 정확한 진단도 가능하게 될 것으로 생각하였다.

그러나, 본 실험의 결과는 정상조직에서는 모두 telomerase 음성을 확인하였지만 여포상암과 유두상암은 물론 선종성 갑상선종과 여포상 선종에서도 모두 높은 telomerase 양성도를 보임으로써 진단적 가치를 확인할 수 없었다. 이 같은 결과는 먼저 실험방법의 문제로 발생할 수 있는데 매 실험마다 대조실험을 실시하였고, 표본당 2회의 실험을 시행하였으며 결과번복이 3예에서 있었으나 모두 판독상의 오류로 확인되어 실험적 과오는 없었으리라고 생각된다. 또 다른 문제는 림파구 오염의 영향으로 생각할 수 있는데, 즉, 종양세포, 배아세포, 생식세포 외에도 혈액내 림파구에서도 telomerase 활성도가 있음이 밝혀졌으며 1997년 Yashima 등¹⁰⁾에 의한 연구 및 Haugen 등⁹⁾에 의한 연구에서 telomerase 양성을 보인 조직표본을 검색한 결과 많은 경우에서 갑상선염 및 림파구 오염을 확인하였다고 보고한 바 있다. 본 연구에서도 악성 림프종과 하시모토 갑상선염은 물론 림파구 침윤이 병소에서 확인된 13예 모두 telomerase 양성임을 확인 할 수 있었다. 비록, 본 실험에서 현미경적 검색을 실시하여 림파구 오염이 있던 경우를 제외하였다 하더라도 TRAP 및 electrophoresis 분석을 이용한 기존의 실험방법보다 TRAP 및 ELISA 분석법을 사용한 저자들의 실험방법의 민감도가 높아 표본내에 1%의 telomerase 양성세포만으로도 측정될 수 있으므로 림파구 오염의 영향을 배제할 수는 없다. 또한, telomerase 활성도는 생존불멸의 특성을 지니는 종양세포뿐만 아니라 증식이 활발한 증식성 세포에서도 표현될 수 있다는 가능성인데, 기존의 연구들 중 증식성 병변인 선종성 갑상선종 일부에서도 telomerase 활성도가 표현되었다는 보고들도 있으며, 민감도가 높은 본 실험방법을 고려할때 기존의 실험방

범으로는 표현되지 않는 telomerase 양성세포가 표현되었을 가능성을 배제할 수 없다.

따라서 본 실험을 통해 질환별 telomerase 활성도의 차이는 확인할 수는 없었으나, 갑상선 암종은 물론 갑상선 선종과 선종성 갑상선종에서도 높은 양성도를 확인함으로써 중앙세포뿐만 아니라 증식이 활발한 증식성 세포에서도 telomerase 활성도가 표현될 수 있다는 가능성을 검증할 필요가 있다고 생각한다. 검증을 위해서는 본 연구에서 확인했듯이 표본내 림파구 오염이 가장 문제가 될 것으로 생각되는데, 림파구 오염을 배제하기 위해서는 표본채취시 현미경하에서 중앙세포만을 선별채취하는 microdissection technique²⁰⁾을 이용하거나, 중앙세포만의 배양을 통해 실험하는 방법을 반드시 고려해야 할 것으로 생각하였다.

결 론

갑상선 중앙세포가 telomerase의 활성도를 가지고 있음을 밝히고 각 질환별 그 활성도의 차이를 확인하여 여러 갑상선 질환의 정의 및 진단에 필요한 기초자료를 제공함으로써 갑상선 결절에 대한 적절한 치료법을 찾아내는데 도움이 되고자 TRAP_{eze}TM ELISA Telomerase Detection Kit를 이용하여 62예의 갑상선 결절에서 telomerase 활성도 분석을 시행한 결과, 본 연구 방법의 높은 민감도를 확인할 수 있었으며, 림파구 침윤에 의한 높은 telomerase 양성도를 확인함으로써 림파구 오염이 검사의 정확도에 많은 영향을 끼침을 확인할 수 있었다. 또한 telomerase 활성도 분석은 신생물은 물론 증식도가 높은 선종성 갑상선종에서도 높은 양성도를 나타냄으로써 갑상선 질환의 감별진단으로는 부적합할 것으로 사료되었다.

References

- 1) Counter CM, Hirte HW, Bacchetti S, Harley CB : *Telomerase activity in human ovarian carcinoma. Proc Natl Acad Sci USA.* 1994 ; 91 : 2900-2904
- 2) Sommerfeld HJ, Meeker AK, Piatyszek MA, Bova GS, Shay JW, Coffey DS : *Telomeric activity : A prevalent marker of malignant human prostate tissue. Cancer Res.* 1996 ; 56 : 218-222
- 3) Park KH, Rha SY, Kim TS et al : *Increment of*

- telomerase activity with breast cancer progression. J Korean Cancer Assoc.* 1997 ; 29(6) : 1032-1040
- 4) Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC : *Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with aging. Nature.* 1990 ; 346 : 458-460
- 5) Saji M, Westra WH, Chen H et al : *Telomerase activity in the differential diagnosis of papillary carcinoma of the thyroid. Surgery.* 1997 ; 122 : 11137-1140
- 6) Brousset P, Chaouche N, Leprat F et al : *Telomerase activity in human thyroid carcinoma originating from the follicular cells. J Clin Endocrinol Metab.* 1997 ; 82 : 4214-4216
- 7) Umbricht CB, Gaji M, Westra WH, Udelsman R, Zeiger MA, Sukumar S : *Telomerase activity : A marker to distinguish follicular thyroid adenoma from carcinoma. Cancer Res.* 1997 ; 57 : 2144-2147
- 8) Cheng A-J, Lin J-D, Chang T, Wang T-CV : *Telomerase activity in benign and malignant human thyroid tissue. British Journal of Cancer.* 1998 ; 77(12) : 2177-2180
- 9) Haugen BR, Nawaz S, Markham N et al : *Telomerase activity in benign and malignant thyroid tumors.* 1997 ; 7(3) : 337-342
- 10) Yashima K, Vuitch F, Gazdar AF, Fahey TJ : *Telomerase activity in benign and malignant thyroid diseases. Surgery.* 1997 ; 122 : 1141-1146
- 11) Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR et al : *Specific association of human telomerase activity with immortalized cells and cancer. Science.* 1994 ; 266 : 2011-2015
- 12) Rodriguez JM, Parrillap, Soda J et al : *Comparison between preoperative cytology and intraoperative frozen section biopsy in the diagnosis of thyroid nodules. Br J Surg.* 1994 ; 81 : 1151-1154
- 13) La-Rossa-GL, Belfiore A, Giuffrida D et al : *Evaluation of the fine needle aspiration biopsy in the preoperative selection of cold thyroid nodules. Cancer.* 1991 ; 67 : 2137-2141
- 14) Burch HB : *Evaluation and management of the solitary thyroid nodule. Endocrinol Metab Clin North Am.* 1996 ; 24 : 663-710
- 15) Harley CB : *Telomere loss : Mitotic clock or genetic time bomb? Mutat Res.* 1991 ; 256 : 271-282
- 16) Harley CB, Futcher AB, Greider CW : *Telomeres shorten during aging of human fibroblates. Nature.*

1990 ; 345 : 458-460

- 17) Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB : *Telomere end-replication problem and cell aging. J Mol Biol.* 1992 ; 239 : 197-201
- 18) Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE et al : *Telomere ahortening associated with chromosome instability id arrested in immortal cells which express telomerase activity. EMBO.* 1992 ; 11 : 1921-1929
- 19) Morin GB : *The human telomere terminal transferase is a ribonuclear protein that synthesizes TTAGGG repeats. Cell.* 1989 ; 59 : 521-529
- 20) Moskaluk CA, Kern SE : *Microdissection and polymerase chain reaction amplification of genomic DNA from histologic tissue section. Am J Pathol.* 1997 ; 150 : 1547-1552