

결장 및 직장암에서 DNA Ploidy와 임상적 병리학적 양상과의 관계

전남대학교 의과대학 외과학교실

위 구 복·김 영 진·조 영 국

— Abstract —

Correlations between DNA Ploidy and Clinical and Pathologic Features in Colorectal Cancer

Koo Bok Wee, M.D., Young Jin Kim, M.D. and Young Kook Cho, M.D.

Department of Surgery, Chonnam University Medical School

The clinical and pathological features in the colorectal carcinoma have been identified with help to predict prognosis and may assist in the selection of patients for adjuvant therapy.

Recently the measurement of cellular DNA content by flow cytometry is emerging as a prognostic aid in a variety of human tumors.

The authors measured the correlations between DNA ploidy and stage, histological type, and percentage of S-phase in colorectal cancer cells using fresh specimens from tissues obtained in resected 23 colorectal cancers by means of a DNA flow cytometer. The DNA ploidy patterns were classified into two DNA histogram types based on their DNA index distributions.

The results showed that diploid were 9 cases (45%), and non-diploid were 14 cases (60%). There was no non-diploidy cells in stage I, but the percentage of non-diploid was increased according to the tumor stage, they were 37%, 71%, and 100% in stage II, III, and IV. In lymph node metastasis and distant metastasis, there was no difference between diploid and non-diploid in negative metastasis, but non-diploid was significantly increased in positive metastasis. The percentage of S-phase was more increased in non-diploid than diploid. The DNA ploidy patterns has no significant correlations to histologic type, tumor location, and tumor size.

The results of this study show that FCM (flow cytometry) analysis of DNA is considered one method of determining the patient's prognosis of colorectal carcinoma.

직장 및 결장암에서 임상적, 조직학적 양상은 환자의 예후에 영향을 주며, 환자의 보조치료 (adjuvant treatment)에도 도움을 준다.

최근에는 flowcytometry FCM 에 의한 cellular DNA contents의 측정이 human cancer의 여러 종류에서 예후와 관계가 있다고 보고하고 있으며, 이에 저자들은 23명의 직장 및 결장암 환자들을 대상으로 암병기, 조직학적 분화도, S-phase의 비율등을 파악하여, 이들

과 DNA ploidy와의 관계를 알아보려고 한다.

DNA ploidy patterns은 2가지의 DNA histogram으로 분류하였으며, diploid가 9예로 39%였고, non-diploid가 14예로 61%를 차지하였다. Stage I에서는 non-diploid가 없었으며, Stage II, III, IV에서는 각각 37%, 71%, 100%로 진행된 암일수록 non-diploid가 증가하였으며, 임파선 전이 및 원격 전이 면에서는 전이가 없는 경우에는 diploid와 non-diploid에서 큰 차이

가 없었지만, 전이가 있는 경우에는 non-diploid가 현저히 증가되었고, S-phase의 비율도 diploid보다는 non-diploid에서 증가하여 DNA 분포양상과 관계가 있었으나, 종양의 조직학적 형태, 위치 크기 등에서는 DNA 분포양상과의 상관관계를 볼 수가 없었다. 결과적으로 cellular DNA contents를 파악하여 DNA Patterns을 알아봄으로서, colorectal cancer를 가진 환자의 예후를 아는데 도움이 되리라 생각한다.

서 론

결장 및 직장암이 서양에서는 위 장관 계통의 암 중에서는 가장 빈도가 높은 암으로 알려져 있으며 우리나라에서도 매년 증가하는 추세여서 이에 대한 연구가 진행되고 있다.

대장암에서 예후는 침범된 림프 결절의 수와 대장벽의 침윤정도등을 고려한 Dukes' classification과 관계가 있으며, 그의 Broder의 조직학적 분화성도 관계가 있다고 보고있다.

최근들어 flowcytometry (FCM)에 의한 cellular DNA contents의 측정이 human carcinoma의 여러 종류에서 예후와 관계가 있다고 보고하고 있으며^{1,5,9,11-13,16,20,28,31,40}, 분류는 normal diploid DNA contents를 갖는 경우와 abnormal non-diploid DNA contents를 갖는 경우로 분류해서 한다.

결장 및 직장암에서도 다른 경우와 마찬가지로 DNA diploidy를 가진 경우가 그렇지 않은 경우보다 예후가 좋다는 여러보고들이 발표되었으며^{1,9,11,16,27,33,34,40}, 이에 저자들은 FCM을 이용한 직장 및 결장암에서 세포내의 DNA ploidy 형태를 분석하여 임상적, 병리학적으로 나타난 양상과 비교를 하여 이들과의 관계 및 예후의 추정에 이용하고자 한다.

대상 및 방법

23명의 절제가능한 결장 및 직장암 환자를 대상으로 하였으며 결장 및 직장암으로부터 얻은 신선한 조직을 빠른시간내에 기계적인 방법으로 조직을 잘게 부수어 세포부유액을 만든 후, 그 부유액을 나일론망을 이용하여 세포덩어리는 제거하고 단일세포액을 얻어낸다. 단일 세포 부유액은 PBS (Phosphate buffered saline)으로

세척한 후 세포수를 10⁶ cell/ml 정도로 조정된 뒤 propidium idoide 용액을 첨가하여 염색한다.

PI (propidium idode) 용액에 의한 염색이 끝난 후 표본은 40 μm의 나일론망으로 거른 후 분석에 들어간다.

본 실험에 사용된 FCM (flowcytometry)는 FAC-Star (Becton Dickinson Immunocytometry Systems)로 488 nm의 파장을 발산하는 argon laser를 갖추고 있다.

DNA양을 측정하기 위해 사용되는 형광염료인 PI는 488 nm의 파장에서 흥분되어 610 nm의 파장으로여기되는 형광물질로 형광을 발하는강도에 따라 DNA양을 인지하였다.

Method of DNA Analysis on Fresh Specimens

1. obtained tissue from resected colon and rectum
2. RPMI 1640+5% fetal calf serum-cut into small piece-centrifuge (200 g for 10 min 3 times)
3. wash with phosphate buffered saline (PBS)
4. DNA staining with 0.1 ml propidium iodide solution
5. flow cytometric measurement-analysis of histogram

결 과

DNA histogram은 Auer등⁴⁾의 분류에 따라 4가지 형으로 분류하였으며, DNA index가 0.49에서 1.08사이

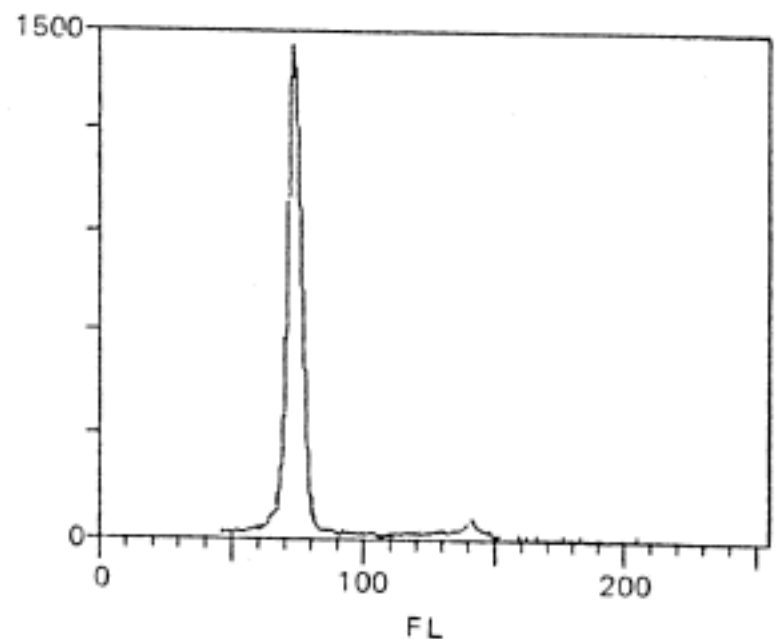


Fig. 1. Type I (Diploid).

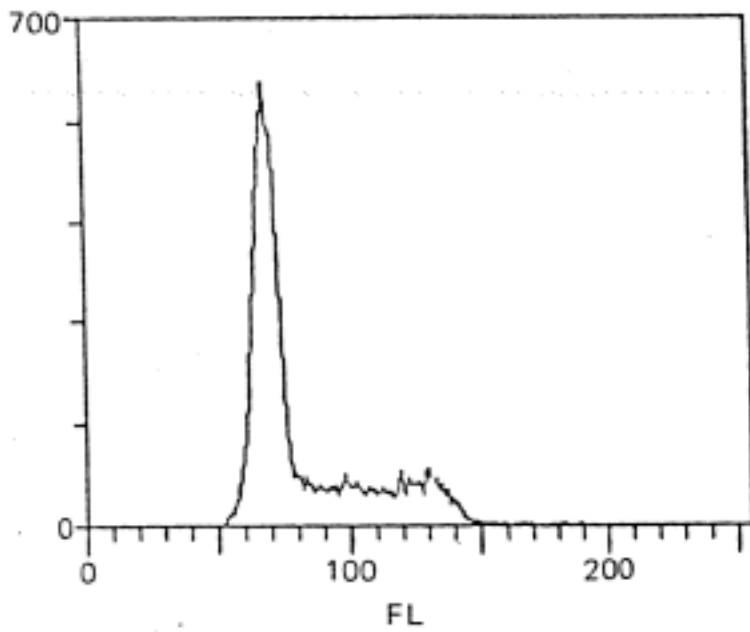


Fig. 2. Type II (Diploid pattern with polyploid).

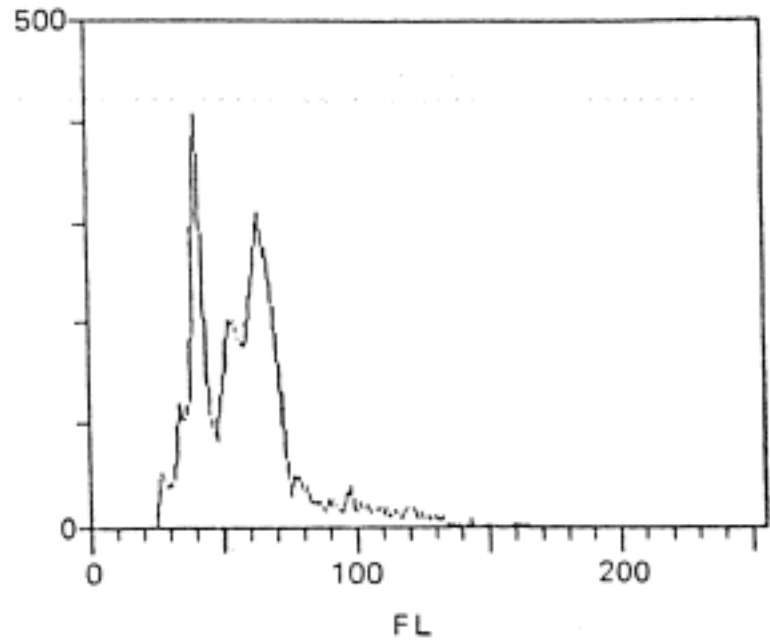


Fig. 4. Type IV (Multiploid and mosaic pattern).

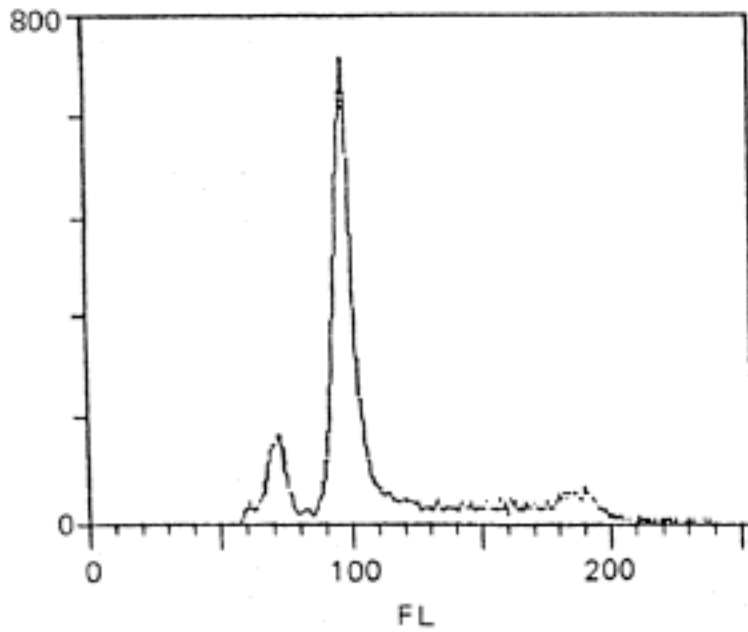


Fig. 3. Type III (Heteroploid).

를 2C의 DNA를 갖는 세포들이 하나의 peak를 형성하는 diploid pattern은 I형이라 하였고 (Fig. 1), 2C나 4C 혹은 6C 등의 DNA 형태를 갖는 세포들이 2개 또는 그 이상의 peak를 이룰 때 II형 (diploid pattern with polyploid cells, Fig. 2), 2C나 4C 이외의 부위에 비정상적인 stem 세포들을 보이는 heteroploid를 III형 (Fig. 3), 2개 이상의 다양하고 불규칙적인 non-diploidy를 갖는 군을 IV형 (Fig. 4)이라 하였는데, 이 중 I형을 diploid, II, III, IV형을 non-diploid로 분류하였으며, diploid가 9예 (39%)였으며 non-diploid가 14례 (61%)였다.

연령별 분포를 보면 41세부터 50세까지가 9예 (39%)

Table 1. Relation of DNA ploidy patterns to age

Age	Diploid	Non-diploid	Total
< 40	1 (33%)	2 (67%)	3
41 - 50	5 (56%)	4 (44%)	9
51 - 60	2 (33%)	4 (67%)	6
> 61	1 (20%)	4 (80%)	5
Total	9 (39%)	14 (61%)	23

Table 2. Relation of DNA ploidy patterns to sex

Sex	Diploid	Non-diploid	Total
Male	5 (45%)	6 (55%)	11
Female	4 (33%)	8 (66%)	12

P > 0.05

로 가장 많은 비율을 차지하였으며, 40세 이하에서는 3명 중 diploid가 1예 (33%) non-diploid가 2예 (67%)였고, 51세부터 60세까지는 6례 중 diploid가 2예 (33%) non-diploid가 4예 (67%)였으며, 61세 이상에서는 5예 중 diploid가 1예 (20%) non-diploid가 4예 (80%)였다 (Table 1).

성별 DNA ploidy patterns을 보면 남자에서는 총 11례 중 diploid가 5예 (45%), non-diploid가 6예 (55%)를 보였으며 여자에는 총 12예 중 diploid가 4예 (33%), non-diploid가 8예 (66%)를 보였다 (Table 2).

Table 3. Relation of DNA ploidy patterns to site

Site	Diploid	Non-diploid	Total
ascending colon	5 (55%)	4 (45%)	9
transverse colon	1	0	1
descending colon	0	3 (100%)	3
rectum	3 (30%)	7 (70%)	10

P > 0.05

Table 5. Relation of DNA ploidy patterns to stage

Stage	Diploid	Non-diploid	Total
I	2 (100%)	0	2
II	5 (63%)	3 (37%)	8
III	2 (29%)	5 (71%)	7
IV	0	6 (100%)	6

P < 0.05

Table 4. Relation of DNA ploidy patterns to histologic type

Histologic type	Diploid	Non-diploid	Total
well differentiated	2 (33%)	4 (67%)	6
moderately	3 (75%)	1 (25%)	4
poorly	3 (38%)	5 (62%)	8
mucinous	1 (25%)	3 (75%)	4
mixed	0	1	1

P > 0.05

Table 6. Relation of DNA ploidy patterns to depth of invasion

Depth of invasion	Diploid	Non-diploid	Total
submucosa	0	0	0
muscle	6 (55%)	5 (45%)	11
serosa	3 (37%)	5 (63%)	8
adjacent structure	0	4 (100%)	4

Table 7. Relation of DNA ploidy patterns to lymph node metastasis

Lymph node metastasis	Diploid	Non-diploid	Total
negative	7 (58%)	5 (42%)	12
positive	2 (18%)	9 (82%)	11

위 치별 종양의 DNA ploidy patterns을 보면 우측 결장은 총 10예 중 diploid가 6예 (60%)였으며 non-diploid가 4예 (40%)를 보였으며, 좌측 결장 및 직장에서는 총 13예 중 diploid가 3예 (23%)였으며 non-diploid는 10예 (77%)로 대부분을 차지하였으나 통계학적 의의는 없었다 (Table 3).

종양의 조직학적인 형태에서 보면 분화도와 DNA 분포양상과의 관계를 보면 잘분화된 종양에서는 6예 중 diploid가 2예 (33%) non-diploid가 4예 (67%)였고, 중등도의 분화도를 보인 종양에서는 4예 중 diploid가 3예 (75%) non-diploid가 1예 (25%)였으며 미분화 종양에서는 총 8예 중 diploid가 3예 (38%) non-diploid가 5예 (62%)로 상관관계가 없었으며 (Table 4), 암병기와 DNA ploidy patterns과의 관계를 보면 stage I에서는 2예 전예가 diploid였으며, stage II에서는 8예 중 5예 (63%)가 diploid 3예 (37%)가 non-diploid였으며, stage III에서는 7예 중 2예 (29%)가 diploid 5예 (71%)가 non-diploid였으며, stage IV에서는 6예 전예가 non-diploid로 병기가 진행될수록 non-diploid patterns이 증가함을 볼 수 있었으며 통계학적으로 유의성이 있었다 (Table 5).

종양의 크기와 DNA ploidy patterns과의 관계를 보면 diploid는 4.3 ± 1.7 cm였고, non-diploid는 5.0 ± 1.5 cm로 non-diploid에서 약간 컸으나 의의는 없었다 ($p > 0.05$).

결장 및 직장벽의 침윤정도와와의 관계를 보면 근육층에서는 11예 중 diploid가 6예 (55%) non-diploid가 5예 (45%)였으며, 장막에 침윤된 경우에는 8예 중 diploid가 3예 (38%) non-diploid가 5예 (62%)였으며, 주위 장기에 침윤된 경우에는 4예 전예가 non-diploid로 침윤 정도가 심할수록 non-diploid의 경향을 보였다 (Table 6).

임파선 전이 및 원격 전이와의 관계를 보면 임파선 전이가 없는 경우에는 12예 중 diploid가 7예 (58%) non-diploid가 5예 (42%)였으며, 임파선 전이가 있는 11예 중 diploid가 2예 (18%) non-diploid가 9예 (83%)를 차지하였으며, 원격 전이가 없는 경우에는 18예로

Table 8. Relation of DNA ploidy patterns to distant metastasis

Distant metastasis	Diploid	Non-diploid	Total
negative	9 (50%)	9 (50%)	18
positive	0	5 (100%)	5

Table 9. Relation of DNA ploidy patterns to percentage of S-phase

	Percentage of S-phase
Diploid	16.6 ± 6.1%
Non-diploid	31.3 ± 14.0%
	P < 0.05

차이가 없었으나, 원격 전이가 있는 경우에는 5에 전예가 non-diploid로 임파선 전이 및 원격 전이가 있는 경우에서 non-diploid가 많은 비중을 차지하였다 (Table 7, 8).

S-phase의 비율과 DNA ploidy patterns과의 관계를 보면 diploid에서는 18%였으며 non-diploid에서는 31.3%로 non-diploid에서 높은 비율을 보였으며 통계학적으로 의의가 있었다 (Table 9)

고 안

악성종양 세포는 정상 diploid 세포보다 많은 DNA를 포함하고 있으며⁸⁾, 염색체의 재배열 (chromosomal rearrangements) 등이 일어나 악성종양 세포에서 DNA의 분포양상을 측정하는 것은 의의가 있으며, 종양세포 내에서 DNA 분포양상을 측정하는 방법으로는 cytofluorometric²⁾, cytophotometric³⁾, and flowctometric study^{5,6,20)} 등이 있으며, 이 중 flowcytometry는 종양 조직의 절편에서 신속하고 정확하게 종양세포 내에 있는 비정상적인 DNA의 분포양상을 측정하는 것이며^{2,3)}, 비정상적인 DNA의 분포양상은 S-phase 비율의 증가, poliploid 세포집단의 출현, non-diploid 세포집단의 출현 등으로 나타난다¹⁸⁾.

Human solid tumors에서는 90% 이상이 non-diploid patterns을 보이고 있어¹⁾ FCM에 의한 DNA 분포양상의 분석이 악성종양의 rapid detection에 이용되며,

leukemia and lymphomas, tumors of the lung^{15,39)}, kidney and urinary tract²⁰⁾, prostate³⁸⁾, genital system¹⁹⁾, skin⁶⁾, thyroid²³⁾, parathyroid²²⁾, brain¹⁴⁾, breast⁶⁾, and bone 등에서 진단에 이용되었으며, Wolley등⁴⁰⁾은 FCM analysis of DNA가 예후의 결정에 중요한 인자가 된다고 하였으며, Forsslund등¹²⁾은 non-diploid가 poor prognosis를 갖는다고 하였으며, Chang등⁹⁾은 FCM analysis of DNA가 prognostic value를 가지고 있으며 non-diploid는 worse prognosis를 가지고 있으며 재발한 83%가 non-diploid였으며 재발이 없는 경우에는 67%가 diploid로 non-diploid에서 재발 및 원격 전이 등의 빈도가 높고 생존율이 낮다고 하였으며, 이외에도 많은 사람들이 결장 및 직장암에서 DNA ploidy의 예후 인자로서의 중요성을 보고하였으며^{1,5,13,16,20,31)}, 이에 반해 Melamed등²⁸⁾은 예후와 FCM analysis of DNA와는 관계가 없다고 보고하였다. 본 교실에서도 이미 17예의 paraffin으로 고정된 유방조직에서 DNA ploidy형을 재발한 군과 재발이 없었던 군으로 비교하여 예후인자로서의 가능성과²⁵⁾, 21예의 위암 환자를 대상으로 FCM analysis of DNA를 시행한 결과 non-diploid 세포의 빈도는 위암의 침윤 정도와 림프절 전이 및 원격 전이 등과 관계가 있어 위암 세포의 생물학적 활성도를 나타내는 지표가 됨을 확인하였으며, 우리나라에서 매년 증가추세에 있는 결장 및 직장암을 대상으로 DNA patterns을 분석하여 비교하였다.

DNA histogram의 분석방법은 여러가지 방법이 있으나, 본 연구에서는 diploid와 non-diploid로 구분하였다.

암병기와 DNA ploidy형과의 관계를 보면 Jones등²⁴⁾은 Dukes'A,B에서는 diploid와 non-diploid가 거의 같은 비율로 나타났으나 Dukes'C에서는 non-diploid가 의의있게 증가되었다고 보고하였으며, Banner등⁵⁾은 Dukes'A,B에서는 diploid의 경향을 보이며 Dukes'C,D에서는 non-diploid의 경향을 보인다고 하였으며, Forsslund등¹²⁾, Kolal등²⁶⁾, Tribukait등³⁸⁾, Wolley등⁴⁰⁾은 non-diploid에서 암병기가 더욱 진행된 상태이고 생존율도 좋지 않다고 하였으며, Melamed등²⁸⁾은 DNA ploidy형과 암병기 및 생존율과는 관계가 없다고 하였다. 저자들의 경우에는 추적기간이 짧아 생존율은 조사할 수 없었으나 1기에서는 2예 전예가 diploid였으며 4기에서는 6예 전예가 non-diploid로 진행된 암일수록

non-diploid의 비율이 높게 나왔다.

종양의 임파선 전이 및 원격 전이와 DNA의 분포양상을 보면 Jones등²⁴⁾은 임파선 전이가 있는 Dukes'C tumors 41예에서 diploid가 7예(17%) non-diploid가 34예(83%)로 나타났으며 침범된 임파선을 이용해서 FCM DNA analysis를 시행한 결과 23예에서 원발종양과 같은 identical DNA ploidy status를 볼 수 있었으며, Wolley등⁴⁰⁾은 aneuploid에서 원격전이가 많다고 하였으며, Scott등³⁴⁾은 Dukes'A, B1에서의 예후는 DNA ploidy에 영향을 받지않지만 Dukes'C1에서의 5년 생존율을 보면 diploid에서는 74% non-diploid에서는 44%로 Dukes'B2 이상에서는 diploid가 non-diploid보다 생존율이 높다고 하였다. 저자들의 경우에서도 임파선 전이나 원격 전이가 없는 경우에는 총 11예 중 diploid가 2예(18%) non-diploid가 9예였으며, 원격 전이가 있는 경우에는 5예 전예가 non-diploid로 전이가 있는 경우에는 현저하게 non-diploid의 비율이 증가하였다.

S-phase는 세포가 증식하는 단계로서 S-phase의 비율이 높다는 것은 cell proliferation이 활발하다는 것을 의미하는 이것은 곧 rapid growing하는 것을 나타내는데 Emdin등¹¹⁾은 S-phase의 비율이 normal mucosa에서는 $4.3 \pm 3.1\%$, diploid tumors에서는 $7.7 \pm 4.2\%$, 그리고 non-diploid tumors에서는 $13.5 \pm 6.6\%$ 의 비율로 non-diploid에서 S-phase의 비율이 높음을 보여주었으며, 저자들의 경우에서도 diploid에서는 $16.6 \pm 6.1\%$ non-diploid에서는 $31.3 \pm 14.0\%$ non-diploid에서 높은 비율을 나타내었다($p < 0.05$).

환자의 나이와 DNA 분포양상을 보면 Jones등²⁴⁾은 elderly patients에서 non-diploid가 증가하며, Scott등³⁴⁾은 65세 이하의 연령층에서 더욱 예후가 좋다고 하였으며 저자들의 경우에는 50세 이하의 경우에는 차이가 없었으며, 51세 이상에서는 non-diploid의 비율이 증가하였으나 의의는 없었으며, 성별의 차이에서 Scott등³⁴⁾은 여자가 남자보다 예후가 좋다고 하였으나, 저자들의 경우에는 남자에서는 diploid가 5예(45%) non-diploid가 6예(55%)였으며, 여자에서는 diploid가 4예(33%) non-diploid가 8예(67%)로 여자에서 non-diploid가 더 많았으나 통계학적으로 의의는 없었다.

종양의 위치와 DNA 분포양상을 보면 결장은 원위부

와 근위부가 생물학적으로 차이가 있다³⁰⁾는 것에서 착안하여 우측과 좌측을 비교분석하였으며, 생존율과 위치와의 관계는 확실하게 밝혀진 바는 없지만 일반적으로 좌측결장의 종양이 더 예후가 좋다고 보고 있으며, Scott등³⁴⁾은 직장을 제외하고 결장에서는 diploid에서 prognostic advantage가 있다고 보고하였으며, Jenes등²⁴⁾은 우측과 좌측과는 차이가 없다고 하였으며 저자들의 경우에는 우측결장에서는 diploid가 6예(60%) non-diploid가 4예(40%)였으며 좌측결장에서는 3예 전예가 non-diploid였으며 직장에서는 diploid가 3예(30%) non-diploid가 7예(70%)로 위치와 DNA ploidy와의 상관성은 의의가 없었다.

종양의 조직학적 분화도와 DNA의 분포양상을 보면 Jones등²⁴⁾은 분화가 잘 되지 않은 형일수록 non-diploid가 증가한다고 하였으나, Banner등⁵⁾, Emdin등¹¹⁾, Scott등³⁴⁾은 분화도와 DNA ploidy형과는 관계가 없다고 하였으며, 저자들의 경우에서도 조직학적 분화도와 DNA ploidy와는관계가 없었다.

종양의 크기와 DNA ploidy와의 관계는 Scott등³⁴⁾의 보고에서와 같이 저자들의 경우에서도 상관관계는 없었다.

결 론

저자들은 23명의 절제 가능한 결장 및 직장암 환자에서 절제한 신선한 조직을 flowcytometry를 이용하여 DNA ploidy patterns를 분석한 결과 diploid형이 9예(39%)였고 non-diploid형이 14예(61%)였다.

결장 및 직장암에서 DNA ploidy형과의 관계를 보면 DNA ploidy patterns와 암병기 및 S-phase와의 관계는 통계학적으로 의의가 있었으며, 암병기가 증가할수록 non-diploid가 증가하였으며, S-phase는 non-diploid에서 더 높은 비율을 보였다. 침윤 정도가 심할수록 non-diploid가 증가하며, 임파선 전이 및 원격전이가 있는 경우에서 non-diploid 비율이 증가되는 경향을 보였으나 통계학적 의의는 없었으며 DNA 분포양상과 종양의 조직학적 분화도, 종양의 크기, 환자의 연령 및 성별과는 상관관계가 없었고, 우측보다는 좌측에 위치한 경우에서 non-diploid 형이 많았으나 통계학적 의의는 없었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 결장 및 직장암에서 DNA ploidy가 예후인자로서 의의가 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

- 1) Armitage NC, Robins RA, Evans DF: *The influence of tumor cell DNA abnormalities on survival in colorectal cancer. Br J Surg* 72:828, 1985
- 2) Ashihara T: *Cytofluorometry and cell pathology J Kyoto Pref Univ Med* 93:763, 1984
- 3) Atkin NB, Kay R: *Prognostic significance of modal DNA value and other factors in malign tumors, based on 1465 cases. Br J Cancer* 40:210, 1979
- 4) Auer G, Eriksson E, Azavedo E, Caspersson T, Wallgren A: *Prognostic of nuclear DNA content in mammary adenocarcinoma in humans. Cancer Research* 44:394, 1984
- 5) Banner BF: *Should flow cytometric DNA analysis precede definitive surgery for colon carcinoma? Ann Surg* 202:740, 1985
- 6) Barlogie B, Drewinko b, Schumann J: *Cellular DNA content as a marker of neoplasia in man. Am J Med* 69:195, 1980
- 7) Braylan RC: *Flow Cytometry Arch pathol Lab Med* 107:1, 1983
- 8) Caspersson TO: *Quantitative tumor cytochemistry. Cancer Res* 39:2341, 1979
- 9) Chang KJ, Enker WE, Melamed M: *Influence of tumor cell DNA ploidy on the natural history of rectal cancer. Am J Surg* 153:184, 1987
- 10) Dean PN, Jett JH: *Mathematical analysis of DNA distributions from flow microfluorometry. J Cell Biol* 60:523, 1974
- 11) Emdin SO, Stenling R, Roos G: *Prognostic value of DNA content in colorectal carcinoma. Cancer* 60:1282, 1987
- 12) Forsslund G, Cedermark B, Ohman U, Erhardt K, Zetterberg A, Auer G: *The significance of DNA distribution pattern in rectal carcinoma. Dis Col Rectum* 27:579, 1984
- 13) Frankfurt OS, Arbuck SG, Chin JL: *Prognostic applications of DNA flow cytometry for human solid tumors. Ann N Y Acad Sci* 468:276, 1986
- 14) Frederiksen P, Bichel P: *Sequential flow cytometric analysis of the single cell DNA content in recurrent human brain tumors. Acta Pathol Microbiol Scand A (Suppl)* 274:398, 1979
- 15) Frost JK, Tyrer HW, Pressman NJ: *Automatic cell identification and enrichment in lung cancer: III. Light scatter and two fluorescence parameters. J Histochem Cytochem* 27:557, 1979
- 16) Goh HS, Jass JR, Atkin WS, Cuzick J, Northover JMA: *Value of flow cytometric determination of ploidy as a guide to prognosis in operable rectal cancer: a multivariate analysis. Int J Colorect Dis* 2:17, 1987
- 17) Greenebaum E, Koss LG, Sherman AB, Elequin F: *Comparison of needle aspiration and solid biopsy techniques in the flow cytometric study of DNA surgically resected tumors. Am J Clin Pathol* 82:559, 1984
- 18) Hadama S, Itho R, Fugita S: *DNA distribution pattern of the so-called severe dysplasia and small carcinoma of the colon and rectum and its possible significance in the tumor progression. Cancer* 61:1555, 1988
- 19) Herman CJ, Bunnag B, Cassidy M: *Clinical cytology specimens for cancer detection, in melamed MR, Mullancy PF, Mendelsohn ML. Flow cytometry and sorting. New York, John Wiley & Sons Inc, 559, 1979*
- 20) Hiddemann W, Schumann J, Andreef M: *Convention on nomenclature for DNA cytometry. Cancer Genet Cytogenet* 13:181, 1984
- 21) Hiddemann W, von Bassewita DB, Kleinermeirer HJ: *DNA stem line heterogeneity in colorectal cancer. Cancer* 58:258, 1986
- 22) Irvin GL III, Bagwell CB: *Identification of histologically undetectable parathyroid hyperplasia by flow cytometry. Am J Surg* 138:567, 1979
- 23) Johannessen JV, Sobrinho-Simoes M, Tangen KO: *A flow cytometric deoxyribonucleic acid analysis of papillary thyroid carcinoma. Lab Invest* 45:336, 1981
- 24) Jones DJ, Schofield PF: *Prognostic significance of DNA ploidy in colorectal cancer: a prospective flow cytometric study. Br J Surg* 75:28, 1988
- 25) Kim YJ, Chung HT, Choi W: *Prognostic significance of DNA ploidy level and estrogen receptor in breast cancer. JKSS* 37:11, 1989
- 26) Kokal WA, Duda RB, Azumi N: *Tumor DNA content in primary and metastatic colorectal carcinoma. Arch Surg* 121:1434, 1986
- 27) Kokal W, Sheibani K, Terz J, Harada R: *Tumor DNA content in the prognosis of colorectal car-*

- cinoma. JAMA 255:3123, 1986*
- 28) Melamed MR, Enker WE, Banner P, Janov AJ, Kessler G, Daryznkiewicz Z: *Flow cytometry of colorectal cancer with three year follow-up. Dis Col Rect 29:184, 1986*
- 29) Pedersen t, Larsen JK, Krarup T: *Characterization of bladder tumors by flow cytometry on bladder washings. Eur Urol 4:351, 1978*
- 30) Petersen SE, Lorentzen M, Bichel P: *A mosaic subpopulation structure of human clorectal carcinomas demonstrated by flow cytometry. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand 274 (Suppl) 412, 1981*
- 31) Quirke P, Dyson JED, Dixon MF, Bird CC, Joslin CAF: *Heterogeneity of colorectal adenocarcinomas evaluated by flow cytometry and histopathology. Br J Cancer 51:99, 1985*
- 32) Rognum TO, Thorud E, Elgjo K, Brandtzaeg P, Orjasaeter, Nygaard K: *Large bowel carcinomas with different ploidy, related to secondary component, IgA and CEA in epithelium and plasma. Br J Cancer 45:921, 1982*
- 33) Rognum O, Thorud E, Lund E: *CLinical behaviour in large bowel carcinoma patients with different DNA ploidy pattern. 14th International Cancer Congress. Budapest, Abstract 24389, 1986*
- 34) Scott NA, Wieand HA: *Colorectal cancer. Arch Surg 122:1375, 1987*
- 35) Simmons A, Elbert G: *Hemalong-D and manual differential leukocyte counts: A laboratory comparison of results obtained with blood of hospitalized patients. Am J Clin Pathol 64:512, 1975*
- 36) Slease RB, Wister RJ, Scher I: *Surface immunoglobulin density on human peripheral blood mononuclear cells. Blood 54:72, 1979*
- 37) Tribukait B, Esposti PL, Ronstrom L: *Tumor ploidy for characterization of prostatic carcinoma flow cytofluorometric DNA studies using aspiration biopsy material. Scand J Urol Nephrol (Suppl) 55:59, 1980*
- 38) Tribukatit B, HammarberG, C, Rubio C: *Ploidy and proliferation patterns in colorectal adenocarcinomas relating to Dukes' classification and to histipathological differentiation. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand 91:89, 1983*
- 39) Vindelov LL, Hansen HH, Christensen IJ: *Clonal heterogeneity of small cell carcinoma of the lung demonstrated by flow cytometric DNA analysis. Cancer Res 40:4295, 1980*
- 40) Woley RC, Schriber K, Koss LG, Karas M, Sherman A: *DNA distribution in human colon carcinomas and its relationship to clinical behaviour. J Nat Cancer Inst 69:15, 1982*