

## Bromodeoxyuridine 표지에 의한 인체 상피 세포암의 세포 역동학 연구

연세대학교 의과대학 <sup>1</sup>치료방사선과학교실, <sup>2</sup>임상병리학교실, <sup>3</sup>산부인과학교실,  
<sup>4</sup>외과학교실, <sup>5</sup>비뇨기과학교실 및 <sup>6</sup>이비인후과학교실

성진실<sup>1</sup> · 이정운<sup>2</sup> · 정은지<sup>1</sup> · 김영태<sup>3</sup>  
김재욱<sup>3</sup> · 김남규<sup>4</sup> · 홍성준<sup>5</sup> · 최은창<sup>6</sup>  
이원상<sup>6</sup> · 권오현<sup>2</sup> · 김귀언<sup>1</sup>

= Abstract =

### Cell Kinetics Studies of Human Epithelial Cancers with Bromodeoxyuridine Labeling

Jinsil Seong, M.D.<sup>1</sup>, Jung Woon Lee, M.D.<sup>2</sup>, Eun Ji Chung, M.D.<sup>1</sup>  
Yung Tae Kim, M.D.<sup>3</sup>, Jae Wook Kim, M.D.<sup>3</sup>, Nam Kyu Kim, M.D.<sup>4</sup>  
Sung Jun Hong, M.D.<sup>5</sup>, Eun Chang Choi, M.D.<sup>6</sup>, Won Sang Lee, M.D.<sup>6</sup>  
Oh Hun Kwon, M.D.<sup>2</sup> and Gwi Eon Kim, M.D.<sup>1</sup>

Departments of <sup>1</sup>Radiation Oncology, <sup>2</sup>Clinical Pathology,  
<sup>3</sup>Obstetrics and Gynecology, <sup>4</sup>General Surgery, <sup>5</sup>Urology, and <sup>6</sup>Otolaryngology  
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Cell kinetic parameters of labeling index (LI), duration of S-phase (Ts), and potential doubling time (Tpot) were analyzed following infusion of bromodeoxyuridine (BUdR) in 33 patients with various epithelial cancers. Twelve uterine cervical cancers, 9 rectal cancers, 7 head and neck cancers, and 5 bladder cancers were included. Biopsies were taken about 4~6 h after 200 mg/m<sup>2</sup> BUdR infusion and the samples were analyzed with bivariate DNA /BUdR flow cytometry.

The distribution of cell kinetic parameters for the 33 epithelial cancers showed a large range of values for each parameter. The median LI, Ts, and Tpot were 4.5%, 10.8 h, and 242.3 h, respectively. Eight among 33 patients (24.2%) showed aneuploidy. In aneuploid tumors the distribution of LI, Ts, and Tpot was in relatively small range. Aneuploid tumors appeared to show higher LI and shorter Tpot than those in diploid tumors. In diploid tumors, the possibility of normal cell contamination could not be ruled out.

The results of this study would be a basis for future trial to predict which ones would show tumor clonogen repopulation during radiotherapy so that benefit from altered fractionated radiotherapy.

---

**Key Words:** Cell kinetics, BUdR, Flow cytometry, Epithelial cancer

---

\*본 연구는 1993년도 연세대학교 의과대학 교수연구비로 이루어졌음.

## 서 론

악성 종양을 방사선으로 치료할 때 치료 도중에도 종양 세포의 Clonogen이 증식하며 이것이 치료 실패의 주된 요인으로 지목되고 있다<sup>1,2)</sup>. 이 문제를 극복하고 치료율을 향상하기 위한 방법으로서 고전적인 일일 일회 조사법을 변형시킨 다양한 종류의 다분할 조사법들이 효과적으로 시도되어 오고 있다<sup>3,4)</sup>. 그러나 방사선치료 도중의 암세포 증식이 모든 종양에 적용되는 문제는 아니며 개체마다 이형성이 존재할 것이다. 그렇다면 세포 증식이 활발한 종양을 식별하여 이들에게 변형된 방사선 치료법을 적용해야 궁극적으로 치료 성공률을 높일 수 있을 것이며 이에 치료전 상태의 종양 세포 역동학에 대한 지식이 유용할 것이다<sup>5)</sup>.

종양 세포를 할로겐 화합물 (iodo-또는 bromo-deoxyuridine; IUdR 또는 BUdR)로 표지시킨 후 flow cytometry 분석을 하여 세포 역동학 측정할 수 있다. 표지된 세포들은 정상적으로 그들의 세포 주기를 진행하게 되며 표지시키고 수 시간 후 종양에서 조직 생검을 하여 세포 역동학 분석을 할 수 있다<sup>6-8)</sup>. 즉 DNA 합성기 시간 (Ts)과 표지 지수 (LI)를 측정할 수 있다. 잠재 배가 시간 (Tpot)은 Ts와 LI 측정값을 근거로 Begg 등<sup>9)</sup>의 방법을 이용하여 산출할 수 있다. 이 T pot는 세포 손실이 없을 때의 세포 증식능의 지표로서 반복성이 높으며 세포 역동학의 대표적인 지표이다<sup>9,10)</sup>. 본 연구에서는 각종 인체 상피 세포암의 세포 역동학을 분석하여 세포 증식 상태를 구체적으로 측정하고 증식이 활발한 종양을 판별하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1) 대상환자

1994년 1월부터 1995년 2월까지 조직학적으로 진단받은 상피 세포암 환자 33예를 대상으로 하였다. 환자의 연령은 35세에서 80세까지(중앙값 59세) 분포하였으며 부위 별로는 자궁 경부암 12예, 직장암 9예, 두경부암 7예 및 방광암 5예 등이었다. 임신 가능성이 있는 환자는 본 연구 대상에 포함시키지 않았다.

### 2) BUdR 표지 및 시료의 준비

BUdR (Gibco, Grand Islands, NY)은 화학명 5-bromo-2'-deoxyuridine으로 무균상태의 백색 분말 상태로 공급된다. 환자의 동의를 얻은 후 주사 직전에 주사용 증류수로 용해시켜서 200 mg/m<sup>2</sup>를 정맥 주사하였다. 4~6시간 경과한 후 종양 조직을 생검하여 이후 시료의 준비과정을 시행하였다.

조직을 잘게 분쇄한 후 0.25% trypsin, 0.02% DNase를 첨가하여 37°C에서 교반시키는 등의 조작을 통하여 단일 세포 부유액을 준비하였다. 이를 35  $\mu$ m 나이론 망에 여과하고 인산 완충액 (phosphate buffer solution, PBS)에 세척한 후 세포 농도를 ml당 10<sup>6</sup>개 이하로 하여 70% ethanol 로 고정시켰다. 다시 2N 염산으로 20분간 반응시켜서 DNA의 이중 나선을 변성시킨 후 0.1 N의 Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>으로 10분간 중화시켰다. 약 1  $\times$  10<sup>6</sup>개의 세포를 0.5% 우혈청 알부민과 마우스 항 BUdR 단일 항체 (1:25로 희석)를 포함하는 1 ml의 인산 완충 혼합액 (PBS/Tween-20) 과 60분간 실온에서 반응시켰다. 이차 항체로는 항 마우스 염소 IgG의 형광배합체 (FITC; Becton Dickinson, Mountain View, CA)를 사용하였다. 1 mg/ml의 ribonuclease A (Sigma, London U.K)와 37°C에서 30분간 반응시킨 후 20  $\mu$ g/ml의 propidium iodide (PI; Sigma, St. Louise, MO)가 들어 있는 1 ml의 PBS/Tween 20에 15분간 재부유화시켜서 DNA를 염색하였다.

### 3) Flow cytometry 분석

세포 주기의 역동학적 분석을 위해 BUdR content (FITC) 와 DNA content (PI)의 이중변수의 분포는 유세포분석기 FACScan (Becton Dickinson, USA)을 이용하여 측정하였다. 15 mW의 argon-ion laser를 이용하여 488 nm에서 excitation 시점으로써 BUdR은 530 nm의 short pass filter로 대수 증폭기(logarithmic amplifier)를 이용하여, PI는 610 nm의 long pass filter로 직선 증폭기(linear amplifier)를 이용하여 검체를 측정하였고, doublet이나 세포응괴는 DDM (double discrimination mode)으로 분석시 제외시켰다. 검체는 최소 20,000개의 세포를 얻어서 분석하였으며 채취 및 분석에

사용한 software는 LYSYS II이었다.

#### 4) Tpot의 계산

Relative movement (RM)는 시간경과에 따라 BUdR로 염색된 세포집단의 진행 상황을 추적관찰한 양적 표현이다. 이를 이용하여 Ts를 계산할 수 있다<sup>11)</sup>. 이 RM법은 Begg<sup>6)</sup>에 의해 처음 기술된 후, White<sup>12)</sup>에 의해 변경된 것을 이용하였다. 간략하게 설명하면 이중변수에 의한 세포주기 분석시 ① BUdR에 염색되고 분열된 부위 (ld), ② BUdR에 염색되고 미분열된 부위 (lu), ③ BUdR에 염색되지 않은 G1 부위, ④ BUdR에 염색되지 않은 G2 부위 각각에 window를 설정한 후, 상기 ②, ③, ④분획의 PI 평균 형광강도값  $F_{lu}$ ,  $F_{G1}$ ,  $F_{G2/M}$ 을 각각 구하였고, lu와 ld의 분획인 flu, fld도 계산하였다. 이를 이용하여 RM을 계산하였다.

$$RM(t) = (F_{lu}(t) - F_{G1}) / (F_{G2/M} - F_{G1}) \quad [1]$$

t: 염색 후 검체채취까지의 시간간격(h)

한편, labeling index와 관련있는 함수인 는 White 등에 의한 방법으로 계산하였다<sup>12,13)</sup>.

$$\nu = \ln[(1 + flu) / (1 - fld/2)] \quad [2]$$

flu: fraction of labeled undivided nuclei

fld: fraction of labeled divided nuclei

White등<sup>12)</sup>에 의하면 시간에 따른 RM의 일차함수는

다음과 같다.

$$RM_L(t) = RM_L(0) + t/2Ts \quad [3]$$

$RM_L(0)$ : zero time RM intercept

$$\text{한편, } RM_L(0) = (1 - e^{-\nu} - \nu e^{-1.3\nu}) / [\nu(1 - e^{-1.3\nu})] \quad [4]$$

따라서  $RM_L(t)$ 를 측정하고  $RM_L(0)$ 를 [4]공식에서 계산한다면, Ts를 수식으로 계산해 낼 수 있다.

$$Ts = t / (2 \times [RM_L(t) - RM_L(0)]) \quad [5]$$

Ts: length of S-phase

이렇게 구해진 Ts와  $\nu$ 를 이용하여 potential doubling time (Tpot)을 구할 수 있다.

$$Tpot = \ln 2 \times Ts / \nu \quad [6]$$

#### 결 과

33예에서 측정된 세포 증식 지표들의 분포가 Fig. 1에 나타나 있다. LI는 분포 범위가 1.1~25.8% 로서 중앙값은 4.5%였고 Ts의 분포범위는 7.2~105.0 h, 중앙값은 10.8 h로서 매우 다양한 분포를 보여 주었다. Tpot 역시 79.3에서 1,005.9 h까지 다양한 분포를 보이고 중앙값은 242.3 h였다. 이를 종양의 종류별로 구분하여 보았을 때 직장암에서 LI가 비교적 높은 수준이었고 자궁 경부암에서 Ts가 높은 값을 보였다 (Table 1).

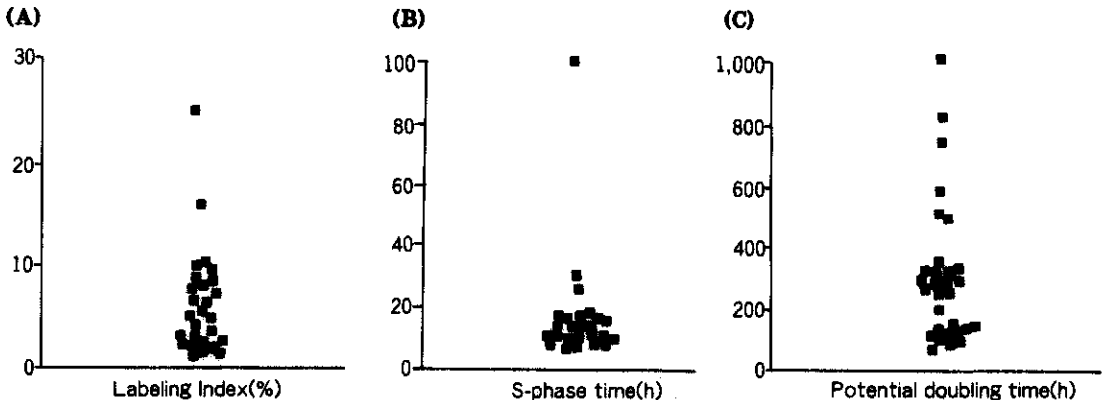


Fig. 1. Distribution of proliferation parameters of LI (A), Ts (B), and Tpot (C) of 33 epithelial cancers.

**Table 1. Summary of the proliferation parameters in 33 epithelial cancers**

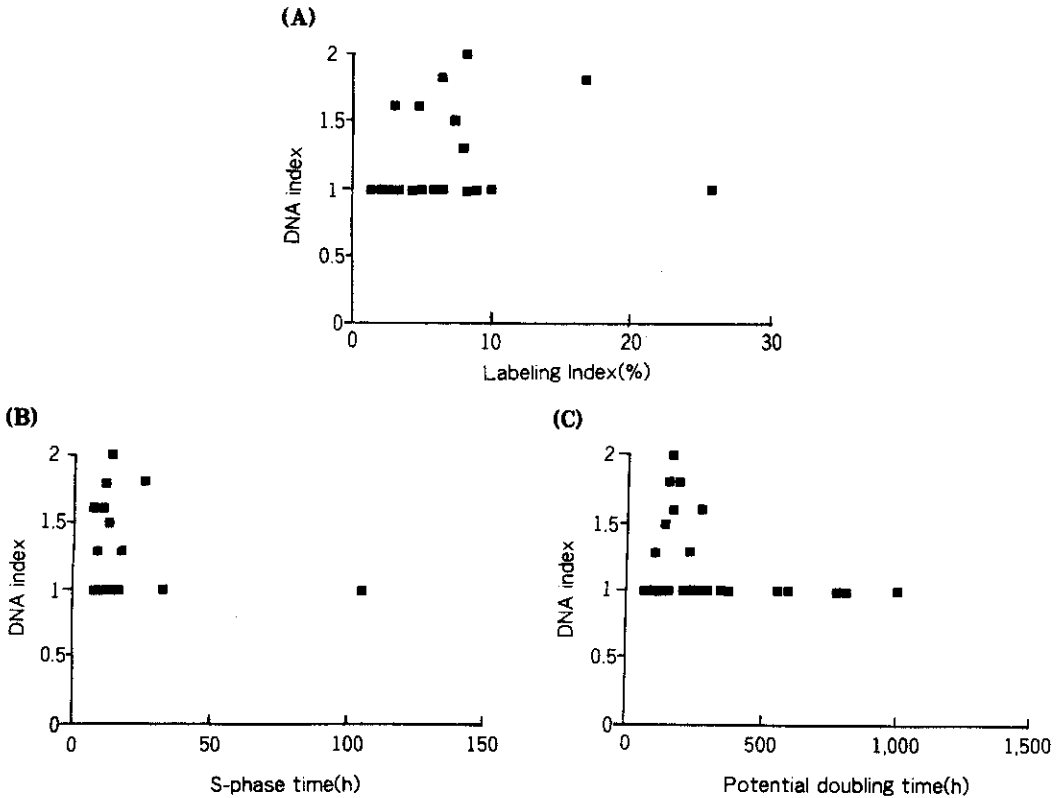
Tumor sites	No. of patients	LI(%)	Ts(h)	Tpot(h)
Uterine cervix	12	2.7(1.1-25.8)	14.05(9.2-105)	359.0(100.9-1005.9)
Rectum	9	8.0(3.1-16.8)	9.7(7.5-25.4)	151.1(80.4-242.3)
Head & Neck	7	4.3(1.9-8.4)	10.8(8.0-15.3)	257.5(79.3-546.1)
Bladder	5	3.5(2.5-7.8)	9.9(7.0-18.4)	236.4(144.8-278.2)
Total	33	4.5(1.1-25.8)	10.8(7.0-10.5)	242.3(79.3-1005.9)

\*median value (range)

**Table 2. Proliferation parameters by DNA ploidy**

Ploidy	No. of patients	LI(%)	Ts(h)	Tpot(h)
Diploidy	25	4.3(1.1-25.8)	10.5(7.0-105.0)	278.4(79.3-1,005.9)
Aneuploidy	8	7.5(2.9-16.8)	12.1(8.3-25.4)	166.7(104.3-278.2)

\*mean value (range)



**Fig. 2. The relationship between DNA index and proliferation parameters of LI (A), Ts (B), and Tpot (C) in 33 epithelial cancers.**

33예 중 8예(24.2%)에서 DNA 배수성이 aneuploidy를 보였다. 배수성을 수적으로 나타낸 DNA index와 세포 증식 지표와의 연관성을 분석한 결과가 Table 2와 Fig. 2에 나와 있다. DNA index가 1인 diploidy에서는 LI, Ts 및 Tpot 모두 넓은 분포 범위를 보이는 반면 DNA index가 1이 아닌 aneuploidy에서는 비교적 좁은 분포 범위에 속하는 양상을 보여 주었다. Aneuploidy군에서는 diploidy 군에 비하여 특히 LI가 높고, Tpot가 짧아 이 군에서 증식능이 활발한 것을 시사하고 있다.

## 고 찰

인체 종양에서 세포 역동학을 측정하고자 할 때 thymidine을 표지하여 autoradiography를 얻는 것이 일반적인 방법이었다. 그러나 이것은 시간이 많이 소요되고 각 시료마다 얻을 수 있는 정보가 제한될 뿐만 아니라 thymidine의 독성이 시행상 큰 제한점이 되었다<sup>17)</sup>. flow cytometry에 의한 세포 역동학 측정은 BUdR 표지를 기본으로 하며 전신적이나 국소적인 부작용이 없는 것으로 보고되고 있다<sup>9,14-16)</sup>. 본 연구에서도 이 검사법에 따른 부작용은 관찰되지 않았으며 조직 생검을 통해 얻은 시료를 준비 과정을 거쳐 flow cytometry 분석 후 결과를 얻기까지 약 2일간이면 충분하므로 임상적으로 시행이 용이한 검사법임이 확인되었다.

본 연구에서 세포 역동학 지표들 즉 LI, Ts, Tpot의 분포 범위가 각각 1.1~25.8%, 7.0~105.0 h, 79.3~1,005.9 h로서 매우 넓은 것으로 나타났다. 특히 Tpot는 최저치와 최고치가 약 120배 이상의 차이를 보이고 있는데 연구 대상에 다양한 부위의 다양한 조직유형(예: 선암, 편평상피암, 이행상피암 등)이 포함되었다는 점을 고려하여 각 종양 부위별로 분석하였으나(Table 1) 역시 다양한 분포범위를 나타내었다. 즉, 종양의 이행성을 다시 한번 확인할 수 있었다.

Lochrin등<sup>18)</sup>, Bourhis등<sup>16)</sup>이 두경부암에서 flow cytometry 분석을 시행한 결과 대상환자의 55%가 aneuploidy를 보였고 Terry등<sup>19)</sup>의 보고에서는 직장암 101예 중 73%가 aneuploidy를 보였다. 본 연구에서는 12예의 자궁 경부암과 7예의 두경부암 모두가 diploidy를 보였고 직장암과 방광암은 각각 55.6%

(5/9), 60% (3/5)의 aneuploidy를 보였다. 이 결과를 종양의 종류에 따른 차이라고 해석하기에는 아직 연구대상 예의 숫자가 적다. Terry등<sup>19)</sup>은 diploidy를 보이는 대상은 종양 세포가 아닌 정상 세포가 섞여 있는지 구별이 불가능하므로 aneuploidy를 보이는 대상에서만 Tpot의 측정이 의미가 있다고 주장하고 있다. 이 문제는 상당한 공감대를 형성하고 있는 현안으로서 Terry등<sup>20)</sup>과 Begg<sup>21)</sup>은 Tpot 등 세포 역동학 지표가 임상결과에 대한 예측적 검사로서의 의의를 가지려면 이 지표들이 실제 종양만을 대표하는 것들이어야 한다고 제시하였다. Flow cytometry 분석에서 diploidy를 보이는 종양세포에 정상세포가 섞였는지 알아 내기는 어렵다. 따라서 이를 위한 대안으로 첫째, cytokeratin에 대한 항체를 이용하여 정상 세포와 종양 세포를 구별하거나<sup>22,23)</sup> 둘째, 종양 특이 항체 또는 정상 조직으로서 섬유아세포, 림프구 등에 대한 항체를 사용하는 방법이 제시되고 있다. 마지막으로 조직 절편을 면역화학염색을 하여 직접 종양세포를 검색하여 LI를 측정하고 Ts만 flow cytometry로 얻는 방법이 제시되어 diploidy를 보이는 종양에서 유용할 것으로 생각되고 있다<sup>24)</sup>. 본 연구에서 50~60%의 aneuploidy를 보인 직장암, 방광암에서는 Tpot의 분포범위가 각각 80.4~242.3 h(중양값 151.1 h), 144.8~278.2 h(중양값 236.4 h)로서 최고치가 최저치의 2~3배 정도에 이르고 있다. 이와 비교하여 대상 모두가 diploidy를 보인 두경부암, 자궁경부암에서는 Tpot이 각각 79.3~546.1 h(중양값 257.5 h), 100.9~1,005.9 h(중양값 359.0 h)로서 최고치가 최저치의 7~10배에 이르고 있다. 즉 이들 diploidy를 보이는 종양에서는 배가 시간이 긴 정상 세포가 섞여서 함께 분석되었을 가능성을 배제할 수 없다.

종양 세포의 세포 역동학 지표들은 종양 고유의 방사선감수성(또는 내성)을 의미하지는 않는다. 이는 고전적인 분할 방사선치료시 치료 도중에도 증식이 활발하여 이를 대비한 변형된 방사선치료법을 적용해야 할 환자군을 선별하는 것에 의의가 있다. 유럽에서 시행된 제3상 연구의 예비적 결과에서는 두경부암에서 Tpot를 측정하고 통상적인 분할 방사선조사 또는 다분할 조사(accelerated fractionation)를 적용하였을 때 다분할 조사군에서는 Tpot 값과 국소제어율이 관련이 없었으나 통상적인 분할 조사군에서는 Tpot

가 짧은 경우 국소제어율이 낮게 나타났다<sup>25)</sup>. 즉 방사선조사 기간을 단축시킨 변형 조사법을 적용하였을 때는 Tpot가 짧은 종양이라도 국소제어가 효과적으로 될 수 있다는 것을 암시한다. 12일 동안에 54 Gy를 조사하는 극단적인 변형 조사법을 시행한 Lochrin 등<sup>10)</sup>의 연구에서도 Tpot는 종양의 국소제어에 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다. 대상 환자군을 균질화시켜 구인두암만 포함시킨 Bourhis 등<sup>10)</sup>의 연구에서는 통상적인 분할조사시 병기 T<sub>2</sub>에서만 Tpot의 의의가 있는 것으로 나타나서 Tpot이 예측적 의의는 있으나 어느 정도 제한적이고 종양의 크기 등 다른 요인이 관여하는 것으로 결론 짓고 있다. Tpot의 임상적 의의는 아직 입증되어야 하는 과정에 있는 것으로 생각된다. 그러나 방사선치료법을 선택하고 적용하는 지침으로서 현실점에서 가장 중요한 지표이며 diploidy인 종양 세포와 정상 세포들을 구분해내는 등 앞서 제시된 몇가지 문제점을 해결하기 위한 연구가 뒤따라야 할 것이다.

결 론

33예의 인체 상피 세포암을 대상으로 종양 세포 역동학의 지표들을 BUdR 표지하여 flow cytometry 분석을 하였다. LI, Ts, Tpot 등 지표들은 넓은 분포 범위를 보여서 세포 역동학에 있어서 종양 세포들의 이형성을 나타내었다. 24.2% (8예)에서만이 aneuploidy를 보였으며 나머지 diploidy인 종양들에서 정상 세포의 혼합 가능성을 배제할 수 없었다. 본 연구에서는 세포 역동학적으로 증식이 활발하여, 변형된 방사선조사법을 적용해야 할 환자군을 선별하고자 하였으며 이같은 예비적 결과를 토대로 방사선조사법의 변형 방식이나 적용중 등에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1) Fowler JF: Potential for increasing the differential response between tumors and normal tissues. Can proliferation rate be used? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **12**: 641, 1986  
 2) Withers HR, Taylor JMG, Maciejewski B: The hazard of accelerated tumor clonogen repopulation during radiotherapy. *Acta Oncol* **27**: 131, 1988

3) Dische S, Saunders M: The rationale for continuous hyperfractionated accelerated radiotherapy (CHART). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **19**: 1317, 1990  
 4) Horiot JC, Lefur N, Guyen T: Hyperfractionated compared with conventional radiotherapy in oropharyngeal carcinoma. An EORTC randomized trial. *Eur J Cancer* **26**: 779, 1990  
 5) Peters LJ, Brock WA, Chapman JD et al: Predictive assays of tumour radiocurability. *Am J Clin Oncol* **11**: 275, 1988  
 6) Begg AC, McNally NJ, Schrieve DC, Karcher H: A method to measure the duration of DNA synthesis and the potential doubling time from a single sample. *Cytometry* **6**: 620-626, 1985  
 7) Dolbeare F, Gratzner H, Pallavicini MG, Gray JW: Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *PNAS* **80**: 5573, 1983  
 8) Gratzner HG: Monoclonal antibody to S-bromo- and S-iodo-deoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* **218**: 474, 1982  
 9) Wilson G, McNally N: Measurement of cell proliferation using bromodeoxyuridine. In: Hall P, Levinson D, Wright N, eds. *Cell proliferation in clinical diagnosis*. Springer Verlag, Berlin, 1992: 113-136  
 10) Begg AC, Moonen L, Hofland I, Dessing M, Bartelink H: Human tumour cell kinetics using a monoclonal antibody against iododeoxyuridine: Intra-tumoral sampling variations. *Radioth. Oncol* **11**: 337-347, 1988  
 11) White RA, Meistrich ML: A comment on: A method to measure the duration of DNA synthesis and the potential doubling time from a single sample. *Cytometry* **7**: 486, 1986  
 12) White RA, Terry NH, Meistrich ML, Calkins DP: Improved method for computing potential doubling time from flow cytometric data. *Cytometry* **11**: 314, 1990  
 13) Terry NH, White RA, Meistrich ML, Calkins DP: Evaluation of flow cytometric methods for determining population potential doubling times using cultured cells. *Cytometry* **12**: 234, 1991  
 14) Nemoto R, Hattori J, Uchida K, Shimazui T,

- Nishijima Y, Koiso K, Harada M: *S-phase fraction of human prostate adenocarcinoma studied with in vivo bromodeoxyuridine labelling. Cancer* **66**: 509, 1991
- 15) Riccardi A, Danova M, Dianici P, Gaetani P, Cebrelli T, Batti G, Mazzini G, Wilson G: *Cell kinetics in leukemia and solid tumor studied with in vivo bromodeoxyuridine and flowcytometry. Br J Cancer* **59**: 898, 1989
- 16) Bourhis J, Wilson G, Wibault P, Bosq J, Chavaudra N, Janot F, Luboinski B, Eschwege F, Malaise EP: *In vivo measurement of the potential doubling time by flowcytometry in oropharyngeal cancer treated by conventional radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys* **26**: 793, 1993
- 17) Steel GG: *Growth kinetics of tumours. Oxford, UK, Clarendon, 1977, 181*
- 18) Lochrin CA, Wilson GD, McNally NJ, Dische S, Saunders MI: *Tumor cell kinetics, local tumor control and accelerated radiotherapy: a preliminary report. Int. J Radiat Oncol Biol Phys* **24**: 87, 1992
- 19) Terry NHA, Meistrich ML, Rich TA: *In vivo BrdUrd labeling index and response of rectal cancer following chemoradiotherapy. Abstracts of 42th Annual Meeting of the Radiation Research Society, p 133, Nashville TN, April 29-May 4, 1994*
- 20) Terry NHA, Brock WA, Hendry JH: *Workshop report; Future directions for predictive assays. Int J Radiat Biol* **64**: 335, 1993
- 21) Begg AC: *Critical appraisal of in situ cell kinetic measurements as a response predictors in human tumors. Semin Radiat Oncol* **3**: 144, 1993
- 22) Begg AC, Hofland I: *Cell kinetic analysis of mixed populations using three-color fluorescence flowcytometry. Cytometry* **12**: 445, 1991
- 23) Ramaekers FC, Beck HL, Feitz WF: *Application of intermediate filament proteins as tissue specific probes in the flowcytometric analysis of complex tumors. Anal Quant Cytol Histol* **8**: 271, 1986
- 24) Bennet MH, Wilson GD, Dische S: *Tumor proliferation assessed by combined histological and flowcytometric analysis: Implications for therapy in squamous carcinoma in situ with the monoclonal antibody Ki 67. Haematol Oncol* **2**: 365, 1984
- 25) Begg AC, Hofland I, Van Glabbeke M, Bartelink H, Horiot JC: *Predictive value of potential doubling time for radiotherapy of head and neck tumor patients; Results from the EORTC Cooperative trial 22851. Semin Radiat Oncol* **2**: 22, 1992