

화상분석기와 유세포측정기를 이용한 DNA 배수성 검사

고려대학교 안암병원 해부병리과

김 인 선 · 남 은 숙

A Comparative Study of DNA Quantitation by Image Cytometry and Flow Cytometry

Insun Kim, M.D. and Eun Sook Nam, M.D.

Department of Anatomical Pathology, Korea University Anam Hospital

There are substantial evidences suggesting that DNA content of tumors may provide the prognostic information with independent significances.

In this study, the results of DNA ploidy analyzed by image cytometry on touch imprint and by flow cytometry on fresh cell suspension of 78 solid tumors were compared. For 68 cases, there was an excellent correlation between two methods. For 6 cases, an aneuploid population was found by image, but not by flow cytometry. One case had an aneuploid peak by flow cytometry. Two methods may use in a complementary fashion to identify as many aneuploid cell population as possible. (**Korean J Pathol 1994; 28: 399~404**)

Key Words: DNA quantitation, Flow cytometry, Image cytometry

서 론

종양에서 DNA 함량의 분석은 임상병기나 조직병리학적 악성도와 상관하여서나 또는 독립적인 인자로서 예후에 영향을 미치리라는 사실이 알려져 있고¹⁻⁴⁾, 이중 유세포측정기를 이용한 DNA 분석이 기본적인 방법으로 이미 국내에도 상당히 보급되어 있는 실정이다. 그러나 최근 화상분석기에 의한 DNA 분석이 소개되면서 이 두 방법간에 불일치하는 예들이 있음이 발표되었다⁵⁻¹⁰⁾. 이는 대부분 화상분석기에서 나타나던 비배수성 세포군이 유세포측정기로는 관찰되지 않는 경우들이다.

본 연구에서 저자들은 78예의 고형암종으로 부터 얻어진 세포날인(imprint)에 Feulgen 염색한 후 화상분석기를 이용하여 DNA ploidy를 측정하고 동시

에 신선조직에서 유세포 측정기로 DNA 함량을 측정하여 각 방법의 장단점을 비교 검토하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 연구재료

고대 안암병원에서 외과적으로 절제되어 신선하게 보내어진 78예의 조직으로부터 유리 슬라이드에 세포 날인을 만들어 화상분석에 이용하였고, 조직의 일부는 즉시 citrate완충용액에서 세포부유액을 만들어 유세포측정에 이용하였다. 이중 10예는 양성병변으로 유방병변이 3예였고 갑상선 선종, 폐과오종, 수막종, 신경교종, 신경초종, 흉선종 및 desmoid 종양이 각각 1예씩이었다. 68예의 악성 종양은 유방암종 13예, 위선암종 10예, 대장선암종 6예, 두경부 편평상피암종 11예를 비롯한 기타 고형암종이었다.

2. 방 법

1) **화상 분석:** 세포 날인된 유리 슬라이드를 실온에

접 수: 1993년 6월 3일, 게재승인: 1993년 9월 9일
주 소: 서울 성북구 안암동5가 126-1, 우편번호 136-705
고려대학교 안암병원 해부병리과, 김인선

서 30분 내지 2시간 건조시킨 다음 10% 중성 완충 포르말린에 30분간 고정된 후 실온에서 다시 건조시켰다. 5M HCl 용액에서 1시간 가수분해 시키고 자력교반기(magnetic stirrer) 위에 올려 놓은 상태에서 Schiff시약으로 1시간 동안 염색한 후 수세하고 탈수하여 포매한 다음 CAS 200 Image analyzer의 DNA ploidy 프로그램을 이용하여 분석하였다. 이 때 200개 이상의 세포를 분석하였고 슬라이드에 포함된 정상림프구와 정상 조직세포의 DNA 양을 내부기준으로 삼고 프로그램에 들어있는 표준세포의 DNA 양을 7.18pg으로하여 검사하는 세포의 DNA 지수를 구하였다.

2) 유세포 측정: 신선한 조직을 citrate 완충용액이 담긴 페트리 접시에서 가위와 면도날을 이용하여 잘게 분쇄한 후 53 μ m 구멍크기를 갖는 나일론망을 사용하여 세포부유액을 여과하였다. 여과한 세포부유액에서 세포수를 2×10^6 /ml로 맞추는 다음 부유액 50 μ l를 Falcon 튜브에 옮기고 여기에 트립신 용액 450 μ l를 가하여 10분간 실온에서 작용시킨다. 다시 RNase 용액 375 μ l를 가하여 10분간 실온에서 반응시킨 다음 propidium iodide 375 μ l를 가하고 10분간 암소에서 반응시킨 후 FACScan으로 DNA 양을 측정하였다. 기계의 작동을 위하여 chicken RBC를 propidium iodide로 염색하여 표준물질로 이용하였다. 조직내 림프구나 정상 세포를 내부표준으로 정하고 각 검체마다 20,000개 이상 세포의 DNA 함량을 측정하여 Cellfit 프로그램으로 분석하였다.

3) 히스토그램 분석: 유세포측정법으로 얻어진 결과를 분석할 때 하나의 뚜렷한 G_0/G_1 peak를 가진 경우를 이배수성(diploidy)이라고 하였고 하나 이상의 뚜렷한 G_0/G_1 peak를 보이며 이에 대응하는 G_2/M

이 있을때를 비배수성(aneuploidy)으로 정의 하였다. 이 중 핵산지수가 0.90 이하일 때는 저이배수성(hypodiploidy)이라고 하고, 1.05보다 크고 1.95보다 작은 때를 과이배수성(hyperdiploidy)이라고 하였으며, G_2/M peak가 전체 세포의 15% 이상이고 핵산지수가 1.95에서 2.05사이에 있을 때를 사배수성(tetraploidy)이라고 정의하였다. 핵산지수가 2.05 이상일 때는 과사배수성(hypertetraploidy)이라고 하였다. 또한 두개 이상의 비배수성 peak가 있을 때를 다배수성(multiploidy)으로 하였다. DNA 지수는 이배수성 G_0/G_1 peak에 대한 비배수성 G_0/G_1 peak의 평균 channel의 비율로 계산되었다.

화상분석기로 분석할 때 표준세포의 DNA 양(7.18 pg)을 기준으로 하여 G_0/G_1 peak의 핵산지수가 0.90에서 1.10에 속할 때를 이배수성으로 하고 핵산지수가 1.11에서 1.89일 때를 과이배수성이라 하였으며 1.90에서 2.10사이를 사배수성이라 하였다. 2.10이상인 경우는 과사배수성이라 정의하였다.

결 과

화상분석기를 이용한 DNA 배수성 검사에서 10예의 양성 병변 중 9예는 이배수성이었고 신경초종 1예는 사배수성이었다. 악성 종양 68예 중 27예는 이배수성을 보였고 40예에서 비배수성을 보였으며 1예는 측정이 불가능하였다. 유세포측정기를 이용한 경우 양성 병변 중 갑상선 선종 1예가 비배수성, 신경초종 1예는 사배수성이었고, 1예에서는 측정이 불가능하였으며, 악성 병변 중에서는 34예가 이배수성이었으며 33예에서 비배수성이었고 1예는 측정이 불가능하였다. 따라서 두 방법의 일치율은 34예의 이배수성과 34예

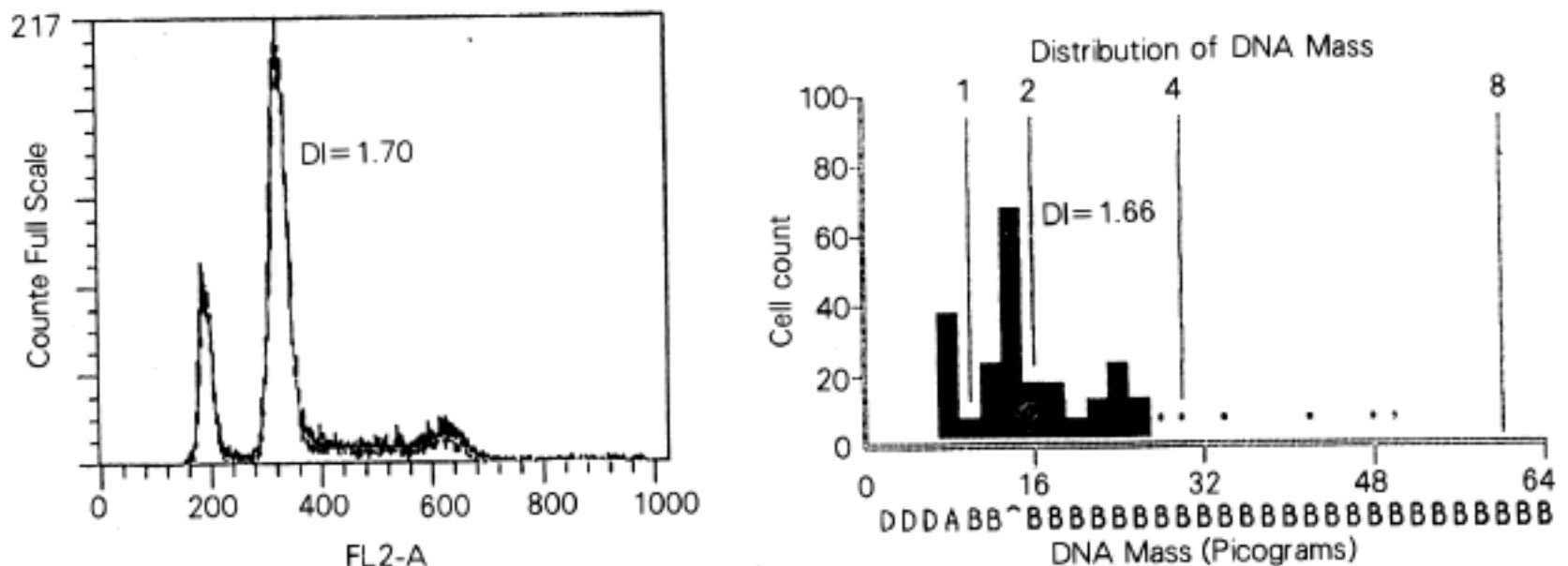


Fig. 1. Concordant aneuploid histogram of flow cytometry (left) and image cytometry (right) of adenocarcinoma of stomach (DI; DNA index).

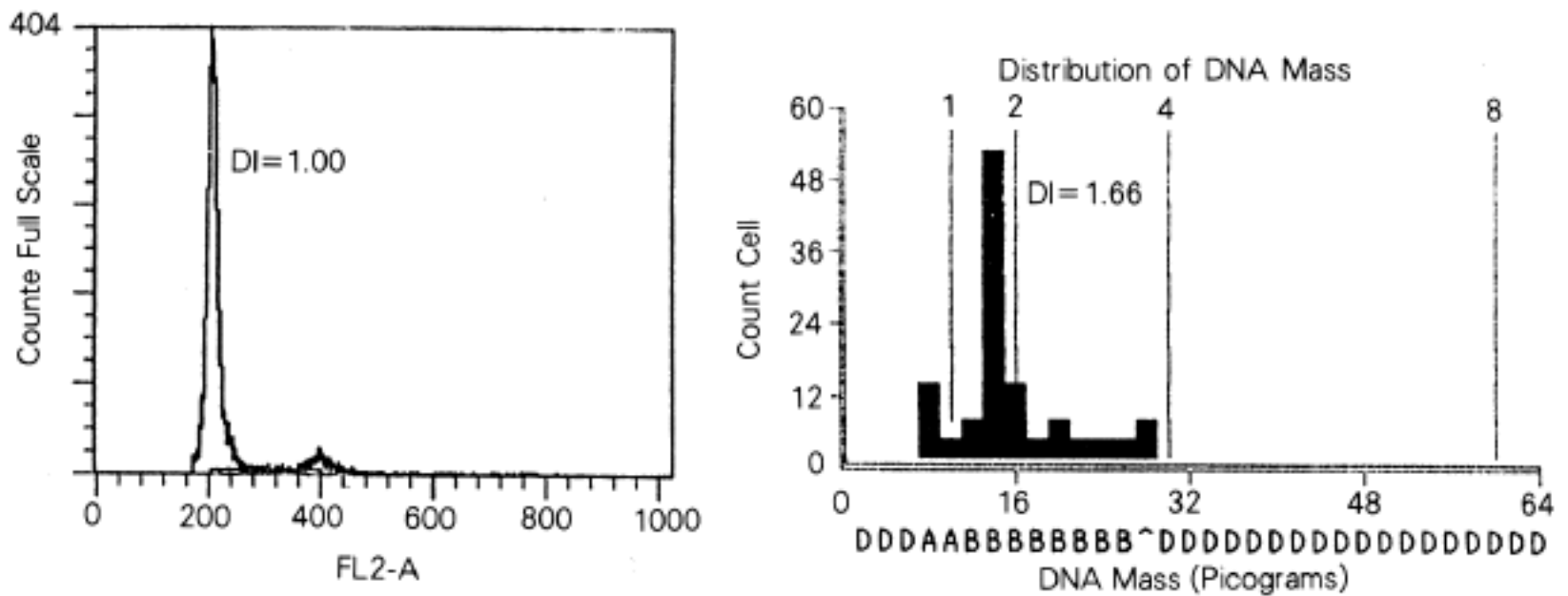


Fig. 2. Discordant histogram of mucinous cystadenoma of borderline malignancy in ovary.

Table 1. Comparison of DNA ploidy analyzed by ICM and FCM

	FCM						
	D	HD	T	HT	M	F	Total
ICM D	34	1				1	36
ICM HD	6	21			1	1	29
ICM T		1	5		1		7
ICM HT		1	1	2			4
ICM M					1		1
ICM F	1						1
Total	41	24	6	2	3	2	78

* ICM: Image cytometry, FCM: Flow cytometry, D: Diploidy, HD: Hyperdiploid, T: Tetraploidy, HT: Hypertetraploidy, M: Multiploidy, F: Fail

Table 2. Results of discordant cases

Cases	ICM	FCM
Benign lesion		
Follicular adenoma	D	A
Malignant lesions		
Colon adenocarcinoma	A	D
Gastric adenocarcinoma	A	D
Uterine leiomyosarcoma	A	D
Breast carcinoma(2)	A	D
Ovarian mucinous cystadenoma, borderline	A	D

* ICM: Image cytometry, FCM: Flow cytometry, D: Diploidy, A: Aneuploidy

의 비배수성인 총 68예로 모두 87.2%에 해당하였다. 두 방법에서 모두 이배수성을 보인 34예와, 비배수성을 보인 34예 중 21예는 과이배수성, 5예는 사배수성, 2예는 과사배수성, 1예는 다배수성을 보여 배수성 양상까지도 일치하였던 예는 모두 63예로 80.7%에 해당하였다(Table 1, Fig. 1).

두 방법에서 DNA 양상이 일치하지 않았던 경우가 7예 있었는데 이 중 6예는 유세포측정법에서 보이지 않던 비배수성 peak가 화상분석에서 관찰되었는데 이는 자궁의 평활근육종, 위선암, 대장선암 및 난소의 경계영역성 점액종 각 1예와 유방암 2예였고, 반대로 갑상선 선종 1예에서는 유세포측정으로 비배수성이었으나 화상분석에서는 이배수성으로 나타났다(Table 2, Fig. 2).

유세포측정으로 다배수성을 보였던 예가 3예였는데

세개의 G0/G1 peak가 있었던 1예에서는 화상분석에서 한개의 peak만 관찰되었고, 2개의 peak가 관찰되었던 2예 중 1예는 화상분석에서 2개의 peak가 모두 관찰되었으나 1예에서는 한개의 peak만 관찰되었다. 화상분석기로 DNA 검사가 불가능했던 예는 악성 섬유 조직구종으로 괴사가 심하고 고정이 잘 안되었기 때문이었고 유세포측정기로 분석이 불가능했던 예는 뇌하수체 부위의 난황낭종과 폐의 과오종이었는데 충분한 세포부유액을 만들지 못했기 때문이었다. 유세포측정에서의 변이계수는 1.0%에서 12.4%로 평균 5.1%이었고 화상분석에서의 변이계수는 2.7%에서 17.5%로 평균 7.6%였다. 두 방법간 핵산지수의 Pearson 상관계수는 0.629로 우수한 상관관계를 갖고 있었다(Fig. 3).

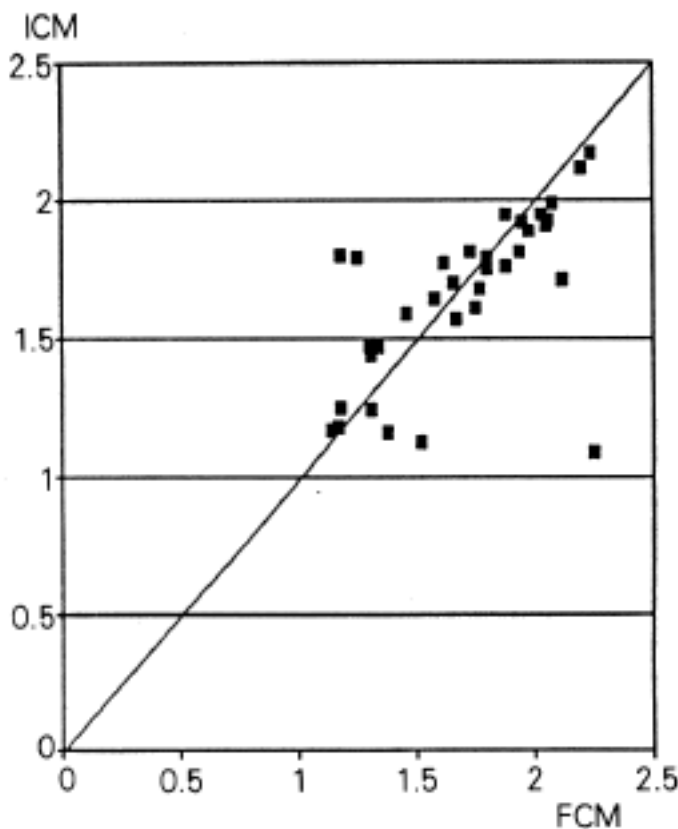


Fig. 3. Comparison between DNA Indices of FCM and ICM ($r=0.629$).

고 찰

Feulgen 염색을 이용한 DNA 함량 측정이 임상적 가치를 갖는다는 사실은 1924년부터 1970년대 초반까지 잘 알려져 왔지만¹⁵⁾ microspectrophotometry의 사용이 용이하지 않아 임상적으로 그리 이용되지 못하다가 1980년대에 electronic cell measurement 방법의 발전은 DNA 함량 측정에 유세포 측정기를 이용하기에 이르고¹⁶⁾ Auer와 Tribukait¹⁷⁾가 유세포 측정법을 통한 DNA 검사가 photometry를 이용한 DNA 검사 결과와 잘 일치한다는 사실을 발표하였다. Schneller등¹⁵⁾은 흉막액에서, Fossa등¹⁸⁾은 유방암 조직에서 두 방법의 결과를 비교한 결과 유세포 측정기로 발견되지 않은 비배수성이 cytophotometry 분석에서 관찰되었음이 보고되었다. 또한 Hedley등¹⁹⁾에 의해 신선조직 뿐 아니라 파라핀 포매된 조직으로부터 세포부유액을 만들어 형광색소인 propidium iodide와 반응시킨 후 유세포 측정기로 세포내 DNA 함량을 측정하는 방법이 널리 이용되어 왔다. 이 방법은 비교적 짧은 시간내에 다량의 세포를 분석할 수 있다는 장점이 있으나 염증세포나 종양세포가 아닌 세포들이 함께 측정되어 소수로 존재하는 비배수성 종양세포들이 잘 발견되지 않을 수 있고 사배수성 근처에 해당하는 비배수성 세포들은 쉽게 파괴되어 유세포 분석에서 소실된다는 단점을 갖고 있다. 그 후 세포도말이나 세포날인에 Feulgen 반응으로

DNA 염색을 한 다음 비디오와 컴퓨터 시스템을 이용하여 각 세포핵의 optical density를 측정하여 분석하는 화상분석기가 개발되어 DNA 함량 측정에 이용되고 있다. 이 방법은 측정속도가 느리고 적은수의 세포만을 분석하기 때문에 해상력이 낮고 표준편차가 높아 비배수성 peak를 감별하기가 어렵다는 단점이 있으나 측정하는 사람이 직접 분석하는 세포를 관찰할 수 있으므로 불필요한 염증세포나 비종양 세포를 제외시킬 수 있다는 장점이 있다. 신선 또는 파라핀 포매 조직, 세침흡인 도말표본 및 체액 등에서 이 두 방법의 결과를 비교분석한 연구들^{5~14)}이 있는데 일치율은 대략 75%에서 98%에 해당되고 대부분 유세포 측정으로 관찰되지 않은 비배수성 세포집단이 화상분석으로 검출되는 경우인데, 이는 유세포 측정 시 비배수성 세포들이 부유액을 만드는 과정에서 쉽게 파괴되거나 염증세포를 비롯한 정상세포에 의해 소수의 비배수성 세포들이 희석되는 반면 화상분석에서는 큰 핵을 갖는 종양세포들이 쉽게 눈에 띄므로 분석이 잘되기 때문이다. 또한 유세포측정에서 사배수 근처에 있는 비배수성 peak를 이배수성의 G₂/M peak로 잘못 관측될 수 있기 때문이다. 그러나 드물게는 유세포분석에서 발견된 비배수성 peak가 화상분석에서는 관찰되지 않는 경우가 있는데 이는 세포날인에서 종양세포가 떨어져 나오지 않아 비배수성 세포가 측정되지 않는 경우와 히스토그램의 변이계수가 높아 이배수 근처에 있는 비배수성 세포를 구별할 수 없는 경우이다.

본 연구에서는 6예에서 화상분석으로는 비배수성 peak가 관찰되었으나 유세포 측정에서 관찰되지 않았는데 이중 위암에서는 핵산지수가 1.86인데도 관찰되지 않아 비배수성 세포군이 소실되었을 가능성이 많고 자궁의 평활근육종과 난소의 경계영역성 절액종에서는 화상분석에서 비정상적인 핵을 갖는 세포들이 주로 측정되었기 때문으로 해석된다. 2예의 유방암과 1예의 대장암에서는 보통 이배수성 peak와 함께 비배수성 peak가 관찰되는 경우와 달리 핵산 지수가 1.14인 비배수성 세포만이 관찰되었는데 유세포 측정에서 내부표준세포를 사용하지 않았기 때문에 비배수성 peak를 이배수성 peak로 잘못 관측한 것으로 생각된다. 갑상선 선종에서 유세포 측정으로 비배수성이 관찰되었으나 화상분석에서 관찰되지 않은 것은 이유를 설명하기가 어려우나 갑상선을 비롯한 내분비 양성종양에서 비배수성이 다른 장기에 비해 흔하다는 사실이 알려져 있다²⁰⁾. 다배수성을 알아내는데는 유세포 측정이 더 좋은 것으로 생각되는데 본 연구에서 1예만이 두개의 비배수성 peak가 두 방법 모두에서 관찰되었고 1예에서는 유세포 측정으로 핵산지수 1.24와 1.43 두개의 peak가 관찰되었으나 화상분석에서는 중간의 1.31 한 개 peak만 관찰되었다. 또한 방광암 1예에서는 핵산지수 1.18 peak와 함께 사배수성 핵산 부위에 1.93과 2.21 두개 peak가 관찰되었는데 화상분석에서는

2.06한개의 peak만 보였다.

두 방법이 각각 실패한 3예 중 2예는 조직이 너무 적었거나 연골조직이 많아 세포 부유액을 만들기 어려워서 유세포측정은 시행할 수 없었으나 화상분석은 가능하였는데, 이런 적은 양의 검체나, 분리가 잘 안되는 고형조직, 또는 세포도말 표본에서 소량의 세포로도 분석이 가능한것이 화상분석법의 장점이라 할 수 있다. 체강액에서 화상분석과 유세포측정으로 DNA의 배수성을 시행하므로써 악성 병변의 진단율을 높일 수 있다는 보고들이 있는데 Kapusta등²¹⁾의 연구에서는 세포학적으로 악성이라고 진단된 체강액에서 92%가 비배수성 집단을 보인 반면 음성인 경우의 15%에서도 보였고 Rijken등²²⁾도 세포학적 진단에서 음성이었던 예에서 비배수성이 관찰되었다고 보고하여 세포학적 진단의 위음성을 낮출 수 있다고 하였다. 또한 확실치 않으나 의심스러운 세포학적 소견을 보이며 비정상적인 DNA 히스토그램을 보일때는 좀더 임상적으로 암종이 있나 찾아봐야 한다고 하였다. 두 방법 중 소수의 암세포가 출현할 때는 화상분석법이 유세포측정법보다 좋은 결과를 보인다고 한다. 그러나 원래 종양이 이배수성인 경우는 위의 두 방법에서 모두 비배수성 세포군이 나오지 않으므로 형태학적인 세포검사가 더 유용하리라 생각된다. Gurley등²³⁾은 세포도말 표본에서 Papanicolaou염색과 Feulgen염색을 시행하여 DNA 함량을 측정하고 결과 Papanicolaou염색으로 측정하고 DNA 분석은 RNA가 동시에 측정되기 때문에 믿을만하지 않으나 이를 탈색시켜 Feulgen염색을 다시 시행하면 화상분석법으로 분석이 가능하다는 사실을 보고하였는데 이는 우리가 흔히 접하는 세포도말표본으로도 DNA 분석이 가능하리라는 것을 시사하였다. 화상분석법의 단점 중에 채취상의 문제는 세포날인을 가능한 한 여러군데에서 시행하면 개선될 수 있으리라 생각되고 또한 냉동조직으로 부터 세포날인한 세포를 분석한 결과와 신선조직으로부터의 세포날인으로 분석한 결과가 좋은 일치율을 보인다는 보고도 있으며²⁴⁾ 파라핀 포매조직으로 부터 만든 세포부유액을 도말하여 화상분석법으로 DNA 함량검사를 한 결과도 유세포측정에서의 결과를 보였다고 하였다²⁵⁾. 따라서 화상분석법은 파라핀 포매조직을 이용하여 유세포측정기로 DNA 분석을 시행할 때, 넓은 CV와 많은 조직파편들 때문에 히스토그램의 분석이 어려운 경우 비배수성 집단을 좀더 쉽게 발견 할 수 있는 장점을 갖고 있다.

결 론

종양의 예후를 결정하는데 중요한 인자로 알려진 DNA 핵산지수를 측정하는 방법 중 유세포 측정법과 화상분석법의 장단점을 비교 검토하고자 78예의 고형 종양에서 세포날인한 슬라이드에 Feulgen 염색한 후

화상분석기로 DNA 배수성을 측정하고 동시에 신선 조직의 부유액에 propidium iodide로 염색하여 유세포측정기로 DNA 함량을 측정 분석한 결과 68예(87.2%)가 두 방법 모두에서 배수성의 일치율을 보였으며 6예에서 비배수성 세포군이 화상분석에서만 발견되었고 1예에서는 유세포측정에서만 나타났다. 나머지 3예 중 2예는 유세포측정에서, 1예는 화상분석에서 분석이 어려웠다.

DNA 함량을 측정하는데 두 방법은 좋은 일치율을 보였으나 화상분석법에 의한 분석에서 비배수성 검출율이 좀 더 높았다.

참 고 문 헌

- 1) Friedlander ML, Hedley DW, Taylor IW. *Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumors. J Clin Pathol* 1984; 37: 961-74.
- 2) Friedlander ML, Hedley DW, Taylor IW, Russel P, Coates AS, Tahersall MHN. *Influence of cellular DNA content on survival in advanced ovarian cancer. Cancer Res* 1984; 44: 397-400.
- 3) Kokal W, Sheibani K, Terz J, Harada JR. *Tumor DNA content in the prognosis of colorectal carcinoma. JAMA* 1986; 255: 3123-7.
- 4) Auer G, Eriksson E, Caspersson T, Wallgren A. *Prognostic significance of nuclear DNA content in mammary adenocarcinoma in humans. Cancer Res* 1984; 44: 394-6.
- 5) Elisheikh TM, Silverman JF, McCool JW, SCT BA, Reley RS. *Comparative DNA analysis of solid tumor by flow cytometric and image analysis of touch imprints and flow cell suspensions. Am J Clin Pathol* 1992; 98: 296-304.
- 6) Bauer TW, Tubbs RR, Edinger MG, Suit PF, Gephardt GN, Levin HS. *A prospective comparison of DNA quantitation by image and flow cytometry. Am J Clin Pathol* 1990; 93: 322-6.
- 7) Claud RD, Weinstein RS, Howedy A, Straus AK, Coon JS. *Comparison of image analysis of imprints with flow cytometry for DNA analysis of solid tumors. Mod Pathol* 1989; 2: 463-7.
- 8) 김성숙, 박석진, 한동선. 간세포암종의 DNA 분석, 유세포분석법과 화상분석법의 비교고찰. *대한병리학회지* 1992; 26: 1-9.
- 9) 김윤미, 정상우, 유주용, 조규혁. 난소점액성 종양의 DNA ploidy 유형에 관한 연구. *대한병리학회지* 1991; 25: 397-406.
- 10) Wilbur DC, Zakoqsik MF, Kosciol CM, Sojda DF, Pastuszak WT. DNA ploidy in breast lesions. A comparative study using two commercial image analysis and flow cytometry. *Analyt Quant Cytol*

- Histol 1990; 12: 28-34.
- 11) Dawson AE, Norton JA, Weingerg DS. *Comparative assessment of proliferation and DNA content in breast carcinoma by image analysis and flow cytometry. Am J Pathol* 1990; 136: 1115-24.
 - 12) Lee AK, Dugan J, Hamilton WM, Cook L, Heatley G, Kamat B, Silverman M. *Quantitative DNA analysis in breast carcinoma. A comparison between image analysis and flow cytometry. Mod Pathol* 1991; 4: 178-82.
 - 13) Areta KV, Jami V, Pauline C, Frank CC, Joel P, Donna P, Chester H. *Flow and image cytometric DNA analysis in Ewings' sarcoma. Mod Pathol* 1990; 5: 56-60.
 - 14) Hostetter AL, Hrafinkelsson J, Wingren SOW, Enestrom S, Nordenskjold B. *A comparative study of DNA cytometry methods for benign and malignant thyroid tissue. Am J Clin Pathol* 1988; 89: 760-3.
 - 15) Schneller J, Eppich E, Greenbaum E, Eliquin F, Sherman A, Wersto R, Koss RG. *Flow cytometry and feulgen cytometry in evaluation of effusions. Cancer* 1987; 59: 1307-13.
 - 16) Coon JS, Landay AL, Weinstein RS. *Biopsy of disease. Advances in flow cytometry for diagnostic pathology. Lab Invest* 1987; 57: 453-79.
 - 17) Auer G, Tribukait B. *Comparative single cell and flow DNA analysis in aspiration biopsies from breast carcinomas. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand[A]* 1980; 88: 355-8.
 - 18) Fossa SD, Thorrud E, Vaage S, Shoai'b MC. *DNA cytometry of primary breast cancer. Comparison of microspectrophotometry and flow cytometry and different preparation method for flow cytometric measurements. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand[A]* 1983; 91: 235-43.
 - 19) Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Rugg DA, Musgrove EA. *Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. J Histochem and Cytochem* 1983; 31: 1333-5.
 - 20) Joensuu H, Klemi P, Eerola E. *DNA aneuploidy in follicular adenomas of the thyroid gland. Am J Pathol* 1986; 124: 373-6.
 - 21) Kapusta L, Zbieranowski I, Demianiuk C, Murray d. *The role of DNA flow and image cytometry in the evaluation of body fluids. Analyst Quant Cytol Histol* 1991; 13: 187-92.
 - 22) Rijken A, Dekker A, Taylor s, Hoffman P, Blank M, krause JR. *Diagnostic value of DNA analysis in effusion by flow cytometry and image analysis. Am J Clin Pathol* 1991; 95: 1-7.
 - 23) Gurley AM, Hidvegi DF, Bacus JW, Bacus SS. *Comparison of Papanicolaou and Feulgen staining methods for DNA quantitation by image analysis. Cytometry* 1990; 11: 468-74.
 - 24) Suit PF, Bauer TW. *DNA quantitation by image cytometry of touch preparations from fresh and frozen tissue. Am J Clin Pathol* 1990; 94: 49-53.
 - 25) Mcfadden PW, Clowry LJ, Daehnert K, Hause LL, Koethe SM. *Image analysis confirmation of DNA aneuploidy in flow cytometric DNA distributions having a wide coefficient of variation of the G₀/G₁ peak. Am J Clin Pathol* 1990; 93: 637-42.