

Flæðigreining krabbameina

Bjarni A. Agnarsson¹⁾, Helgi Sigurðsson²⁾, Jón Gunnlaugur Jónasson¹⁾, Sigrún Kristjánsdóttir¹⁾

Flow cytometric analysis of human malignancies

Agnarsson BA, Sigurðsson H, Jónasson JG, Kristjánsdóttir S

Læknablaðið 1996; 82: 131–6

In this article recent advances in the flow cytometric analysis of human tumors are reviewed with regard to both DNA ploidy analysis and the estimation of S-phase fraction (SPF). The technique and background principles of flow cytometry are described and its clinical usefulness is discussed. Special consideration is given to malignancies of the breast, urinary bladder, prostate gland, ovaries, endometrium, skin, colorectum and the thyroid gland. Finally the usefulness of flow cytometry in the diagnosis of partial and complete hydatidiform moles is described.

Ágrip

Í þessari stuttu yfirlitgrein er skýrt frá nýjungum á sviði DNA mælinga með flæðigreini (flow cytometer) bæði hvað varðar ákvörðun á DNA innihaldi og mælingar á hlutfalli frumna í S-fasa. Gerð er grein fyrir aðferðafræði og grundvallaratriðum varðandi rannsóknaraðferð þessa og síðan fjallað um klínískt notagildi við mat á horfum sjúklinga með krabbamein. Sérstaklega er fjallað um krabbamein í brjóstum, þvagblöðru, blöðruhálskirtli, eggjastokkum, legbolsslímhúð, húð, ristli og endaparmi og skjaldkirtli. Að lokum er fjallað um DNA mælingar við greiningu blöðrufylgju (mola hydatidosa).

Frá ¹⁾Rannsóknastofu Háskólans í meinafræði, ²⁾krabbameinslækningadeild Landspítalans. Fyrirspurnir, bréfaskipti: Bjarni A. Agnarsson, Rannsóknastofu Háskólans í meinafræði, pósthólf 1465, 121 Reykjavík.

Lykilorð: Flæðigreining, krabbamein, sjúkdómshorfur.

Inngangur

Verulegar framfarir hafa orðið hin síðari ár á sviði frumurannsókna og sameindaerfðafræði og fer innsæi vaxandi á hinum ýmsu eiginleikum heilbrigðra frumna og æxlisfrumna. Hægt er með fljótvirkri aðferð, flæðigreiningu (flow cytometry), að mæla vaxtarhraða (hlutfall þeirra frumna í æxli, sem eru að auka DNA innihald sitt fyrir skiptingu, þ.e. S-fasinn í frumuhringnum) og DNA innihald mörg þúsund æxlisfrumna úr tilteknu æxli. Mörg krabbamein hafa óeðlilegt magn af DNA í kjörnum æxlisfrumna, þ.e. þau eru mislitna (aneuploid, non-diploid) í stað þess að vera tvílitna (diploid). Það hefur verið sýnt fram á að horfur sjúklinga með margar tegundir krabbameina eru verri ef æxlisfrumurnar eru mislitna og einnig eru horfur oft háðar vaxtarhraða (1–3). Hér á eftir verður gerð grein fyrir DNA flæðigreiningu og klínísku notagildi hennar en boðið hefur verið upp á þessa rannsóknaraðferð á Rannsóknastofu Háskólans í meinafræði síðan 1991. Rétt er að benda lesendum á íslenska grein, þar sem aðallega er skýrt frá notagildi þessarar tækni við ónæmisfræðilegar rannsóknir (4).

Flæðigreining

Flæðigreinin er tæki sem mælir ýmsa eiginleika frumna er þær streyma í einfaldri röð fram hjá leysigeisla. Þegar mæla á vaxtarhraða og/eða DNA innihald er frumum (eða kjörnum) komið í lausn með aðstoð ensíma, sem brjóta niður vefinn. Saman við frumulausnina er síðan blandað efni (til dæmis própídíum jodíð) sem binst sérhæft við DNA og hefur jafnframt þann eiginleika að gefa frá sér flúrskin við ljósáreiði. Flúrskinið sem hver fruma eða kjarni gefur frá sér er í réttu hlutfalli við DNA innihaldið og mæla sérstakir nemar í flæðigreininum flúrskinsmagnið. Yfirleitt eru um 20 þúsund frumur mældar úr hverju sýni og

sér tölva um að búa til línurit (sjá mynd), sem sýnir DNA innihaldið í frumum sýnisins. Viðmiðunarfrumum, til dæmis eðlilegum líkamsfrumum eða rauðum blóðkornum úr silungum eða kjúklingum er oft blandað saman við frumulausnina til að auðvelda matið á DNA innihaldi.

Hægt er að mæla bæði fersk sýni svo og sýni sem steipt hafa verið í paraffín (5). Það síðarnefnda eykur verulega notagildi aðferðarinnar þar sem yfirleitt er til slíkur vefur og gefur það einnig möguleika á afturvirkum rannsóknum.

Klínískt notagildi flæðigreiningar

Skipta má klínísku notagildi flæðigreiningar í nokkra flokka (sjá töflu). Aðallega verður fjallað um notkun flæðigreiningar við mat á horfum krabbameinssjúklinga, en rétt þykir þó að vekja athygli á því gagni sem hafa má af flæðigreiningu þegar vafi leikur á því hvort tiltekið æxli sé nýtt frumæxli eða meinvarp frá fyrra krabbameini. Í þessum tilvikum getur samanburður á DNA mynstri nýja æxlisins og fyrra æxlis með flæðigreiningu gefið ákveðnar vísbendingar, því að meinvörp hafa yfirleitt sama DNA mynstur og æxlið sem þau eru sprottin frá (6,7). Notagildi flæðigreiningar við mat á horfum sjúklinga með krabbamein er háð því hvers eðlis krabbameinið er og á hvaða stigi sjúkdómurinn er þegar hann greinist. Það skiptir til dæmis ekki miklu máli að vita hvort útbreitt brisartilskrabbamein sé tvílitna eða mislitna. Fyrir önnur krabbamein getur þessi rannsóknaraðferð hins vegar gefið mikilsverðar viðbótarupplýsingar (1–3) og eru nú flestir því sammála að DNA flæðigreining auki nákvæmni við mat á horfum sjúklinga með krabbamein í mörgum líffærum og geti stundum verið leiðbeinandi við val á meðferð. Verður hér á eftir gerð grein fyrir krabbameinum í ýmsum líffærum, þar sem sú virðist vera raunin.

Brjóstakrabbamein. Flestar rannsóknir sýna að notagildi sé af flæðigreiningu við mat á horfum sjúklinga með brjóstakrabbamein. Sýnt hefur verið fram á að upplýsingar um DNA innihald og/eða S-fasa mælingar hafa þýðingu hvort sem um er að ræða sjúklinga með eitlaneikvæðan (8–10) eða eitlajakvæðan sjúkdóm (11–13). Sem dæmi má nefna að í rannsókn sem gerð var í Svíþjóð hjá sjúklingum með eitlaneikvætt brjóstakrabbamein var unnt að finna sérstakan áhættuhóp með tilliti til endurkomu

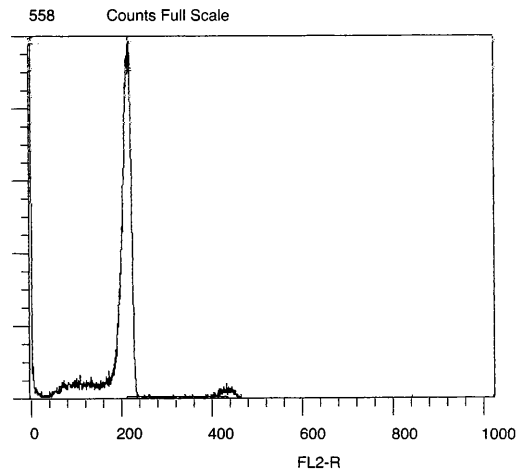


Fig. a

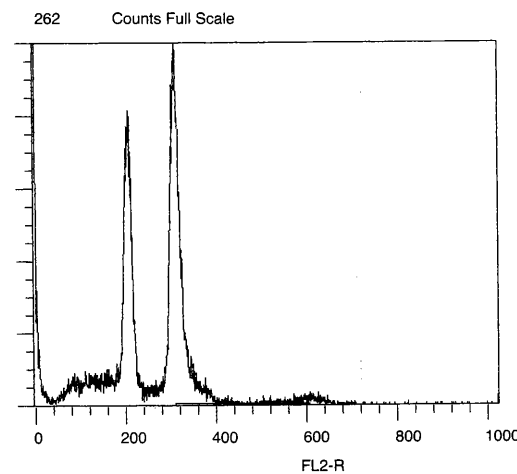


Fig. b

Fig. Proliferating cells double their DNA content prior to cell division and the different phases of the cell cycle are thus reflected in the histogram.

Figure a shows an example of a DNA diploid tumor. At the right (highest DNA value) the small peak is due to cells which are in the process of dividing or are in the phase just prior to cell division (G_2+M phase) and have thus double the amount of DNA ($4n$) compared to the cells which form the large peak on the left and which are either resting cells or cells which have entered the first phase of the cell cycle (G_0+G_1 phase, $2n$). The DNA content of the cells which are synthesizing DNA in preparation of mitosis (S -phase) is displayed between the two peaks (DNA content between $2n$ and $4n$). A computer program measures the percentage of cells in each phase. The S -phase fraction is used to measure the rate of growth of the tumor. If the tumor is diploid only one cell population is seen but if the tumor is aneuploid an additional cell population appears on the histogram (figure b). The peak on the left is due to diploid cells in the specimen (fibroblasts, inflammatory cells etc.).

Table. *Clinical usefulness of DNA flow cytometry.*

Clinical use	Explanation/example
Diagnosis of malignancy	Aneuploid tumors are usually malignant but benign tumors are usually diploid
Prognostic information independent of stage of disease	Aneuploid cancers in general have a worse prognosis than diploid cancers
Response of tumors to treatment	Response to treatment is often dependent on S-phase fraction
Confirmation of tumor recurrence	Aneuploid cells (in for example urine) indicate tumor recurrence
Differential diagnosis of tumors	A primary tumor and its metastases usually have the same DNA index. Two different primaries often have different DNA indexes
Diagnosis of aneuploid disease	Partial hydatidiform moles are usually triploid

æxlis, með því að nota saman upplýsingar um stærð æxlis, prógesterón viðtaka og S-fasa mælingar (9). Í þessum hópi sem í var um það bil þriðjungur sjúklinga skipti máli að gefa í upphafi viðbótarmeðferð með krabbameinslyfjum. Jafnframt er hægt að komast hjá slíkri meðferð hjá þeim sjúklingum, sem ekki falla í þennan áhættuhóp. Lokið er íslenski rannsókn þar sem athugaðar voru 347 konur sem greindust með brjóstakrabbamein á árunum 1981–1984 (14). Í þessari rannsókn gáfu S-fasa mælingar upplýsingar um horfur umfram þær upplýsingar sem fást með hefðbundinni stigun og hjá konum með eitlaneikvæðan sjúkdóm var mat á S-fasa eini þátturinn sem hafði marktæka þýðingu við mat á horfum. Nýlega var haldinn fundur sérfræðinga til að athuga stöðu flæðigreiningar í tengslum við brjóstakrabbamein (15). Niðurstaða fundarins var sú að fylgni er milli DNA innihalds og horfa sjúklingsins en yfirleitt nær DNA innihald þó ekki að verða sjálfstæður áhættuþáttur þegar notuð eru fjölpátta reiknilíkön. S-fasa mælingar hafa aftur á móti sjálfstætt forspárgildi og virðast þannig skipta meira máli en DNA innihald. Rétt er þó að benda á að S-fasa mælingar geta verið tæknilega erfiðari en mat á DNA innihaldi. Einnig hefur komið í ljós að mislitna æxli eða æxli með háan S-fasa eru næmari fyrir krabbameinslyfjum en þau sem eru tvílitna eða hafa lágan S-fasa (16).

Þvagblöðrukrabbamein. Greinileg fylgni er milli DNA innihalds í þvagblöðrukrabbameini og hættu á ífarandi vexti og myndun meinvarpa. Æxli sem eru vel þroskuð (gráða I) hafa yfirleitt eðlilegt DNA innihald, en illa þroskuð æxli (gráða III) og ífarandi æxli eru yfirleitt mislitna. Um það bil tveir þriðju meðalvel þroskaðra æxla (gráða II) eru með eðlilegt

DNA innihald og um það bil þriðjungur mislitna (17). Sýnt hefur verið fram á að forstigsæxli sem hafa eðlilegt DNA innihald vaxa mjög sjaldan ífarandi og mynda yfirleitt ekki meinvörp. Þannig er fylgni milli DNA innihalds og sjúkdómsstigs (18) og einnig er fylgni milli DNA innihalds og S-fasa. Einnig er hægt að haga eftirliti sjúklinga með þvagblöðrukrabbamein á þann hátt að gera flæðigreiningu á þvagsýnum til að greina endurkomið æxli (19).

Blöðruhálskirtilskrabbamein. Ákveðið samhengi er milli stigs krabbameins í blöðruhálskirtli og DNA innihalds. Flest æxli á stigi A eru tvílitna, en flest æxli á stigum C og D eru mislitna. Æxli á stigi B liggja þarna á milli (20). Svo virðist sem tvílitna æxli sem greinast á stigi A myndi sjaldan meinvörp og endurspeglast þetta í hinni háu tíðni leyndra krabbameina sem finnast við krufningu (2). Í rannsókn þar sem athugaðir voru sjúklingar, sem höfðu gengist undir brotnám kirtilsins og höfðu eitlameinvörp, gaf flæðigreining mikilsverðar upplýsingar (21). Sjúkdómurinn tók sig upp hjá 75% þeirra sem höfðu mislitna æxli en aðeins hjá 15% þeirra sem höfðu tvílitna æxli. Enginn sjúklingur með tvílitna æxli dó á athugunartímanum (fimm til 19 ár), en af þeim sem voru með mislitna æxli dó tæplega helmingurinn. Í nýlegri rannsókn frá sömu stofnun þar sem skoðaðir voru sjúklingar sem höfðu farið í skurðaðgerð og sjúklingarnir flokkaðir í hópa eftir ælisgráðu svo og stigi eða útbreiðslu æxlis var sýnt fram á að jafnaði tæplega þrisvar sinnum verri horfur innan hvers flokks fyrir sjúklinga sem höfðu mislitna æxli en þá sem voru með tvílitna æxli (22).

Eggjastokkkrabbamein. Sýnt hefur verið fram á að bæði DNA innihald og S-fasa hlutfall eru sjálfstæðir áhættuþættir í krabbameini í

eggjastokkum (23) og virðist áhættan fara vaxandi eftir því sem æxli hafa fleiri mislitna frumuhópa (multiploidy). Svokölluð jaðaræxli (borderline tumors) í eggjastokkum eru yfirleitt tvílitna og hafa góðar horfur (24), en ef æxli af þessari gerð eru mislitna er mælt með því að þau séu meðhöndluð með krabbameinslyfjum. Rétt er að geta þess að ekki er hægt að útiloka að æxli af þessari gerð sem er tvílitna geti myndað meinvörp (25). Nefna má að nú er verið að framkvæma afturvirka íslenska rannsókn á eggjastokkkrabbameinum.

Legbolskrabbamein. Líflíkur sjúklinga með legbolskrabbamein eru almennt betri hjá þeim sem hafa tvílitna æxli en þeim sem hafa mislitna æxli og er ákveðin fylgni milli mislitna DNA og vefjafræðilegrar gráðu (26). Í stórrí rannsókn sem tók til 256 sjúklinga með legbolskrabbamein, var sýnt fram á að DNA innihald gaf meiri upplýsingar um horfur en dýpt íferðar í legbolsegginn og vefjafræðileg gráða (27), og var um sjálfstæðan áhættuhóp að ræða.

Húðkrabbamein. Í sortuæxlum (melanoma malignum) er fylgni milli horfa og endurkomu æxlis annars vegar og DNA innihalds hins vegar. Rannsóknir hafa sýnt að ef æxlunum er skipt í þrjú flokka eftir Breslow þykkt, sem gefur upplýsingar um horfur, er með DNA flæðigreiningu hægt að fá enn nánari upplýsingar um tíðni endurkomu innan hvers flokks eftir því hvort æxlin eru mislitna eða tvílitna (28).

Ristil- og endaparmskrabbamein. Í rannsókn sem tók til 77 sjúklinga með ristil- og endaparmskrabbamein hafði DNA innihald æxlanna mesta þýðingu við að segja til um endurkomu æxlis eða dauða, og virtist þannig hafa meiri þýðingu en stig æxlis við greiningu (29). Í annarri rannsókn var sýnt fram á 19% fimm ára líflíkur hjá sjúklingum með mislitna æxli en 43% líflíkur hjá sjúklingum með tvílitna æxli (30). Í þessari rannsókn skipti DNA innihald meira máli en stígun og vefjafræðileg gráða. Aðrar rannsóknir hafa hins vegar ekki getað staðfest þessar niðurstöður (31,32) og er því staða DNA flæðigreiningar í ristilkrabbameinum fremur óljós. Nýlega birtist íslensk rannsókn um DNA flæðigreiningu í botnlanga-krabbameinum sem sýndi ekki fram á marktæka fylgni milli DNA innihalds og klínískrar hegðunar æxlanna (33). Í tengslum við ristilkrabbamein má nefna að nýlega hefur birst

rannsókn þar sem fylgst var reglulega með sjúklingum með sáraristilbólgu (colitis ulcerosa) með DNA flæðigreiningu (34). Niðurstöður þeirrar rannsóknar benda til þess að mislitna DNA geti komið fram áður en hægt er að bera kennsl á forstigsbreytingar krabbameins í vefjasneiðum, og gæti því flæðigreining komið að gagni við eftirlit sjúklinga með þennan sjúkdóm.

Skjaldkirtilskrabbamein. Gildi S-fasa mælinga í skjaldkirtilskrabbameinum hefur ekki verið ljóst enda hafa rannsóknir á þessum æxlum gefið mismunandi niðurstöður. Í nýrri íslenskri rannsókn þar sem skoðuð voru öll skjaldkirtilskrabbamein sem greindust hérlandis frá 1955 til 1990, en þau voru 424 talsins, var sýnt að enda þótt fylgni væri milli bæði DNA innihalds og S-fasa annars vegar og horfa hins vegar þá reyndust þessir þættir ekki hafa sjálfstætt forspárgildi þegar tekið var tillit til annarra hefðbundinna þátta (35).

Blöðrufylgja. Rétt þykir að nefna notkun DNA mælinga í tengslum við blöðrufylgju, þótt ekki sé um krabbamein að ræða. Vefjafræðileg greining er oft erfið og hlutlæg og kemur flæðigreining þá að verulegu gagni, þar sem ófullkomin blöðrufylgja (mola hydatidosa partialis) er yfirleitt þrílitna (triploid), en fullkomin blöðrufylgja er yfirleitt tvílitna og er auðvelt og fljótlegt að sýna fram á þetta með flæðirannsókn (36,37).

Rannsóknir á DNA flæðigreiningu í krabbameinum fara nú fram víða um heim og hafa rannsóknarstofur í ríkari mæli samstarf sín á milli. Íslendingar taka þátt í norrænum samstarfi á þessu sviði, þar sem leitast er við að samhæfa rannsóknaraðferðir og túlkun niðurstaðna (38). Þessi rannsóknaraðferð er notuð reglulega hérlandis við mat á horfum og ákvörðun meðferðar hjá sjúklingum með brjóstakrabbamein og krabbamein í kynfærum kvenna. Margar framvirkar rannsóknir eru í gangi á þessu sviði og má búast við því að þær skili mikilsverðum viðbótarupplýsingum.

HEIMILDIR

1. Merkel DE, Dressler LG, McGuire WL. Flow cytometry, cellular DNA content and prognosis in human malignancy. *J Clin Oncol* 1987; 5: 1690-1703.
2. Koss LG, Czerniak B, Herz F, Wersto RB. Flow cytometric measurements of DNA and other cell components in human tumors: a critical appraisal. *Hum Pathol* 1989; 20: 528-48.
3. Ross DW. Clinical usefulness of DNA ploidy and cell cycle studies. *Arch Path Lab Med* 1993; 117: 1077.

4. Sigfússon Á, Guðmundsdóttir Ó. Af flæðifrumusjám. Blað meinatækna 1991; 1: 3–11.
5. Headley 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* 1983; 31: 1333–5.
6. Erhard K, Auer G. Mammary carcinoma: comparison of DNA-content in the primary tumor and the corresponding axillary lymph node metastases. *Acta Path Microbiol Immunol, Scand Sect A* 1986; 95: 29–34.
7. Guðmundsdóttir G. Samanburður á DNA-innihaldi frumæxla og meinvarpa mældu með flæðigreini. 4. árs verkefni við læknadeild Háskóla Íslands, 1994.
8. Clark GM, Dressler LG, Owens MA, Pounds G, Oldaker T, McGuire WL. Prediction of relapse or survival in patients with node-negative breast cancer by DNA flow cytometry. *New Engl J Med* 1989; 320: 627–33.
9. Sigurðsson H, Baldetorp B, Borg Á, Dalberg M, Fernö M, Killander D, et al. Indicators of prognosis in node-negative breast cancer. *New Engl J Med* 1990; 322: 1045–53.
10. Witzig TE, Ingle JN, Cha SS, Schaid DJ, Tabery RL, Wold LE, et al. DNA ploidy and the percentage of cells in S-phase as prognostic factors for women with lymph node negative breast cancer. *Cancer* 1994; 74: 1752–61.
11. Coulson PB, Thornthwaite JT, Woolley TW, Sugarbaker EV, Seckinger D. Prognostic indicators including DNA histogram type, receptor content, and staging related to human breast cancer patient survival. *Cancer Research* 1984; 44: 4187–96.
12. Headley DW, Rugg CA, Gelber RD. Association of DNA index and S-phase fraction with prognosis of nodes positive early breast cancer. *Cancer Research* 1987; 47: 4729–35.
13. Kallioniemi O-P, Blanco G, Alavaikko M, Hietanen T, Mattila J, Lauslahti K, et al. Improving the prognostic value of DNA flow cytometry in breast cancer by combining DNA index and S-phase fraction. *Cancer* 1988; 62: 2183–90.
14. Guðlaugsdóttir S, Sigurðsson H, Agnarsson BA, Jónasson JG, Kristjánsdóttir S, Baldursson G, et al. DNA flæðigreining eykur nákvæmni við mat á horfum sjúklinga með brjóstakrabbamein. *Læknablaðið* 1996; 82: 138–47.
15. Headley DW, Clark GM, Cornelisse CJ, Killander D, Kute T, Merkel D. Consensus review of the clinical utility of DNA cytometry in carcinoma of the breast. *Cytometry* 1993; 14: 482–5.
16. Briffod M, Spyros F, Tubiana-Hulin M, Pallud C, Mayras C, Filleul A, et al. Sequential cytopunctures during preoperative chemotherapy for primary breast cancer. *Cancer* 1989; 63: 631–7.
17. Tribukait B, Gustafson H, Espositi P-L. The significance of ploidy and proliferation in the clinical and biological evaluation of bladder tumours: a study of 100 untreated cases. *Br J Urol* 1982; 54: 130–5.
18. Lopez-Beltran A, Croghan GA, Croghan I, Matilla A, Gaeta JF. Prognostic factors in bladder cancer. A pathologic, immunohistochemical, and DNA flow-cytometric study. *Am J Clin Pathol* 1994; 102: 109–14.
19. Klein FA, Herr HW, Sogani PC, Whitmore WF, Melamed MR. Detection and follow-up of carcinomas of the urinary bladder by flow cytometry. *Cancer* 1982; 50: 389–95.
20. Koss LG. The puzzle of prostatic carcinoma. *Mayo Clin Proc* 1988; 63: 193–7.
21. Winkler HZ, Rainwater LM, Myers RP, Farrow GM, Therneau TM, Zincke H, et al. Stage D1 prostatic adenocarcinoma: significance of nuclear DNA ploidy patterns studies by flow cytometry. *Mayo Clin Proc* 1988; 63: 103–12.
22. Lieber MM, Murtaugh PA, Farrow GM, Myers RP, Blute ML. DNA ploidy and surgically treated prostate cancer. Important independent association with prognosis for patients with prostate carcinoma treated by radical prostatectomy. *Cancer* 1995; 75: 1935–43.
23. Kallioniemi O-P, Punnonen R, Mattila J, Lehtinen M, Koivula T. Prognostic significance of DNA index, multiploidy and S-phase fraction in ovarian cancer. *Cancer* 1988; 61: 334–9.
24. Friedlander ML, Russell P, Taylor IW, Hedley DW, Tattersall MHN. Flow cytometric analysis of cellular DNA content as an adjunct to the diagnosis of ovarian tumours of borderline malignancy. *Pathology* 1984; 16: 301–6.
25. Tan LK, Flynn SD, Carcangiu ML. Ovarian serous borderline tumors with lymph node involvement. Clinicopathologic and DNA content study of seven cases and review of the literature. *Am J Surg Pathol* 1994; 18: 904–12.
26. Iversen OE. Flow cytometric deoxyribonucleic acid index: a prognostic factor in endometrial carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 155: 770–6.
27. Britton LC, Wilson TO, Gaffey TA, Cha SS, Samuel Wieand H, Podratz KC. DNA ploidy in endometrial carcinoma: a major objective factor. *Mayo Clin Proc* 1990; 65: 643.
28. Coon JS, Landay AL, Weinstein RS. Advances in flow cytometry for diagnostic pathology. *Lab Invest* 1987; 57: 453–79.
29. Kokal W, Sheibani K, Terz J, Harada JR. Tumor DNA content in the prognosis of colorectal carcinoma. *JAMA* 1986; 255: 3123–7.
30. Armitage NC, Robins RA, Evans DF, Turner DR, Baldwin RW, Hardcastle JD. The influence of tumor cell DNA abnormalities on survival in colorectal cancer. *Br J Surg* 1985; 72: 828–30.
31. Melamed MR, Enker WE, Banner P, Janov AJ, Kessler G, Darzynkiewicz Z. Flow cytometry of colorectal carcinoma with three-year follow-up. *Dis Colon Rectum* 1986; 29: 184–6.
32. Lanza G Jr, Maestri I, Ballotta MR, Dubini A, Cavazzini L. Relationship of nuclear DNA content to clinicopathologic features in colorectal cancer. *Mod Pathol* 1994; 7: 161–5.
33. Nielsen GP, Jónasson JG, Agnarsson BA, Ísaksson HJ. Flow cytometric DNA analysis of adenocarcinomas of the vermiform appendix. *APMIS* 1993; 101: 811–4.
34. Löfberg R, Broström O, Karlén P, Öst Å, Tribukait B. DNA aneuploidy in ulcerative colitis: reproducibility, topographic distribution and relation to dysplasia. *Gastroenterology* 1992; 102: 1149–54.
35. Jónasson JG, Hrafnkelsson J. Nuclear DNA analysis and prognosis in carcinoma of the thyroid gland. A nationwide study in Iceland on carcinomas diagnosed 1955–1990. *Virchows Archiv* 1994; 425: 349–55.
36. Jeffers MD, O'Dwyer P, Curran B, Leader M, Gillan JE. Partial hydatidiform mole: a common but underdiagnosed condition. A 3-year retrospective clinicopathological and DNA flow cytometric analysis. *Int J Gyn Pathol* 1993; 12: 315–22.
37. Lage JM, Popek EJ. The role of DNA flow cytometry in evaluation of partial and complete hydatidiform moles and hydropic abortions. *Sem Diagn Pathol* 1993; 10: 267–74.
38. Baldetorp B, Bendahl P-O, Fernö M, Alanen K, Delle U, Falkmer U, et al. Reproducibility in DNA flow cytometric analysis of breast cancer: comparison of 12 laboratories' results for 67 sample homogenates. *Cytometry* 1995; 22: 115–27.