

Analiza zawartości DNA metodą *video-imaging* w komórkach czerniaków złośliwych

Janusz Skowronek

z Wielkopolskiego Centrum Onkologii

Dyrektor: dr n. przyr. J. Malicki

z Zakładu Radiobiologii i Biologii Komórki Akademii Medycznej w Poznaniu

Kierownik: prof. dr hab. med. J.B. Warchol

*Wykrycie aneuploidii w komórkach nowotworów jest często wiązane ze złym rokowaniem klinicznym. W 103 przypadkach czerniaka złośliwego określono w komórkach zawartość DNA metodą cytometrii obrazowej (*video-imaging*). Uzyskane wyniki dotyczące ploidi DNA odniesiono do przebiegu klinicznego choroby oraz obrazu histopatologicznego czerniaka. Ponadto oceniono zależność między występowaniem aneuploidalnego lub diploidalnego guza z okresem 5-letniego przeżycia chorych. Porównano wyniki oznaczeń ploidi na materiale świeżym (rozmazy odbitkowe) i retrospektywnym (z blozków parafinowych). Stwierdzono wyższy odsetek guzów aneuploidalnych (68,0%) niż diploidalnych (32,0%) ($p < 0,01$). Częściej spotykano aneuploidię u chorych w II i III stopniu zaawansowania klinicznego choroby. Nie udało się wykazać zależności między ploidią DNA a wiekiem, płcią i lokalizacją guza pierwotnego. Uzyskane wyniki sugerują, że wykrycie aneuploidii prowadzi do precyzyjniejszego określenia badanego nowotworu ale nie przesądza ono jednoznacznie o dalszym rokowaniu.*

Estimation of DNA content using *video-imaging* in melanoma malignum cells

Abstract

*DNA aneuploid neoplasms are said to show correlation with bad prognosis. DNA content in 103 melanoma malignum cells was determined by *video-imaging* cytometry. Correlation between DNA content, clinical and histopathological data and 5-year survival rate were made. DNA ploidy measured in paraffin-embedded material and fresh material (cytological smears) was compared. Aneuploidy rate (68,0%) was significantly higher ($p < 0,01$) than diploidy rate (32,0%). Aneuploidy was related to stage II i III melanoma. Ploidy was not related to age, sex and localisation of primary lesion. Results suggest that aneuploidy doesn't seem to be significant worse prognostic factor.*

Skrót rozprawy na stopień doktora nauk medycznych nadany 19 czerwca 1996 r. przez Radę Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Poznaniu. Promotor: prof. dr hab. med. Jan Bręborowicz. Recenzenci: prof. dr hab. med. Albina Żółtowska, prof. dr hab. med., mgr chemii Jerzy B. Warchol.

Wstęp

Zachorowalność na czerniaka złośliwego pod względem dynamiki przyrostu ustępuje jedynie rakowi sutka u kobiet [1, 2], a jego przebieg kliniczny, zwłaszcza u mężczyzn, staje się bardziej agresywny [3]. Czerniak należy do nowotworów o trudnym do przewidzenia przebiegu klinicznym [4], nierzadko, pomimo niewielkiego zaawansowania w momencie rozpoznania, daje szybko przerzuty a przebieg choroby jest agresywny. W innych przypadkach pomimo licznych wznów procesu nowotworowego leczonych chirurgicznie chory żyje wiele lat. Czas przeżycia cechuje się dużą różnorodnością [5-8].

W diagnostyce i przewidywaniu przebiegu klinicznego czerniaka dużą rolę odgrywają czynniki rokownicze, z których za najważniejszy uważa się dziś grubość nacieku wg Breslowa [1, 9-13].

Mniejsze znaczenie prognostyczne wydają się mieć takie czynniki jak, np. wiek, płeć, lokalizacja czy typ kliniczny [5, 11, 14-18].

Ze względu na konieczność doboru dla każdego przypadku właściwej dla niego drogi postępowania obejmującej zasady leczenia oraz zakres i częstość kontroli po zakończeniu jego leczenia poszukuje się nowych wyznaczników pozwalających na określenie czerniaków o złym i dobrym rokowaniu. Obecnie za jeden z najważniejszych elementów oceny stopnia złośliwości nowotworów uważa się badanie zawartości DNA w jądrach komórek nowotworów [19-23]. W wielu badaniach potwierdzono zależność między nieprawidłową zawartością DNA a bardziej agresywnym przebiegiem klinicznym nowotworu [24-27].

W czerniaku złośliwym dotychczasowe badania nie przyniosły jednoznacznej odpowiedzi na pytanie o znaczenie wystąpienia aneuploidalnej zawartości DNA w jądrach tych komórek, a uzyskane wyniki są często sprzeczne [19, 28-33].

Celem pracy było poznanie zależności między zawartością DNA w komórkach a wybranymi cechami klinicznymi i histopatologicznymi czerniaka złośliwego oraz czasem przeżycia chorych, pozwalających na określenie znaczenia rokowniczego wystąpienia nieprawidłowej zawartości DNA w komórkach.

Material i metody

Grupę badaną stanowiło 103 chorych, u których usunięto czerniaka złośliwego na oddziałach chirurgicznych Wielkopolskiego Centrum Onkologii w okresie od 1985 do 1993 roku. Wyróżniono dwie grupy chorych. Grupa A liczyła 52 chorych leczonych w okresie 1985-1989, których poddano następnie 5-letniej obserwacji. W grupie tej dokonano pomiarów zawartości DNA na materiale tkankowym z blozków parafinowych. Grupa B liczyła 51 chorych, których leczono w 1993 roku. W grupie tej wartości ploidii DNA badano na materiale świeżym i z blozków parafinowych co umożliwiło porównanie otrzymanych wyników. Uzyskane wyniki badanego przypadku odniesiono do cech klinicznych i histopatologicznych. Dane kliniczne opracowano na podstawie historii chorób i przeprowadzonej katamnezie.

Przygotowanie preparatów

Rozmazy odbitkowe (materiał świeży, nieutrwalony z sali operacyjnej) wykonywane były na szkiełku mikroskopowym pokrytym żelatyną a następnie komórkami diploidalnego wzorca wewnętrznego, którym były ludzkie limfocyty. Szkiełko utrwalano przez 3 minuty w płynie Carnoya (15 cz. alkoholu absolutnego, 4 cz. formaliny i 1 cz. kwasu octowego), który, jak wykazano w pracy Krygier-Stojałowskiej [34], w dostateczny sposób utrwała chromatynę i pozwala na badanie DNA. Preparaty barwiono metodą Feulgena. Przygotowanie preparatów z bloczków parafinowych przeprowadzano w następujący sposób: 1/ ścięcie na mikrotomie 2-3 skrawków o grubości 50 μm z bloczka parafinowego, 2/ usunięcie skalpelem fragmentów towarzyszącej guzowi tkanki, 3/ odparafinowanie wg metody opisanej przez Hedleya i wsp. [35], 4/ przygotowanie zawiesiny komórek nanoszonej na szkiełko i dalej barwionej metodą Feulgena.

Pomiary DNA

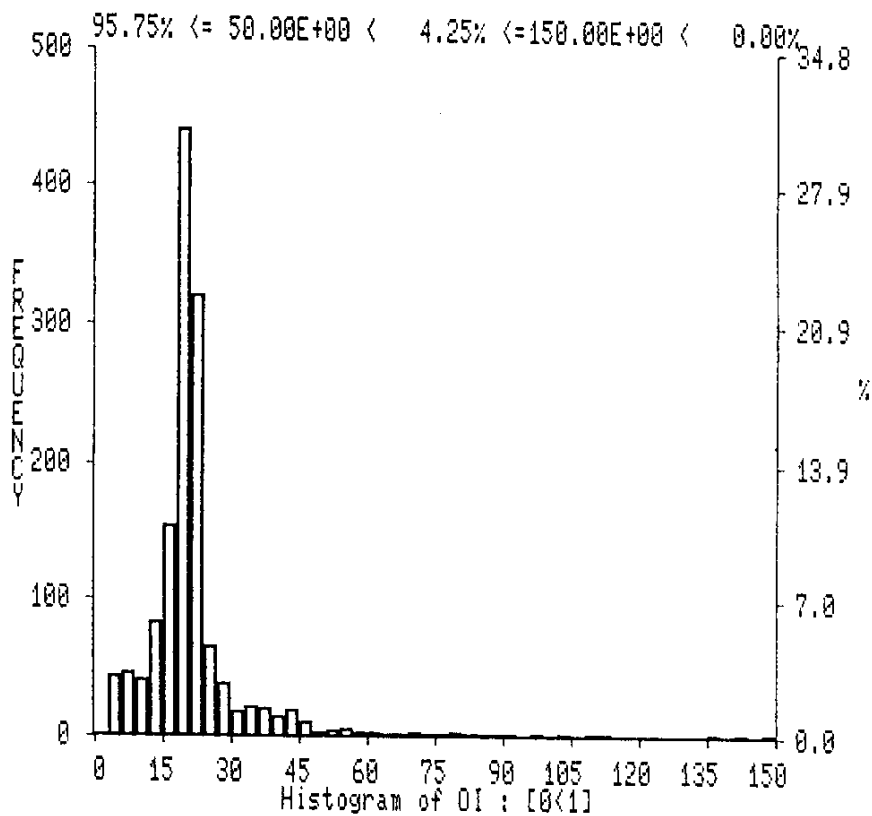
W pomiarach metodą cytometrii obrazowej (video-imaging) oznaczano zawartość DNA w poszczególnych fazach cyklu życiowego komórki odnosząc ją do zawartości DNA komórek populacji wzorcowej (referencyjnej) o zakładanej diploidalnej ($2n$) zawartości DNA. Diploidalnym wzorcem wewnętrznym były ludzkie limfocyty. Wyniki pomiarów otrzymano w postaci histogramów. Histogramy DNA analizowano przyjmując, że populacja komórek różniąca się mniej niż 10% od wzorca diploidalnego posiada diploidalną zawartość DNA. Przyjęto, że guz posiada aneuploidalną populację komórek, jeśli w histogramie DNA był obecny wyraźny pik różniący się bardziej niż 10% od wzorca diploidalnego. Pomiary metodą cytometrii obrazowej wykonywano na analizatorze obrazu MAGICAL (firmy Joyce-Loebl) stosując programy GENIAS i RESULTS. Mierzono każdorazowo zawartość DNA średnio w 1000 komórkach czerniaka i 100 komórkach wzorca wewnętrznego. Pomiarów dokonywano przy stałym powiększeniu 640x i stałych warunkach oświetlenia. Wielkość błędu obliczeń – 2,58.

Na ryc. 1 i 2 przedstawiono przykłady histogramów diploidalnego i aneuploidalnego otrzymane metodą video-imaging.

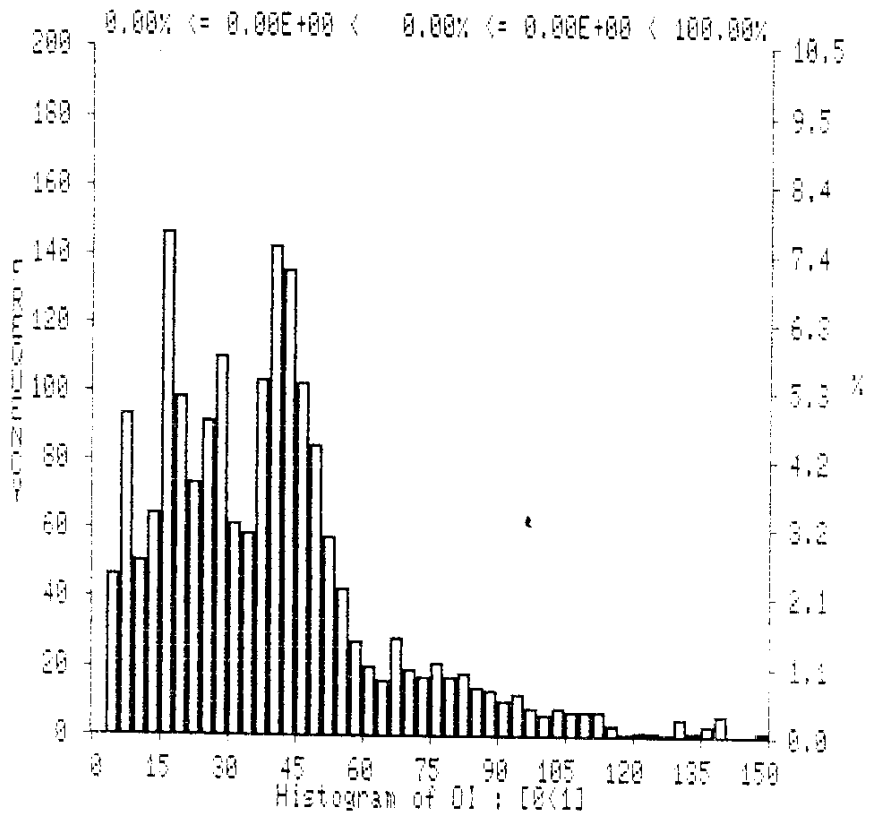
Ocenę statystyczną wykonywano przy pomocy testu χ^2 . Poziom istotności przyjęto dla $p=0,05$. Krzywą przeżycia opracowano przy pomocy metody Kaplan-Meiera.

Wyniki

W grupie 103 chorych stwierdzono profil diploidalny DNA u 33 chorych (32,0%) a aneuploidalny u 70 chorych (68,0%) ($p<0,01$), w tym profil diploidalny u 24 na 70 kobiet (34,3%) i u 9 na 33 mężczyzn (27,3%), profil aneuploidalny u 46 kobiet (65,7%) i 24 mężczyzn (72,7%) ($p<0,05$). Zależności wartości ploidi DNA od płci, wieku, lokalizacji i stopnia zaawansowania klinicznego przedstawiono w tabeli I.



Ryc. 1. Czerniak złośliwy – przykład histogramu diploidalnego, zależność gęstości optycznej (OI) od liczebności komórek.



Ryc. 2. Czerniak złośliwy – przykład histogramu aneuploidalnego, zależność gęstości optycznej (OI) od liczebności komórek.

Różnice odsetka aneuploidii w zależności od wieku i lokalizacji były nieistotne statystycznie, stwierdzono wyższy odsetek komórek aneuploidalnych w II i III stopniu zaawansowania klinicznego w porównaniu ze stopniem I.

Tab. I. Porównanie zawartości DNA z cechami klinicznymi.

Cecha	n	Diploidia		Aneuploidia		p <
		n	%	n	%	
Chorzy ogółem:	103	33	32,0	70	68,0	0,01
Kobiety:	70	24	34,3	46	65,7	0,05
Mężczyźni:	33	9	27,3	24	72,7*	0,05
Grupy wiekowe:						
0-19	1	1	100,0	0	0,0	
20-29	9	1	11,1	8	88,9	
30-39	10	3	30,0	7	70,0	
40-49	34	9	26,5	25	73,5	0,05
50-59	16	8	50,0	8	50,0	
60-69	16	5	31,3	11	68,7	
70-79	14	6	42,9	8	57,1	
>80	3	0	0,0	3	100,0*	
Lokalizacja:						
głowa i szyja	12	4	33,3	8	66,7	
tułów	25	7	28,0	18	72,0	
kończyny górne	20	7	35,0	13	65,0	
kończyny dolne	46	15	32,6	31	67,4*	NS
Stopień zaawansowania:						
I	17	13	76,5	4	23,5	
II	65	15	23,1	50	76,9	0,001
			p < 0,01		*	
III	21	5	23,8	16	71,1	

* – NS

Porównano zawartość DNA z wybranymi cechami histopatologicznymi. W całej grupie 103 chorych w zależności od typu klinicznego czerniaka stwierdzono aneuploidię w 30 na 48 przypadkach typu SSM (62,5%), w 38 na 51 przypadkach typu NMM (74,5%) i w 2 na 4 przypadkach typu LMM (50,0%). Różnice w odsetkach aneuploidii pomiędzy typami czerniaka były nieistotne statystycznie. W zależności od poziomu naciekania wg Clarka stwierdzono aneuploidię w 27 na 38 przypadków (71,0%) Clarka III, w 35 na 50 przypadków (70,0%) Clarka IV i w 8 przypadkach Clarka V. Nie stwierdzono aneuploidii w czerniakach o poziomie naciekania Clark I i II. W przypadku zajętych regionalnych węzłów chłonnych stwierdzono aneuploidię w 16 na 21 przypadkach (76,2%), przy braku przerzutów aneuploidia wystąpiła w 54 na 82 przypadki (65,9%) (NS).

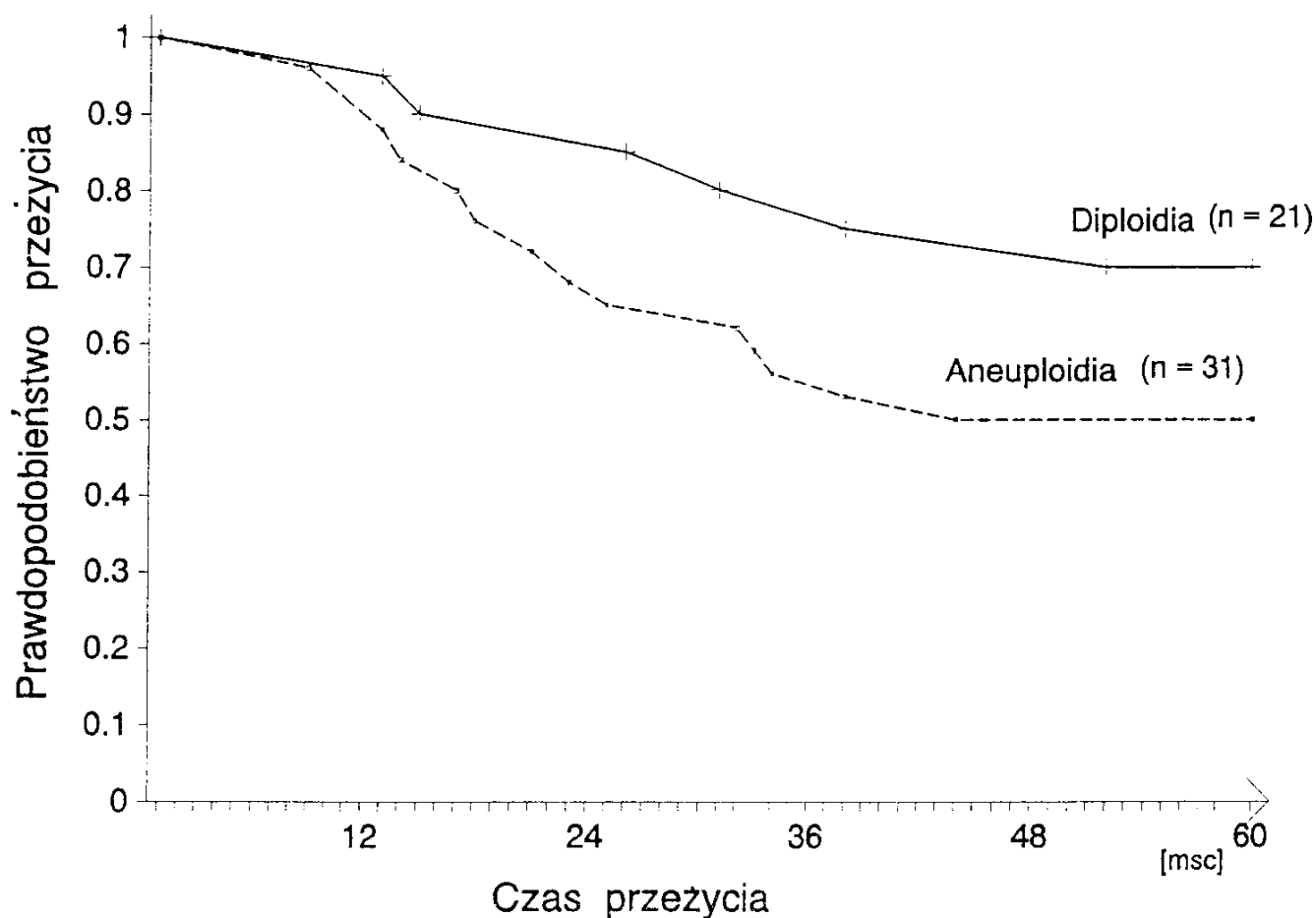
W grupie B porównano zawartość DNA z rozszerzonym w stosunku do grupy A zestawem cech histopatologicznych. Wyniki zamieszczono w tabeli II.

Tab. II. Porównanie zawartości DNA z cechami histopatologicznymi (Grupa B).

Cecha	n	Diploidia		Aneuploidia		p<
		n	%	n	%	
Grubość nacieku wg Breslowa:						
<0,75	2	2	100,0	0	0,0	0,001
0,76 - 1,50	3	1	33,3	2	66,7	
1,51 - 4,00	14	4	28,6	10	71,4	
>4,00	32	5	15,6	27	84,4*	
Obecność owrzodzenia						
tak	32	7	21,9	25	78,1	0,01
nie	19	5	26,3	14	73,3*	
Typ komórek:						
nabłonkowy	19	6	31,6	13	68,4	0,01
wrzecionowy	11	1	9,1	10	90,9*	
mieszany	21	5	23,8	16	76,2	
Naciek zapalny:						
brak	4	0	0,0	4	100,0	0,01
+	16	3	18,8	13	81,2	
++	21	6	28,6	15	71,4*	
+++	10	3	30,0	7	70,0	
Skład komórkowy nacieku:						
kom. plazmatyczne	1	0	0,0	1	100,0	NS
limfocyty	30	9	30,0	21	70,0	
oba typy komórek	16	3	18,8	13	81,2	
Cechy regresji:						
tak	12	2	16,7	10	83,3	0,05
nie	39	11	28,2	28	71,8*	
Inwazja naczyń:						
brak	46	11	23,9	35	76,1	0,001
limfatyczne	5	1	20,0	4	80,0	
krwionośne	0	0	0,0	0	0,0	
Liczba mitoz/10 pól:						
< 10	13	6	46,2	7	53,9	0,01
10 - 20	17	4	23,5	13	76,5	
21 - 30	11	2	18,2	9	81,8*	
> 30	10	2	20,0	8	80,0	
Maksymalna średnica czerniaka w mm:						
< 10	8	1	12,5	7	87,5	0,01
10 - 20	25	6	24,0	19	76,0	
21 - 30	14	3	21,4	11	78,6*	
> 30	4	2	50,0	2	50,0	

* — NS

Wyższy statystycznie znamienne odsetek aneuploidii od odsetka diploidii stwierdzono przy przekroczeniu grubości nacieku powyżej 1,50 mm wg Breslowa, przy obecności nacieku zapalnego wokół komórek guza, przy braku cech regresji oraz przy przekroczeniu liczby mitoz powyżej 10 na 10 pól (powiększenie 640x).



Ryc. 3. Krzywa 5-letniego przeżycia.

W grupie A porównano 5-letni czas przeżycia ogółem z zawartością DNA (tabela III, wykres 1). 5 lat przeżyło 54,8% (n = 17/31) chorych z guzem aneuploidalnym i 71,4% (n = 15/21) chorych z guzem diploidalnym [NS]. Zauważono tendencję do krótszego czasu przeżycia w grupie chorych z aneuploidią (większość zgonów w drugim i trzecim roku obserwacji). Obserwację chorych z grupy B zakończono po dwóch latach. Z tej grupy 2 lata przeżyło 71,8% chorych (n = 28/39) z guzem aneuploidalnym i 83,3% chorych (n = 10/12) z guzem diploidalnym (NS).

Tab. III. Czas przeżycia ogółem w porównaniu z zawartością DNA (Grupa A).

Czas przeżycia ogółem (w msc)	n	Diploidia		Aneuploidia		p <
		n	%	n	%	
< 12	1	0	0,0	1	3,2	
12 - 24	9	2	9,5	7	22,6	
25 - 36	6	2	9,5	4	12,9	
37 - 48	3	1	4,8	2	6,5	
49 - 60	1	1	4,8	0	0,0	
> 60	32	15	71,4	17	54,8	NS
			100,0		100,0	

Wyniki pomiarów zawartości DNA uzyskane na materiale świeżym tkankowym (rozmaży odbitkowe) i retrospektywnym (z bloczków parafinowych) były identyczne.

Omówienie wyników

W całej grupie badanych czerniaków stwierdzono wyższy odsetek guzów aneuploidalnych niż diploidalnych. Podobne wyniki uzyskali Wass i wsp. (67,0% aneuploidii) [33], Barlogie i wsp. (89,0% aneuploidii) [20], Buchner i wsp. (76,0% aneuploidii) [19], Sondergaard i wsp. (74,0% aneuploidii) [10], Zaloudik i wsp. (62,0% aneuploidii) [36]. Odmienne wyniki uzyskali Schmiegelow i wsp. (diploidia w 85,9% typu SSM i 66,4% typu NMM) [9], Bartkowiak i wsp. (diploidia w 57,0%) [32], Silver i wsp. (55,6% diploidii) [30]. Wpływ na różnice uzyskanych wyników mogą mieć odmienne grupy badanych chorych, inne metody przygotowywania preparatów oraz odmienna klasyfikacja histogramów. Wszystkie wyżej wymienione pomiary wykonano metodą cytometrii przepływowej. Można z tego wysunąć wniosek, że stwierdzenie aneuploidii w czerniaku nie jest jednoznacznie cechą rokowniczą, tak jak np. grubość nacieku wg Breslowa.

W badanej grupie nie stwierdzono zależności pomiędzy wartością ploidi DNA a płcią chorych, wiekiem i lokalizacją ogniska pierwotnego co koreluje z wynikami uzyskanymi przez Lindholma i wsp. [28], Zaloudika i wsp. [36] oraz Kheir i wsp. [37]. Uważa się, że płć żeńska i lokalizacja na kończynach dolnych rokuje lepiej, jednak ze względu na częste łączne występowanie tych cech, a także rzadsze stwierdzanie owrzodzenia u kobiet (czynnik niekorzystny rokowniczo) znaczenie rokownicze tych cech nie jest dziś uważane za tak jednoznaczne.

Im wyższy stopień zaawansowania klinicznego, tym gorsze rokowanie, co jest związane z cechą pT (grubość nacieku wg Breslowa, poziom nacieku wg Clarka) i cechą N (obecność przerzutów). Wyniki własne wskazują na wzrastający odsetek aneuploidii w guzach o grubości nacieku powyżej 1,50 mm, w III, IV i V poziomie nacieku wg Clarka. W II i III stopniu zaawansowania klinicznego różnica odsetka aneuploidii w stosunku do stopnia I była istotna statystycznie ($p < 0,01$).

Wyższy statystycznie odsetek aneuploidii stwierdzono przy obecności nacieku zapalnego, braku cech regresji oraz przy przekroczeniu liczby mitoz/na 10 pól powyżej 10. Obecność nacieku zapalnego wokół guza jest uważana za korzystną cechę rokowniczą, obecność cech regresji jest uważana za cechę niekorzystną rokowniczo. Brak jest doniesień innych badaczy porównujących te cechy z wartością ploidi DNA. Wg Shaw i wsp. [4] wysoki indeks mitotyczny jest powiązany z większą złośliwością guza i wysokim odsetkiem wznów, Sondergaard i wsp. [10] stwierdzili wyższy odsetek aneuploidii w guzach o wysokim indeksie mitotycznym. Porównanie innych cech histologicznych z ploidią DNA nie wykazało statystycznie znamiennej zależności. Niewielka liczba badań dotyczących zależności pomiędzy ploidią DNA i cechami histopatologicznymi wymaga podjęcia dalszych badań.

Chorzy z guzem aneuploidalnym żyli krócej niż chorzy z guzem diploidalnym, jednak różnica nie była istotna statystycznie. W szeregu doniesień wykazano znamienne

statystycznie krótszy okres do pierwszej wznowy lub pojawienia się przerzutów dla guzów aneuploidalnych [10, 19, 32, 37]. Inaczej Lindholm i wsp. [28], którzy stwierdzili wyższy odsetek przeżyć 5 i 10-letnich dla guzów aneuploidalnych. Na podstawie analizy własnych wyników oraz danych z piśmiennictwa można przypuszczać, że stwierdzenie aneuploidii w czerniaku rokuje krótszy okres przeżycia chorego, wymaga to jednak potwierdzenia w dalszych badaniach.

Całość uzyskanych wyników wskazuje, że oznaczanie ploidii DNA jako czynnika rokowniczego w czerniaku raczej nie stanie się głównym elementem decyzyjnym postępowania leczniczego lecz jedynie uzupełnieniem diagnostyki.

Wyniki pomiarów uzyskane na materiale świeżym tkankowym i retrospektywnym tego samego chorego były identyczne. Przygotowywanie rozmazów odbitkowych z usuniętej tkanki okazało się metodą szybką i dokładną. Na uwagę zasługuje konieczność dokładnego odparafinowania tkanki z kostki parafinowej oraz usunięcia tkanki podskórnej i zdrowej skóry przy użyciu skalpela. Zastosowanie metody cytometrii obrazowej umożliwia identyfikację komórek nowotworowych pod mikroskopem, a zatem ograniczenie do minimum możliwości pomiarów DNA w komórkach nie będących komórkami badanymi. Cytometria obrazowa pozwala również na segregację komórek według zadanych kryteriów, i tak, można oznaczać DNA wyłącznie w komórkach o określonym kształcie lub o określonej powierzchni, zawsze pod kontrolą mikroskopu. Wadą pomiarów tą metodą jest ich czasochłonność.

Wnioski

1. W grupie chorych na czerniaka występuje wyższy odsetek komórek aneuploidalnych niż diploidalnych.
2. Aneuploidia występuje częściej w czerniakach o II i III stopniu zaawansowania klinicznego, w guzach o grubości nacieku powyżej 1,50 mm i w poziomie naciekania wg Clarka III, IV i V.
3. Oznaczanie ploidii DNA w czerniaku złośliwym nie pozwala na jednoznaczne wyróżnienie grupy o złym i dobrym rokowaniu.
4. Otrzymane wyniki oznaczania ploidii wykonane na materiale tkankowym świeżym i uzyskane metodą odparafinowania z bloczków parafinowych nie wykazują różnic.
5. Przygotowywanie rozmazów odbitkowych z komórek czerniaka jest szybką i dokładną metodą pozwalającą na wykonanie pomiaru ploidii DNA metodą cytometrii obrazowej.
6. Zastosowanie techniki cytometrii obrazowej pozwala na oznaczanie ploidii DNA w dowolnie wybranej grupie komórek pod kontrolą mikroskopu, co umożliwia właściwą identyfikację komórek nowotworowych.

Piśmiennictwo

1. Balch CM, Houghton A, Peters L. Cutaneous Melanoma. W: DeVita VT Jr, Hellmann S, Rosenberg SA. *Cancer, Principles and Practice of Oncology*. New York: JB Lippincott, 1993; 1612-1661.

2. Greene MH, Clark WH Jr, Tucker MA i wsp. High risk of malignant Melanoma in melanoma-prone families with dysplastic nevi. *Ann Intern Med* 1985; 102: 458-462.
3. Perez CA, Brady LW. *Principles and Practice of Radiation Oncology*. Philadelphia: JB Lippincott, 1992: 488-491.
4. Shaw HM, Balch CM, Soong S-J i wsp. Prognostic histopathological factors in Malignant Melanoma. *Pathology* 1985; 17: 271-274.
5. Presant CA, Bartolucci AA. Prognostic factors in metastatic malignant Melanoma: the Southeastern Cancer Study Group Experience. *Cancer* 1982; 49: 2192-2196.
6. Pawlicki M, Skolyszewski J, Stryjewska B i wsp. Prognostic factors in advanced metastatic and recurrent Melanoma treated with DTIC. *Tumori* 1987; 73: 49-50.
7. Markowitz JS, Cosimi LA, Carey RW. Prognostic factors after initial recurrence of cutaneous Melanoma. *Arch Surg* 1991; 126: 703-708.
8. Heimdal K, Hannidsal E, Gunderson S. Metastatic malignant Melanoma. *Eur J Cancer* 1989; 25: 1219-1223.
9. Schmiegelow P, Schroiff R, Breitbart E i wsp. Malignant Melanoma – its precursors and its topography of proliferation. *Virchows Archiv [A]*, 1986; 409: 47-59.
10. Sondergaard K, Larsen JK, Moller U i wsp. DNA ploidy – characteristics of Human Malignant Melanoma analysed by Flow Cytometry and compared with histology and clinical course. *Virchows Arch [B] [Cell Pathol]* 1983; 42: 43-52.
11. Balch CM, Soong S-J, Shaw HM i wsp. An analysis of prognostic factors in 8500 patients with cutaneous Melanoma. W: Balch CM, Houghton AN, Milton GW i wsp. (red.). *Cutaneous Melanoma: clinical management and treatment results worldwide*, 2nd ed., Philadelphia: JB Lippincott, 1992, 165-187.
12. Garbe C, Buttner P, Bertz J i wsp. Primary Cutaneous Melanoma: Identification of Prognostic Groups and Estimation of Individual Prognosis for 5093 Patients. *Cancer* 1995; 75, 10: 2484-2491.
13. Buttner P, Garbe C, Bertz J i wsp. Primary Cutaneous Melanoma: Optimized Cutoff Points of Tumor Thickness and Importance of Clark's Level for Prognostic Classification. *Cancer* 1995; 75, 10: 2499-2506.
14. Mansson-Brahme E, Carstensen J, Erhardt K i wsp. Prognostic Factors in Thin Cutaneous Malignant Melanoma. *Cancer* 1994; 73: 2324-2332.
15. Lemish WM, Heenan PJ, Holmar CJD i wsp. Survival from preinvasive and invasive Malignant Melanoma in Western Australia. *Cancer* 1983; 52: 580.
16. Day CL, Mihm MC, Lew RA i wsp. Prognostic factors for Melanoma patients with lesions 0.76-1.96 mm in thickness. *Ann Surg* 1982; 195: 30.
17. Shaw HM, McGovern VJ, Milton GW i wsp. Histologic features of tumors and the femal superiority in survival from Malignant Melanoma. *Cancer* 1980; 45: 1604.
18. Balch CM, Soong S-J, Murad TM i wsp. A multifactorial analysis of melanoma: II. Prognostic factors in patients with stage I (localised) Melanoma. *Surgery* 1979; 86: 343-351.
19. Buchner T, Hiddemann W, Wormann B i wsp. Differential pattern of DNA-aneuploidy in human malignancy. *Pathol Res Pract* 1985; 179: 310-317.
20. Barlogie B, Raber MN, Schumann J i wsp. Flow Cytometry in Clinical Cancer Research. *Cancer Res* 1983; 43: 3982-3997.
21. Lackowska B, Wasilewska A, Gruchala A i wsp. I. Flow Cytometric Analysis of Low Grade B-cell Non-Hodgkin's Lymphoma: Correlation between Histology, Immunophenotyping and Cell Cycle Analysis. *Pat Pol* 1984; 45, 4: 263-269.
22. Witzig TE, Ingle JN, Cha SS i wsp. 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.
23. Niwińska A. Nowe czynniki rokownicze u chorych na raka sutka bez przerzutów do węzłów chłonnych. *Nowotwory* 1995; 45: 459-469.
24. Merkel DE, McGuire WL. Ploidy, Proliferative Activity and Prognosis. DNA Flow Cytometry of Solid Tumors. *Cancer* 1990; 65: 1194-1205.
25. Czerniak B, Eppich EM, Gorczyca W i wsp. Cytometryczne pomiary ploiddi DNA w rakach jelita grubego. *Pat Pol* 1988; 39: 1-12.

26. Friedlander ML, Hedley DW, Taylor JW. Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumours. *J Clin Pathol* 1984; 37: 961-974.
27. Hermann CJ. Cytometric DNA Analysis in the Management of Cancer. *Cancer* 1992; 69: 1553-1556.
28. Lindholm C, Hofer P-A, Jonsson H. Single Cell DNA Cytophotometry in Clinical Stage I Malignant Melanoma. *Acta Oncologica* 1990; 29: 147-150.
29. Muhonen T, Pyrhonen S, Laasonen A i wsp. DNA aneuploidy and low S-phase fraction as favourable prognostic signs in metastatic Melanoma. *Br J Cancer* 1991; 65: 749-752.
30. Silver HKB, Karim KA, Le Riche J i wsp. Nuclear DNA, Serum Sialic Acid and measured depth in Malignant Melanoma for predicting disease recurrence and survival. *Int J Cancer* 1989; 44: 31-34.
31. Karlsson M, Boeryd B, Carstensen J i wsp. DNA ploidy and S-phase in primary Malignant Melanoma as prognostic factors for stage III disease. *Br J Cancer* 1993; 67: 134-138.
32. Bartkowiak D, Schumann J, Otto FJ i wsp. DNA Flow Cytometry in the Prognosis of Primary Malignant Melanoma. *Oncology* 1991; 48: 39-43.
33. Wass J, Zbroja RA, Young GAR i wsp. Malignant Melanoma: Analysis by DNA Flow Cytometry. *Pathology* 1985; 17: 475-480.
34. Krygier-Stojalowska A. Zasady cytofotometrii. W: *Topochemiczne metody badań komórek i tkanek*. Warszawa: 1987, 111-134.
35. Hedley DW, Friedlander MK, Taylor JW i wsp. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using Flow Cytometry. *J Histochem Cytochem* 1983; 31: 1333-1335.
36. Zaloudik J, Moore M, Ghosh AK i wsp. DNA content and MHC class II antigen expression in malignant Melanoma: Clinical course. *J Clin Pathol* 1988; 41: 1078-1084.
37. Kheir SM, Bines SD, Von Roenn JH i wsp. Prognostic significance of DNA Aneuploidy in Stage I Cutaneous Melanoma. *Ann Surg* 1988; 207: 455-461.

Otrzymano 9 września 1996 r.

Adres autora: Zakład Radioterapii z Oddziałem, Wielkopolskie Centrum Onkologii, ul. Garbary 15, 61-866 Poznań.