

Margareta Strojan Fležar¹, Marija Us-Krašovec²

Slikovna citometrija v onkologiji

Image Cytometry in Oncology

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: novotvorbe – patologija, slikovna citometrija, DNA-ploidija

Slikovna citometrija je statična kvantitativna analitična metoda, ki omogoča merjenje številnih lastnosti celic na objektu stekelcu. S slikovnim citometrom lahko podrobno analiziramo količino DNA ter strukturo in razporeditev jedrnega kromatina v posamični celici, bodisi rakavi ali normalni, oziroma v celici, ki pripada neki vmesni stopnji med neoplastično preobrazbo. Za optimalno analizo s slikovnim citometrom potrebujemo celične vzorce, v katerih so celice nanešene v enem sloju in med seboj dovolj razmaknjene. Preparat barvamo po Feulgnovi metodi, ki omogoča stehiometrično barvanje DNA v jedru. Na podlagi jedrnih slik, ki jih posnamo s slikovnim citometrom (optično elektronsko računalniški sistem) na celičnem preparatu, izračunamo številne jedrne značilnosti. Nove slikovnocitometrične značilnosti rakavih celic omogočajo dodatno opredelitev klasičnih kliničnih in histopatoloških dejavnikov poteka bolezni in odziva na zdravljenje. Predvsem pa upamo, da nam bo slikovnocitometrična analiza subtilnih sprememb kromatina na normalnih celicah omogočila odkrivati raka pri bolnikih, ki še ne kažejo kliničnih znakov bolezni.

ABSTRACT

KEY WORDS: neoplasms – pathology, image cytometry, DNA-ploidy

Image cytometry is a static, quantitative analytical method used for objective measurement of numerous cell characteristics on glass slides. Specifically, it makes it possible to measure the DNA content and the nuclear texture features of single cells, either cancerous or normal, or of single cells belonging to an undefined stage of neoplastic transformation. Monolayered single cell slides are required for optimal analysis using an image cytometer. Cell preparations are stained according to the Feulgen method for stoichiometric staining of DNA in the cell nucleus. An image cytometer is an optical electronic system equipped with high-powered computers. Numerous nuclear texture features are calculated from nuclear images, which are acquired via image cytometer. New image cytometric features of malignant cells could be used as additional prognostic factors, with standard clinical and histopathologic factors that are commonly used to predict the course of the disease and the patient's response to treatment. Above all, we are hoping that image cytometric analysis of subvisual changes of chromatin in normal cells will provide new tests for cancer detection at preclinical stages.

¹ Asist. dr. Margareta Strojan Fležar, dr. med., Onkološki Inštitut, Zaloška 2, 1000 Ljubljana.

² Prof. dr. Marija Us-Krašovec, dr. med., Onkološki Inštitut, Zaloška 2, 1000 Ljubljana.

Rak vznikne, ko se celica osvobodi običajnih mehanizmov, ki nadzorujejo njeno delitev, rast, delovanje in smrt. Boljše poznavanje in razumevanje bioloških sprememb v rakavih celicah je pogoj za napredek pri zdravljenju raka in posledično za zniževanje umrljivosti. Prav gotovo pa boljše razumevanje biologije raka prispeva tudi k odkrivanju ugodnih rakavih sprememb, pri katerih je možnost ozdravitve največja.

Biološki potek maligne bolezni, ki narekuje načrtovanje zdravljenja, skušamo opredeliti z napovednimi dejavniki. Klasični klinično-patološki napovedni dejavniki so zajeti v TNM*-klasifikaciji, dopolnjuje pa jih histološki tip in specifične lastnosti neoplazme (1). Klinična praksa je pokazala, da imajo maligni tumorji enakega TNM in histološkega tipa lahko zelo različen biološki potencial (opredeljen s hitrostjo rasti tumorja, s sposobnostjo vraščanja v okolno tkivo in uničevanjem le tega, s sposobnostjo in hitrostjo metastaziranja) in niso enako občutljivi na specifično zdravljenje. Z razvojem novih tehnologij smo dobili možnost, da analiziramo različne komponente neoplastične celice in s tem odkrijemo nove napovedne označevalce poteka bolezni in odziva na zdravljenje.

Ena izmed novejših tehnologij je slikovna citometrija (angl. *image cytometry*), ki je statična kvantitativna analitična metoda, ki omogoča merjenje lastnosti celic (predvsem jeder) na objektnem stekelcu (2, 3). S slikovnim citometrom lahko podrobno analiziramo celice, bodisi rakave ali normalne, ali pa celice vmesnih stopenj med neoplastično preobrazbo.

S slikovnim citometrom izmerimo količino DNA v preiskovanem vzorcu, ki odraža celoten genetski material v preiskovani celični populaciji. Prepoznavanje majhnih aneuploidnih klonov in redkih celic z veliko količino DNA (>5c** količino DNA) je prednost analize DNA-ploidije s sodobnim slikovnim citometrom pred pretočnicocitometričnimi meritvami količine DNA (2).

Slikovni citometer omogoča objektivno in podrobno analizo strukture in razporeditve jedrnega kromatina, ki je odraz genetskega in funkcionalnega stanja v celici. Različne elemente kromatina, ki jih izmerimo s slikovnim citometrom, smo poimenovali jedrne značilke (angl. *nuclear texture features*).

Slikovni citometri, ki imajo ustrezno programsko opremo, omogočajo tudi kvantifikacijo drugih celičnih komponent (receptorjev, genov idr.).

SLIKOVNI CITOMETER: ZGRADBA IN DELOVANJE

Slikovni citometer je optično elektronsko računalniški sistem, katerega delovanje povezuje in usklajuje programska oprema (4). Strojno opremo slikovnega citometra sestavljajo svetlobni mikroskop, izvor svetlobe, videokamera (CCD, angl. *charged coupled device*) ter računalnik z ustreznimi krmilniki. Programsko opremo sestavljajo operacijski sistem, programi za zajemanje podatkov, snemanje, procesiranje in urejanje slik, analizo slik ter programi za analizo podatkov.

Delovanje slikovnega citometra obsega več faz; prva faza je zajemanje slike. Osnovni pogoj za dobro sliko je pravilna in natančna nastavitev mikroskopa. Videokamera posname sliko celice oz. jedra v preparatu v svetlobnem mikroskopu. Videokamera je sestavljena iz številnih senzorjev, ki zaznavajo jakost vpadne svetlobe, ki prehaja od izvora svetlobe preko celic oz. jeder do kamere; jakost svetlobe se v kameri pretvori v električni signal. Površina celične ali jedrne slike, ki jo pokrije en senzor, se imenuje slikovni element ali piksel (iz angl. *picture element, pixel*). Iz velikosti piksla lahko sklepamo, kakšna je prostorska ločljivost kamere, oziroma kako blizu sta dva objekta, da ju še ločimo med seboj. Pomembna je tudi fotometrična ločljivost, ki pove, koliko različnih nivojev sivine zazna sistem.

* T (angl. *tumor*): velikost tumorja

N (angl. *node*): prizadetost regionalnih bezgavk

M (angl. *metastasis*): prisotnost ali odsotnost oddaljenih metastaz

** 1c je enota za količino DNA, ki ustreza polovici povprečne jedrne količine DNA v normalni (nespremenjeni) diploidni populaciji v fazi G0G1 celičnega ciklusa.

Sledi digitalizacija slike, pri kateri se analogni električni signal, ki ga sproži jakost vpadne svetlobe, pretvori v zaporedje števil (analogno-digitalni pretvornik), ki so primerne za računalniško obdelavo. Nato sledi računalniška obdelava slike. Poteka po posebnih algoritmihi, ki omogočajo segmentacijo slike (npr. prepoznavanje jedrne meje), vključno z avtomatičnim fokusiranjem mikroskopske slike. Končna faza je povzemanje merljivih značilnosti celic oz. jeder (izraženo v številkah), predvsem količine DNA in jedrnih značilk, kar omogoča končno analizo vzorca in razvrščanje objektov (posamičnih celic ali jeder ali pa preiskovanega vzorca kot celote).

VRSTE CELIČNIH VZORCEV IN NJIHOVA PRIPRAVA ZA ANALIZO S SLIKOVNIM CITOMETROM

Analiza celic s slikovnim citometrom zahteva posebno pripravo vzorcev. Optimalne rezultate dobimo, če so celice nanešene na objektno stekelce v enem sloju in so med seboj dovolj razmaknjene. Analiziramo vzorce iz svežega in arhiviranega tkiva, iz katerih pripravimo razmaze, ali pa suspenzije posamičnih celic, ki jih s filtriranjem ali sedimentiranjem nanesemo na stekelce.

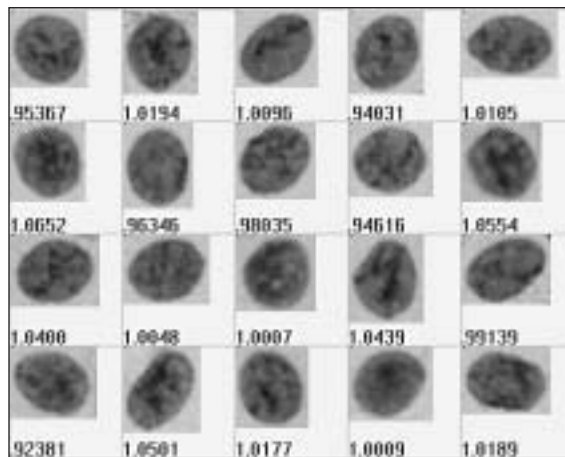
Vzorci svežega tkiva so spontano odlučene celice, vzorci aspiracijske biopsije s tanko iglo in odtisi reznih ploskev kirurških biopsij. Sveže celične vzorce moramo fiksirati, bodisi s sušenjem na zraku ali pa v alkohol-

nih fiksativih. Arhivski material so vse vrste arhiviranih citoloških preparatov in tkivne rezine, vklopljene v parafin. Arhivirane citološke preparate moramo pred nadaljevanjem priprave razbarvati. Iz tkivnih rezin napravimo suspenzije posamičnih celic po ustaljenem protokolu in jih nanesemo na stekelce (5).

Celične preparate barvamo po modificirani metodi po Feulgnu s tioninom, ki stehiometrično obarva DNA, kar pomeni, da se barvilo veže na vsa možna vezavna mesta in tako obarva celotno količino DNA v jedru. Celične preparate najprej ponovno fiksiramo v Böhm-Sprengerjevem fiksativu. Sledi hidroliza DNA v HCl, ki je ključna stopnja stehiometričnega barvanja DNA po Feulgnovi metodi, saj na DNA odpira vezavna mesta za barvilo. Proces hidrolize je odvisen od vrste tkiva, načina fiksacije, temperature, pri kateri poteka hidroliza, ter koncentracije HCl (6, 7). Ugotovili so, da je najučinkovitejša hidroliza v 5 N HCl pri sobni temperaturi (22°C). Optimalen čas hidrolize moramo ugotoviti za vsako vrsto tkiva in način fiksacije (8–10). Nato preparate barvamo v barvilo, ki vsebuje tionin.

ANALIZA REZULTATOV IN NJIHOV POMEN V ONKOLOGIJI

S slikovnim citometrom zajamemo poljubno število jedrnih slik, ki so v točnem fokusu in natančno segmentirane od okolice (slika 1). Jedrne slike so osnova za izračun DNA-ploidije in dijete in jedrnih značilk.



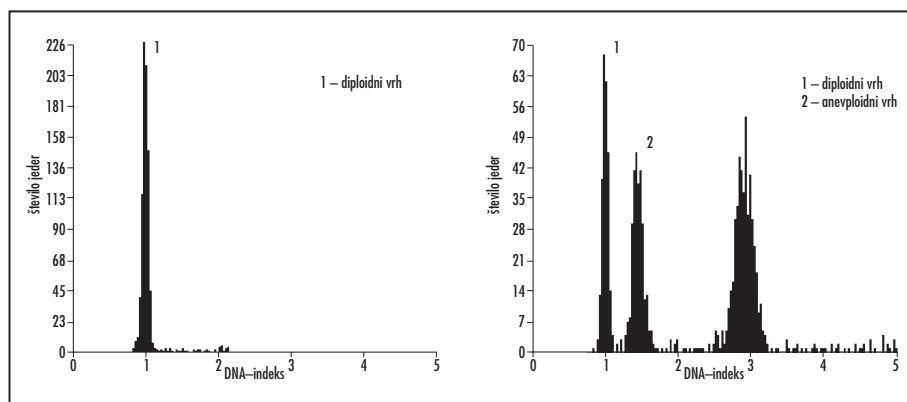
Slika 1. Galerija jedrnih slik (celice bukalne sluznice), ki so osnova za izračun DNA-ploidije in jedrnih značilk (števila pod sliko jedra je njegov DNA-indeks).

Slikovnocitometrična DNA-ploidija

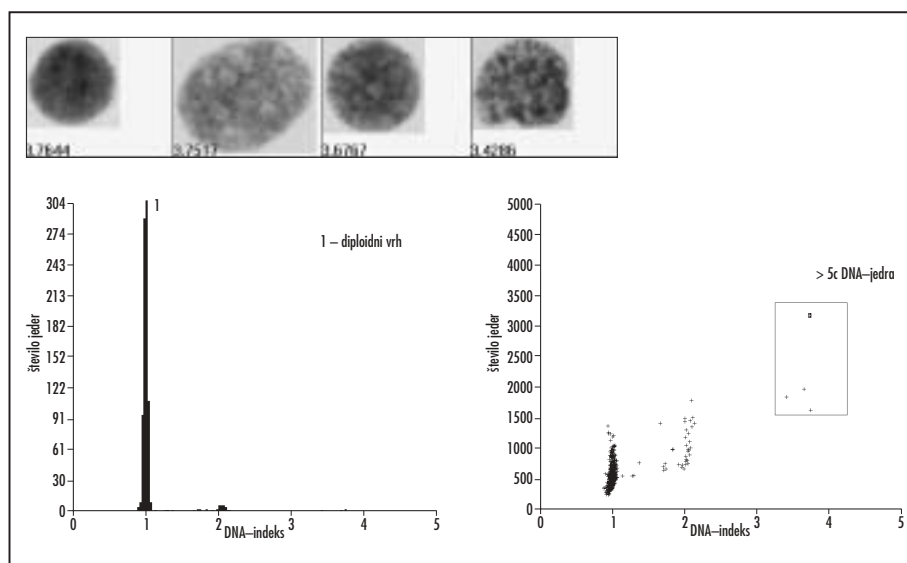
Z razvojem citometrije so se v literaturi pojavile številne študije o količini DNA in o celičnem ciklusu, predvsem o njegovi fazi S, pri različnih tumorjih. DNA-ploidija odraža celotno genetsko vsebino tumorske populacije. V tumorju ugotovljena aneuploidija kaže na genetsko nestabilnost tumorja (slika 2). Delež celic v fazi S celičnega ciklusa pa odraža proliferacijsko aktivnost tumorja.

Iz obsežne literature na področju DNA-ploidije lahko povzamemo, da so pri mnogih tumorjih ugotavljali, da imata DNA-ploidija ali DNA-indeks pomemben pomen za napovedovanje poteka bolezni (11, 12). Vse raziskave DNA-ploidije pa tega ne potrjujejo. Eden izmed možnih vzrokov nasprotujočih si izsledkov je uporaba različnih metod za analizo DNA-ploidije.

DNA-ploidijo lahko analiziramo s pretočnim ali slikovnim citometrom. Slikovna



Slika 2. DNA histograma diploidnega (levo) in aneuploidnega (multiploidnega) tumorja (desno), analiziranih s slikovnim citometrom.



Slika 3. DNA stolpičasti histogram (levo) in razsevni histogram (desno) diploidnega mejno malignega seroznega tumorja jajčnika, ki vsebuje tudi celice z veliko količino DNA (> 5c DNA). Jedrne slike teh celic s pripadajočimi vrednostmi DNA-indeksa so prikazane na galeriji.

citometrija se je razvila prej, vendar je bila analiza celic s prvimi, enostavnimi, slikovnimi citometri zamudna. Analiza preiskovanega vzorca je bila zato omejena na manjše število celic (100–200 celic na slikovnem citometru v primerjavi z > 10.000 celicami v pretočnem citometru). Čeprav se je slikovna citometrija razvila prej, so jo kasneje pri študiju DNA-ploidije zanemarjali prav zaradi njene počasnosti pri merjenju v primerjavi s pretočno citometrijo.

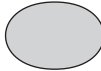
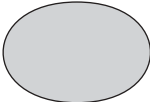
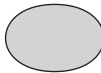
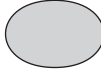
S pretočnim citometrom analiziramo veliko število celic v kratkem času, vendar pa nimamo morfološke kontrole nad preiskovanimi celicami. V množici signalov (> 10.000) izgubimo klone maloštevilnih aneuploidnih celic, ki morda pomembno prispevajo k biološkemu potencialu preiskovanega tumorja. Prav prepoznavanje majhnih aneuploidnih klonov in redkih celic z veliko količino DNA, tj. > 5c količino DNA, je prednost analize DNA-ploidije s sodobnim slikovnim citometrom (2) (slika 3). Slikovni citometer omogoča vidni nadzor nad celicami, zato lahko ločimo ohranjene celice z veliko količino DNA od artefaktov ali skupkov celic v višjih ploidnih območjih, kar pri pretočnocitometričnih meritvah ni možno. Sodobni slikovni citome-

tri so zaradi zmogljivejših računalnikov tudi hitrejši in omogočajo analizo več tisoč celic v kratkem času. Zato analiza DNA-ploidije s sodobnimi slikovnimi citometri spet postaja zanimiva za raziskovalce in klinike.

Jedrne značilke, izmerjene s slikovnim citometrom

Sodobni slikovni citometer lahko iz jedrnih slik avtomatsko izračuna poleg DNA-ploidije še številne jedrne značilke, ki omogočajo natančno analizo preiskovanega celičnega vzorca (slika 4) (13).

Dvodimenzionalna slika kromatinskega vzorca, ki jo dobimo pri slikovnocitometrični analizi, je projekcija trodimenzionalne strukture in razporeditve kromatina, v kateri vsak interfazni kromosom verjetno zavzema natančno določeno področje v jedru, ki se ohranja med celičnim ciklusom (14–17). Predpostavljamo, da so zato izmerjene jedrne značilke nadomestni označevalec molekularnih dogajanj v jedru. Z njimi lahko objektivno ovrednotimo, kako in koliko se je celica med neoplastičnim procesom spremenila, ko primerjamo normalne oziroma benigne celice z atipičnimi ali displastičnimi, in končno, z morfološko jasno malignimi celicami (18, 19).

Jedrna značilka	Normalno jedro	Spremenjeno jedro (atipično ali tumorsko)
Morfometrične značilke: a) Velikost jedra		
b) Oblika jedra		
IOG: Količina DNA/kromatina		
Jedrne značilke: Struktura in razporeditev kromatina		

Slika 4. Shematski prikaz morfometričnih in strukturnih jedrnih značilk.

S slikovnim citometrom lahko analiziramo različne skupine značilk. Osnovne so morfometrične značilke, ki prikazujejo velikost in obliko jedra (velikost: površina, premer, variabilnost premera; oblika: sferičnost, ekscentričnost, jedrna os), in fotometrične značilke (integrirana optična gostota (IOG), ki je enaka celotni količini DNA; varianca intenzitete optične gostote; najvišja in najnižja intenziteta optične gostote). Obe skupini značilk lahko analiziramo tudi z običajnimi, enostavnimi, citometri. S slikovnim citometrom Cyto-Savant™, ki ga imamo na Onkološkem inštitutu, lahko analiziramo še pet skupin jedrnih značilk, ki prikazujejo strukturo in razporeditev kromatina v jedru. To so diskretne jedrne značilke (predstavljajo razdelitev jedra v področja z nizko, srednjo in visoko optično gostoto in razmerja med njimi), Markovske značilke (entropija, energija, kontrast, homogenost, korelacija), Nemarkovske strukturne značilke (opredeljujejo globalne ocene razlik v nivojih sivine v objektu), dolžinska razporeditev kromatina (angl. *run length features*) ter razgibanost površine jedra glede na razporeditev gostote kromatina v jedru (angl. *fractal texture features*) (13).

Izsledki začetnih raziskav na področju slikovnocitometričnih jedrnih značilk nakazujejo njihovo potencialno uporabnost na različnih področjih onkološke patologije.

Jedrne značilke kot objektivni pripomoček za oceno jedrne stopnje malignosti

Jedrna stopnja malignosti (gradus) je pomemben klasičen histopatološki napovedni dejavnik poteka bolezni pri večini neoplazem (20). Zadržek pri mikroskopski oceni jedrne stopnje malignosti ali diferenciacije tumorja je subjektivnost ocenjevanja in zato pri istem ocenjevalcu ali med različnimi ocenjevalci istega tumorja ni vedno ponovljiva. Jedrni gradus so objektivno analizirali s slikovnim citometrom pri karcinomu dojke, pri karcinomu mehurja in pri karcinomu debelega črevesa (21–23). Tudi v naši raziskavi seroznih karcinomov jajčnika smo ugotovili, da z jedrnimi značilkami lahko dobro opredelimo jedrno stopnjo malignosti (24).

Jedrne značilke kot potencialni napovedni dejavniki

Objavljene so le posamične študije slikovnocitometrične analize kromatinskega vzorca kot morebitnega novega napovednega dejavnika za potek bolezni (karcinom dojke, karcinom mehurja, karcinom prostate), zato dokončnih zaključkov o njihovem pomenu še ni (25–27). Začetna raziskava obeta, da bi jedrne značilke verjetno lahko uporabili za nove napovedne dejavnike tudi pri karcinomih jajčnika (24).

Jedrne značilke odražajo funkcionalno in genetsko stanje maligne celice

Haroske s sodelavci je poročal o povezavi jedrnih značilk s prisotnostjo hormonskih receptorjev in izražanjem gena p53 v tumorskem tkivu pri karcinomu dojke (28). Z jedrnimi značilkami lahko opredelimo tudi spremembe v jedru med celičnim ciklusom (29).

Jedrne značilke in MAC

Najbolj zanimiv izziv je uporaba jedrnih značilk za analizo MAC (angl. *malignancy associated changes*). MAC so opredelili kot subtilne, komaj vidne spremembe v strukturi kromatina v na videz zdravih celicah, ki se nahajajo blizu ali tudi daleč stran od maligne neoplazme (30). S svetlobnomikroskopsko preiskavo so MAC opredelili kot drobne okroglaste svetline – razredčitve – in polkrožne zgostitve v jedrnem kromatinu, vendar običajna svetlobnomikroskopska preiskava MAC zahteva izjemno natančnost in je zelo zamudna ter slabo ponovljiva. Zanesljivo in hitro analiziramo MAC s sodobnim slikovnim citometrom.

Kaj sproži nastanek MAC, še ni znano. Morda gre za sistemski učinek neoplazme, ki z izločanjem določenih substanc (npr. rastnih dejavnikov) vpliva na ostale, zdrave celice v telesu. MAC so morda lahko posledica sistemskega učinka karcinogena, ki ne sproži le nastanka tumorja, ampak povzroči subtilne spremembe na vseh celicah v organizmu. V 70. letih so objavili članke, v katerih so s svetlobno mikroskopsko preiskavo našli MAC na normalnih celicah bukalne sluznice, pljuč, materničnega vratu, krvnih celicah, kostnem mozgu idr., pri bolnikih z različnimi malignomi (30). MAC so že v istem obdobju

ju uspešno objektivno opredelili s takratnimi enostavnimi slikovnimi citometri. Ker je bila tovrstna analiza MAC zahtevna in zamudna, so raziskave sčasoma zamrle. Sodobni slikovni citometri z videokamerami z visoko prostorsko in svetlobno ločljivostjo in hitrimi procesorji omogočajo razmeroma hitro in enostavno analizo MAC, zato so MAC ponovno postale predmet raziskav. MAC so našli v displastičnih spremembah na brisih materničnega vratu, pa tudi v normalnem bronhialnem epiteliju, v normalnih celicah sputuma in v normalnih celicah ploščatega epitelija bukalne sluznice pri bolnikih s pljučnim rakom (19, 31–34). V kolikšni meri so MAC značilne za določeno vrsto malignoma, ali se pojavijo tudi pri nemalignih obolenjih, in v kakšni oddaljenosti od tumorja se pojavijo, ne vemo. Vsekakor je zelo obetavna misel o uporabi MAC za zgodnje odkrivanje različnih vrst raka, posebno tistih, ki so zaenkrat neprimerni za enostavno presejevanje.

Slikovnocitometrične analize na Onkološkem inštitutu

Laboratorij za slikovno citometrijo oddelka za citopatologijo na Onkološkem inštitutu je opremljen z najodobnejšim slikovnim citometrom Cyto-Savant™. V laboratoriju se ukvarjamo z metodološkimi problemi, ki

zajemajo optimizacijo priprave in barvanja vzorcev in optimizacijo slikovnocitometričnih meritev (9, 10). Z analizo vrednosti jedrnih značilk različnih karcinomov (dojka, grlo, jajčnik) in malignih tumorjev mehkih tkiv smo v dosedanjih raziskavah skušali opredeliti biološki potencial tumorjev (26, 35, 36). Ugotovili smo tudi, da so MAC izražene na bukalni sluznici bolnikov z rakom pljuč, zato bi bile MAC uporabne za odkrivanje malignih tumorjev, preden se pojavijo klinični znaki (37).

ZAKLJUČEK

Z novimi slikovnocitometričnimi lastnostmi rakavih celic dodatno objektivno opredelimo klasične histopatološke napovedne dejavnike, predvsem jedro stopnjo malignosti, ki je pomembna za načrtovanje zdravljenja. Nadaljnje raziskave bodo ugotovile, ali so slikovnocitometrične lastnosti morda uporabne kot novi neodvisni napovedni dejavniki teka bolezni pri bolnikih z rakom. Najbolj zanimiva je možnost, da s slikovnocitometrično analizo na videz zdravih celic ugotovimo subtilne spremembe kromatinskega vzorca pri bolnikih z rakom v predkliničnem stadiju. To pomeni, da tovrstna analiza ponuja možnost presejalnih testov za zgodnje odkrivanje raka pri na videz zdravih ljudeh.

LITERATURA

1. Sobin LH, Wittekind Ch. TNM classification of malignant tumours. International Union Against Cancer (UICC). 5th ed. New York: Wiley-Liss; 1997.
2. Böcking A, Striepecke E, Auer H, Fuzesi L. Static DNA cytometry. Biological background, technique and diagnostic interpretation. In: Wied GL, Bartels PH, Rosenthal D, Schenk U, eds. *Compendium on computerized cytology and histology laboratory*. Chicago: Tutorials of cytology; 1994. p. 107–28.
3. Wied GH, Bartels PH, Bibbo M, Dytch HE. Image analysis in quantitative cytopathology and histopathology. *Human Pathol* 1989; 20: 549–71.
4. Jaggi B, Poon S, Pontifex B, Fengler J, Palcic B. A quantitative microscope for image cytometry. *J SPIE* 1991; 1448: 89–97.
5. Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Rugg CA, Musgrove EA. Method of analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow-cytometry. *J Histochem Cytochem* 1983; 11: 1333–5.
6. Kjellstrand PTT. Mechanisms of the Feulgen acid hydrolysis. *J Microsc* 1980; 119: 391–6.
7. Kjellstrand PTT. Temperature and acid concentration in the search for optimum Feulgen hydrolysis conditions. *J Histochem Cytochem* 197; 25: 129–34.
8. Reith A, Daniels H. Assessment of DNA ploidy in tumor material. Preparation and measurement by image cytometry. In: Weid GL, Bartels PH, Rosenthal D, Schenk U, ed. *Compendium on the computerized cytology and histology laboratory*. Chicago: Tutorials of cytology; 1994. p. 185–93.
9. Fležar M, Douudine A, Us – Krašovec M. The effect of primary fixation with standard postfixation and the duration of hydrolysis on nuclear features in image cytometry. *Anal Cell Pathol* 1998; 17: 131–44.

10. Fležar M, Us – Krašovec M, Žganec M, Lavrenčak J, Golouh R. Hydrolysis profiles of formalin fixed paraffin-embedded tumors based on nuclear texture feature measurements. *Anal Cell Pathol* 1999; 19: 111–8.
11. Merkel DE, McGuire WL. Ploidy, proliferative activity and prognosis. DNA flow cytometry of solid tumors. *Cancer* 1990; 65: 1194–205.
12. Shankey TV, Rabinovitch PS, Bagwell B, Bauer KD, Duque RE, Hedley DW et al. Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry. *Cytometry* 1993; 14: 472–7.
13. Doudkine A, MacAuly C, Poulin N, Palcic B. Nuclear texture measurements in image cytometry. *Pathologica* 1995; 87: 286–99.
14. Nicolini C. Chromatin structure: From nuclei to genes. *Anticancer Res* 1983; 3: 63–86.
15. Eils R, Dietzel S, Bertin E, et al. Three-dimensional reconstruction of painted human interphase chromosomes: active and inactive X chromosome territories have similar volumes but differ in shape and surface structure. *J Cell Biol* 1996; 135: 1427–40.
16. Haaf T, Achmid M. Chromosome topology in mammalian interphase nuclei. *Exp Cell Res* 1991; 192: 325–32.
17. Hubert J, Bourgeois CA. The nuclear skeleton and the spatial arrangement of chromosomes in the interphase nucleus of vertebrate somatic cells. *Hum Genet* 1986; 74: 1–15.
18. Palcic B, MacAulay C. Malignancy associated changes. Can they be employed clinically? In: Weid GL, Bartels PH, Rosenthal D, Schenk U, ed. *Compendium on the computerized cytology and histology laboratory*. Chicago; Tutorials of cytology; 1994. p. 157–65.
19. Palcic B. Nuclear texture: Can it be used as a surrogate endpoint marker? *J Cell Biochem* 1994; Suppl 19: 40–6.
20. Henson DE. The histological grading of neoplasms. *Arch Pathol Lab Med* 1988; 112: 1091–6.
21. Dawson AE, Austin RE, Weinberg DS. Nuclear grading of breast carcinoma by image analysis. Classification by multivariate and neural network analysis. *AJCP* 1991; 95 Suppl 1: 29–37.
22. Colombel MC, Pous MF, Abbou CC, Van Velthoven R, et al. Computer assisted image analysis of bladder tumor nuclei for morphonuclear and ploidy assessment. *Anal Cell Pathol* 1994; 6: 137–47.
23. Verhest A, Kiss R, d'Olne D, Larsimont D, Salmon I, et al. Characterization of human colorectal mucosa, polyps, and cancers by means of computerized morphonuclear image analysis. *Cancer* 1990; 65: 2047–54.
24. Fležar M. Jedrne značilke seroznih tumorjev jajčnika. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta; 2000: 86.
25. Komitowski D, Hart MM, Janson CP. Chromatin organization and breast cancer prognosis. Two-dimensional and three-dimensional image analysis. *Cancer* 1993; 72: 1239–46.
26. Van Velthoven R, Petein M, Oosterlinck WJ, Raviv G, et al. The additional predictive value contributed by quantitative chromatin pattern description as compared to DNA ploidy level measurement in 257 superficial bladder transitional cell carcinomas. *Eur Urol* 1996; 29: 245–51.
27. Veltri RW, Partin AW, Epstein JE, Marley GM, et al. Quantitative nuclear morphometry, Markovian texture descriptors and DNA content captured on CAS-200 image analysis system, combined with PCNA and HER-2/*neu* immunohistochemistry for prediction of prostate cancer progression. *J Cell Biochem* 1994; Suppl 19: 249–58.
28. Haroske G, Dimmer V, Friedrich K, Meyer W, et al. Nuclear image analysis of immunohistochemically stained cells in breast carcinomas. *Histochem Cell Biol* 1996; 105: 479–85.
29. Lavrenčak J, Fležar M, Žganec M, Us-Krašovec M. Nuclear features in cell cycle phases. 13th congress of the International Society for Analytical Cytology; 1996; Rimini, Italy.
30. Nieburgs H. Malignancy associated cellular markers. In: Weid GL, Keebler CM, Koss GL, Patten SF, Rosenthal D, ed. *Compendium on diagnostic cytology*. Chicago; Tutorials of cytology; 1992. p. 409–18.
31. Wied GL, Bartels PH, Bibbo M, Sychra JJ. Cytophotometric markers for uterine cancer in intermediate cells. *Anal Quant Cytol Histol* 1980; 2: 257–63.
32. Hanselaar AGJM, Poulin N, Pahlplatz MMM, Garner D, et al. DNA-cytometry of progressive and regressive cervical intraepithelial neoplasia. *Anal Cell Pathol* 1998; 16: 11–27.
33. Fležar M, Lavrenčak J, Žganec M, Us-Krašovec M. Longitudinal study of malignancy associated changes in progressive cervical dysplasia. *Radiol Oncol* 1998; 32: 65–9.
34. MacAulay C, Lam S, Payne PW, LeRiche JC, et al. Malignancy associated changes in bronchial epithelial cells in biopsy specimens. *Anal Quant Cytol Histol* 1995; 17: 55–61.
35. Us-Krašovec M, Fležar M, Lavrenčak J. Predictive value of nuclear texture features in breast carcinoma. In: Eržen I, Pajer Z, editors. Life sciences 1996. Proceedings of the 3rd international conference; 1996 Sep 21–26; Gozd Martuljek Slovenija. Ljubljana: Society for stereology and quantitative image analysis; 1996: 189–90.
36. Bubnič B, Fležar M, Lavrenčak J, Žargi M, Žganec M, Us-Krašovec M. Image analysis of normal and cancerous laryngeal mucosa. *Acta Cytol* 1997; 41: 1207.
37. Us-Krašovec M. Zgodnja detekcija raka s slikovnicitometrično analizo normalnih celic. *Onkologija* 2001; 5: 13–4.