

기관지암 세포의 DNA 배수성에 관한 화상분석학적 연구

전남대학교 의과대학 병리학교실

김수성 · 이재혁 · 정상우 · 유주용

= Abstract =

Evaluation of DNA Ploidy of Bronchogenic Carcinomas by Image Analysis

Soo Sung Kim, M.D., Jae Hyuck Lee, M.D.,
Sang Woo Jung, M.D. and Yoo Joo Yong, M.D.

Department of Pathology, Chonnam University Medical School, Kwangju, Korea

In order to extract useful tumor cell-specific information, DNA contents and other morphological parameters were measured by image analysis. Single cell preparation was made from archived paraffin blocks of 14 cases of bronchogenic squamous cell carcinoma, poorly differentiated, by protease treatment. The cells were Feulgen stained, and DNA content, area, perimeter, and major axis of the tumor cell nuclei were measured. Inflammatory lymphocytes concurrent with the tumor cells were used as an internal standard.

DNA ploidy of the lymphocytes and 2C tumor cells showed simple peaks with Gaussian distribution and mean coefficients of variation of 10% and 14% respectively. By the location and proportion of the tumor cells other than 2C cells, DNA ploidy could be classified into diploidy(1 case), polyploidy(2 cases), and aneuploidy(11 cases). The mean proportion of DNA aneuploidal tumor cells relative to the total tumor cells was 82.8%. In 8 cases, nuclear areas showed more or less overlapped distribution, whereas DNA contents showed discrete peaks.

These results suggest that many bronchogenic squamous cell carcinomas, poorly differentiated, have DNA aneuploidy and high proportion of aneuploidal cells, and that nuclear size and DNA content are more or less independent parameters.

Key Words : Bronchogenic carcinoma, DNA ploidy, Image analysis

서 론

종양의 생물학적 악성도는 치료방침을 결정하고 예후를 추정하는데 있어서 중요한 역할을 하며 따라서 종양의 악성도를 판정하기 위해서 여러가지 방법이 이

용되고 있다. 임상에서 주로 사용되는 악성도의 기준은 종양세포의 종류와 분화정도 등의 형태학적 인수와 병기(staging)와 같은 임상적 인수이다. 그외 보조적으로 호르몬 수용체¹⁾, 여러가지 암태아 항원(oncofetal antigens), 암유전자(oncogenes) 또는 암유전자 산물²⁾, 그리고 성장인자와 성장인자 수용체 등이 측정되고 있다. 이 기준들은 정도의 차이는 있으나 많은 경우에서 상호의존적이다. 이 기준들은 낮은 분화도를 보이는 종양세포에서 암태아 항원이나 암유전자 산물 또

접 수: 1990년 2월 4일, 게재승인: 1990년 12월 24일
주 소: 광주직할시 동구 학 1동 5번지, 우편번호 501-190
전남대학교 의과대학 병리학교실, 김 수 성

는 성장인자의 발현 빈도가 높은 경우를 들 수 있다. 종양의 악성도를 판정하기 위한 그외의 기준은 종양세포핵의 DNA 함량의 분포, 즉 DNA 배수성(ploidy)이다. 종양의 DNA 배수성은 다른 기준들과는 달리 상당수의 경우에서 비교적 독립적인 악성도의 지표가 됨이 알려져 있다³⁾.

종양의 DNA 배수성은 전통적으로 분광측광현미경법(microspectrophotometry)에 의하여 측정되어 왔으나^{4,5)}, 근래 유식세포측정법(flow cytometry)에 의한 측정이 보편화되고 있다^{6,7)}. 유식세포측정법으로는 다수의 세포를 신속하게 처리할 수 있고 DNA 배수성 외에도 핵의 크기, 또는 세포의 다른 phenotype을 동시에 측정할 수 있다⁸⁻¹⁰⁾. 그러나 유식세포측정법에서는 다양한 종류의 세포가 함께 측정되므로 종양세포와 비종양세포의 비에 따라서 DNA 배수성의 양상이 다를 수 있고 작은 DNA 배수성 피크는 감춰질 수 있다. 또한 각 DNA 배수성 피크를 이루는 종양세포의 형태학적 특성의 관찰이 크게 제한받는다. 이에 비하여 최근 전산학의 발달로 가능하게 된 화상분석법은 유식세포 측정법에 비하여 처리속도가 늦으나 측정자와 컴퓨터 시스템과의 교호적 진행에 의하여 종양세포와 비종양세포의 DNA 배수성을 구분하여 측정할 수 있고¹¹⁾, 그 외에도 각 세포의 형태계측학적 및 구조학적 변량을 동시에 측정할 수 있다. 따라서 화상분석법에 의해서는 종양세포의 DNA 배수성 외에도 DNA 배수성 피크를 이루는 종양세포의 형태학적 특성을 규명할 수 있다¹²⁾.

저자들은 화상분석에 의하여 기관지암의 DNA 배수성과 종양세포핵의 형태계측학적 및 염색질 구조를 측정함으로써 DNA 배수성 양상을 조사하고 DNA 배수성 양상과 종양세포의 형태학적 특성을 연관지어 고찰하기 위하여 본 연구를 시도하였다.

재료 및 방법

1. 재료

최근 5년간 전남대학병원 병리과에 의뢰된 원발성 기관지 편평상피암의 외과적 절제조직과 주변 림프절 조직의 hematoxylin-eosin 염색표본을 검토하여 암조직이 전체병변을 대표할 수 있고 파라핀 조직과의 보관상태가 양호한 14예를 조사대상으로 하였다.

2. 표본제작방법

Hedley등^{13,14)}과 Jacobsen등¹⁵⁾의 방법을 다소 변형시켜 파라핀 조직괴로부터 세포부유액을 만들었다. 파라핀 조직괴에서 얻은 70 μ m두께의 절편을 xylene으로 2회 처리하여 파라핀을 제거하였고 무수 및 단계적 저농도 ethanol(96%, 64%, 32%, 16%)과 증류수를 거쳐 함수시킨 후 PBS(phosphate buffered saline) 완충액으로 세척하였다. 절편을 0.1% protease(Sigma) 용액에 60분간 37°C에서 부치시켰으며 부치 중 5분, 10분, 20분, 30분, 및 60분에 부치액을 주사기로 흡입 및 분출시켜 개개 세포의 유리를 촉진시켰으며 부치 후 냉 PBS로 세척하였다. 세포부유액을 45 μ m구경의 nylon mesh를 통해 여과시켰고 여과액내의 유리세포수가 2×10^4 /ml가 되도록 조정하여 최종 세포부유액을 만들었다. 세포부유액 1ml를 poly-L-lysine이 도포된 유리 슬라이드에 놓고 원심분리시켜 도말 세포표본을 만들었다. 표본을 실온에서 5N HCl로 75분간 작용시켜 핵산의 가수분해를 일으켰고 Schiff 반응으로 Feulgen 염색을 시행하였다¹⁶⁾.

3. 화상분석에 의한 변량측정

염색표본의 현미경화상을 화상분석장치(IBAS 2000, Kontron, FRG)의 TV camera와 analog-digital 변환기를 통하여 256개의 휘도(grey level)로 표현되는 grey image로 변환시켰다. 본 연구에서 하나의 화상단위가 표현할 수 있는 화상단위는 $0.40 \times 0.40 \mu$ m(분해능 0.40μ m)이었다. Grey image를 대조 강화시킨 후 분할(segmentation)에 의하여 세포핵의 2치 화상(binary image)인 기준화상(template image)을 구하였다. 기준화상으로부터 핵의 면적, 둘레 및 장경 등 형태계측학적 변량을 측정하였고 기준화상을 바탕으로 하여 원래의 grey image로부터 평균 배경 휘도(mean background grey value)와 세포핵의 평균휘도(mean nuclear grey value) 등 광계측학적 변량을 측정하였다.

핵의 DNA 함량은 다음식에 의하여 산출하였다.

$$\text{DNA 함량} = (-\log \frac{[\text{평균세포핵휘도}]}{[\text{평균배경 휘도}]}) \times [\text{핵의면적}]$$

각 예당 30개 이상의 염증성 림프구와 200개 이상의 종양세포를 무작위로 선택하여 측정하였다.

성 적

전체 예에서 종양세포와 함께 출현하는 염색성 림프구의 DNA 함량은 평균 변이계수 10%인 정규분포성의 단일 피크를 보여주었다. 종양세포의 DNA 배수성 양상은 염색성 림프구핵의 DNA 피크 부근에 위치하는 피크 1과 그의 1~3개의 피크들로 구성되었으며 각 피크의 크기는 다양하였다. 염색성 림프구의 평균 DNA 양과 피크 1에 위치한 종양세포의 평균 DNA 양의 비는 약 0.9:1로서 15% 이상을 벗어나는 저이배성(hypodiploidy)이나 고이배성(hyperdiploidy) 피크를 갖는 예는 없었으며 따라서 종양세포의 피크 1을 정상 DNA 배수성인 2C 피크라고 볼 수 있었다. 종양세포의 2C 피크는 염색성 림프구의 DNA 배수성 양상과 같이 정규분포성의 단일 피크이었으며 평균 변이계수는 14% 이었다. 2C 이외의 피크는 정규분포 또는 준정규분포를 보였으며 일반적으로 변이계수는 염색성 림프구나 2C 종양세포 피크의 변이계수보다는 컸다.

2C 피크와 피크 2, 피크 3, 그리고 피크 4의 상대적 위치 및 각 피크를 구성하는 종양세포의 수에 따라서 전체를 DNA 이배성(diploidy)과 DNA 다배성(polyploidy), 그리고 DNA 이수성(aneuploidy)으로 구분할 수 있었다. DNA 이배성의 예는 다수의 종양세포가 2C 영역에 위치하며 전체 종양세포의 20% 미만만이 2C의 2배수 위치인 4C 또는 8C 영역에 위치하는 경우로서 1예만이 이에 해당되었다(Fig. 1). DNA 다배성의 예는 2C 피크 이외의 피크가 2C의 2 배수 위치, 즉 4C 또는 8C의 영역에 위치하면서 2C 이외의 피크를 구성하는 종양세포가 전체 종양세포의 20% 이상을 차지하는 경우로서 2예가 이에 해당되었다(Fig. 2). 각 피크를 구성하는 종양세포의 수와는 관계없이 2C의 2 배수 위치를 벗어난 위치에서 DNA 피크가 형성된 경우나 종양세포가 2C 이외의 위치에 광범히 산재하여 출현하는 경우를 DNA 이수성이라고 분류하였으며 11예가 이에 해당되었다(Fig. 3). 종양세포가 피크를 구성하지 않으면서 광범히 산재되어 출현한 예는 관찰되지 않았다. 각 예에서의 피크수 및 전체 종양세포에 대한 각 피크를 구성하는 종양세포의 비는 Table 1과 같다. 1예의 DNA 이배성의 경우에는 2C와 4C 영역에서 피크를 볼 수 있었으며 피크 1과 피크 2의 종양

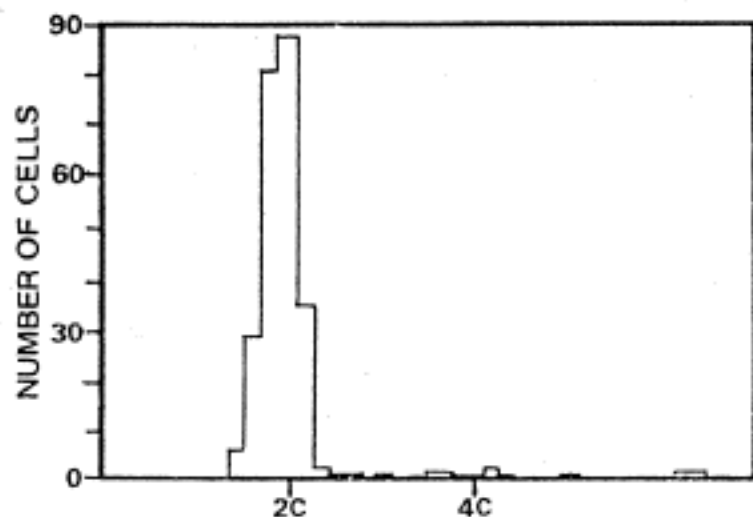


Fig. 1. A histogram of a DNA diploidy case (Case 9) shows a prominent peak 1 with a mode at 2C region and an minor peak 2 with a mode at 4C region. Proportion of the tumor cells at 4C region is 6.6% of the total tumor cells.

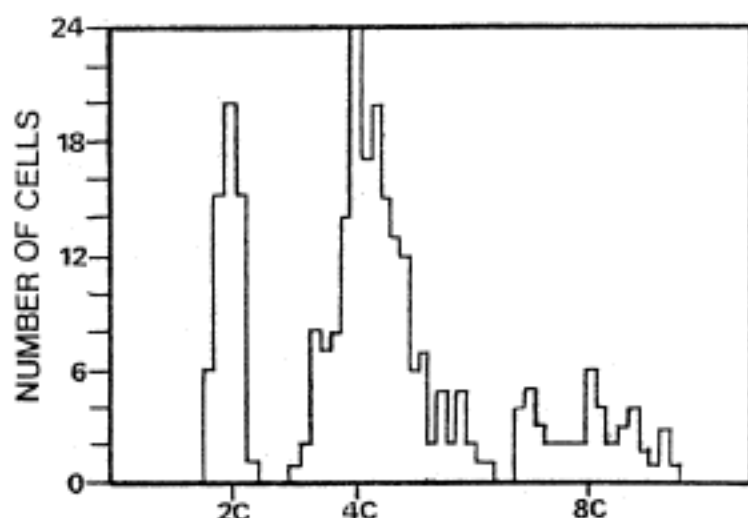


Fig. 2. A histogram of a DNA polyploidy case (Case 8) consists of three peaks at 2C, 4C, and 8C regions. The 2C peak has a smaller CV, while the others have larger ones.

세포는 전체종양세포의 93.4%와 6.6%이었다. 2예의 DNA 다배성의 경우 각각 2C, 4C 및 8C 영역에 피크가 형성되었으며 절반 이상의 종양세포가 4C 영역 및 8C 영역에 분포하였다. 11예의 DNA 이수성의 예중 5예에서는 3개의 피크가 관찰되었고 6예에서는 4개의 피크가 관찰되었다. DNA 이수성의 예에서는 2C 영역 이외의 위치에 분포하는 종양세포수가 전체 종양세포수의 44% 이상이었고 평균은 82.8%로서 다수의 종양세포가 2C 영역 이외에 위치하였다.

Table 1. DNA ploidy and proportion of the tumor cells in various peaks

Case No.	Ploidy	Peak1(%)	Peak2(%)	Peak3(%)	Peak4(%)
9	D	93.4	6.6	—	—
8	P	20.5	61.9	17.6	—
13	P	48.8	47.3	3.9	—
1	A	10.8	64.3	10.5	14.3
2	A	5.8	66.8	24.8	2.6
3	A	14.2	50.3	13.4	21.9
4	A	11.3	73.3	15.3	—
5	A	16.2	61.3	22.5	—
6	A	66.1	31.8	2.1	—
7	A	6.3	66.8	24.5	2.4
10	A	43.4	45.9	10.8	—
11	A	14.9	75.7	9.4	—
12	A	5.7	71.3	23.7	—
14	A	0.7	49.0	39.0	11.0

D : Diploidy, P : Polyploidy, A : Aneuploidy

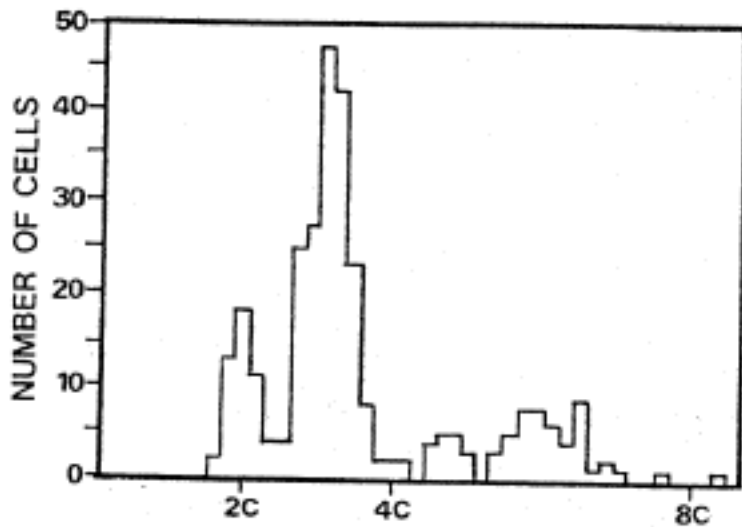


Fig. 3. A histogram of a DNA aneuploidy case (Case 5) shows a 2C peak and other peaks deviated from 4C and 8C regions. The distribution between 4C and 8C regions has apparent two peaks, but considering the variation, a unimodal distribution is highly probable.

세포핵의 면적과 둘레 및 장경은 큰 상관관계(상관계수 > 0.9!)를 가졌다. 세포핵의 면적과 DNA 양과는 조사대상 예에 따라 달랐으나 일반적으로 DNA 함량이 클수록 면적도 커지는 경향으로서 피크 1을 구성하는 종양세포핵의 면적이 작았고 피크 2, 피크 3 및 피

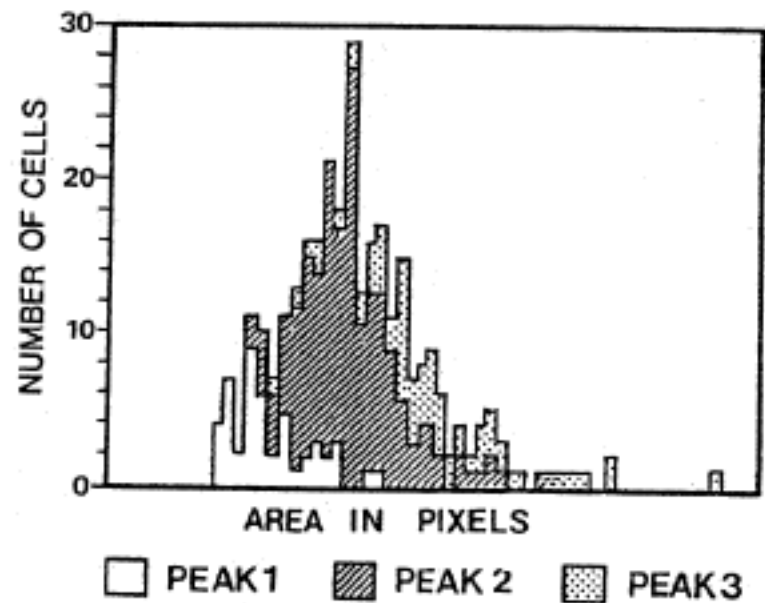


Fig. 4. Nuclear area distribution by the DNA peaks in the same case of Fig. 3 (Case 5). Nuclear areas increase as DNA contents do but the increase of the nuclear areas is gradual whereas that of DNA contents is discrete, forming peaks in DNA ploidy.

크 4를 구성하는 종양세포의 핵면적은 점차 증가되었다. 핵면적의 증가는 연속적으로서, DNA 함량분포에 따라서 종양세포들은 분명한 피크를 형성하였으나 면적분포에 따른 피크형성은 관찰되지 않았다(Fig. 4).

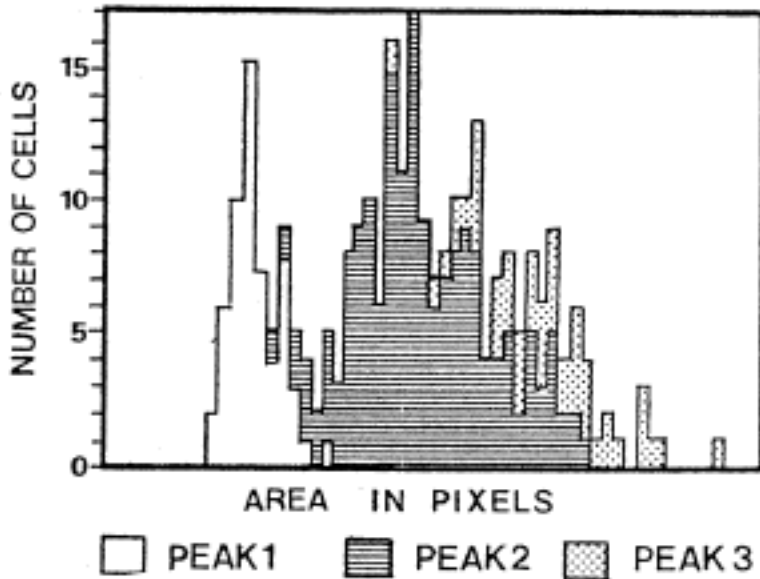


Fig. 5. In the same case of Fig. 2 (Case 8), the peak 1 tumor cells comprise a discrete distribution of the nuclear areas. The cells of the other peaks show somewhat good separation but still overlapped.

그러나 1에의 DNA 다배성과 2에의 DNA 이수성에에서는 DNA 배수성상 피크 1을 구성하는 종양세포가 핵면적분포상에서도 분명한 피크를 형성하였다.

고 찰

본 연구에서는 암세포에서의 DNA 양과 형태계측학적 특성을 화상분석에 의하여 계측하고 그 계측치를 분석함으로써 암세포가 갖는 여러가지 특성을 계량적으로 비교할 수 있었다. 암세포의 여러가지 특성을 동시에 측정할 수 있음은 분광측광현미경법이나 유식세포분석법으로는 거의 불가능한 것으로서 화상분석법의 큰 장점이라고 할 수 있다. 화상분석에 의한 DNA ploidy 조사가 이루어진 바 있으나^{11,12} 본 연구에서처럼 여러 특성의 동시관찰은 현재 시도되고 있는 단계다.

본 연구성적상 화상분석에 의한 종양세포의 DNA 이배성 피크는 정규분포곡선으로 표현되었으며 14%의 평균 변이계수를 가졌다. 이 변이계수는 유식세포분석법에 의한 파라핀 포매조직에서의 DNA 이배성 피크의 평균변이계수 3.6%¹⁷와 분광측광현미경법에 의한 신선동결조직 이배성 피크의 평균변이계수 4.9%¹⁸보다는 높았으나 만족할 만한 변동범위라고 생각되었으며 DNA 배수성 피크와 그외 종양세포들의 특성을 분

석하는 데에는 큰 장애를 주지 않았다.

기관지암의 예후 결정에는 병기와 종양세포의 분화도 등의 인자외에도 DNA 배수성이 관여하는 것으로 알려져 있다¹⁹. 그러나 최근 van Bodegom 등²⁰은 병기를 포함시킨 기관지 편평상피세포암의 경우, DNA 배수성보다도 전체 종양세포 중 이수성 세포의 비가의의있는 예후결정인자라고 보고하고 있다. 그것은 기관지암의 예후관정을 위해서는 DNA 배수성 외에 이수성 세포비율의 측정이 요구됨을 의미한다. 현재 주로 사용되고 있는 유식세포분석법으로는 종양세포와 비종양세포의 DNA 양이 함께 측정되므로 종양세포만의 DNA 배수성을 별도로 분석할 수 없으며 따라서 전체 종양세포에 대한 이수성 세포의 비율을 정확히 알 수 없다. 그러나 화상분석에 의해서는 비종양세포와 종양세포가 선택적으로 측정되므로 종양세포만의 DNA 배수성을 구할 수 있고 각 피크에 따른 종양세포 비율을 보다 정확히 산출해 낼 수 있다.

본 연구에서는 기관지의 저분화 편평상피암은 DNA 이수성 예가 많을 뿐만 아니라 전체 종양세포중 DNA 이수성의 종양세포가 다수임을 보여 주고 있으며 저분화 편평상피암의 높은 악성도를 의미하는 것이라고 추정할 수 있었다. 추후 화상분석에 의한 DNA 배수성의 각 피크에 따른 종양세포 비율을 실제 임상 결과가 알려진 환자를 대상으로 하여 종양의 예후관정에 적용해 보는 것은 매우 중요하고 흥미있는 과제라고 생각한다. Baak 등²¹은 암세포핵의 크기에 관한 형태계측학적 인자들이 유방암 환자의 예후결정에 유의하게 관여하며, Boon 등²²은 분광측광현미경법에 의해 유방암 세포의 핵면적과 DNA 양의 표준편차 및 DNA 배수성 양상들을 계측하여 이들 인자가 상호 작용함으로써 환자의 예후를 결정한다고 보고하였다. 핵의 면적, 모양, 둘레 또는 장경 등 형태계측학적 인자들이 기관지 편평상피세포암의 예후에 어떻게 작용하는지는 알려져 있지 않으나 가능한 한 여러가지 변량들을 조사한 후 다변량분석으로 유의한 변량들을 선택하고 선택된 변량들의 무게에 따라 예후지수를 산출하여 비교하는 것이 바람직할 것이다. 즉 기관지암의 예후관정에는 병기와 분화정도 등 전통적인 인자 외에도 DNA 배수성과 함께 여러 화상분석학적 인자들을 고려하여야 할 것이다.

본 연구성적상 많은 예에서 암세포의 DNA 양과 핵

면적은 높은 상관관계를 가지므로 일반적으로 DNA 양이 많은 세포일수록 핵면적이 크다고 볼 수 있었다. 그러나 소수의 종양세포는 2C 피크의 암세포와 같은 크기의 핵면적을 가지면서도 보다 많은 DNA 양을 갖는 세포가 출현하였다. 이와 같은 현상은 아직 보고되지 않은 내용으로서 그 의미는 추후 조사되어야 하리라고 생각한다.

본 연구에서는 보관되어 있는 파라핀 포매조직에서부터 단일세포 도말표본을 만들어 DNA 배수성을 분석하였다. 파라핀 포매조직을 이용하는 것은 후향적 연구를 가능하게 하므로 환자의 임상경과와 관계된 알고있는 내용들을 추가함으로써 새로운 환자의 치료 방향과 예후를 판정하는 보다 강력한 데이터 베이스를 단시간내에 구성할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 단일세포 부유액을 만드는 과정까지는 화상분석법이나 유식세포분석법에서 모두 동일하므로 본 연구에서와 같은 방법으로 단일세포 부유액을 만들어 일부는 유식세포분석에 의하여, 그리고 일부는 화상분석법에 의하여 DNA 배수성을 분석할 수 있다. 유식세포분석법은 화상분석법에 비하여 높은 분해능과 처리능을 가지며 세포의 다른 표현형을 함께 측정할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 따라서 양자의 방법으로 암세포의 여러 가지 특성을 측정하여 비교하는 것은 매우 중요하리라고 생각한다.

결 론

화상분석법에 의하여 기관지 저분화 편평상피암의 DNA 배수성 양상을 조사하고 DNA 양과 암세포의 형태학적 특성을 관찰하기 위하여 14예의 파라핀 포매조직으로부터 단일세포 도말표본을 만들었고 선택적으로 종양세포의 DNA 양과 핵의 면적, 둘레, 장경 등을 측정하였다. 종양세포와 함께 출현하는 염증성 림프구의 특성을 측정하여 내부표준으로 삼았다.

내부표준세포인 염증성 림프구와 2C 종양세포의 DNA 분포는 정규분포성의 단일 피크로서 각각 평균 10%와 14%의 변이계수를 보였으며 림프구 DNA 피크와 2C 종양세포의 DNA 피크비는 0.9:1이었다. 2C 종양세포를 기준으로 하여 전체예의 DNA 배수성 양상을 이배성 1예, 다배성 2예, 그리고 이수성 11예로 구분할 수 있었다. 화상분석방법에 의해서는 DNA 배

수성 양상의외에도 유식세포 분석법으로는 측정이 어려운 2C 이외의 종양세포의 비를 산출할 수 있었던 바 DNA 이수성 예에서는 평균 82.8%로 높은 치를 볼 수 있었다. 8예에서는 종양세포 DNA 양의 분포가 분명한 피크를 형성하였으나 핵면적은 연속적 분포를 보였다.

이상의 성적으로 기관지 저분화 편평상피암에서는 DNA 이수성이 많으며 2C 이외 종양세포의 비가 높음을 알 수 있었고 DNA 배수성과 형태계측학적 인수는 비교적 독립적임을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- 1) Suh SP, Yoo JY: *Estrogen receptors in various breast lesions of Korean patients. Kor J Clin Pathol* 8:275-285, 1988
- 2) Lee KM, Yoo JY: *Immunohistochemical study on the Ha-ras p21 expression in the gastric carcinoma. Kor J Pathol* 24:1-9, 1990
- 3) van der Linden JC, Lindeman J, Baak JPA, Meijer CJLM, Herman CJ: *The multivariate prognostic index and nuclear DNA contents are independent prognostic factors in primary breast patients. Cytometry* 10:56-61, 1989
- 4) Böhm N, Sandritter W: *DNA in human tumors: A cytophotometric study. Current Topics in Pathology* 60:152-219, 1975
- 5) Friedlander ML, Hedley DW, Taylor IW: *Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumors. J Clin Pathol* 37:961-974, 1984
- 6) Coon JS, Landay AL, Weinstein RS: *Advances in flow cytometry for diagnostic pathology. Lab Invest* 57:453-479, 1987
- 7) Kute TE, Muss H: *Flow cytometry in solid-tumor prognosis. Laboratory Management. July, 1987, p. 21-32*
- 8) Barlogie B, Raber MN, Schumann J, et al: *Flow cytometry in clinical cancer research. Cancer Res* 43:3982-3997, 1983
- 9) Dent GA, Leglise MC, Pryzwansky KB, Ross DW: *Simultaneous paired analysis by flow cytometry of surface markers, cytoplasmic antigens, or oncogene expression with DNA content. Cytometry* 10:192-198, 1989
- 10) Laffin J, Fogleman D, Lehman JM: *Correlation of DNA content, p53, T antigen, and V antigen in*

- simian virus 40-infected human diploid cells. Cytometry 10:205-213, 1989*
- 11) Auffermann W, Repges R, Böcking A: *Rapid diagnostic DNA cytometry with an automatic microscope and a TV image-analysis system. Anal Quant Cytol 6: 179-188, 1984*
 - 12) Kaern J, Danielsen HE, Farrants G, et al: *Comparison between determination of nuclear size and DNA content by single cell cytometry (SA) and DNA content by flow cytometry (FCM). Proceedings of First Conference of the European Society for Analytical Cellular Pathology. Schloss Elmau, FRG, 1989, p.41*
 - 13) Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Rugg CA, Musgrove EA: *Method for analysis of cellular DNA content of paraffin embedded pathological material using flow cytometry. J Histochem Cytochem 31: 1333-1335, 1983*
 - 14) Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IE, Rugg CA, Musgrove EA: *Application of DNA flow cytometry to paraffin-embedded archival material for the study of aneuploidy and its clinical significance. Cytometry 6: 327-333, 1985*
 - 15) Jacobsen AB, Thorud E, Fossa SD, et al: *DNA flow cytometry in metastases and a recurrency of malignant melanomas. A comparison of results from fresh and paraffin embedded material. Virchows Arch Cell Pathol [B] 54: 273-277, 1988*
 - 16) Gaub J, Auer G, Zetterberg A: *Quantitative cytochemical aspects of a combined Feulgen naphthol S staining procedure for the simultaneous determination of nuclear and cytoplasmic protein and DNA in mamalian cells. Exp Cell Res 92:323-332, 1975*
 - 17) Hedley DW: *Flow cytometry using paraffin-embedded tissue: Five Years on. Cytometry 10:229-241, 1989*
 - 18) Stal O, Klintenberg C, Franzen G, et al: *A comparison of static cytofluorometry and flow cytometry for the estimation of ploidy and DNA replication in human breast cancer. Breast Cancer Res Treat 7: 15-22, 1986*
 - 19) Tirindelli-Danesi D, Teodori L, Mauro F, et al: *Prognostic significance of flow cytometry in lung cancer. Cancer 60: 844-851, 1987*
 - 20) van Bodegom PC, Baak JPA, Galen CS-V, et al: *The percentage of aneuploid cells is significantly correlated with survival in accurately staged patients with stage I resected squamous cell lung cancer and long-term follow up. Cancer 63: 143-147, 1989*
 - 21) Baak JPA, Kurver PHJ, de Graaf S, Boon ME: *Morphometry for prognosis prediction in breast cancer. Lancet 8: 315, 1981*
 - 22) Boon ME, Auer GU, van Kaam H, Schwinghammer H: *Classifying breast carcinomas with DNA measurements and morphometry. Cytometry 5: 469-472, 1984*