

## Matched comparison of p53, c-erb B2 and bcl-2 markers in breast cancer tissue and fine needle aspiration biopsy materials

### Meme karsinomlarında p53, c-erb B2 ve bcl-2 işaretleyicilerinin doku kesitinde ve ince iğne aspirasyon biyopsi materyallerinde karşılaştırmalı değerlendirilmesi

Esin Cengiz Boduroğlu, Sultan Çiğdem Irkkan, Tulu Ayata Kebat

Dr. A. Y. Ankara Onkoloji Eğitim Ve Araştırma Hastanesi, Patoloji Kliniği, Ankara, Türkiye

Dergiye Ulaşma Tarihi:28/08/2014 Dergiye Kabul Tarihi:08/01/2015 Doi: 10.5505/aot.2014.48568

#### ÖZET

**Amaç:** Meme karsinomlarında ince iğne aspirasyon biyopsisi tanının ve bir kısım prognostik parametrenin belirlenmesi için cerrahi biyopsinin yerine uygun bir alternatif olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmada ardışık gönderilen 100 mastektomi spesmeninde tümörden ince iğne aspirasyon biyopsi yöntemi ile elde edilen örnekte p53, bcl-2, c-erb B2 immün boyamaları yapılmış ve doku boyamaları ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

**Yöntemler:** Doku fiksasyonu ve takibi aşamaları sonucu antijenitede gelişebilecek değişikliklerin önlenmesi için doku kesitleri frozen yöntemle çalışılmıştır.

**Bulgular:** Frozen kesitlerde yeterlilik %98.67, ince iğne aspirasyon biyopsisi materyallerinde yeterlilik %99 olarak bulunmuştur. Her üç antikorun doku ve ince iğne aspirasyon biyopsisi boyanmaları arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Sitolojik materyalde p53 duyarlılığı düşük (%50) olmakla birlikte özgüllük yüksek bulunmuştur (%92.3). Diğer antikorlar için hem duyarlılık hem de özgüllük yüksek bulunmuştur (sırasıyla bcl-2 için %89.2 ve %92.5, c-erb B2 için %84.1 ve %89.6).

**Sonuç:** Bu bulgular ışığında meme karsinomlarında p53, bcl-2, c-erb B2 sitolojik materyalde güvenle kullanılabilir ancak p53 boyamasında duyarlılık düşük olduğu için yalancı negatif sonuç verebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Meme kanseri; Sitoloji; p53; c-erb B2; bcl-2

#### ABSTRACT

**Objective:** Fine needle aspiration (FNA) is accepted to be an appropriate alternative to surgical biopsy both for diagnosis and definition of some prognostic parameters in breast cancer. In this study, p53, bcl-2 and c-erb B2 immunoreactivity of 100 consecutive cases that both FNA and mastectomy performed were compared.

**Methods:** Frozen samples of tissue were used in the study in order to eliminate the effects of the tissue processing.

**Results:** The adequacy of samples was 98.67% for the tissue sampling and 99% for the FNA materials. There were statistically significant relationship between tissue and cytologic material for each of the three markers ( $p<0.05$ ). The sensitivity of p53 in cytologic material was quite low (50%) but sensitivity was high (92.3%). The sensitivity and the specificity for both bcl-2 and c-erb B2 were high (sensitivity 89.2%, 84.1% and specificity 92.5%, 89.6%, respectively).

**Conclusion:** Fine needle aspiration biopsy material could be used safely to determine p53, bcl-2, c-erb B2 in breast cancer, but it has to be kept in mind that the p53 specificity is quite low and p53 staining in cytologic material could lead to false negative results.

**Key words:** Breast cancer; Cytology; p53; c-erb B2; bcl-2

#### Giriş

Günümüz tıp uygulamalarında maliyet hesapları önem kazanmıştır. Pahalı ve uzun zaman alabilecek tanı yöntemlerini, doğruluğu ve güvenilirliği gösterilmiş daha kısa zamanda sonuçlanan ve daha ucuza mal olan yöntemlerle değiştirmek oldukça cazip

görülmektedir. Meme karsinomlarında ince iğne aspirasyon biyopsisinin (İİAB) tanısal amaçla insizyonel veya eksizyonel biyopsinin yerine geçebilen uygun ucuz ve kolay bir alternatif olduğu kabul edilmektedir (1-3). Doğruluğu %90'lara ulaşmaktadır (4,5). Ancak meme karsinomlarında artık tedaviye başlarken yalnızca tanının belirlenmiş olması



yetmemektedir. Kanser tanısı hücrel antijenlerin ve reseptörlerin gösterilmesi ile desteklenebilmekte ve böylece tedavinin şekillendirilmesi mümkün olmaktadır (6). Biyopsi materyallerinde hormon reseptörleri ile birlikte karsinogenezde rolü olduğuna inanılan ve prognostik önemleri netleşmemiş olsa da prognostik parametreler ile yakın ilişkisi bulunan bazı işaretleyicilerin ve prediktif belirleyicilerin de çalışılması gerekebilmektedir (7-10). Bu noktadan yola çıkarak çalışmamızda meme karsinomlarında sıklıkla araştırma konusu olan p53, bcl-2, c-erb B2 işaretleyicileri (11-16) immünohistokimya (İHK) boyama yöntemi kullanılarak, frozen kesit ve İİAB materyallerinde çalışılmış ve boyanma sonuçları karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada seçilen antikorlar hücre içinde değişik yerleşime sahip olup, yerleşim yerinin sitolojik materyalde zorluğa neden olup olmadığının da değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Bu çalışmaya Patoloji Laboratuvarına Eylül 1997-Aralık 1999 tarihleri arasında ardışık gönderilen, meme karsinomu nedeniyle mastektomi uygulanmış 100 adet olguya ait, rezidü tümör içeren mastektomi materyali dahil edilmiştir.

Olgulara ait cinsiyet, yaş, fizik muayene ve laboratuvar bulgularını içeren klinik bilgiler hastane dosyalarından ve patoloji raporlarından alınmıştır. Laboratuvarımıza gelen rezidü tümör içeren mastektomi spesmenlerindeki tümöral dokulardan saklanmak üzere frozen kesitleri alınmış, İİAB yapıp, yayma preparatlar hazırlanmıştır. Frozen kesitler fikse edilmeden, yayma preparatlar ise -20°C'de saf asetonda fikse edilerek derin dondurucuda -20°C de boyamaların yapılacağı zamana kadar saklanmıştır.

### *İmmünohistokimyasal boyama yöntemi*

Dondurucudan çıkarılan frozen kesitler ve yayma preparatlar oda sıcaklığında 10 dakika saf aseton ve ardından 10 dakika tris tampon (pH: 7.6) çözeltide bekletilmiştir. Protein bloğu takiben, anti- bcl-2 antikor (monoklonal, mouse 1/1000, Biogenex, USA), anti-p53 antikor (mono-

clonal, mouse, clone DO-7 konsantre, 1/3000, DAKO Glostrup DENMARK) ve anti-c-erb B2 antikor (Monoklonal, mouse, clone CD11 konsantre, 1/250, Biogenex, USA uygulanmış, buzdolabında +4 °C en az 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Yirmi dakika biotinlenmiş multilink (Biogenex, USA) sekonder antikorunu takiben 20 dk alkalen fosfataz konjuge streptovidin label (Biogenex, USA) uygulanmıştır. Her aşamada ara yıkamalar tris tampon ile yapılmıştır. New fuchsin substrat (Biogenex, USA) damlatılarak 40 dakika bekletilmiş ve distile su ile yıkanıp, Mayer's hematoksilen ile zıt boyama yapılmıştır.

İHK boyama sonuçları ışık mikroskopunda incelenmiştir. Bcl-2 için dokudaki lenfositler internal pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Tümör hücrelerindeki sitoplazmik boyanma pozitif olarak kabul edilmiştir. P53 ile yalnızca nükleer boyanma pozitif olarak kabul edilirken, c-erb B2 ile membranöz boyanma pozitif olarak değerlendirilmiştir. c-erb B2 ile sitoplazmik boyanmalar pozitiflik olarak kabul edilmemiştir. Ancak bütün materyallerde antikor dilüsyonu ile giderilemeyen, protein blok kullanılmasına ve +4 °C de uzun inkübasyona rağmen myoepitelyal boyanma izlenmiştir. Boyamalar yapılırken p53 ve c-erb B2 pozitif olduğu bilinen meme karsinomu örnekleri pozitif kontrol ve antikor aşaması tampon solüsyon ile değiştirilerek negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

İHK boyamalarda pozitiflik oranları semi-kantitatif olarak yüzde değerleri belirlenerek ve %25'den az, %26-75, %75'den fazla şeklinde gruplara ayrılarak derecelendirilmiştir (11).

Yayma preparatlar değerlendirilirken, preperatta en az 3 epitelyal hücre kümesinin görülmesi durumunda örnekleme yeterli olarak kabul edilmiştir (12). Üç hücre kümesi görülemeyen olgularda yedek yayma preparatlarına ikinci kez boyama uygulanmış, ikinci boyamada da en az üç hücre kümesi görülmeyenler yetersiz örnekleme olarak kabul edilmiştir.

### *Verilerin istatistiksel değerlendirmesi*

Sonuçlar "SPSS for windows" paket programında değerlendirilmiştir. Tüm ista-



tistiklerde en küçük anlamlılık sınırı 0.05 olarak kabul edilmiştir. Değerlendirmede bağımlı grup oranlarının karşılaştırmasında “Mc Nemar” testi kullanılmıştır.

Duyarlılık ve özgüllük hesaplamaları aşağıda verilen formüller kullanılarak yapılmıştır:

Duyarlılık = gerçek pozitiflik x 100/ örnek sayısı

Özgüllük = yalancı pozitiflik x 100/ örnek sayısı

## Sonuçlar

Çalışma grubu 100 olgudan oluşmaktadır. Olgulara ait tümörlerin histopatolojik tipleri Tablo 1’de verilmektedir. Tümörlü dokulara ait frozen kesitlerin hazırlanmasında yetersiz örnek sayısının 300 örnek içinde 4 adet (%1.33), yayma preparatlarda ise 300 örnek içinde 3 adet (%1) olduğu izlenmektedir (Tablo 2).

**Tablo 1.** Çalışma grubunda tümörlerin histopatolojik tipleri

Histopatolojik tip	Olgu sayısı	%
İnvaziv duktal karsinom	81	81
İnvaziv lobüler karsinom	10	10
İnvaziv duktal ve invaziv lobüler karsinom	3	3
İnvaziv papiller karsinom	1	1
İnvaziv duktal ve müsinoz karsinom	2	2
Metaplastik karsinom	3	3

Tümör frozen kesitleri ve yayma preparatlarına uygulanan p53, bcl-2 ve c-erb B2 İHK boyamaların sonuçlarının değerlendirmesi Tablo 2’de görülmektedir

Tümör dokularına uygulanan bcl 2, p53 ve c-erb B2 İHK boyamalarının frozen kesitler ile yayma preparatlarda karşılaştırılması aşağıda sırayla verilmektedir. Tümöre ait bcl-2 İHK boyama sonuçları Tablo 3’te izlenmektedir.

İİAB’de bcl-2 boyamasının duyarlılığı %89.2, özgüllük %92.5 olarak

bulunmuştur. Tümör dokularına ait frozen kesit ve yayma preparatlarda izlenen p53 İHK boyanmasının karşılaştırılması Tablo 4’de verilmektedir. İİAB’de p53 boyamasının duyarlılığı %50, özgüllük %92.3 olarak bulunmuştur. Tümör dokularına ait frozen kesit ve yayma preparatlarda izlenen c-erb B2 İHK boyanması karşılaştırma sonuçları Tablo 5’de verilmektedir. İİAB’de c-erb B2 boyamasının duyarlılığı %84.1, özgüllük %89.6 olarak bulunmuştur.

## Tartışma

İİAB’de yeterlilik araştırılması, tanımlanması gereken önemli bir noktadır. Alınan örneklerin dokuları temsil edip etmediğinin belirlenmesi gerekir. Çalışmamızda materyal örnekleme yeterliliği incelendiğinde hem frozen kesitlerde hem yayma preparatlarda yetersiz örneklemlerin olduğu gözlenmiştir. Kesitler için toplam 300 örnek içinde 4 adet (%1.33), yayma preparatlar için yine toplam 300 örnek içinde 3 adet (%1) örnek yeterlilik kriterlerini sağlayamamıştır (Tablo 2). Yeterlilik kriterlerinin farklı belirlenmesi yetersiz örnek sayısını yakından ilgilendirmektedir. Meme İİAB lerinde yetersiz örnek miktarı %20.2-34 olabilmektedir. Kline ve ark.’nın çalışmasında yayma preparatların yeterli olarak değerlendirilmesi için minimum gerekli epitelyal küme sayısı 6’dan bire indirildiğinde yetersiz preparat oranı %13.7’ye düşmüştür (17).

Çalışma grubuna İHK yöntemle p53, bcl-2 ve c-erb B2 antikorları hem frozen kesitlere hem yayma preparatlara uygulanmıştır. Doku takibinin getireceği antijen maskelenmesini ortadan kaldırmak amacıyla yayma materyalinin kıyaslanmasında frozen kesitlerin kullanılması uygun görülmüştür.

Tümöral dokulara ait frozen kesitlerde p53 pozitif olgu sayısı 28 (%28) iken yayma preparatlarda p53 pozitif olgu sayısı 14’e (%14) düşmüştür (Tablo 2). Yetersiz materyal miktarı aynı kalırken kesitte pozitif olan



**Tablo 2.** Tümör frozen kesitleri ve yayma preparatlarına uygulanan p53, bcl-2 ve c-erb B2 immünohistokimyasal boyamaların sonuçları.

		Frozen kesit		Yayma preparatlar	
		sayı	yüzde	sayı	yüzde
P53	yetersiz materyal	1	1	1	1
	negatif boyanma	71	71	85	85
	pozitif boyanma	28	28	14	14
Bcl-2	yetersiz materyal	-	-	-	-
	negatif boyanma	17	17	20	20
	pozitif boyanma	83	83	80	80
c-erb B2	yetersiz materyal	3	3	2	2
	negatif boyanma	14	14	20	20
	pozitif boyanma	83	83	78	78
TOPLAM	yetersiz materyal	4	1.33	3	1.00
	negatif boyanma	102	34.00	125	41.67
	pozitif boyanma	194	64.67	172	57.33

**Tablo 3.** Tümör dokularına ait frozen kesit ve yayma preparatlarda izlenen bcl-2 immünohistokimyasal boyanmasının karşılaştırılması.

Tümör frozen kesitlerde p53 ekspresyonu	Tümör yayma preparatlarında bcl-2 ekspresyonu				p değeri		
	Yok	%1-25	%26-75	%76 üzeri			
	n	%	n	%	n	%	
yok	11	64.7	4	23.5	1	5.9	*0.000
%1-25	3	23.1	6	46.2	1	7.7	
%26-75	3	25.0	4	33.3	4	33.3	
%76 ve üzeri	3	5.2	7	12.1	24	41.4	

\*: istatistiksel olarak anlamlı (Mc Nemar testi)

**Tablo 4.** Tümör dokularına ait frozen kesit ve yayma preparatlarda izlenen p53 immünohistokimyasal boyanmasının karşılaştırılması.

Tümör frozen kesitlerde p53 ekspresyonu	Tümör yayma preparatlarında p53 ekspresyonu				p değeri		
	Yok	%1-25	%26-75	%76 üzeri			
	n	%	n	%	n	%	
yok	69	98.6	0	0.0	1	1.4	*0.000
%1-25	12	80.0	3	20.0	0	0.0	
%26-75	1	11.1	1	11.1	7	77.8	
%76 ve üzeri	3	75.0	0	0.0	0	0.0	

\*: istatistiksel olarak anlamlı (Mc Nemar testi)

olguların %50'sinin yayma preparatlarda negatif olarak bulunması dikkat çekicidir. Ancak istatistiksel değerlendirmede kesitlerdeki boyanma ile sitolojik materyaldeki boyanma arasında istatistiksel olarak anlamlı

bir ilişki saptanmıştır (p=0.000) (Tablo 4). Değişik çalışmalarda frozen kesitlerde p53 pozitifliği %38.5 ile %52 arasında değişmektedir (18,19). Çalışmamızdaki pozitiflik



oranı bu değerlere göre düşüktür. Literatürde p53 pozitifliğinin değişik antikörlerin kullanılması ve laboratuvar farklılıklarına bağlı olarak değişik oranlarda görüldüğü belirtilmektedir

(20, 21). Sitolojik materyalde p53 İHK boyamalarında pozitiflik oranı %13 ile %57

**Tablo 5.** Tümör dokularına ait frozen kesit ve yayma preparatlarda izlenen p53 immünohistokimyasal boyanmasının karşılaştırılması.

Tümör frozen kesitlerde p53 ekspresyonu	Tümör yayma preparatlarında c-erb B2 ekspresyonu				p değeri
	Yok n %	%1-25 n %	%26-75 n %	%76 üzeri n %	
yok	6 42.9	7 50.0	1 7.1	0 0.0	*0.000
%1-25	5 31.3	8 50.0	3 18.8	0 0.0	
%26-75	4 21.1	2 10.5	9 47.4	4 21.1	
%76 ve üzeri	4 8.5	11 23.4	18 38.3	14 29.8	

\*: istatistiksel olarak anlamlı (Mc Nemar testi)

arasında bildirilmektedir (22,23). Çalışmamızda elde ettiğimiz %14'lük pozitiflik literatür ile uyumlu görünmektedir. Ancak İİAB materyallerinde frozen kesitlere göre pozitiflik oranının düşmüş olması nedeniyle sitolojik materyalde p53 boyanmasının duyarlılığı (sensitivite) %50, özgüllüğü (spesifisite) %92.3 olarak bulunmuştur. Çalışma grubumuzda frozen kesitlerde p53 pozitif olan olgularda boyanmanın sıklıkla %1-25 arası hücrede olduğu dikkati çekmektedir yani p53 pozitifliği yaygın olarak saptanmamıştır (Tablo 4). İİAB de doku örneklerine göre daha az hücre elde edilir, p53 boyamalarında zaten yaygın olmayan pozitif hücrelerin daha da seyrelip örnekler rastlamamış olma olasılığı bu sonucu doğurmuş olabilir.

Hori ve ark.'nın frozen kesitlerde bcl-2 boyaması yaptıkları çalışmalarında %80.8 olgunun pozitif olduğu gözlenmektedir (24). Parafine gömülü dokulardan elde edilen boyamalarda pozitiflik frozen kesitlerdeki gibi olabileceği gibi daha düşük de olabilmektedir (25,26). Sitolojik materyalde bcl-2 pozitifliği %65 olarak bildirilmektedir (27). Çalışmamızda yayma preparatlarda bcl-2'nin literatüre göre yüksek bulunması örneklerin operasyon yapıldıktan sonra çok çabuk hazırlanıp hemen -20°C aseton ile fikse edilmesine bağlı olabilir.

Dokuların oda sıcaklığında beklemesinin bcl-2 overekspresyonunu azalttığı bilinmektedir. Çalışmamızda tümöral dokuda frozen kesitler ve yayma preparatlardaki bcl-2 overekspresyonu arasında istatistiksel öneme sahip bir ilişki saptanmıştır (p=0.000) (Tablo 3). Böylece sitolojik materyalde izlenen bcl-2 boyamasının frozen kesitlerdeki ile paralel olduğu söylenebilir. İİAB'nin duyarlılığı bcl-2 boyaması için %89.2, özgüllüğü ise %92.5 olarak bulunmuştur. Bu bulgu ile de İİAB'de bcl-2 İHK boyamasının güvenilir sonuçlar verdiği söylenebilir.

Tümöral dokulara yapılan c-erb B2 İHK boyamalarında frozen kesitlerde 83 (%83) olgu pozitif boyanma gösterirken, yayma preparatlarda 78 (%78) olgu pozitif boyanma göstermektedir. Meme kanserlerinde c-erb B2 overekspresyonu %11 ile %42 arasında değişen oranlarda bildirilmektedir (28-30). Troncone ve ark.'nın çalışmalarında frozen kesitlerde c-erb B2 pozitifliğini %42, İİAB materyalinde pozitifliği %48 olarak bildirmektedirler (31). Çalışmamızda c-erb B2 overekspresyonunun yüksek çıkmasının bir nedeni boyamanın frozen kesitlere yapılmış olması, bir diğer nedeni de çalışma grubunun kötü prognostik parametrelere sahip olan olguları yüksek oranda içermesi olabilir. Çalışmamızda tümöral dokuda frozen kesitler ve yayma preparatlardaki c-erb B2 overekspresyonu





arasında istatistiksel öneme sahip bir ilişki saptanmıştır (p=0.000) (Tablo 5). Böylece sitolojik materyalde izlenen c-erbB-2 boyamasının frozen kesitlerdeki ile kısmen paralel olduğu söylenebilir. İİAB'nin duyarlılığı c-erb B2 boyaması için %84.1, özgüllüğü ise %89.6 olarak bulunmuştur.

Literatürde meme İİAB'lerinde tanı amaçlı yapılan çalışmalarda duyarlılık ve özgüllüğün yüksek olduğu bildirilmektedir (32). Palombini ve ark.'nın 1956 olgu içeren çalışmalarında meme kitlelerinde yapılan İİAB'nin tanısallık duyarlılığı %95.7, özgüllüğü % 89.6 olarak bildirilmektedir (33). İİAB'lerde duyarlılık (sensitivite) değişik faktörlerden etkilenmektedir; 1) örneğin yeterliliği, 2) preparatın iyi hazırlanması, 3) boyanın başarısı (12). Çalışmamızda tümöral dokudan yapılan İİAB örneklemelerindeki p53, bcl-2 ve c-erb B2 İHK boyanmalarını değerlendirdiğimizde şu sonuçları elde etmekteyiz; yayma preparatlarında P53 ekspresyonuna bakıldığında, frozen preparatlarda pozitif olan olguların önemli bir kısmında yalancı negatif sonuç vermektedir. P53 için sitolojik materyalde duyarlılık düşük olmakla birlikte özgüllük yüksektir yani yalancı pozitif oranı tatmin edici oranda düşüktür. Aynı değerlendirmeyi bcl-2 işaretleyicisi için yaptığımızda sitolojik materyalde hem yalancı negatif hem de yalancı pozitif sonuçların az olduğunu dolayısı ile bcl-2 İHK boyamasının rahatlıkla sitolojik materyalde kullanılabilmesini ve güvenilir olduğunu görmekteyiz. Son işaretleyici c-erb B2'de bcl-2'de olduğu gibi yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip bulunmuştur ve güvenle İİAB materyallerinde kullanılabilir. C-erb B2'nin meme karsinomlarında tedavi seçimlerini etkilemesi nedeniyle İİAB materyalinde güvenilir sonuçlar vermesinin ayrı bir önemi olduğuna inanıyoruz.

Elde ettiğimiz bu bulguların ışığında meme karsinomlarında p53, bcl-2, c-erb B2 için İİAB materyallerinin kullanılabilmesini düşünüyoruz. Ancak p53 boyamasında özellikle pozitifliğin yaygın olmadığı (%1-25 pozitiflik izlenen) olgularda duyarlılığın düşük olduğu yani yalancı negatif sonuç verebileceği akıld tutulmalıdır.

Doku takibi uygulanmadığından frozen kesitlerle sitolojik materyal, antijenitelerini korumaları bakımından birbirleri ile eşdeğer görülebilir. Frozen kesitler ile karşı-

laştırıldığında İİAB materyallerinde İHK uygulaması meme kanseri taramalarında ucuz ve kolay bir yöntem olarak kullanılabilir. Yeterlilik sorununa karşı hazırlanan preparat sayısının fazla olması etkili olabilir.

**Çıkar Çatışması: Yok**

## Kaynaklar

1. Bell DA, Hajdu SI, Urban JA, Gaston JP. Role of aspiration cytology in the diagnosis and management of mammary lesions in office practice. *Cancer* 1983;51:1182-9
2. Rimm DL, Stastny JF, Rimm EB, et al. Comparison of fine-needle aspiration and open surgical biopsy as methods for obtaining a pathologic diagnosis. *Cancer Cytopath* 1997;81:51-6
3. Rosenthal DL. Breast lesions diagnosed by fine needle aspiration. *Pathol Res Pract* 1986;181:645-6
4. Gupta RJ, Dowle CS, Simpson JS. The value of needle aspiration cytology of the breast, with an emphasis on the diagnosis of breast disease in young women below the age of 30. *Acta Cytologica* 1990;34:165-8
5. Norton LW, Davis JR, Wiens JL, et al. Accuracy of aspiration cytology in detecting breast cancer. *Surgery* 1984;96:806-14
6. Mitteldorf CA, Alves VA, Kanamura CT, Carneiro PC. Immunocytochemistry applied to aspiration biopsy cytology. *Acta Cytologica* 1999;43:218-26
7. Bozzetti C, Nizzoli R, Naldi N, et al. Bcl-2 expression on fine-needle aspirates from primary breast carcinoma: correlation with other biologic factors. *Cancer* 1999;87:224-30
8. Fritzsche FR, Bode PK, Moch H, Kristiansen G, Varga Z, Bode B. Determination of the Her-2/neu gene amplification status in cytologic breast cancer specimens using automated silver-enhanced in-situ hybridization (SISH). *Am J Surg Pathol* 2010;34:1180-5
9. Hemachandran M, Nijhawan R, Joshi K. Cytological grading, apoptosis, and Bcl-2 protein expression in breast cancer. *Diagn Cytopathol* 2002;26:356-9
10. Park K, Han S. Cytologic Evaluation of p53, Cyclin D1, and Cathepsin D and Their Correlation with Histologic Sections in Primary Breast Carcinoma. *J Korean Breast Cancer Soc* 2002;5:113-7
11. Slooten HJ, Clahsen PC, Dierendonck JH, et al. Expression of Bcl-2 in node-negative breast cancer is associated with various prognostic factors, but does not predict response to one course of perioperative chemotherapy. *Br J Cancer* 1996;74:78-85
12. Layfield LJ, Mooney EE, Glasgow B, et al. What constitute an adequate smear in fine-needle aspiration cytology of the breast? *Cancer Cytopathol* 1997;81:16-21
13. Friedrichs K, Gluba S, Eidtmann H, Jonat W. Overexpression of p53 and prognosis in breast cancer. *Cancer* 1993;72:3641-7



14. O'Malley FP, Saad Z, Kerkvliet N, et al. The predictive power of semiquantitative immunohistochemical assessment of p53 and c-erbB-2 in lymph node-negative breast cancer. *Hum Pathol* 1996;27:955-63
15. Poller DN, Hutchings CE, Galea M, et al. p53 protein expression in human breast cancer: Relationship to expression of epidermal growth factor receptor, c-erbB-2 protein overexpression and oestrogen receptor. *Br J Cancer* 1992;66:583-8
16. Davidoff AM, Herndon II JE, Glover N, et al. Relation between p53 overexpression and established prognostic factors in breast cancer. *Surgery* 1991;110:259-64
17. Kline TS. Adequacy and aspirates from the breast: a philosophical approach. *Diagn Cytopathol* 1995;13:470-2
18. Allred DC, Clark GM, Elledge R, et al. Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:200-6
19. Poller DN, Hutchings CE, Galea M, et al. p53 protein expression in human breast cancer: Relationship to expression of epidermal growth factor receptor, c-erbB-2 protein overexpression and oestrogen receptor. *Br J Cancer* 1992;66:583-8
20. Fisher CJ, Gillett CE, Vojtesek B, et al. Problems with p53 immunohistological staining: the effect of fixation and variation in the methods of evaluation. *Br J Cancer* 1994;69:26-31
21. Horne GM, Anderson JJ, Tiniakos DG, et al. P53 protein as a prognostic indicator in breast carcinoma: a comparison of four antibodies for immunohistochemistry. *Br J Cancer* 1996;73:29-35
22. Elledge RM, Allred DC. The p53 tumor suppressor gene in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 1994;32:39-47
23. Ioakim-Liossi A, Markopoulos C, Karakitsos P, et al. p53 protein expression in benign and malignant breast lesions. *Acta Cytol* 1998;42:918-22
24. Hori M, Nogami T, Itabashi M, et al. Expression of bcl-2 in human breast cancer: Correlation between hormone receptor status, protein accumulation and DNA strand breaks associated with apoptosis. *Pathology International* 1997;47:757-76
25. Zhang GJ, Kimijima I, Abe R, et al. Correlation between the expression of apoptosis-related bcl-2 and p53 oncoproteins and the carcinogenesis and progression of breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 1997;3:2329-35
26. Zhang G, Kimijima I, Tsuchiya A, Abe R. The role of bcl-2 expression in breast carcinomas. *Oncology Reports* 1998;5:1211-6
27. Troncone G, Zeppa P, Vetrani A, et al. Bcl-2 protein in breast cancer cells obtained by fine needle aspiration (FNA). *Cytopathology* 1995;6:219-25
28. Albanell J, Bellmunt J, Molina R, et al. Node-negative breast cancers with p53 (-)/HER2-neu (-) status may identify women with very good prognosis. *Anticancer Res* 1996;16:1027-32
29. Toikkanen S, Helin H, Isola J et al. Prognostic significance of HER2 oncoprotein expression in breast cancer: a 30-year follow-up. *J Clin Oncol* 1992;10:1044-8
30. Slamon D.J., Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the HER2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244: 707-712
31. Troncone G, Panico L, Vetrani A, et al. c-erbB-2 expression in FNAB smears and matched surgical specimens of breast cancer. *Diagn Cytopathol* 1996;14:135-9
32. Rimm DL, Stastny JF, Rimm EB, et al. Comparison of fine-needle aspiration and open surgical biopsy as methods for obtaining a pathologic diagnosis. *Cancer Cytopathol* 1997;81:51-6
33. Palombini L, Fulciniti F, Vetrani A, et al. Fine-needle aspiration biopsies of breast masses. *Cancer* 1988;61:2273-7

