

## 형태계측학적 및 광계측학적 특성에 의한 종양세포아형의 판별분석

—자궁경부 암종 세포에 대한 관찰—

전남대학교 의과대학 병리학교실

박창수 · 최대용 · 이민철 · 정상우

### Discriminant Analysis of Tumor Cell Subpopulation Based on Morphometric and Photometric Features

—Observations on tumor cells of the uterine cervix carcinoma—

Chang Soo Park, M.D., Dae Yong Choi, M.D., Min Cheol Lee, M.D. and Sang-Woo Juhng, M.D.

DNA aneuploid cells are poorly characterized in both biochemical and morphological terms. This study was performed to see the relationship between DNA ploidy and morphometric and photometric nuclear features. DNA contents of tumor cells were measured by image cytometry in 46 cases of micro- or early invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Also measured were nuclear area, perimeter, maximum diameter, chromatin pattern index, and staining intensity. Among the 46 cases, 20 cases which had both DNA diploid and aneuploid cell subpopulations were selected, and the two subpopulations were discriminated statistically. Multivariate discriminant analysis separated clearly the two subpopulations, whereas univariate analysis failed. For canonical discriminant function, nuclear area was selected first, followed by staining intensity in each case. Other variables selected afterwards were nuclear perimeter, maximum diameter, and/or chromatin pattern index in random fashion. Correlation coefficient between the canonical discriminant function and the variables were 0.20~0.40 for nuclear area and 0.25 or less for the others. The above results suggest that DNA ploidy is a parameter more or less independent on individual morphometric and photometric parameters. (Korean J Pathol 1993; 27: 108~114)

**Key Words:** Discriminant analysis, DNA ploidy, Morphometry, Photometry

### 서 론

종양의 생물학적 악성도는 치료 방침을 결정하고 예후를 추정하는데 있어서 중요한 역할을 하며 따라서

종양의 악성도를 판정하기 위해서 여러가지 방법이 이용되고 있다. 임상에서 주로 사용되는 악성도의 기준은 종양세포의 종류와 분화정도 등의 형태학적 인수들과 병기(staging)와 같은 임상적 인수이다. 그외 보조적으로 호르몬 수용체<sup>1)</sup>, 여러가지 암태아 항원, 암유전자 또는 암유전자의 산물<sup>2)</sup>, 그리고 성장인자와 성장인자 수용체등이 측정되고 있다. 종양의 악성도를 판정하기 위한 그외의 기준은 종양세포핵의 DNA 함량의 분포, 즉 DNA ploidy이다.

접 수: 1992년 10월 7일, 게재승인: 1992년 12월 26일  
주 소: 광주직할시 동구 학동 5번지, 우편번호 501-190  
전남대학교 의과대학 병리학교실, 박창수

\*본 논문은 1989년 문교부 학술연구조성비(일반과제)에 의해서 연구되었음.

DNA ploidy는 DNA diploidy와 DNA aneuploidy로 대별된다. 일반적으로 양성종양이나 악성도

가 낮은 종양에서 DNA diploidy를 볼 수 있으며 악성도가 높은 종양에서 DNA diploidy와 DNA aneuploidy를 함께 볼 수 있다. DNA diploidy와 DNA aneuploidy가 함께 출현하는 경우, 대체로 두 가지 ploidy는 DNA histogram상 명확히 구분된다. 즉 DNA 함량에 의해 악성종양세포들은 정상 DNA 함량과 비정상 DNA 함량을 갖는 종양세포아군으로 구분된다. 그러나 DNA 함량에 의해 구분되는 종양세포아군이 어떠한 생물학적 특성을 갖는지는 아직 불분명하다.

저자는 DNA 함량에 따른 종양세포아군의 생물학적 특성을 조사하기 위한 연구의 일환으로 DNA diploidy 세포군과 DNA aneuploidy 세포군의 형태학적 특성을 비교하고자 본 연구를 시도하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

자궁경부암종으로 적출된 자궁 경부 조직의 hematoxylin-eosin 염색표본을 검토하여 비각화 대세포성의 미세 침윤성 또는 초기 침윤성 편평상피암종으로서 암조직이 전체 병변을 대표할 수 있고 파라핀 조직괴의 보관상태가 양호한 46예를 연구대상으로 하였다.

### 2. 표본제작방법

Hedley등<sup>3,4)</sup>과 Jacobsen등<sup>5)</sup>의 방법을 다소 변형시켜 파라핀 조직괴로부터 세포부유액을 만들었다. 이를 약술하면 파라핀 조직괴에서 얻은 80  $\mu$ m 두께의 절편을 xylene으로 처리하여 파라핀을 제거하였고 무수 및 단계적 저농도의 ethanol과 증류수를 거쳐 합수시킨 후 PBS(phosphate buffered saline)로 세척하였다. 절편을 trypsin(Sigma, St. Louis, USA) 용액에 37°C에서 12시간 부치하였고 부치 중 가볍게 진탕시켜 개개 세포의 유리를 촉진시켰으며 부치 후 냉 PBS로 세척하였다. 세포부유액을 60  $\mu$ m 구경의 nylon mesh를 통해 여과시켰고 여과액 내의 유리 세포수를 PBS로  $2 \times 10^4$ /ml가 되도록 조정하여 최종 세포부유액을 만들었다. 세포부유액 1 ml를 poly-L-lysine이 도포된 유리 슬라이드에 원침시켜 도말 세포 표본을 만들었다. 표본을 실온에서 5N HCl로 75분간 작용시켜 핵산의 가수분해를 일으켰고 Schiff 반응으로 Feulgen 염색을 시행하였다<sup>6)</sup>.

### 3. 화상분석에 의한 변량측정

광학현미경과 on-line으로 연결된 TV camera (NewviconER, Hamamatsu, Japan) 및 화상분석 장치(IBAS 2000, Kontron, Deutschland)를 이용하여 현미경화상을 digital grey image로 변환시켰다. Digital grey image는 512 $\times$ 512개의 화소로 구성되

었으며 하나의 화소는 256가지의 휘도로 표현되었고 그 크기는 0.40 $\times$ 0.40  $\mu$ m이었다. Digital grey image를 명암 보정 후 분할에 의해 세포핵의 이치화상(binary image)을 얻었고 이치화상에서부터 상피세포핵만을 선택하여 측정 대상 세포의 기준화상(template image)을 구하였다. 기준화상으로부터 세포핵을 구성하는 화소수를 측정하여 핵의 단면적과 둘레, 그리고 장경 등 형태계측학적 변량을 구하였다. 또한 기준화상을 바탕으로 하여 명암 보정된 digital grey image로부터 평균 배경휘도와 세포핵을 구성하는 각 화소의 휘도를 측정하여 세포핵의 염색강도와 염색질 구조지수, 그리고 DNA 함량 등 광계측학적 변량을 구하였다. 세포핵의 염색강도는 세포핵 화소의 평균 흡광도로 표현하였고, 염색질 구조 지수는 평균 흡광도에 대한 세포핵 화소의 흡광도 분산으로 표현하였다. 세포핵의 평균 흡광도와 DNA 함량은 다음식에 의해 계산하였다.

$$\text{평균 흡광도} = -\log \frac{[\text{세포핵의 평균 휘도}]}{[\text{평균 배경 휘도}]}$$

$$\text{DNA 함량} = [\text{평균 흡광도}] \times [\text{핵의 면적}]$$

각 예당 200개 이상의 암종세포를 무작위로 추출하여 측정하였으며 광계측학적 측정치의 대조목적으로 20~30개의 염증성 림프구를 내부 표준세포로 함께 측정하였다.

### 4. 통계학적 분석

DNA 함량의 분포를 조사하여 정상 DNA 함량의 diploidy 세포들과 비정상 DNA 함량의 aneuploidy 세포들을 함께 갖는 예를 선택하였다. 선택한 전 예를 대상으로 DNA diploidy와 aneuploidy 세포군 사이의 변량별 차이를 Wilcoxon의 순위합 검정으로 검정하였고, 각 예에서의 변량별 차이를 Student t 검정으로 조사하였다. DNA diploidy와 aneuploidy 세포군이 다른 변량들에 의해 어떻게 설명되는지를 다변량 판별분석으로 검토하였다. 다변량 판별분석에서 세포군의 크기에 비례적으로 사전확률(a priori probability)을 설정하였고 Wilks  $\lambda$ 를 최소화시키는 방법으로 변량들을 선택하였다<sup>7)</sup>.

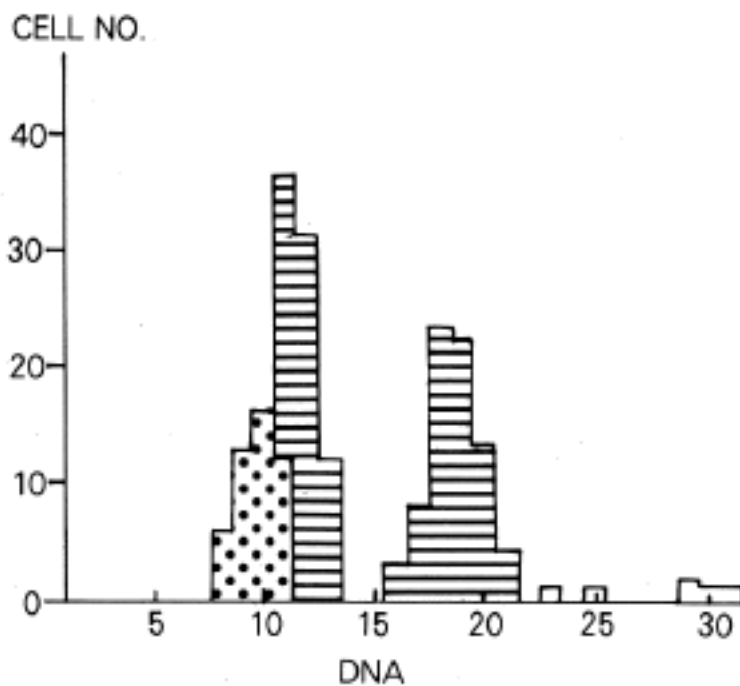
## 성 적

### 1. DNA Ploidy

DNA 함량을 X축에, 그리고 세포 수를 Y축에 표시한 DNA histogram의 1예는 Fig. 1과 같다. Fig. 1에서와 같이 모든 예에서 내부 표준 세포인 염증성 림프구 DNA 함량의 최대빈도값을 계급구간 10 또는 11에 위치하도록 표시하였을 때, 암종세포 DNA 함량의 최대빈도값은 계급구간 11 또는 12에 위치하는 정

규성의 분포와 그보다 큰 계급구간에 위치하는 정규성 또는 비정규성의 분포를 보였다. 염색성 림프구의 DNA peak와 암종세포의 첫번째 peak의 계급구간 비는 1:1.2이내로서 그 이상을 벗어나는 hypoploidy나 hyperploidy의 peak를 보이는 예는 없었다. 암종세포의 첫번째 peak를 DNA 배수성인 2C peak라고 정의하였으며 2C peak의 계급구간 11 또는 12의 2배수에 위치하는 계급구간을 4C라고 정의하였고, 4배수에 위치하는 계급구간을 8C라고 정의하였다.

DNA histogram상 2C 부위에 형성된 peak를 DNA diploidy, 2C나 4C 또는 8C의 계급구간에서부터 20%이상 떨어진 부위에 형성된 peak를 DNA



**Fig. 1.** A DNA histogram(Case 17). Lymphocytes(bars with small dots) show a Gaussian peak with a mode at class interval 10. Tumor cells of DNA diploidy have a modal value at class interval 12(2C) and those of DNA aneuploidy at class interval 18, deviated more than 20% from class interval 24(4C). Open bars represent DNA contents of the cells in S phase.

aneuploidy라고 해석하였으며 전체 46예중 20예가 DNA diploidy와 aneuploidy의 세포군을 가졌다. 각 세포군을 이루는 세포는 40개 이상이었다.

### 2. 일변량분석

선택된 20예의 평균 핵면적, 둘레, 장경, 염색질구조 지수 및 염색강도와 그 표준편차는 Table 1과 같다. 각 변량의 평균치는 DNA diploidy 세포군에 비하여 DNA aneuploidy 세포군에서 유의하게 더 컸다( $p < 0.01$ ).

각 예에서 DNA diploidy 세포군과 DNA aneuploidy 세포군의 각 변량별 분포는 정규분포 또는 준정규분포를 보였으며 상당 부분 중첩되어 있었다(Fig. 2). 각 변량의 평균치는 DNA diploidy 세포군에 비하여 DNA aneuploidy 세포군에서 다소 더 컸다. Student t 검정에 의한 p값은 대상 예에 따라 차이가 있었으나 핵면적과 둘레의 경우에 20예 모두에서 0.0005이하이었고, 장경과 염색질 구조지수의 경우에는 0.001이하이었다. 염색질 구조지수의 p값은 0.001과 0.123사이이었으며 0.05이상인 경우가 7예이었다 (Table 1).

### 3. 다변량 판별분석

각 예에서 DNA diploidy 세포군과 DNA aneuploidy 세포군을 구분하기 위한 정준판별함수는 세가지 이상의 변량들과 상수로 구성되었다(Table 2).

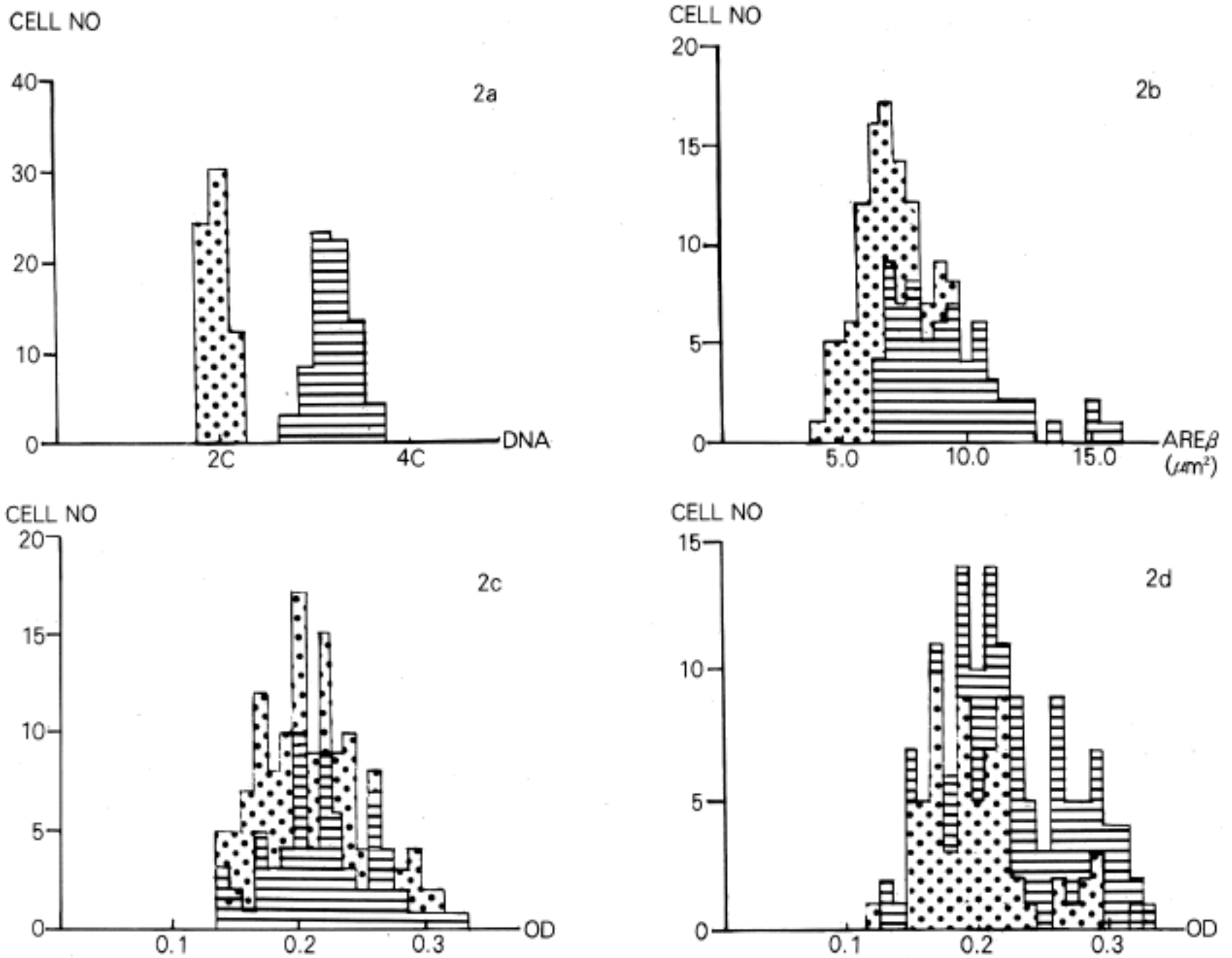
변량의 선택 과정에서 핵면적이 가장 먼저 선택되었으

**Table 2.** Variables selected for canonical discriminant function, unstandardized, and their coefficients in Case 19

Nuclear area	0.6515E - 02
Nuclear perimeter	0.9582E - 02
Maximum diameter	-0.1251
Staining intensity	0.1736
Constant	11.0766

**Table 1.** Mean values of the variables and their standard deviations of DNA diploid and DNA aneuploid subpopulations in 20 cases(Mean  $\pm$  S.D.), and p values for the two subpopulations in each case

Variable	Diploidy	Aneuploidy	p value
Nuclear area( $\mu\text{m}^2$ )	6.5 $\pm$ 1.5	9.4 $\pm$ 2.7	<0.0005
Nuclear perimeter( $\mu\text{m}$ )	9.7 $\pm$ 1.5	11.0 $\pm$ 1.6	<0.0005
Maximum diameter( $\mu\text{m}$ )	3.5 $\pm$ 0.4	3.8 $\pm$ 0.5	<0.001
Chromatin pattern(OD)	0.21 $\pm$ 0.05	0.22 $\pm$ 0.07	<0.123, >0.001
Staining intensity(OD)	0.20 $\pm$ 0.04	0.23 $\pm$ 0.04	<0.001



**Fig. 2.** Distribution of DNA contents(2a), nuclear area(2b), chromatin texture index(2c), and staining intensity (2d) of DNA diploidy(lined bars) and DNA aneuploidy(lined bars) subpopulations in the same case of Fig. 1(Case 17). DNA contents show a dichotomous distribution, whereas the other variables show overlapped ones. OD means optical density.

**Table 3.** Discrimination result in Case 19

Actual group	No. of cells	Predicted group	
		Diploidy	Aneuploidy
Diploidy	90	89 (98.9%)	1 (1.1%)
Aneuploidy	46	0 (0.0%)	46 (100.0%)

**Table 4.** Correlation coefficients(Pearson's  $\gamma$ ) between canonical discriminant function and variables in Case 19

Nuclear area	0.33755
Nuclear perimeter	0.22815
Maximum diameter	0.10932
Chromatin pattern	0.03440
Staining intensity	0.10910

며 그 다음으로 핵의 염색강도가 선택되었다. 그 이후 선택된 변량들은 핵둘레, 장경 또는 염색질 구조지수이었으나 선택여부나 선택 순서는 대상예에 따라 달랐

다.

각 예 별로 DNA diploidy 세포군과 DNA aneuploidy 세포군은 정준판별함수에 의해 잘 판별되었다.

15에에서는 세포의 실제군과 예측군이 일치되었으며 5에에서만 3% 미만의 불일치율을 보였다. Di-ploidy 군의 세포를 aneuploidy 군의 세포로 잘못 예측한 경우가 3예이었고(Table 3), aneuploidy 군의 세포를 diploidy 군의 세포로 잘못 예측한 경우가 1예이었으며, 1에에서는 두가지 모두 잘못 예측되었다. 잘못 예측된 세포의 사후확률(*a posteriori* probability)은 0.70이하로 대체로 낮았다.

각 예에서 정준판별함수와 각 변량과의 상관계수는 핵면적의 경우에 0.20~0.40 사이로서 가장 컸고 다음으로는 둘레와 장경 또는 염색강도의 순이었으며 염색질 구조지수의 상관계수가 가장 낮았다(Table 4).

## 고 찰

DNA aneuploidy가 여러가지 종양 환자의 예후를 추정하기 위한 중요한 지표가 될 수 있음이 보고된 이래 DNA aneuploidy와 종양의 악성도를 비교한 많은 연구보고를 볼 수 있다<sup>8-10</sup>). 그러나 DNA aneuploidy가 어떠한 기전에 의하여 종양의 악성도와 연관지어 있는지는 현재로서는 불분명하다. DNA aneuploidy의 악성도를 설명하기 위하여 DNA aneuploidy 세포들의 높은 미분화성, 증식능, 침윤성과 전이성, 암유전자의 발현도등이 제시되어 있으나 단편적 자료에 의한 추정이 대부분이며 종양세포의 DNA 함량과 그외의 악성도와 관련된 특성을 다인수 측정에 의해 비교 검토한 보고는 매우 드물다. 그러나 종양의 악성도를 이해하기 위해서는 종양세포의 DNA 함량을 포함하여 악성도와 관련된 특성들의 다인수 분석이 필요할 것이다.

형태학적으로 악성세포는 양성세포에 비하여 미분화 상태이며 핵의 거대상, 과염색상 및 염색질의 조대상을 보인다<sup>11</sup>). 악성세포의 이러한 형태학적 특성이 DNA diploidy 세포군과 DNA aneuploidy 세포군에서도 관찰될 수 있는지의 여부는 높은 악성도의 종양세포군을 인지하고 이해하기 위한 첫 단계 과제일 것으로 생각된다.

DNA 함량과 형태학적 변량의 다인수 측정은 본 연구에서와 같이 화상분석학적 방법에 의하여 용이하게 수행될 수 있다. 종양의 DNA 함량은 전통적으로 현미경 분광측정법(microspectrophotometry)에 의하여 측정되어 왔으나<sup>9,12</sup>), 근래 유세포분석법(flow cytometry)에 의한 측정이 보편화되고 있다<sup>13,14</sup>). 유세포분석법으로는 다수의 세포를 신속하게 처리할 수 있고 DNA 함량 외에도 핵의 크기나 세포의 다른 표현형을 동시에 측정할 수 있다<sup>8,15,16</sup>). 그러나 유세포분석법에서는 다양한 종류의 세포가 함께 측정되므로 종양세포와 비종양세포의 비에 따라서 DNA ploidy의 양상이 다를 수 있고 작은 DNA ploidy의 세포군은 감취질 수 있다. 또한 각 DNA ploidy의 세포군을 이

루는 종양세포의 형태학적 특성의 관찰이 크게 제한받는다. 이에 비하여 최근 전산학의 발달로 가능하게 된 화상분석법은 유세포분석법에 비하여 처리속도가 느으나 운영자와 컴퓨터 시스템과의 교호적 진행에 의하여 종양세포와 비종양세포의 DNA 함량을 구분하여 측정할 수 있고<sup>17</sup>), 그 외에도 각 세포의 형태계측학적 및 광계측학적 변량을 동시에 측정할 수 있다. 따라서 화상분석법으로는 종양세포의 DNA ploidy 외에도 DNA ploidy를 이루는 종양세포아군의 형태학적 특성을 규명할 수 있다.

본 연구에서 화상분석법을 이용하여 측정한 변량들을 일변량분석의 방법으로 조사한 결과 DNA aneuploidy 세포들은 핵면적, 둘레, 장경등 형태계측학적 특성과 염색질 구조지수 및 염색강도의 같은 광계측학적 특징에서 DNA diploidy 세포들과는 다를 수 있었다. 그러나 DNA histogram상 DNA diploidy 세포군과 DNA aneuploidy 세포군의 DNA 함량은 불연속적인 두군으로 명확히 구분되었음에 비하여 그외의 형태학적 특성은 상당 부분 중첩되어 있어서 명확히 구분되지 않았다. 이와같은 사실은 비록 DNA 함량이 핵면적과 염색강도의 두가지 변량에서부터 유도된 값이기는 하나 DNA ploidy와 개개의 변량 사이에는 선형관계가 성립하지 않음을 의미하며 DNA 함량을 직접 측정하지 않고서는 일변량분석으로 DNA aneuploidy 세포군을 인지하기가 어렵다는 것을 의미한다.

두가지 이상의 관찰군이 일변량분석에 의해 용이하게 구분되지 않는 자료집합에서는 관찰군의 특성이 두가지 이상의 변량에 의해 결정될 수 있음을 가정하여 볼 수 있다. 본 연구의 자료집합처럼 다변량 정규분포성이 인정되는 집합에서는 다변량 판별분석 방법으로 관찰군을 구분하는 결정 변량을 정의할 수 있고, 결정 변량들의 선형결합에 의해 관찰군을 구분하는 판별함수를 만들 수 있으며, 각 관찰예의 판별함수 값에 의해 관찰예가 어느 관찰군에 속하는지를 확률적으로 예측할 수 있다. 또한 관찰예의 판별함수 값과 각 변량 사이의 상관계수를 조사하여 판별함수와 각 변량 사이의 상관도를 비교할 수 있다<sup>18,19</sup>). 이와 같이 다변량 판별분석은 일변량분석으로는 얻기 어려운 정보를 제공할 수 있으므로 확률론적 의사결정에 점차 많이 이용되고 있다<sup>20-23</sup>).

본 연구에서 DNA 함량과 개개의 변량 사이에는 선형관계가 성립하지 않았으나 다변량 판별분석에 의하면 DNA ploidy 세포군은 핵면적과 염색강도를 포함한 3가지 이상의 변량들의 선형결합에 의하여 불연속적인 2군으로 거의 명확하게 구분되었다. 분석대상의 모든 예에서 핵면적이 먼저 선택되었고 그 다음으로 핵의 염색강도가 선택되었음은 형태계측학적 및 광계측학적 변량중 핵면적과 염색강도가 DNA ploidy를 구분하기 위한 가장 결정력 있는 변량임을 의미한다.



이와같은 점은 DNA 함량이 핵면적과 염색강도의 두 가지 변량에서부터 유도된 변량이므로 당연하다고 할 수 있다. 그러나 DNA 함량이 핵면적과 염색강도의 대수함수 값임에 비하여 DNA ploidy는 핵면적과 염색강도를 포함한 3가지 이상의 변량들의 선형결합에 의해 잘 구분된 것은 DNA ploidy가 몇가지 형태학적 변량의 일차 결합에 의하여 정의될 수 있다는 것을 보여주고 있다. 정준판별함수를 구성하는 변량들이 조사대상 예에 따라 다소 달랐으므로 DNA ploidy를 예측하기 위한 특정한 판별함수를 상정하기는 어려우나 test set를 대상으로 판별력을 조사해 볼 필요가 있다고 생각한다. DNA ploidy를 구분하기 위한 다변량 판별함수와 각 변량들 사이의 상관계수는 핵면적의 경우에 가장 컸으나 모든 예에서 0.40 미만이었으며 핵면적 이외의 변량들과의 상관계수는 0.25 이하이었으므로 DNA 함량과 개개의 형태학적 변량 사이에는 상관도가 낮다고 볼 수 있다.

Charpin 등<sup>24)</sup>은 조직 수준에서 유방암의 DNA aneuploidy가 증식능과는 순상관관계를 가지며 호르몬 수용체와는 역상관관계를 가짐을 보고하여 DNA aneuploidy 세포의 악성도를 추정하고 있다. 그러나 DNA aneuploidy와 악성도의 상관성을 규명하기 위해서는 DNA 함량과 다른 악성도의 표지자들을 세포 수준에서 측정하여 DNA diploidy 세포군과 DNA aneuploidy 세포군 사이의 차이를 직접 비교하는 것이 바람직할 것이다. 본 연구에서와 같이 화상분석학적 방법으로 DNA 함량과 다른 악성도의 표지자를 함께 측정하여 이변량 또는 다변량분석에 의해 고찰함으로써 DNA aneuploidy 세포군의 특성을 밝힐 수 있을 것으로 기대된다.

## 결 론

많은 종양에 있어서 DNA aneuploidy는 높은 악성도를 반영하는 것으로 보고되고 있다. 그러나 DNA aneuploidy 세포들의 형태학적 특성은 불분명하다. 저자들은 미소 침윤성 또는 초기 침윤성 자궁경부암 46예에서 종양세포의 DNA 함량 분포를 조사하여 DNA diploidy 세포들과 DNA aneuploidy 세포들을 함께 갖는 20예를 선택하였으며 각 예에서 DNA diploidy와 aneuploidy 세포군이 다른 형태계측학적 및 광계측학적 변량들에 의해 어떻게 설명되는지를 일변량분석 및 다변량판별분석으로 검토하였다.

일변량분석에서 DNA aneuploidy 세포군은 DNA diploidy 세포군에 비해 큰 핵면적과 둘레, 장경, 염색강도, 및 염색질 구조지수를 가졌으나 각 변량은 DNA ploidy와는 달리 중첩된 분포를 보였다. 각 예에서 DNA diploidy와 DNA aneuploidy 세포군은 DNA 함량을 제외한 다른 변수들의 정준판별함수에 의해 구분되었다. 정준판별함수를 구성하는 변량들은

모든 예에서 핵면적과 염색강도의 순서로 먼저 선택되었다. 그 이후 선택된 변량들은 핵둘레, 장경, 염색질 구조지수이었으나 선택여부나 선택순서는 각 예에 따라 달랐다. 각 변량들과 정준판별함수 사이의 상관계수는 핵면적의 경우 0.20~0.40 사이이었고 나머지 변량들의 경우에는 0.25이하이었다. 이상의 결과로 자궁경부암에서 DNA ploidy는 핵면적, 둘레, 장경과 같은 형태계측학적 변량과 염색강도, 염색질 구조지수와 같은 광계측학적 변량과는 비교적 독립적임을 알 수 있었다.

## 참 고 문 헌

- 1) Suh SP, Yoo JY. *Estrogen receptors in various breast lesions of Korean patients. KJCP* 1988; 8: 275-85.
- 2) Lee KM, Yoo JY. *Immunohistochemical study on the Ha-ras p 21 expression in the gastric carcinoma. Kor J Path* 1990; 24: 1-9.
- 3) Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW. *Method for analysis of cellular DNA content of paraffin embedded pathological material using flow cytometry. J Histochem Cytochem* 1983; 31: 1333-35.
- 4) 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* 1985; 6: 327-33.
- 5) Jacobsen AB, Thorud E, Fossa SD, Lunde S, Shoaib MC, Juul NO, Pettersen EO. *DNA flow cytometry in metastases and a recurrency of malignant melanomas. A comparison of results from fresh and paraffin embedded material. Virchows Archiv (B) Cell Pathol* 1988; 54: 273-7.
- 6) 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 mammalian cells. Exp Cell Res* 1975; 92: 323-32.
- 7) Norusis MJ. *Statistical Package for Social Sciences/PC+. SPSS Inc. Chicago* 1988; pp B1-B39.
- 8) Barlogie B, Raber MN, Schumann J, Johnsson TS, Drewinko B, Swartzendruber DE, Gohde W, Andreef M, Freireich E. *Flow cytometry in clinical cancer research. Cancer Res* 1983; 43: 3982-97.
- 9) Friedlander ML, Hedley DW, Taylor IW. *Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumors. J Clin Pathol* 1984; 37: 961-74.
- 10) Quirke P, Dyson JED. *Flow cytometry. Methodology and applications in pathology. J Pathol* 1986; 149: 79-87.

- 11) Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Pathologic Basis of Disease. 4th ed, Philadelphia, WB Saunders Co 1989; 243-9.*
- 12) Böhm N, Sandritter W. *DNA in human tumors: A cytophotometric study. Current Topics in Pathology 1975; 60: 152-219.*
- 13) Coon JS, Landay AL, Weinstein RS. *Advances in flow cytometry for diagnostic pathology. Lab Invest 1987; 57: 453-79.*
- 14) Kute TE, Muss H. *Flow cytometry in solid-tumor prognosis. Laboratory Management. 1987; 21-32.*
- 15) 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 1989; 10: 192-8.*
- 16) 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 1989; 10: 205-13.*
- 17) Auffermann W, Reppes R, Böcking A. *Rapid diagnostic DNA cytometry with an automatic microscope and a TV image-analysis system Anal Quant Cytol 1984; 6: 179-88.*
- 18) England JM. *Discriminant functions. Blood Cells 1989; 15: 463-71.*
- 19) Weber JE. *Applications of multivariate analysis in diagnostic cytology. Anal Quant Cytol Histol 1988; 10: 54-72.*
- 20) Kunze KD, Haroske G, Dimmer V, Meyer W, Theissig F. *Grading and prognosis of invasive ductal mammary carcinoma, by nuclear image analysis in tissue sections. Pathol Res Pract 1989; 185: 689-93.*
- 21) Mariuzzi GM, Mambelli V, Criante P, Sisti S. *Quantitative evaluation of morphological parameters for infiltrating ductal breast cancer prognosis. Pathol Res Pract 1989; 185: 698-700.*
- 22) Oberholzer M, Ettlin R, Christen H, Gschwind R, Buser M, Rosel F, Lotscher R, Dalquen P. *The significance of morphometric methods in cytologic diagnostics: Differentiation between mesothelial cells, mesothelioma cells and metastatic adenocarcinoma cells in pleural effusions with special emphasis on chromatin texture. Anal Cell Pathol 1991; 3: 25-42.*
- 23) Redman CW, Finn C, Ward K, Kelly K, Buxton EJ, Varma R, Shortland-Webb W, Luesley DM. *Tumour cell activity markers in epithelial ovarian cancer: Are biochemical and cytometric indices complementary? Br J Cancer 1990; 61: 755-8.*
- 24) Charpin C, Andrac L, Lavaut M-N, Andonian C, Fraternali M, Devictor B, Perez-Castillo A, Bonnier P, Piana L. *Image cytometry of aneuploidy, growth fraction(MoAb Ki-67) and hormone receptors(ER, PR) immunocytochemical assays in breast carcinomas. Anal Cell Pathol 1990; 2: 357-71.*