

İNVAZİV DUKTAL MEME KANSERİNDE FLOW SİTOMETRİK PROLİFERASYON FAKTÖRLERİ: PROLİFERATİF İNDEKS BAĞIMSIZ PROGNOSTİK ÖNEME SAHİP

Uz. Dr. Nüvit DURAKER*, Uz. Dr. Elif PEŞTERELİ**, Uz. Dr. Hülya YAVUZ***, Uz. Dr. Deniz ÖZCAN***,
Bio. Mehmet KARADON***, Msc. Özden ÖZ CALAY****

ÖZET: İnvaziv duktal meme kanserli 62 hastada flow sitometrik proliferasyon faktörlerinin prognostik önemi araştırıldı. Bu faktörlerden sentez fazı oranı aneuploid tümörler için iki şekilde hesaplandı: Yalnızca aneuploid hücre topluluğunun sentez fazı (%S); diploid ve aneuploid tüm hücrelerin sentez fazı (toplam %S). Toplam %S ile postsentez ve mitoz fazlarının (G2M) toplamı proliferatif indeks olarak alındı. Tek değişkenli analizde aksilla lenf nodu durumu, nükleer greyt, mitoz sayısı ve ploidinin prognostik önemi yoktu. İki cm ve daha küçük tümörlerde ($p=0.035$); histolojik olarak iyi diferansiye tümörlerde ($p=0.036$); %S, toplam %S ve proliferatif indeksi düşük olgularda (sırasıyla $p=0.013$, $p=0.033$, $p=0.014$) hastalıksız sağkalım anlamlı olarak daha iyi idi. Çok değişkenli Cox Regresyon Testi uygulandığında tümör büyüklüğü ($p=0.045$) ve proliferatif indeksin ($p=0.041$) bağımsız prognostik faktör olduğu belirlendi. Sonuç olarak, memenin invaziv duktal kanserinde hücre sikluslu proliferasyon fazlarının tümünü kapsayan flow sitometrik proliferatif indeks bağımsız prognostik öneme sahiptir.

ANAHTAR KELİMELE: Meme karsinomu, flow sitometri, sentez fazı, G2M

SUMMARY: FLOW CYTOMETRIC PROLIFERATION FACTORS IN INVASIVE DUCTAL BREAST CANCER: PROLIFERATIVE INDEX HAS AN INDEPENDENT PROGNOSTIC IMPORTANCE: The prognostic importance of flow cytometric proliferation factors was studied in 62 patients with invasive ductal breast cancer. Of these factors, the synthesis phase fraction was calculated by two different ways for aneuploid tumors: The synthesis phase of only aneuploid cell population (%S); synthesis phase of all diploid and aneuploid cells (total %S). The sum of total %S, and phases of post-synthesis and mitosis (G2M) were considered as proliferative index. In univariate analysis, axillary lymph node status, nuclear grade, mitosis counting and ploidy had no prognostic significance. In tumors 2 cm or less ($p=0.035$); in histologically well differentiated tumors ($p=0.036$); in cases with low %S, total %S and proliferative index (respectively $p=0.013$, $p=0.033$ and $p=0.014$), the disease-free survival was statistically significant. Tumor size ($p=0.045$) and proliferative index ($p=0.041$) were determined as independent prognostic factors by using Cox multivariate regression analysis. In conclusion, in the invasive ductal breast cancer, flow cytometric proliferative index, which includes all the proliferation phases of the cell cycle, has an independent prognostic significance.

KEY WORDS: Breast carcinoma, flow cytometry, synthesis phase, G2M.

GİRİŞ

Meme kanserinde flow sitometrik sentez fazı fraksiyonu prognostik değeri olduğuna ilişkin uzlaşma sağlanmakla birlikte (1) bazı yazarlarca bağımsız prognostik önemi olmadığı da belirtilmektedir (2,3,4,5). Çalışmaların çoğunda aneuploid tümörler için yalnızca aneuploid hücre topluluğunun sentez fazı oranı alınmaktadır. Bazı araştırmacılar ise (3,6) aneuploid tümörlerde diploid ve aneuploid hücre topluluklarının sentez fazlarının birlikte hesaplanmasıyla elde edilen toplam sentez fazı fraksiyonunun da prognostik öneme sahip olduğunu belirtmektedirler. Yine bu yazarlar toplam sentez fazı fraksiyonuna, hücre siklusunun postsentez ve mitoz fazları oranının eklenmesiyle elde edilen proliferatif indeksin hücre siklusunun tüm proliferasyon fazlarını kapsadığını ve bunun prognozu kestirmede önemli olduğunu vurgulamaktadırlar.

Çalışmamızda invaziv duktal meme kanserli hastalarda flow sitometrik proliferasyon faktörlerinin (sentez fazı fraksiyonu ve proliferatif indeks) prognostik önemi araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hastalar

1987-1990 yılları arasında primer meme kanseri nedeniyle ameliyat olan 84 hastanın parafin bloklarından flow sitometrik DNA analizi yapıldı. Bunlardan histolojik tanısı invaziv duktal karsinom olan (özel tipler hariç) ve sentez ve G2M fazları ölçümü yapılabilen 62'si değerlendirilmeye alındı (yaş ortalaması 51,4 yıl, dağılımı 26-79 yıl). 50 hastaya modifiye radikal mastektomi; sekizine radikal mastektomi; birer hastaya da kadranektomi ve aksilla diseksiyonu; lampektomi ve aksilla diseksiyonu; basit mastektomi; lampektomi yapıldı. Hastaların ameliyat sonrası tedavi ve izlemleri SSK Okmeydanı Eğitim Hastanesi Onkoloji Kliniğinde yapıldı. Klinikopatolojik özelliklerine göre tüm hastalara radyoterapi, sistemik kemoterapi ve tamoksifen tek tek ya da kombinasyonlar şeklinde uygulandı. Hastalar ilk yıl üç ay, ikinci yıl dört ay daha sonra altı ay aralarla kontrol edildiler. Kontrollerde fizik muayene, rutin biyokimyasal ve radyolojik incelemelerle ek olarak gerektiğinde değişik tanısal görüntüleme yöntemleri kullanıldı.

Hastalıksız sağkalım ameliyat tarihinden çalışmanın sonlandırıldığı Eylül 1996'ya kadar geçen süre; ilk lokal nüks ya da uzak metastazın saptandığı ya da ikinci bir primer kanserin belirlendiği tarihe kadar geçen süre olarak alındı. 28 olguda hastalık nüksetti. Nüks gelişmeyen hastalarda ortalama izlem süresi 74 aydı.

* SSK Okmeydanı Eğitim Hastanesi 3. Cerrahi Kliniği

** Pakize İ. Tarzi Laboratuvarı

*** SSK Okmeydanı Eğitim Hastanesi Patoloji Kliniği

**** Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyoistatistik Bilim Dalı

Teşekkür: Flow sitometri analizlerinin yapılmasındaki katkılarından ötürü Pakize İ. Tarzi Laboratuvarı yöneticilerine teşekkür ederiz.

TABLO 1. DİPLOİD VE ANÖPLOİD TUMÖRLERDE FLOW SİTOMETRİK PROLİFERASYON FAKTÖRLERİNİN ORTALAMA DÜZEYLERİ

Faktör	Diploid ort.% (±ss)	Anöplöid Ort.% (±ss)	P
%S	14.3 (±9.8)	15.1 (±9.6)	0.737
Toplam	14.3 (±9.8)	20.2 (±15.3)	0.088
Proliferatif indeks	15.8 (±9.8)	25.8 (±18.3)	0.014

%S: Anöplöid tümörlerde anöplöid hücrelerin sentez fazı oranı

Toplam %S: Anöplöid tümörlerde diploid ve anöplöid tüm hücrelerin sentez fazı oranı

Proliferatif indeks: Toplam %S + G2M fazı

Tümör büyüklüğü 12 olguda klinik, 50 olguda patolojik incelemeyle belirlendi. Aksilla diseksiyonu yapılmayan iki olgu dışında lenf nodu durumu histolojik olarak saptandı. Parafin bloklardan 5m kalınlığında yayılan kesitler hematoksil-eo-zin ile boyandıktan sonra incelendi. Histolojik greyt Bloom-Richardson (7), nükleer greyt Black kriterlerine göre (8) belirlendi. mitoz sayısı Elston ve Ellis'in tanımladığı şekilde (9) tümörün perferinde, mitozun en yoğun olduğu yerlerde 400x büyütmede 10 farklı alanda yapıldı.

TABLO 2. PLOİDİ İLE PATOLOJİK VE FLOW SİTOMETRİK PROLİFERASYON FAKTÖRLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİ

Faktör	Toplam olgu	Anöplöid Olgu (%)	P
Tümör büyüklüğü			
≤2 cm	13	9 (69.2)	0.612
> 2 cm	49	27 (55.1)	
Aksilla			
Negatif	17	6 (35.3)	0.035
Pozitif	43	28 (65.1)	
Histolojik greyt			
I	8	4 (50)	0.548
II+III	54	32 (59.2)	
Nükleer greyt			
I	9	6 (66.6)	0.571
II+III	53	30 (56.6)	
Mitoz sayısı			
Düşük	33	18 (54.5)	0.507
Yüksek	29	18 (62.1)	
%S			
Düşük	31	14 (45.1)	0.081
Yüksek	31	22 (70.9)	
Toplam %S			
Düşük	39	22 (56.4)	0.731
Yüksek	23	14 (60.8)	
Proliferatif indeks			
Düşük	36	20 (55.5)	0.756
Yüksek	26	16 (61.5)	

%S: Anöplöid tümörlerde anöplöid hücrelerin sentez fazı oranı

Toplam %S: Anöplöid tümörlerde diploid ve anöplöid tüm hücrelerin sentez fazı oranı

Proliferatif indeks: Toplam %S + G2M fazı

TABLO 3. TOPLAM %S İLE PATOLOJİK VE FLOW SİTOMETRİK FAKTÖRLER ARASINDAKİ İLİŞKİ

Faktör	Toplam olgu	Anöplöid Olgu (%)	P
Tümör büyüklüğü			
≤2 cm	13	4 (30.8)	0.595
> 2 cm	49	19 (38.8)	
Aksilla			
Negatif	17	6 (35.3)	0.976
Pozitif	43	15 (34.9)	
Histolojik greyt			
I	8	1 (12.5)	0.122
II+III	54	22 (40.7)	
Nükleer greyt			
I	9	5 (55.5)	0.215
II+III	53	18 (33.9)	
Mitoz sayısı			
Düşük	33	11 (33.3)	0.512
Yüksek	29	12 (41.8)	
%S			
Düşük	31	8 (25.8)	0.065
Yüksek	31	15 (48.4)	
Proliferatif indeks			
Düşük	36	0 (0)	0.000
Yüksek	26	23 (88.4)	

%S: Anöplöid tümörlerde anöplöid hücrelerin sentez fazı oranı

Toplam %S: Anöplöid tümörlerde diploid ve anöplöid tüm hücrelerin sentez fazı oranı

Proliferatif indeks: Toplam %S + G2M fazı

Flow Sitometrik İnceleme

Daha önceki çalışmamızda ayrıntısıyla anlattığımız gibi (10) bloklardan alınan 50 m kalınlığındaki iki kesit deparafinize ve rehidrate edildi. Modifiye Hedley yöntemi ile (11) mekanik ve kimyasal yolla parçalanarak tek hücre süspansiyonu sağlandı. Süspansiyonlar DNA-PREH'de RNase ile işleme sokulup propidyum iyodid ile boyandı. DNA analizleri, DNA miktarını grafik olarak (histogram) gösteren Epics Profile II Flow Cytometer (Coulter, Hialeah, FL) ile yapıldı. En az 5000 hücre bulunan olguların histogramları Multicycle software (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA) ile incelendi. Tek bir piki olan histogramlar diploid kabul edildi. Birden fazla belirgin pik varlığında ilk pik diploid, diğeri anöplöid olarak alındı. İncelenen tümör hücrelerinin %10'undan fazlası belirgin ikinci pikte görüldüğünde anöplöid hücre topluluğu olarak değerlendirildi.

Sentez fazı ve postsentez + mitoz (G2M) fazındaki hücrelerin yüzde oranı, GO/G1 pikinin varyasyon katsayısının %10'dan düşük olduğu histogramlarda Gaussian yöntemi ile hesaplandı. Anöplöid tümörlerde sentez fazı oranı; yalnızca anöplöid hücrelerin sentez fazı (%S) ve diploid ve anöplöid tüm hücrelerin toplam sentez fazı (toplam %S) olarak iki ayrı şekilde hesaplandı. Toplam %S + G2M proliferatif indeks olarak alındı. Diploid ve anöplöid grupların sentez fazları ve proliferatif indeks ortalamaları ayrı ayrı hesaplanarak bu ortalamaların üzerindeki değerler yüksek, altındakiler düşük olarak değerlendirildi.

TABLO 4. TEK DEĞİŞKENLİ ANALİZDE PROGNOSTİK FAKTÖRLERİN HASTALIKSIZ SAĞKALIMLA İLİŞKİLERİ

Faktör	Toplam olgu	Nüks Olgu	Ort. HSS (ay)	X2	P
Tümör büyüklüğü					
≤2 cm	13	2	90.8	4.41	0.035
> 2 cm	49	26	66.8		
Aksilla					
Negatif	17	5	89.1	2.93	0.087
Pozitif	43	22	64.2		
Histolojik greyt					
I	8	1	105	4.37	0.036
II+III	54	27	65.4		
Nükleer greyt					
I	9	5	64.7	0.25	0.617
II+III	53	23	74.7		
Mitoz sayısı					
Düşük	33	13	73.9	1.00	0.317
Yüksek	29	15	66.7		
%S					
Düşük	31	9	85.7	6.06	0.013
Yüksek	31	19	57.8		
Toplam %S					
Düşük	39	14	81.4	4.53	0.033
Yüksek	23	14	56.4		
Proliferatif indeks					
Düşük	36	12	83.6	6.01	0.014
Yüksek	26	16	55.8		
Ploidi					
Diploid	26	9	85.4	3.58	0.058
Anöplid	36	19	58.7		

%S: Anöplid tümörlerde anöplid hücrelerin sentez fazı oranı

Toplam %S: Anöplid tümörlerde diploid ve anöplid tüm hücrelerin sentez fazı oranı

Proliferatif indeks: Toplam %S + G2M fazı

HSS: Hastaliksiz sağkalım

(p=0.014) (Tablo 1). Ploidi ile patolojik faktörler ve flow sitometrik proliferasyon faktörleri arasındaki ilişki Tablo 2'de verilmektedir. Aksilla pozitif olgularda anöplid anlamlı olarak yüksek iken (p0.035), diğer faktörlerle ploidi arasında anlamlı bir ilişki yoktu. Toplam %S ile diğer faktörler arasındaki ilişki incelendiğinde (Tablo 3) yalnızca proliferatif indeks ile arasında korelasyon vardı (p=0.000). Ayrıca incelendiğinde mitoz sayısı ile %S ve proliferatif indeks arasında da anlamlı bir ilişki olmadığı görüldü.

Tek değişkenli analizde (Tablo 4) aksilla lenf nodu durumu, nükleer greyt, mitoz sayısı ve ploidinin prognostik değeri görülmezken; iki cm ve daha küçük tümörlerde (p=0.035); histolojik iyi diferansiyeli tümörlerde (p=0.036); %S, toplam %S ve proliferatif indeksi düşük olgularda (sırasıyla p=0.013, p=0.033 p=0.014) hastaliksiz sağkalım anlamlı olarak daha iyi idi.

Çok değişkenli Cox Regresyon Testi uygulandığında (Tablo 5) tümör büyüklüğü (p=0.045) ve proliferatif indeks

(p=0.041) bağımsız prognostik faktör olduğu belirlendi.

TARTIŞMA

Çalışmamızda proliferasyon faktörlerinden %S ve toplam %S ortalamaları diploid ve anöplid tümörler arasında anlamlı bir farklılık göstermiyordu. Proliferatif indeks ise anöplid tümörlerde anlamlı olarak yüksekti. Bazı çalışmalarda, toplam %S (3,6,12) ve proliferatif indeks (3,6) anöplid tümörlerde anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Çalışmamızda histolojik proliferasyon faktörü olan mitoz sayısının, ploidi ve flow sitometrik proliferasyon faktörleri ile arasında anlamlı bir ilişki görülmezken, prognostik değerinin de olmadığı anlaşıldı. Birçok çalışmada (12,13,14,15,16) anöplid ve yüksek sentez fazına sahip tümörlerde mitoz sayısı anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Mitoz sayısının bağımsız prognostik öneminin olduğunu vurgulayanlar (13,15,17) yanında, olmadığını belirtenler de (4,14,18) vardır. Mitoz sayısının bir prognostik proliferasyon faktörü olarak kullanımına itirazlar iki noktadadır (19): Birincisi fiksasyon öncesi etkenlere bağlı instabilite. İkincisi hazırlanan preparatın iyi kalitede olmamasına ve patoloğun morfoloji kriterlerini kullanımında gevşek davranmasına bağlı tekrarlanabilirliğinin yetersizliği. Ancak çok merkezli bir çalışmada (20),

İstatistiksel Değerlendirme

Değerlendirmeler SPSS bilgisayar programında yapıldı. Diploid ve anöplid grupların %S, toplam %S ve proliferatif indeks ortalama değerlerinin karşılaştırılmasında t-testi uygulandı. İncelenen faktörler ikili gruplara ayrıldı: Tümör büyüklüğü için iki cm ve altı ile iki cm'den büyük; aksilla lenf nodu durumu için negatif ve pozitif; histolojik ve nükleer greyt için greyt I (iyi diferansiyeli) ve greyt II+III (orta derecede + kötü diferansiyeli); mitoz sayısı için düşük (10'un altı) ve yüksek (10 ve üstü); ploidi için diploid ve anöplid; %S, toplam %S ve proliferatif indeks için düşük ve yüksek. Ploidi ve toplam %S ile diğer parametrelerin arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesinde X2-testi ve Fisher'in Kesin Olasılık Testi kullanıldı. Hastaliksiz sağkalım Kaplan-Meier yöntemiyle incelendi ve prognostik faktörlerin istatistiksel anlamlılıkları log-rank testi ile değerlendirildi. Faktörlerin bağımsız prognostik önemini belirlemek için çok değişkenli Cox regresyon Testi uygulandı. p<0.05 değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

SONUÇLAR

Diploid ve anöplid tümörlerin %S ve toplam %S ortalamaları arasında anlamlı bir fark yokken, proliferatif indeks ortalaması anöplid tümörlerde anlamlı olarak yüksek idi

**TABLO 5. ÇOK DEĞİŞKENLİ COX
REGRESYON ANALİZİNDE PROGNOSTİK
FAKTÖRLER**

Faktör	P
Proliferatif indeks	0.041
Tümör büyüklüğü	0.045
Histolojik greyt	0.052
Ploidi	0.074
Nükleer greyt	0.086
%S	0.151
Toplam %S	0.186
Aksilla	0.35
Mitoz sayısı	0.624

%S: Anöploid tümörlerde anöploid hücrelerin sentez fazı oranı
Toplam %S: Anöploid tümörlerde diploid ve anöploid tüm hücrelerin sentez fazı oranı
Proliferatif indeks: Toplam %S + G2M fazı

protokol kurallarına titizlikle uyulduğunda bu sorunların aşılacağı ve mitoz sayısının prognostik faktör olarak yaygın şekilde kullanılabileceği belirtilmektedir.

Anöploid tümörlerde yalnızca anöploid hücre topluluğunun değil tüm hücrelerin ortalama seentez fazının da prognostik öneme sahip olabileceği; bu toplam sentez fazı ile hücre siklusunun diğer proliferasyon fazları olan postsentez ve mitoz fazlarını birlikte kapsayan proliferatif indeksin tümörün proliferasyon kapasitesini daha iyi yansıtabileceği düşüncesiyle araştırmalar yapılmıştır.

Witzig ve ark (6) toplam %S'nin hastalıksız sağkalımda, proliferatif indeksin sağkalımda bağımsız prognostik faktör olduğunu, %S'nin ise bağımsız prognostik önemi olmadığını saptamışlardır.

Muss ve ark (3) toplam %S'nin prognostik değeri yokken proliferatif indeksin bağımsız prognostik önemi olduğunu ve hücre siklusu aktivitesini değerlendirmede daha yararlı olduğunu vurgulamışlardır.

Kallioniemi ve ark (21) ise tek değişkenli analizde en güçlüsü toplam %S olmak üzere G2M ve proliferatif indeksin prognostik değeri olduğunu, ancak çok değişkenli analizde toplam %S'nin etkisi giderildiğinde G2M ve proliferatif indeksin ek bir prognostik katkı sağlamadığını saptamışlardır.

Çalışmamızda da tek değişkenli analizde %S, toplam %S proliferatif indeksin düşük olduğu olgularda hastalıksız sağkalım anlamlı olarak iyi idi. Çok değişkenli analizde ise bu faktörlerden yalnızca proliferatif indeks bağımsız prognostik önemini korudu.

Sonuç olarak, memenin invaziv duktal kanserinde hücre siklusu proliferasyon fazlarının tümünü kapsayan flow sitometrik proliferatif indeks bağımsız prognostik öneme sahiptir.

KAYNAKLAR

- Hedley DW, Clark GM, Cornelisse CJ, et al. DNA Cytometry Consensus Conference: Consensus review of the clinical utility of DNA cytometry in carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat* 1993; 28: 55-59.
- Hedley DW, Rugg CA, Gelber RD. Association of DNA indeks and S-phase fraction with prognosis of nodes positive early breast cancer. *Cancer Res* 1987; 47: 4729-4735.
- Muss HB, Kute TE, Case LD, et al. The relation of flow cytometry to clinical and biologic characteristics in women with node negative primary breast cancer. *Cancer* 1989; 64: 184-190.
- Toikkanen S, Joensuu H, Klemi P. Nuclear DNA content as a prognostic factor in T1-2 No breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1990; 93: 471-479.
- Kute TE, Muss HB, Cooper MR, et al. The use of flow cytometry for the prognosis of stage II Adjuvant treated breast cancer patients. *Cancer* 1990; 66: 1810-1816.
- Witzig TE, Ingle JN, Cha SS, 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; 74:1752-1761.
- Bloom HJG, Richardson WW. Histologic grading and prognosis in breast cancer: a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 1957; 11:359-377.
- Black MM, Speer FD, Opler SR. Structural representations of tumor-host relationships in mammary carcinoma:biologic prognostic significance. *Am J Clin Pathol* 1956; 26: 250-265.
- Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; 19:403-410.
- Duraker N, Peştereli E, Çavuşoğlu S, et al. Primer meme kanserinde flow sitometrik anöploidi ve yüksek sentez fazı fraksiyonunun prognostik değeri. *Ulusal Cerrahi Dergisi* 1995; 11: 394-401.
- Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, et al. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem* 1983; 31: 1333-1335.
- Bergers E, van Diest PJ, Baak JPA. Cell cycle analysis of 932 flow cytometric DNA histograms of fresh frozen breast carcinoma material: correlations between flow cytometric, clinical, and pathologic variables. *Cancer* 1996; 77: 2258-2266.
- Uyterlinde AM, Schipper NW, Baak JPA, et al. Limited prognostic value of cellular DNA content to classical and morphometrical parameters in invasive ductal breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1988; 89: 301-307.
- Toikkanen S, Joensuu H, Klemi P. The prognostic significance of nuclear DNA content in invasive breast cancer: a study with long-term follow-up. *Br J Cancer* 1989; 60: 693-700.
- Joensuu H, Toikkanen S, Klemi PJ. DNA index and S-phase fraction and their combination as prognostic factors in operable ductal breast carcinoma. *Cancer* 1990; 66:331-340.
- Bosari S, Lee AKC, Tahan SR, et al. DNA flow cytometric analysis and prognosis of axillary lymph node-negative breast carcinoma. *Cancer* 1992; 70: 1943-1950.
- Baak JPA, Dop HV, Kurver PHJ, Herman J. The value of morphometry to classic prognosticators in breast cancer. *Cancer* 1985; 56:374-382.
- Merkel DE, Winchester DJ, Goldschmidt RA, et al. DNA flow cytometry and pathologic grading as prognostic guides in axillary lymph node-negative breast cancer. *Cancer* 1993; 72: 1926-1932.
- Baak JPA. mitosis counting n tumors (editorial). *Hum Pathol* 1990; 21: 683-685.
- van Diest PJ, Baak JPA, Matze-Cok P, et al. Reproducibility of mitosis counting in 2,469 breast cancer specimens:results from the multicenter morphometric mammary carcinoma proect. *Hum Pathol* 1992; 23:603-607.
- Kallioniemi O-P, Blanco G, Alavaikko M, et al. Improving the prognostic value of DNA flow cytometry in breast cancer by combining DNA index and S-phase fraction: a proposed classification og DNA histograms in breast cancer. *Cancer* 1988; 62:2183-2190.