

## 난소 점액성 종양의 DNA Ploidy 유형에 관한 연구

전남대학교 의과대학 병리학교실

김윤미 · 정상우 · 유주용 · 조규혁

### Evaluation of DNA Ploidy and Other Morphometric Parameters of Ovarian Mucinous Tumors

Yun Mee Kim, M.D., Sang Woo Juhng, M.D., Joo Yong Yoo, M.D. and Kyu Hyuk Cho, M.D.

*Department of Pathology, Chonnam University Medical School*

Biological behavior of malignant tumors has been assessed by morphological grading, clinical staging, and estimating other tumor markers. Recently DNA ploidy measured by flow cytometry and image analyser has been suggested as an additional useful indicator of the tumor behavior.

In order to extract useful tumor cell-specific information in ovarian mucinous tumors, DNA contents and other morphologic parameters were measured by image analysis and DNA ploidy was also measured by flow cytometry.

In all cases of cystadenoma, DNA diploidies were observed. In borderline malignancy, DNA diploidies were chiefly observed except one case of polyploidy. In true malignancy, DNA aneuploidies were observed except one case of polyploidy and two cases of diploidies by image analysis, and except four cases of diploides and one case of polyploidy by flow cytometry. The statistical significance were observed in DNA ploidy pattern by image analysis. In nuclear areas, perimeters and major axis, statistical significance were not observed.

These results suggest that DNA ploidy pattern are more or less independent parameter as an additional useful indicator of the histological grade of malignancy and that image analysis are better than flow cytometry in detecting DNA aneuploidy.

**Key Words:** Ovary, Mucinous tumors, DNA ploidy, Flow cytometry, Imge analysis

#### 서 론

난소의 상피성 종양 중 점액성 종양은 다른 유형에 비하여 간질에 둘러싸인 소선(small glands)과 낭종(cysts)을 포함하고 있어서 침윤의 유무만 가지고 경계성 암과 암을 구별하기는 어려운 것으로 알려져 있

다. 그리고 이와 같은 종양의 진단에 있어서 병리학자들 사이의 주관적인 차이가 약 40%로 알려져 있고 이러한 주관성을 탈피하기 위하여 좀 더 객관성을 띠는 형태계측학적 방법이 도입되었고 이 방법을 이용한 연구들이 보고되고 있는 실정이다.

경계성 암은 그 치료 방법 및 예후가 암과 다르므로 양자의 감별이 중요하다. 종양의 생물학적 악성도는 치료 방침을 결정하고 예후를 추정하는데 있어서 중요한 역할을 하며 이 악성도를 판정하는 기준으로 종양

접 수: 1990년 11월 19일, 게재승인: 1991년 6월 10일  
주 소: 광주직할시 학동 5번지, 우편번호 501-190  
전남대학교 의과대학 병리학교실, 김 윤 미

세포의 분화 정도, staging, hormone 수용체<sup>1)</sup>, 여러 가지 암태아 항원(oncofetal antigens), 암유전자(oncogenes) 또는 암유전자 산물<sup>2)</sup> 그리고 성장인자와 성장인자 수용체 등이 이용되고 있다. 이 기준들은 정도의 차이는 있지만 많은 경우에서 상호 의존적이다. 종양의 악성도를 판정하기 위한 그 외의 기준은 종양세포핵의 DNA 함량의 분포, 즉 DNA ploidy이다. 종양의 DNA ploidy는 다른 기준들과는 달리 상당수의 경우에서 비교적 독립적인 악성도의 지표가 됨이 알려져 있다<sup>3)</sup>. 종양의 DNA ploidy는 전통적으로 microspectrophotometry법에 의하여 측정되어 왔으나<sup>4, 5)</sup>, 근래 flow cytometry법에 의한 측정이 보편화되고 있다<sup>6)</sup>. Flow cytometry 법으로는 다수의 세포를 신속하게 처리할 수 있고 DNA ploidy 이외에도 핵의 크기 또는 세포의 다른 phenotype을 동시에 측정할 수 있으나<sup>7-9)</sup> 다양한 세포의 종류가 함께 측정되므로 종양세포와 비종양세포의 비에 따라서 DNA ploidy pattern이 다를 수 있고 작은 DNA ploidy peak는 masking될 수 있다. 또한 각 DNA ploidy peak를 이루는 종양세포의 형태학적 특성의 관찰이 크게 제한받는다. 최근 전산학의 발달로 가능하게 된 화상분석법은 처리 속도는 늦으나 종양세포와 비종양세포의 DNA ploidy를 구분하여 측정할 수 있고, 그 외에도 각 세포의 형태계측학적 및 구조학적

변량들을 동시에 측정할 수 있다.

본 연구는 flow cytometry와 화상분석법에 의하여 난소의 점액성 종양의 DNA ploidy를 측정비교하고 또한 화상분석으로 종양세포핵의 형태계측학적 변량을 측정함으로써 각 종양세포핵의 형태학적 특성을 고찰 비교분석하기 위하여 본 연구를 시도하였다.

## 재료 및 방법

최근 전남대학교 병원에서 난소의 점액성 낭선종, 경계성 암(Borderline malignancy) 및 암(true malignancy)으로 진단된 조직의 hematoxylineo-sin 염색표본을 검토하여 병변에 따라 전체 병변을 대표할 수 있고 파라핀 조직괴의 보관상태가 양호한 19예를 대상으로 하였다(Fig. 1~3). 이때 Borderline malignancy와 True malignancy는 Hart와 Norris(1973) 분류에 따랐다<sup>10)</sup>.

### 1. 표본 제작

Laffin등 및 Hedley등<sup>11-13)</sup>과 Jacobson등<sup>14)</sup>의 방법을 다소 변형시켜 파라핀 조직괴로부터 세포부유액을 만들었다. 파라핀 조직괴에서 얻은 70  $\mu$ m 두께의 절편을 xylene으로 30분간 2회 처리하여 파라핀을 제거하였고 무수 및 단계적 저농도 ethanol(96%,

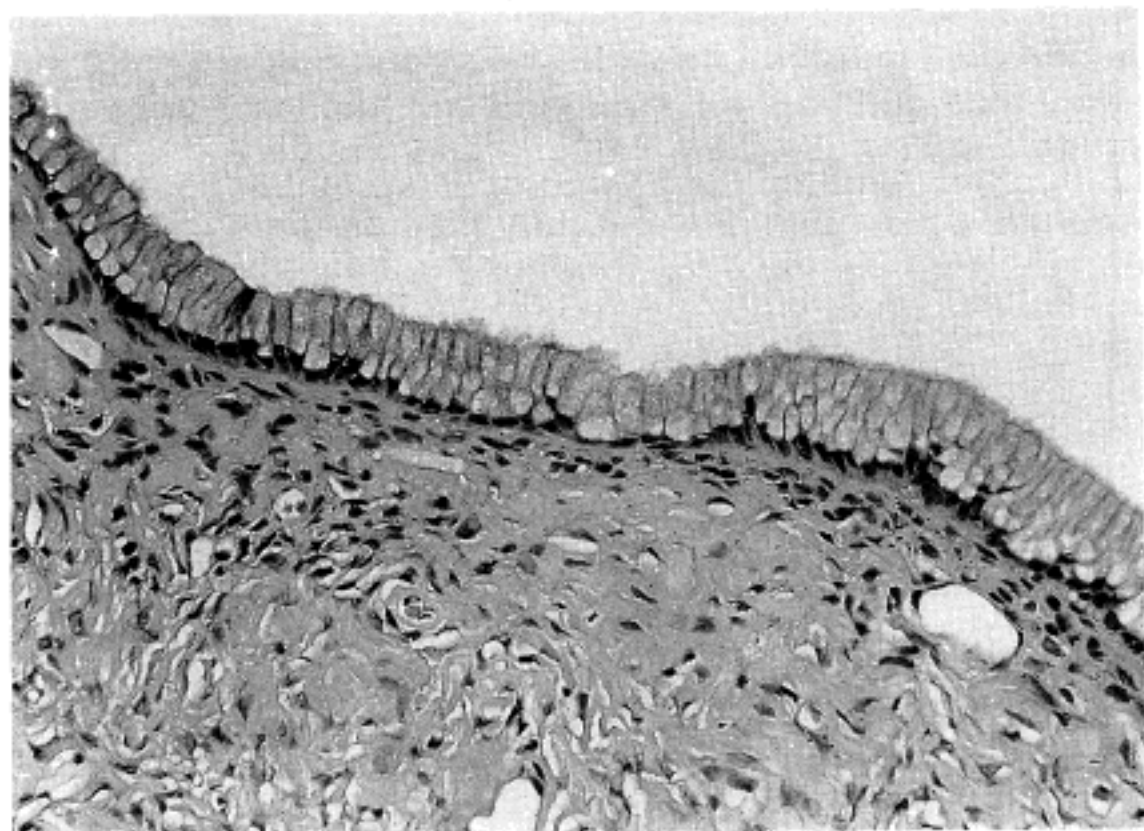


Fig. 1. Mucinous cystadenoma, lined by a single layer of tall columnar epithelium with basally located nuclei and mucin in cytoplasm.

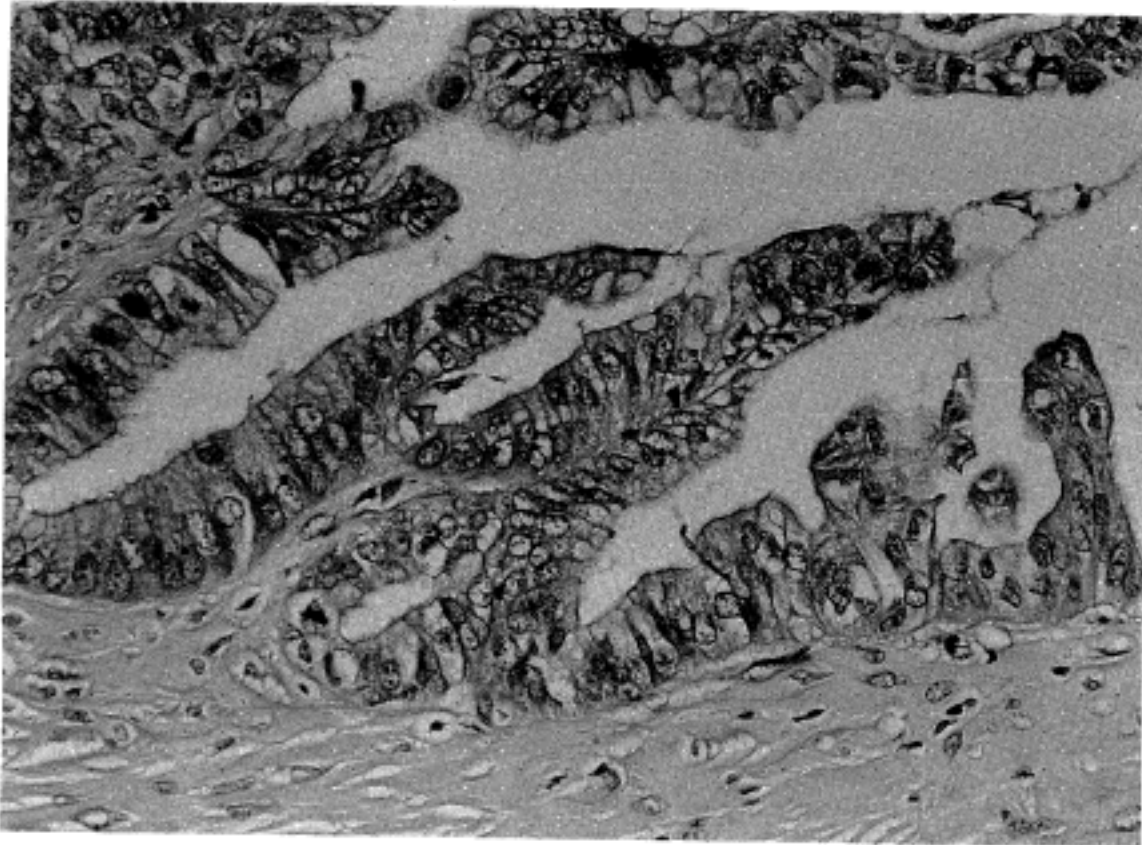


Fig. 2. Mucinous cystadenocarcinoma of borderline malignancy, showing two or three layered atypical cells with mitosis.

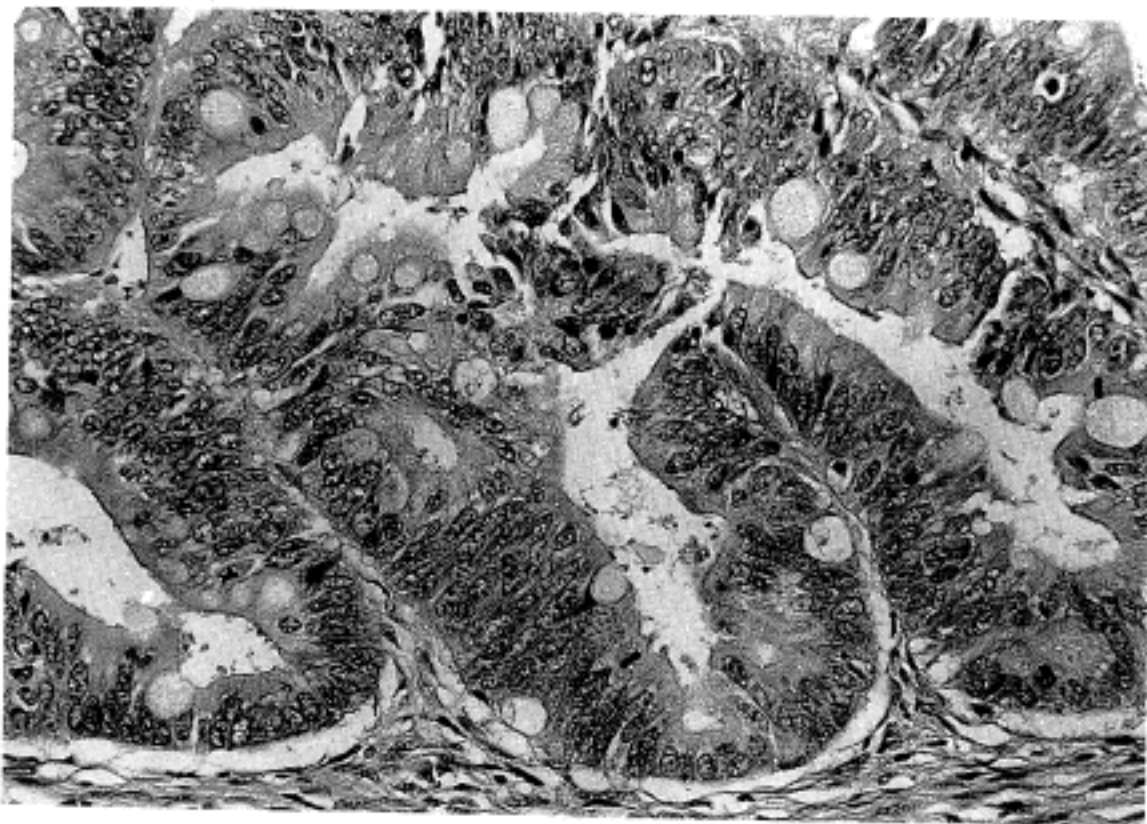


Fig. 3. Mucinous cystadenocarcinoma, showing multilayered large tumor cells with vesicular chromatin pattern, prominent nucleoli and mitosis.

64%, 32%, 16%)과 증류수를 거쳐 흡수시킨 후 PBS (phosphate buffered saline)로 세척하였다. 절편을 0.1% protease(Sigma) 용액을 60분간 37°C에서 부치시켰으며, 부치도중 5분, 10분, 20분, 30분 및 60분에 부치액을 주사기로 흡입 및 분출시켜 개개 세포의 유리를 촉진시켰으며 부치 후 냉 PBS로 세척하였다. 세포부유액을 45  $\mu$ m 구경의 nylon mesh를 통해 여과시킨 후 flow cytometry를 위해서는 여과액

내의 일부를 채취하여 유리세포수가  $2 \times 10^6$ /ml이 되도록 조정하여 최종부유액을 만들고 0.416% propidium iodide를 이용한 Vindel $\phi$ v 염색을 시행하였다. 한편으로는 화상분석을 위하여 여과액의 일부를 채취하여 최종부유액을  $2 \times 10^6$ /ml이 되도록 조정하여 세포부유액 1 ml을 poly-L-lysine이 도포된 slide glass에 cytopspining시켜 도말세포표본을 만들었다. 표본을 실온에서 5N HCl로 75분간 작용시켜 핵산의

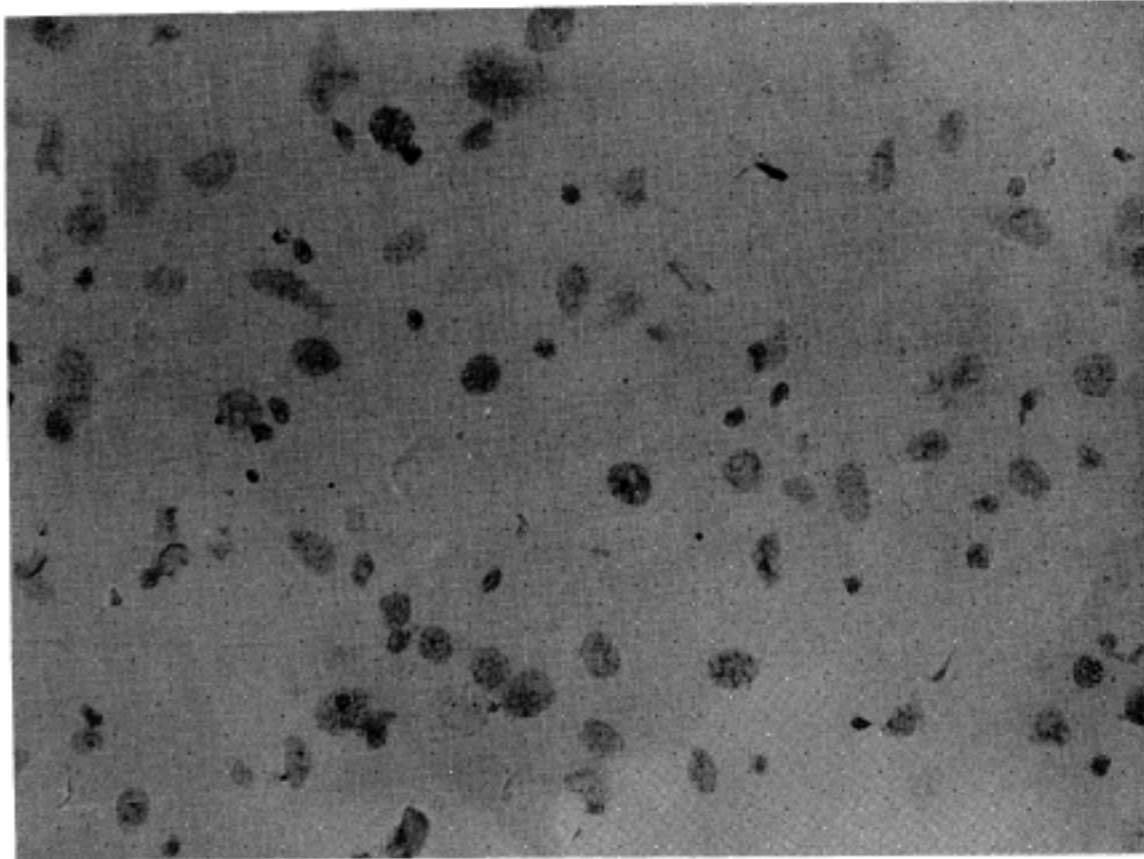


Fig. 4. Small dark cells are lymphocytes and large round to oval cells are tumor cells (Feulgen stain).

가수분해를 일으켰고 Schiff reaction으로 Feulgen 염색을 시행하였다<sup>15,16)</sup>(Fig. 4).

### 2. 유식세포분석기(Flow Cytometry)에 의한 DNA ploidy 측정

염색된 단일세포부유액을 15 milliwatts Argon-ion laser가 부착된 FACScan(Becton Dickinson) 유식세포분석기를 이용하여 DNA ploidy를 측정하였다. 측정시의 excitation wave length는 488 nm이고 emission wave length는 585 nm이었다. 각 증례마다 20,000개 이상의 세포를 측정하였고 내부기준은 diploid G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> peak를 이용하였다.

### 3. 화상분석에 의한 DNA ploidy와 핵의 변량 측정

염색표본의 현미경화상을 화상분석장치(IBAS 2,000 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 × 0.40 μm<sup>2</sup>(분해능 0.40 μm)이었다. Grey image를 대조 강화시킨 후 분할(segmentation)에 의하여 세포핵의 이진화상(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 평균 휘도(mean nuclear grey value) 및 핵의 휘도 분포분산등 광계측학적 변량을 측정하였다.

핵의 DNA 함량은 다음식에 의하여 산출하였다.

$$\text{DNA 함량} = \left( -\log \frac{[\text{평균 세포 핵 휘도}]}{[\text{평균 배경 휘도}]} \right) \times [\text{면적}]$$

각 예당 내부표준세포로써 염증성 림프구 30개 이상과 종양세포 200개 이상을 random으로 선택하여 측정하였다.

### 4. 통계학적 분석

각 변량을 기준으로하여 난소의 점액성 낭선종, 경계성 암과 암사이의 비교는 Wilcoxon's rank sum test로 검증하였다<sup>17)</sup>.

## 성 적

Flow cytometry에 의한 DNA histogram 유형은 diploid G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>을 기준으로 대다수의 세포가 diploid G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>에 있는 경우를 diploidy(Fig. 5a), 20% 이상의 세포가 diploid G<sub>2</sub>M에 위치하는 경우를

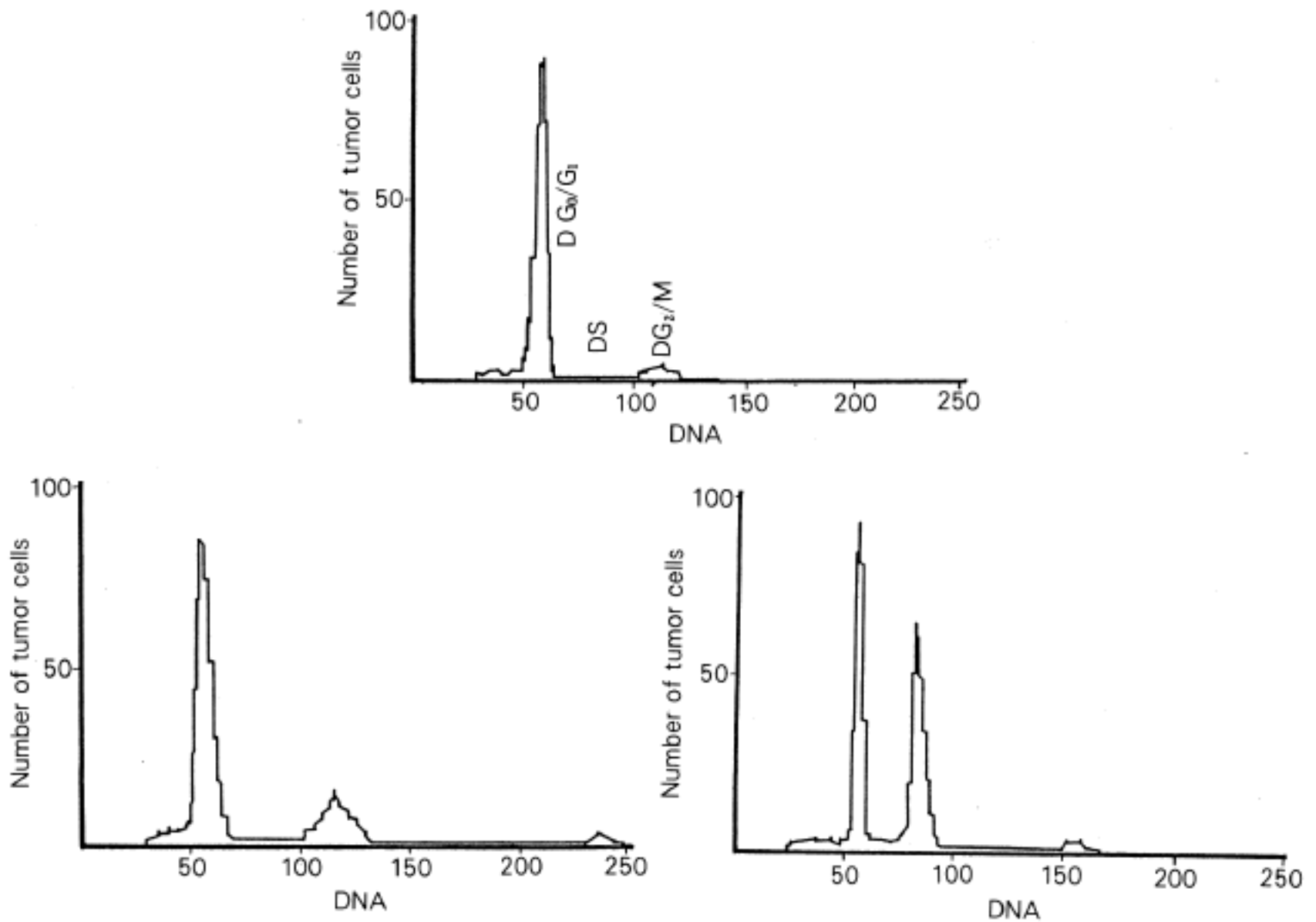


Fig. 5. DNA histogram measured by flow cytometry: a. DNA diploidy histogram, b. DNA polyploidy histogram, c. DNA aneuploidy histogram(D G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>; diploidy G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase, D S; diploidy S phase, D G<sub>2</sub>/M; diploidy G<sub>2</sub>/M phase).

polyploidy(Fig. 5b), 20% 이상의 세포가 diploid G<sub>2</sub>M 이외의 위치에 있는 경우를 aneuploidy(Fig. 5c)로 구분하였으며 종양별 DNA ploidy 유형은 Table 2와 같다.

화상분석에 의한 DNA ploidy 측정시 전체 예에서 종양세포와 함께 출현하는 염증성 림프구의 DNA ploidy pattern은 평균 변이계수 10%인 정규분포성의 single peak를 보였다. 이에 비하여 종양세포의 DNA ploidy pattern은 염증성 림프구핵의 DNA peak 부근에 위치하는 peak 1과 peak 2로 구성되어 있었다. 염증성 림프구의 평균 DNA양과 peak 1에 위치한 종양세포의 평균 DNA 양의 비는 약 0.9:1로서 15% 이상을 벗어나는 hyperdiploidy나 hypodiploidy peak를 갖는 예는 없었으며 따라서 종양세포의 DNA peak 1을 정상 DNA diploidy인 2C

peak라고 볼 수 있었다. 종양세포의 2C peak는 염증성 림프구의 DNA ploidy pattern과 같이 single peak였으며 평균 변이계수는 18%이었다. 2C이외의 peak는 정규분포 또는 준정규분포를 보였으며 일반적으로 변이계수는 염증성 림프구나 2C 종양세포 peak의 변이계수보다는 컸다.

종양세포의 2C peak와 peak 2의 비에 따라서 전체를 DNA diploidy, polyploidy, aneuploidy 예로 구분할 수 있었다. DNA diploidy 예는 다수의 종양세포가 2C region에 위치하며 전체종양세포의 20% 미만이 2C의 배수 위치인 4C 또는 8C 부위에 위치하는 경우로 분류하였고(Fig. 6a), DNA polyploidy 예는 2C 이외의 peak가 2C의 배수 위치 즉 4C, 8C에 위치하면서 전체종양세포의 약 20% 이상을 차지하는 경우로 분류하였다(Fig. 6b). 각 peak를 구성

**Table 1.** Nuclear area( $\mu\text{m}^2$ ), perimeter( $\mu\text{m}$ ), major axis( $\mu\text{m}$ ) in ovarian mucinous cystadenoma, borderline malignancy and cystadenocarcinoma

Mucinous cystadenoma						
Case No.	Area		Perimeter		Major axis	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
1	98.34	18.34	42.58	5.61	13.42	1.75
2	108.69	25.87	51.66	10.35	15.49	2.86
3	126.90	32.20	50.25	10.20	16.41	3.23
4	98.02	32.15	44.07	8.04	14.30	2.77
Mean	107.99	27.14	47.14	8.55	14.90	2.65
SD	11.73	5.69	3.88	1.93	1.14	0.55
Borderline malignancy						
Case No.	Area		Perimeter		Major axis	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
1	118.62	27.94	45.61	6.63	15.15	2.56
2	109.48	23.60	45.33	6.40	14.89	2.70
3	110.31	28.79	46.27	7.74	15.07	2.57
4	101.66	15.91	42.02	4.22	14.28	1.62
5	133.75	28.59	51.94	8.64	17.00	2.64
6	114.90	20.66	46.03	4.95	15.67	1.84
7	105.82	24.85	43.70	6.44	17.25	2.02
8	90.23	24.92	43.23	8.20	12.88	2.27
Mean	110.60	24.22	45.52	6.65	14.82	2.28
SD	11.93	4.21	2.80	1.44	1.18	0.38
Mucinous cystadenocarcinoma						
Case No.	Area		Perimeter		Major axis	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
1	105.26	24.00	43.01	5.73	14.11	1.92
2	104.37	19.35	44.01	4.98	14.14	1.79
3	133.15	39.29	48.22	7.87	15.90	2.73
4	81.67	25.49	37.76	6.73	11.82	2.06
5	141.83	36.83	50.03	7.59	15.85	2.39
6	119.25	40.56	48.35	11.57	14.46	3.30
7	126.46	39.09	47.14	8.51	15.33	2.54
Mean	116.00	32.15	45.50	7.57	14.52	2.39
SD	18.93	8.16	3.91	2.00	1.31	0.49

하는 종양세포의 수와는 관계없이 2C의 2배수 위치를 벗어난 위치에서 DNA peak가 형성된 경우나 종양세포가 2C이외의 위치에 광범히 산재하여 출현하는 경

우를 DNA aneuploidy(Fig. 6c)라고 분류하였다. 종양별 DNA ploidy 유형은 Table 2와 같다. DNA aneuploidy 검출은 화상 분석에 의한 경우가 더 높

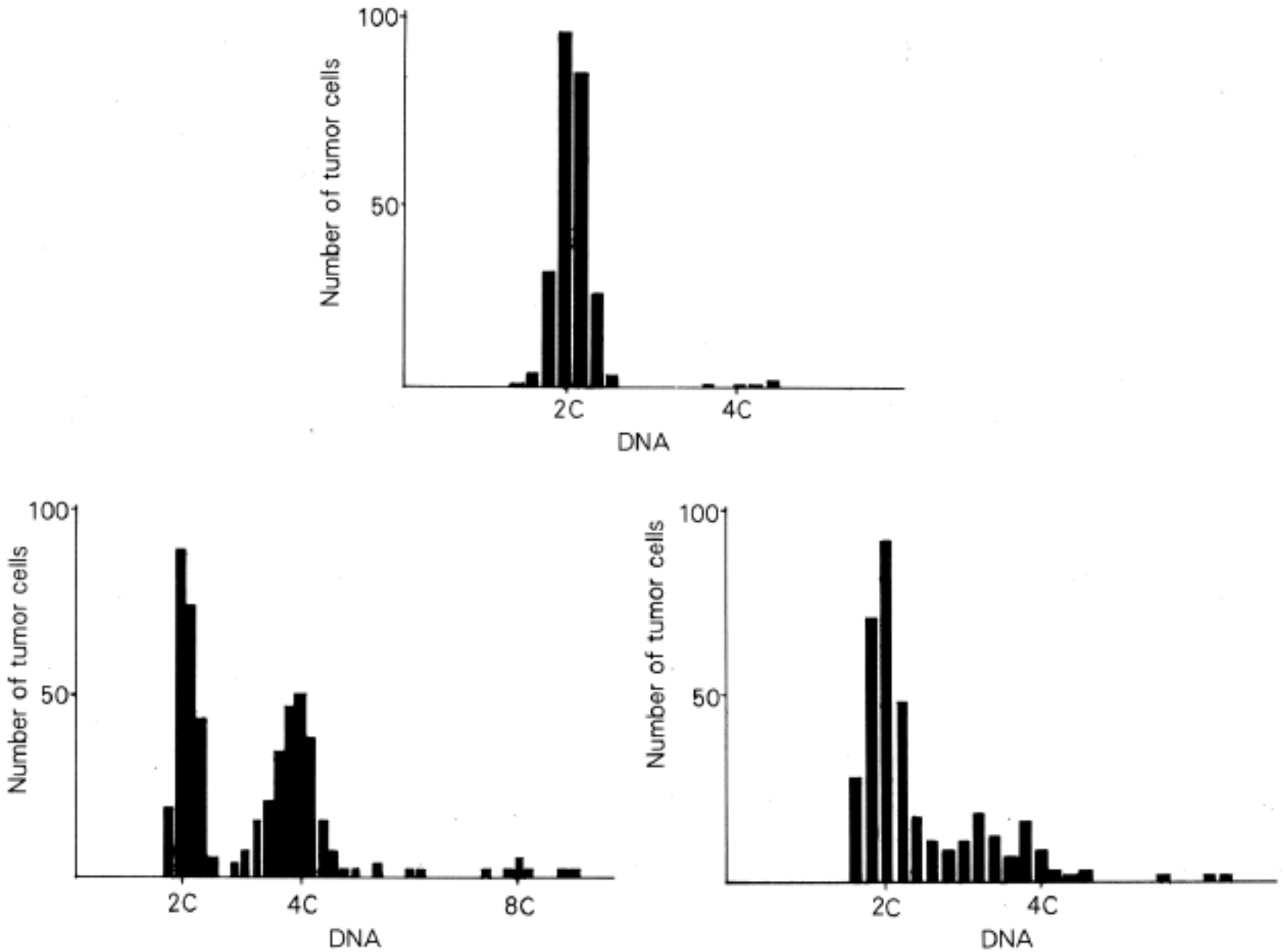


Fig. 6. DNA histograms measured by image analysis: a. DNA diploidy histogram, b. DNA polyploidy histogram, c. DNA aneuploidy histogram.

Table 2. DNA ploidy pattern of ovarian mucinous tumors by flow cytometry and image analysis

	Benign		Borderline		Malignancy	
	Flow	Image	Flow	Image	Flow	Image
Diploidy	4	4	7	7	4	2
Polyploidy	•	•	1	1	1	1
Aneuploidy	•	•	•	•	2	4

음을 알 수 있다.

화상 분석에 의한 DNA ploidy는 낭선종과 암( $p=0.0122$ ), 경계성 암과 암( $p=0.0031$ ) 사이에서는 통계학적으로 유의한 차이를 보였고 낭선종과 경계성 암사이엔 유의한 차이는 없었다.

각 예에서의 핵면적, 둘레 및 장경에 대한 결과는 Table 1과 같다. 세포핵의 면적과 둘레 및 장경은 낭

선종, 경계성암과 암에서 서로 비슷한 수치를 보였고, 이들은 통계학적으로 유의하지 않았으며, 각 종양의 DNA ploidy와도 상관성이 없는 것으로 관찰되었다.

### 고 찰

본 연구에서는 난소의 점액성 낭선종, 경계성 암과

암세포에서의 DNA ploidy pattern을 flow cytometry와 화상분석으로 측정하여 결과를 서로 비교하였고 그의 형태계측학적 특성을 화상분석에 의해 측정하고 그 측정치를 통계적으로 처리함으로써 각 종양별로 그 종양세포가 갖는 여러 특성을 상호비교할 수 있었다. 이와같이 종양세포의 여러가지 특성을 동시에 측정할 수 있음은 화상분석법의 장점이라고 할 수 있으며, 본 연구에서처럼 여러 특성의 동시관찰은 현재 시도되고 있는 단계이다.

난소 상피성 종양에서 경계성 암과 암의 감별을 위한 여러 연구가 보고되어 왔다. Hart와 Norris<sup>10)</sup>는 1기에 해당하는 난소의 점액성 종양의 연구에서 명백한 침윤이 있는 경우엔 침윤암(암)으로, 침윤이 불확실한 경우엔 비정형 상피세포가 4층 이상이면 침윤암(암), 3층 이하이면 경계성 암으로 분류하였고 이 분류는 예후와 상관성이 있는 것으로 보고하였다<sup>10)</sup>. Baak 등<sup>18-20)</sup>은 난소의 점액성 종양중 경계성 암과 암의 감별을 형태계측학적 방법으로 다변량 분석하여 시도하였는데 핵분열지수, 간질조직에 대한 상피세포의 비율, 핵면적, 둘레 및 장경 등의 형태계측학적 인자중에서도 핵분열지수와 간질세포에 대한 상피세포의 비율이 가장 중요한 인자라고 보고하였다<sup>18-20)</sup>. Alto 등<sup>21)</sup>은 점액성, 장액성 종양에서 암태아항원(Carcinoembryonic antigen)에 대한 면역조직화학적 염색과 PAS 염색을 실시하여 형태계측학적인 방법으로 경계성 암과 암의 감별을 시도하였다<sup>21)</sup>. 난소의 점액성 종양에서 DNA 측정은 1969년 Weiss가 Feulgen 염색된 파라핀절편에서 microspectrophotometry으로 측정하였고<sup>22)</sup>, 근래에는 flow cytometry에 의하여 측정하여 예후와의 연관성을 조사한 연구들이 보고되었는데 이들은 다변량분석을 하였으며, DNA diploidy인 경우보다 DNA aneuploidy인 경우에 예후가 더 좋지 않음을 지적하였고<sup>5,23,24)</sup>, 예후 추정 sensitivity는 0.9로 아주 높음을 보고하였다<sup>25)</sup>. 현재 주로 사용되고 있는 flow cytometry법으로는 종양세포와 비종양 세포의 DNA 양이 함께 측정되므로 종양세포만의 DNA ploidy를 별도로 분석할 수 없으며 따라서 전체 종양세포에 대한 aneuploid cell의 비율을 정확히 알 수 없다. 그러나 화상분석에 의해서는 비종양세포와 종양세포가 선택적으로 측정되므로 종양세포만의 DNA ploidy를 구할 수 있

고 각 peak에 따른 종양세포비를 보다 정확히 산출해 낼 수 있다.

화상 분석에 의한 측정시 낭선종과 암, 경계성 암과 암사이의 DNA ploidy pattern이 통계학적으로 유의한 차이를 보이며 악성도가 증가함에 따라 DNA diploidy, polyploidy, aneuploidy 순으로 출현함을 알 수 있었다. 암에서 DNA diploidy를 보인 2예는 진단 당시 경계성 암과의 감별이 매우 어려웠던 경우로 hematoxylin-eosin 염색 표본을 재고찰하였으나 여전히 감별이 어려웠다. Hart와 Norris의 기준을 사용할 경우 분명한 침윤이 없는 경우에는 일반적으로 경계성 암과 분화가 좋은 암과의 구분은 실제로 상당히 주관적인 가능성이 있기 때문에 화상분석에 의한 DNA ploidy, 핵의 면적, 둘레, 장경 등을 다변량분석을 하여 전통적인 예후인자인 staging, grading와 함께 예후판정을 위해 서로 비교해 보아야 할 것으로 생각한다. 핵의 면적, 둘레 및 장경은 특히 경계성 암과 암의 구별시 의의있는 것으로 알려졌으나 본 연구에서는 통계학적으로 유의한 차이가 없었다. 좀 더 많은 예를 대상으로 하여 비교해보는 것이 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 보관되어 있는 파라핀 포매 조직에서 단일세포 도말표본을 만들어 DNA ploidy 및 형태계측학적 인자를 분석하였다. 파라핀 포매조직을 이용하는 것은 진단 당시 조직의 재고찰을 가능하게 하므로 환자의 치료 방향 및 예후를 판정하는데 유용하다. 단일세포부유액을 만드는 과정까지는 화상분석법이나 flow cytometry에서 모두 동일하므로 단일세포부유액을 만들어 일부에서는 flow cytometry법으로 또 일부에서는 화상분석법에 의하여 DNA ploidy 및 형태계측학적 또는 구조학적 변량을 동시에 측정 비교해 볼 수 있었다. DNA aneuploidy의 측정은 flow cytometry보다는 화상분석법에 의한 검출률이 더 높음을 알 수 있었다.

## 결 론

난소의 점액성 종양 즉 낭선종, 경계성암과 암의 DNA ploidy유형을 조사하고 종양세포의 형태학적 특성을 관찰하기 위하여 19예의 파라핀 포매 조직으로부터 단일세포 도말표본을 만들었고 화상분석법에



의하여 선택적으로 종양세포의 DNA양과 핵의 면적, 둘레, 장경을 측정하였으며 종양세포와 함께 출현하는 염증성 림프구를 내부 표준으로 삼았다. 또한 동시에 flow cytometry에 의하여 DNA ploidy를 측정하였다.

화상분석법에 의한 측정시 내부 표준세포인 염증성 림프구와 2C 종양세포의 DNA 분포는 정규분포성의 단일 peak로서 평균 10%와 18%의 변이계수를 보였으며 림프구의 DNA peak와 2C 종양세포의 DNA peak비는 0.9:1이었다. 2C 종양세포를 기준으로하여 전체 예의 DNA ploidy pattern을 보면 낭선종에서는 4예 모두 diploidy, 경계성 암에서는 1예만 polyploidy이고 나머지 7예는 diploidy, 암에서는 diploidy 2예와 polyploidy 1예를 제외한 나머지 4예에서는 aneuploidy를 보였다. 이 중 DNA diploidy를 보인 2예의 암은 진단 당시 경계성 암과의 감별이 어려웠던 경우였다. 낭선종과 암, 경계성 암과 암사이의 DNA ploidy pattern은 통계적으로 유의한 차이를 보였고 핵의 면적, 둘레 및 장경은 각 종양사이에 유의한 차이가 없었다. 그리고 flow cytometry에 의한 DNA ploidy pattern은 암에서 diploidy 4예, aneuploidy 2예를 제외하고는 화상분석법에서와 동일하였다.

이상의 성적으로 난소 점액성 종양에서 낭선종과 경계성 암은 주로 DNA diploidy, 암은 DNA aneuploidy로 종양의 조직학적 악성도를 평가하는데 DAN ploidy가 비교적 독립적으로 보조적인 지표가 됨을 알 수 있었으며 DAN aneuploidy의 검출률은 화상분석법에 의한 경우에 더 높음을 알 수 있었다.

### 참 고 문 헌

- 1) Suh SP, Yoo JY: Estrogen receptors in various breast lesions of Korean patients. *KJCP* 8: 275-285, 1988
- 2) Lee KM: Immunohistochemical study on the Ha-ras p 21 expression in the gastric carcinoma. Doctorial Thesis, Faculty of Medical Science, Chonnam Univ Grad School, 1989
- 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 patient. *Cytometry* 10(1): 56-61, 1989
- 4) Bohm N, Sandritter W: DNA in human tumor: A cytophotometric study. *Current topics in pathology* 60: 151-219, 1975
- 5) Friedlander ML, Hedley DW, Taylor IW, Russell P, Coates AS, Tattersall MHN: Influence of cellular DNA content on survival in advanced ovarian cancer. *Cancer Res* 44: 397-400, 1984
- 6) Coon JS, Landay AL, Weinstein RS: Advances in flow cytometry for diagnostic pathology. *Lab Invest* 57(5): 453-479, 1987
- 7) Barlogie B, Raber MN, Schumann J, Johnson TS, Drewinkko B, Swarzen Druber DE, Gohde W, Andreef M, Freireich E: Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Res* 43(9): 3982-3997, 1983
- 8) Dent GA, Leglise MC, Pruzwansky KB, Ross DW: Simultaneous paired analysis by flow cytometry of surface markers, cytoplasmic antigens or oncogene expression with DNA content. *Cytometry* 10(2): 192-198, 1989
- 9) Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW: Method for analysis of cellular DNA content of paraffin embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 31: 1333-1342, 1988
- 10) Hart WR, Norris HJ: Borderline and malignant mucinous tumors of the ovary. *Cancer* 31: 1031-1045, 1973
- 11) Laffin J, Fogleman D, Lehman JM: Correlation of DNA content, P 53, T antigen and V antigen in simian virus 40-infected human diploid cells. *Cytometry* 10(2): 205-213, 1989
- 12) Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Rugg CA, Musgrove: Application of DNA flow cytometry to paraffin-embedded archival material for the study of aneuploidy and its clinical significance. *Cytometry* 6: 327-333, 1985.
- 13) Hedley DW: Flow cytometry using paraffin-embedded tissue: Five years on. *Cytometry* 10(3): 229-241, 1989
- 14) Jacobson AB, Thorud E, Fossa SD, Lunde S, Shoaib MC, Juul NO, Pettersen EO: DNA flow cytometry in metastases and a reccurrency of malignant melanomas. A comparison of results from fresh and paraffin embedded material. *Virchows Archiv B Cell Pathol* 54(5): 273-277, 1988

- 15) Gaub J, Auer G, Zetterberg A: *Quantitative cytochemical aspects of a combined Feulgen naphol S staining procedure for the simultaneous determination of nuclear and cytoplasmic protein and DNA in mammalian cells. Exp Cell Res 92: 323-332, 1975*
- 16) Kaern J, Danielsen HE, Farrants G, Reith A, Juhng SW, Stenersen T, Troe C: *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*
- 17) Lehmann EI: *Non parametrics: Statistical Methods Based on Ranks. Mc Graw Hill, NY, 1975*
- 18) Baak JPA, DOP HV, Kurver PHJ, Hermans J: *The value of morphometry to classic prognosticators in breast cancer. Cancer 56: 374-382, 1981*
- 19) Baak JPA, Ley GVD: *Borderline or malignant ovarian tumour? A case report of decision making with morphometry. J Clin Pathol 37: 1110-1113, 1984*
- 20) Baak JPA, Wisse-Brekelmane ECM, Langley FA, Talerman A, Delemarre JFM: *Morphometric data to FIGO stage and histological type and grade for prognosis of ovarian tumours. J Clin Pathol 39: 1340-1346, 1986*
- 21) Alto ML, Selkainabo K, Collan Y: *Evaluation of carcinoembryonic antigen and periodic acid-schiff stains in the diagnosis of serous and mucinous ovarian tumors: morphometric study. Appl Pathol 4: 83-89, 1986*
- 22) Weiss RRW, Richart PM, Okagaki T: *DNA content of mucinous tumors of the ovary. Am J OB & GY 103: 409-424, 1969*
- 23) volm M, Bruggemann A, Gunther M, Kleine W, Pfliederer A, Vogt-Schaden M: *Prognostic relevance of ploidy, proliferation, and resistance-predictive tests in ovarian carcinoma. Cancer Res 45: 5180-5185, 1985*
- 24) Rutgers DH, Wils IS, Schaap AHP, van Lindert ACM: *DNA flow cytometry, histological grade, stage, and age as prognostic factors in human epithelial ovarian carcinomas. Path Res Pract 182: 207-213, 1987*
- 25) Erhardt K, Auer G, Bjorkholm E, Forsslund G, Moberger B, Sivfversward C, Wicksell G, Zetterberg A: *Prognostic significance of nuclear DNA content in serous ovarian tumors. Cancer Res 44: 2198-2202, 1984*