

# TENDON KILIFININ DEV HÜCRELİ TÜMÖRÜNDE Kİ-67, CD68 VE KANİBALİZM ANALİZİ

## Analysis of Cannibalism, Ki-67 And CD68 in Giant Cell Tumor of Tendon Sheath

Aydan KILIÇARSLAN, Hayriye TATLI DOĞAN, Nuran SÜNGÜ

### ÖZET

**Amaç:** Tendon kılıfının dev hücreli tümörü(TKDHT) nispeten yavaş büyüyen, tendon kılıfı ve sinovial hücrelerden orijin alan bir tümördür. TKDHT lezyonlarının çoğu el ve ayak parmaklarının tendon kılıflarından gelişir. Bu çalışmada amaç retrospektif olarak 45 olguyu klinikopatolojik olarak incelemek, proliferasyon aktivitesinin ve kanibalizm varlığının lokal rekürrens oranına etkisini araştırmaktır.

**Gereç ve Yöntemler:** Hastanemizde 2005-2014 yılları arasında TKDHT tanısı alan 45 olgu retrospektif olarak değerlendirildi. Hastaların yaşı, cinsiyeti, tümör lokalizasyonu, lokal rekürrens varlığı, Ki-67 proliferasyon indeksi, CD68 ile boyanan dev hücre oranı ve kanibalistik hücre varlığı değerlendirildi.

**Bulgular:** Hastaların 21'i kadın, 24'ü erkek ve yaş ortalaması 41.3 (12-68) idi. Tümör en sık el parmaklarında (36 hasta, %80) yerleşim göstermekteydi. 3 hastada lokal rekürrens gözlemlendi. Serimizdeki TKDHT'inde Ki-67proliferasyon indeksi ortalaması % 12,9'du. CD68 ile 33 hastada (%73) boyanma görüldü. Kanibalistik hücre varlığı 22 hastada (%48,8) mevcuttu. Lokal rekürrens gösteren hastaların hepsinde Ki-67 proliferasyon indeksi (%20) olarak saptandı. Ayrıca lokal rekürrens gösteren hastaların hepsinde CD68 ile pozitif boyanma (yaygın paternde) ve kanibalistik hücre (%10'un üzerinde) varlığının olduğu dikkati çekmiştir. Kanibalistik hücre varlığı açısından lokal rekürrens gösteren ve lokal rekürrens göstermeyen hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p=0,045$ ).

**Tartışma ve Sonuç:** Ki-67 proliferasyon indeksinin yüksek olması ve kanibalistik hücrelerin varlığı TKDHT'de lokal rekürrens olasılığını tahmin etmede önemli bir prediktif belirleyici olabilir. Ancak hasta sayımız yeterince fazla olmadığından daha geniş serilerde yeni araştırmalarla desteklenmesi önerilir.

**Anahtar Sözcükler:** Tendon kılıfının dev hücreli tümörü; Kanibalizm; Ki-67; CD68; Rekürrens

### ABSTRACT

**Objectives and Introduction:** Giant cell Tumor of Tendon Sheath(GCTTS) is a slow growing tumor and it origins from tendon sheath and synovial cells. GCTTS lesions generally occur on fingers' and toes' sheaths. In this study our aim is to clinopathologically review 45 retrospective cases and find the effect of proliferation activity and cannibalism on local recurrence.

**Material and Methods:** 45 cases diagnosed with GCTTS between the years 2005 and 2014 in our hospital evaluated retrospectively. Patients' age, gender, tumor localization, local recurrence occurrence, Ki-67 proliferation index, CD68 stained giant cell ratio and cannibalistic cell existence is evaluated.

**Results:** 21 of the patients are female, 24 of the patients are male and the average age is 41.3 (12-68). Tumor localization is mostly seen on fingers(36 patients, 80%). Local recurrence is observed in 3 patients. In our series of patients,average Ki-67 proliferation index in GCTTS is 12,9% and in 33 patients CD68 staining is observed (73%). In 22 patients(48,8%) cannibalistic cell existence is detected. For all patients who showed local recurrence, Ki-67 proliferaton index (20%), CD68 staining ratio was common and cannibalistic cell ratio was above 10%. The presence of cannibalistic cell was statistically significant in the cases with local recurrence ( $p=0,045$ )

**Discussion and Conclusion:** High levels of Ki-67 proliferation index and existence of cannibalism could be a predictive discovery in prediction of GCTTS local recurrence. However our patient range was not wide enough. We suggest further research on wider series to enlighten this subject.

**Keywords:** Giant cell tumor of the tendon sheath; Cannibalism; Ki-67; CD68, Recurrence

Ankara Yıldırım Beyazıt  
Üniversitesi, Patoloji Anabilim Dalı,  
Ankara

Aydan KILIÇARSLAN, Yrd. Doç. Dr.  
Hayriye TATLI DOĞAN, Yrd. Doç. Dr.  
Nuran SÜNGÜ, Yrd. Doç. Dr.

### İletişim:

Yrd. Doç. Dr. Aydan KILIÇARSLAN  
Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi,  
Patoloji Anabilim Dalı, Ankara  
Tel: 05055619579  
e-mail:  
dr.kilicaydan@gmail.com

Geliş tarihi/Received: 24.06.2017  
Kabul tarihi/Accepted: 01.08.2017

Bozok Tıp Derg 2017;7(3):20-5  
Bozok Med J 2017;7(3):20-5

## GİRİŞ

Tendon kılıfının dev hücreli tümörü (TKDHT) nispeten yavaş büyüyen, tendon kılıfı ve sinovial hücrelerden köken alan bir tümördür. Gangliyon kistinden sonra ikinci sıklıkta rastlanan el tümörüdür. En sık parmakların palmar yüzeyine yerleşir (1). Diğer yerleştiği yerler el - ayak bileği, dirsek ve diz bölgesidir (2). TKDHT kendi içinde lokalize ve diffüz olarak ikiye ayrılır. Lokalize tip en yaygın görülen tipi olup parmaklara yerleşim gösterir. Diffüz tip (pigmente villonodüler sinovitis) nadir görülür ve eklem yerleşimlidir (3). Bu tümörde yuvarlak ve poligonal histiyosit benzeri hücreler ve bunlara eşlik eden dev hücreler, köpüksü hücreler ve hemosiderin ihtiva eden hücrelerden meydana gelir (4,5). TKDHT tedavisi cerrahidir. Eksizyon sonrası rekürrens oranı yüksektir. Rekürrensin önlenmesi için lezyonunun tamamının eksizyonu ve varsa uydu lezyonların çıkarılması gerekir (3,6).

Kanibalizm tümör kitlesi içinde yaşayan tümör hücrelerinin sindirilmesidir. Bu sürecin rolü hala tam olarak anlaşılammıştır. Daha önceki çalışmalarda kanibalizmin malign tümörler ve malign hücrelerin metastazları ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir (7,8,9). A.Fernandez-Flores'in yaptığı bir çalışmada TKDHT olgularında kanibalistik hücrelere yüksek oranda (%84,34) rastlanmıştır (10). Bu çalışmadaki amaçımız retrospektif 45 hastanın klinikopatolojik olarak incelenmesi, proliferasyon aktivitesinin ve kanibalizm varlığının lokal agresiflik ve rekürrens oranına etkisini araştırmaktır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

2005-2014 tarihleri arasında TKDHT tanısı alan 61 hastadan takibe gelebilen 45 hasta retrospektif olarak incelendi. Hastaların yaşı, cinsiyeti, tümör lokalizasyonu ve lokal rekürrens oranı değerlendirildi. Retrospektif olarak patoloji departman arşivindeki bu 45 hastanın preparatları yeniden incelendi. İnceleme sonunda sellüler olan bir parafin bloktan, pozitif şarjlı lamalar üzerine 3-4µ kalınlıkta doku kesiti alındı. Benchmark GX otomatik boyama platformunda (Ventana medical systems, Tuscon, AZ, US) Ki-67 (Thermo scientific, SP6 klonu) ve CD68 (Thermo scientific, KP1 klonu)

immünohistokimyasal boyaması uygulandı.

### **Ki-67 immünohistokimyasal boyamasının değerlendirilmesi**

Tümör hücrelerindeki nükleer boyanma pozitif olarak kabul edildi. Doku üzerinde en yüksek boyanan alan seçilerek, 100'lük büyütme alanında boyanan hücre oranı (%) Ki-67 proliferasyon indeksi olarak kabul edildi.

### **CD68 immünohistokimyasal boyamasının değerlendirilmesi**

Tümör hücrelerindeki sitoplazmik boyanma pozitif olarak kabul edildi. CD68 ile boyanma yüzdesi %5 altında olanlar negatif, %5- %30'un altında ise fokal, %30 üzerinde ise yaygın olarak derecelendirildi.

### **Kanibalistik hücre varlığı değerlendirilmesi**

CD68 immünohistokimyasal boyaması uygulanmış preparat üzerinde osteoklast benzeri dev hücrelerin sitoplazmalarında daha küçük tümör hücresinin bulunması kanibalistik hücre olarak kabul edildi. Sitoplazmalarında eritrosit ve lökosit bulunduran dev hücreler değerlendirilmeye alınmadı. Kanibalistik hücre varlığı %10 altında ise seyrek, %10'un üzerinde ise yaygın olarak derecelendirildi.

### **İstatistiksel analiz**

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde gruplar arasındaki farklılıkları göstermek için nonparametrik veriler için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Tanımlayıcı istatistik olarak Ortalama, Standart Sapma (Standart Hata) ve Ortanca (Min-Max) kullanıldı. P<0.05 olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

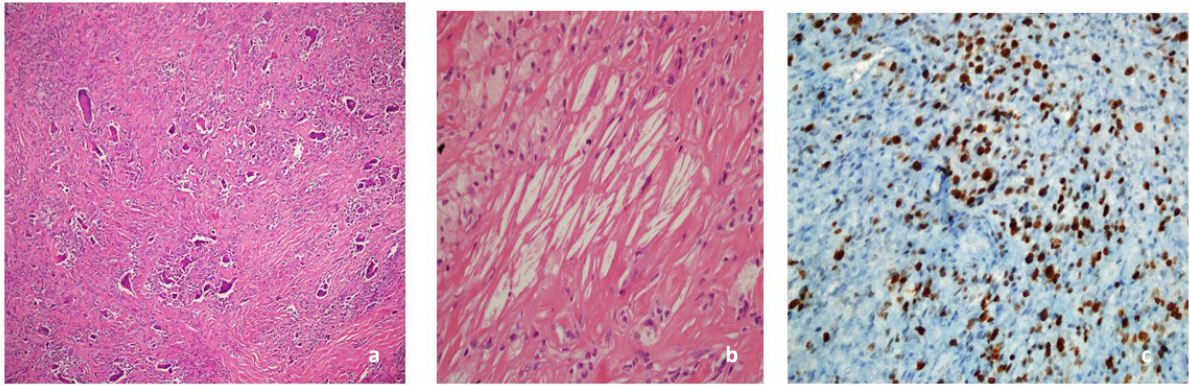
## BULGULAR

TKDHT nedeni ile cerrahi uygulanan hastaların 21'i kadın, 24'ü erkek ve yaş ortalaması 41.3 (12-68) idi. Tümör lokalizasyonu en sık el parmaklarında (36 hasta, %80) yerleşim göstermekteydi. Tüm hastalara marjinal eksizyon uygulandı. Hastaların takiplerinde muayene, ultrasonografi, x-Ray ve gerekli durumlarda manyetik rezonsans görüntüleme (MRI) kullanıldı. Bizim hasta

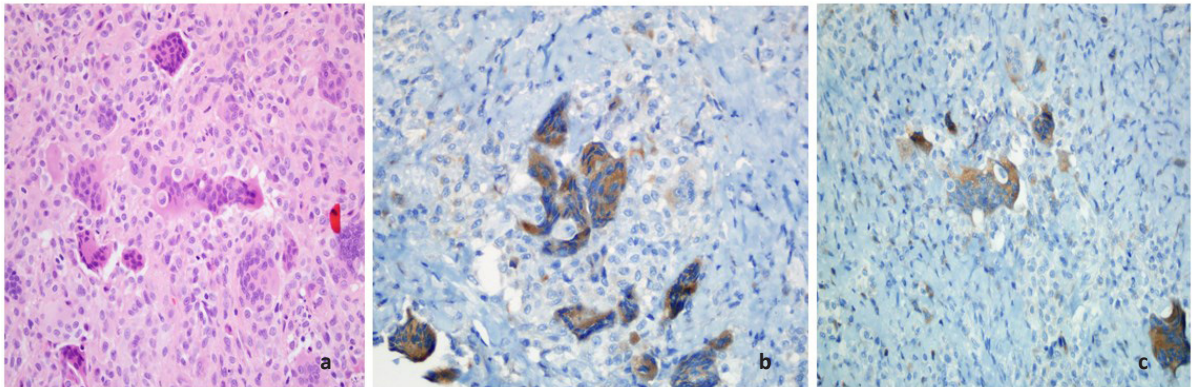
serimizde toplam 3 vakada takipler sırasında lokal rekürrens görüldü. TKDHT preparatlarının mikroskopik incelemesinde hiyalizasyon alanları, osteoklast benzeri dev hücre, stromal hücreler, ksantomatöz histiyositler ve hemosiderin birikimi mevcuttu (Resim 1a, 1b). Tablo 1’de hastaların yaşı, cinsiyeti, lokalizasyonu, lokal rekürrens, Ki-67 proliferasyon indeksi, CD68 boyanma oranı ve kanibalizm varlığı gösterilmiştir.

Serimizdeki TKDHT’deki Ki-67 proliferasyon indeksi ortalaması % 12,9 (median:10) olarak bulundu. Lokal rekürrens gösteren hastalarda Ki-67 proliferasyon indeksi %10-30 arasında değişmektedir ve ortalama% 20 (median:20) bulundu ( Resim 1c). Lokal rekürrens gösteren hastalarda Ki-67 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ( $p>0.05$ ).

CD68 ile hastaların 26’sında yaygın, 7’sinde fokal boyanma saptanırken 12 hastada ise belirgin bir boyanma görülmedi. CD68 ile toplamda hastaların %73’ünde pozitif boyanma saptandı. Kanibalistik hücre varlığı 22 hastada( 6 hastada yaygın, 16 hastada seyrek, %48,9) görülürken 23 hastada (%51,1) saptanmadı. Lokal rekürrens gösteren hastaların hepsinde CD68 ile boyanmanın olduğu (yaygın bir paternde) ve kanibalistik hücre (%10’un üzerinde yaygın) varlığının olduğu saptandı ( Resim 2a-c). Lokal rekürrens gösteren ve lokal rekürrens göstermeyen hastalar arasında kanibalizm varlığı (yaygın ya da seyrek) yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı ( $p=0.045$ ).



**Resim 1:** Tendon kılıfının dev hücreli tümörü, (a) tipik mononükleer hücreler ile osteoklast benzeri dev hücreler (HE x 100), (b) yaygın ksantomatöz değişiklikler (HE x 400), (c) Ki-67 immünohistokimyasal boyama (x400).



**Resim 2:** (a) Osteoklast benzeri dev hücrenin stoplazmasında yutmuş olduğu tümör hücreleri (kanibal hücre) (HE x 400), (b,c) CD 68 boyaması ile gösterilen kanibalistik hücre (x400).

**Tablo 1.** Hastaların klinik verileri ve immünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesi

Cinsiyet	Hasta yaşı	Tümör lokalizasyonu	Ki-67 pro. İndeksi (%)	CD68	Kanibalizm	Lokal rekürrens
Kadın	12	Sağ el 2. parmak	10	+ (fokal)	-	Yok
Erkek	21	Sol ayak 1. parmak	10	+ (yaygın)	+ (seyrek )	Yok
Erkek	22	Sol el 4. parmak	10	+ (yaygın)	+ (yaygın)	Yok
Kadın	25	Sağ ayak 2. parmak	20	+ (yaygın)	+ (yaygın)	Var
Kadın	25	Sağ el 1. parmak	10	+ (yaygın)	-	Yok
Erkek	26	Sol el 3. parmak	20	-	-	Yok
Erkek	26	Sol el 2. parmak	10	+ (yaygın)	-	Yok
Erkek	27	Sol el 2. parmak	20	+ (fokal)	-	Yok
Kadın	27	Sağ el 1. parmak	20	+ (yaygın)	-	Yok
Erkek	30	Sol el 3.parmak volar	10	+ (yaygın)	+ (seyrek)	Yok
Kadın	30	Sol el 2. parmak	5	-	-	Yok
Erkek	31	Sağ el 2.parmak	10	+ (fokal)	-	Yok
Erkek	31	Sol el 1. parmak	20	+ (yaygın)	+ (seyrek)	Yok
Kadın	31	Sağ el 2. Parmak volar	5	+ (yaygın)	+ (seyrek)	Yok
Erkek	32	Sağ el 3. parmak	10	-	-	Yok
Erkek	34	Sol el 2. parmak	10	+ (yaygın)	+ (seyrek)	Yok
Kadın	34	Sol el 1. parmak	10	+ (yaygın)	+ (seyrek)	Yok
Kadın	35	Sağ el 3. parmak	10	+ (fokal)	-	Yok
Kadın	37	Sağ el 1.parmak volar	20	+ (yaygın)	-	Yok
Erkek	38	Sağ el 1. parmak	10	-	-	Yok
Erkek	39	Sağ ayak bileği	10	+ (fokal)	-	Yok
Erkek	39	El bilek dorsal	5	-	-	Yok
Erkek	41	Sol el 2. parmak	20	+ (yaygın)	+ (seyrek)	Yok
Erkek	41	Sol el 3. parmak	10	+ (fokal)	-	Yok
Kadın	42	Sağ el 1. parmak	10	+ (yaygın)	+ (seyrek)	Yok
Kadın	43	Sağ el 3. parmak	10	-	-	Yok
Erkek	45	Sağ el bileği	20	+ (yaygın)	+ (seyrek)	Yok
Kadın	45	Sol el 3. parmak	10	+ (yaygın)	+ (yaygın)	Yok
Kadın	45	Sağ el 2. parmak	20	+ (fokal)	+ (seyrek)	Yok
Erkek	48	Sağ el bileği volar	10	+ (yaygın)	+ (seyrek)	Yok
Kadın	48	Sağ el 2.parmak volar	30	+ (yaygın)	+ (yaygın)	Yok
Erkek	49	Sol el 5.parmak volar	20	+ (yaygın)	+ (seyrek)	Yok
Erkek	49	Sol el 2. Parmak volar	5	+ (yaygın)	-	Yok
Kadın	50	Sağ el 3. Parmak dorsal	20	+ (yaygın)	+ (seyrek)	Yok
Kadın	51	Sağ el 5. parmak volar	10	-	-	Yok
Kadın	51	Sol el 2. parmak volar	5	-	-	Yok
Erkek	54	Sağ el bilek dorsal	10	-	-	Yok
Erkek	56	Sol ayak bileği dorsal	10	-	-	Yok
Kadın	56	Sağ el 1. parmak	10	+ (yaygın)	+ (seyrek)	Yok
Kadın	56	Sağ el 1. parmak	5	-	-	Yok
Kadın	56	Sağ el 1. Parmak volar	10	+ (yaygın)	+ (yaygın)	Var
Erkek	59	Sol el 1. parmak volar	30	+ (yaygın)	+ (yaygın)	Var
Erkek	59	Sağ el 1. parmak	10	-	-	Yok
Erkek	63	Sağ el 1. Parmak volar	20	+ (yaygın)	+ (seyrek)	Yok
Kadın	68	Sağ el 1.parmak pulpa	10	+ (yaygın)	+ (seyrek)	Yok



## TARTIŞMA

TKDHT kendi içinde lokalize ve diffüz olarak ikiye ayrılır. Lokalize tip en sık parmaklara yerleşim gösterirken diffüz tip (pigmente villünodüler sinovitis) daha nadir görülür ve eklem yerleşimlidir (3). TKDHT'lerin cerrahi sonrası rekürrens oranları% 9-14 olarak bildirilmiştir. İnkomplet eksizyon en önemli rekürrens risk faktörüdür (6,11). Önceki bazı çalışmalarda olguların takibinde yüksek mitotik aktivite ile rekürrens arasında ilişki bildirilmiştir (12,13), ancak bazı çalışmalarda bu ilişkiyi gösterilememiştir (3,14). Biz çalışmamızda lokal rekürrens gösteren hastalarda Ki-67 proliferasyon indeksini %20 olarak bulduk ve serimizin ortalamasından (%12,9) yüksekti (Tablo 1). Bununla birlikte gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p>0.05$ ).

Hüresel kanibalizm büyük hücrelerin kendinden daha küçük hücreleri sitoplazmalarına katmalarına denir. Bu bulgu ilk kez Leyden tarafından 1904 yılında kuşgözü olarak isimlendirilmiştir. Yutulmuş hücre içeri alındığında hala canlı olmasına rağmen bu süreçte hücre sindirilir (15). Bu özelliği nedeni ile kanibalizm fagositoz, entoz ve emperipolezisten tamamen ayrı bir antitedir (8). Kanibalistik hücreler tümör hücreleri dışındaki lenfosit, eozinofil lökositler ve eritrositleri de fagosite ederler (16). Sonuçta normal (stromal ya da tümör ile infiltre immün hücreleri) ile kardeş tümör hücreleri arasında ayırım yapmazlar.

Ohsaki H ve arkadaşları tarafından renal glomerüler hastalıkları olan hastaların idrar örneklerinde "benign kanibalizm tariflemişler (17). A. Fernandez-Flores benign yumuşak doku tümörlerinde (dev hücreli tendon kılıfı tümörlerinde) kanibalizmin varlığını göstermiştir (10). Bizim çalışmamızda 22 (%48,8) vakada kanibal hücre izlenmiş olup bunların 6 (%13,3)'sında yaygın, 16 (%35,5) 'ünde seyrekli (Tablo.1). Yaygın olan 6 (%13,3) vakadan 3 (%6,7)'ünde lokal rekürrens izlenirken diğer 3(%6,7) 'ünde son kontrollerinde lokal rekürrens durumu görülmemiştir. Lokal rekürrens gösteren hasta grubundaki 3 (%6,7) vakanın hepsinde kanibal hücre varlığının yaygın olması dikkat çekiciydi. Lokal rekürrens gösteren hastalarda Mann-Whitney U testi ile kanibalizm varlığı açısından

istatistiksel olarak da anlamlı fark saptandı ( $p=0,045$ ). Bununla birlikte kanibalizmin lokal rekürrens gösteren hastalarda daha sık olmasına rağmen hasta sayımızın az olması nedeniyle kanibalizm ile rekürrens arasındaki ilişki konusunda net bir sonuca ulaşamadık. Daha ileri bir yorum için daha fazla sayıda hasta ile bu çalışmanın yapılması gereklidir. Bu nedenle kanibalizm lokal rekürrenslere tahmin etmede önemli bir prediktif faktör olabilir. Lokal rekürrensi olmayan 42 hastadan 23'ünde(%54.7) kanibalizme rastlanmazken; 16'sında (%38) seyrek, 3'ünde(%7.1) yaygın olarak kanibalizme rastlandı.

Sonuç olarak Ki-67 proliferasyon indeksinin yüksek olması ve kanibal hücrelerinin varlığı TKDHT lokal rekürrens yapma olasılığını tahmin etmede önemli bir prediktif bir bulgu olabilir. Ancak hasta grubumuz yeterince geniş değildir. Bu konunun aydınlatılabilmesi için daha geniş serilerde yeni araştırmaların yapılması önerilir.

## KAYNAKLAR

1. Adams EL, Yoder EM, Kasdan ML. Giant cell tumor of the tendon sheath: experience with 65 cases. *Eplasty*. 2012;12:e50.
2. Walsh EF, Mechrefe A, Akelman E, Schiller AL. Giant cell tumor of tendon sheath. *American journal of orthopedics Belle Mead, N.J.* 2005;34(3):116-21.
3. Suresh SS, Zaki H. Giant cell tumor of tendon sheath: case series and review of literature. *Journal of hand and microsurgery*. 2010;2(2):67-71.
4. O'Connell JX. Pathology of the synovium. *American journal of clinical pathology*. 2000;114(5):773-84.
5. Bedir R, Balik MS, Sehitoglu I, Gucer H, Yurdakul C. Giant Cell Tumour of the Tendon Sheath: Analysis of 35 Cases and their Ki-67 Proliferation Indexes. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*.2014;8(12):12-5.
6. Hamdi MF, Touati B, Zakhama A. Giant cell tumour of the flexor tendon sheath of the hand: analysis of 27 cases. *Musculoskeletal surgery*. 2012;96(1):29-33.
7. Gupta K, Dey P. Cell cannibalism: diagnostic marker of malignancy. *Diagnostic cytopathology*. 2003;28(2):86-7.
8. Sharma N, Dey P. Cell cannibalism and cancer. *Diagnostic cytopathology*. 2011;39(3):229-233.
9. Bansal C, Tiwari V, Singh U, Srivastava A, Misra J. Cell Cannibalism: A cytological study in effusion samples. *Journal of cytology / Indian Academy of Cytologists*. 2011;28(2):57-60.
10. Fernandez-Flores A. Cannibalism in a benign soft tissue tumor

(giant-cell tumor of the tendon sheath, localized type): a study of 66 cases. Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie. 2012;53(1):15-22.

11. Ozalp T, Yercan H, Kurt C, Ozdemir O, Coskunol E. [Giant-cell tumors of the tendon sheath involving the hand or the wrist: an analysis of 141 patients]. Acta orthopaedica et traumatologica turcica. 2004;38(2):120-4.

12. Rao AS, Vigorita VJ. Pigmented villonodular synovitis (giant-cell tumor of the tendon sheath and synovial membrane). A review of eighty-one cases. The Journal of bone and joint surgery. American volume. 1984;66(1):76-94.

13. Kitagawa Y, Ito H, Yokoyama M, Sawaizumi T, Maeda S. The effect of cellular proliferative activity on recurrence and local tumour extent of localized giant cell tumour of tendon sheath. Journal of hand surgery (Edinburgh, Scotland). 2004;29(6):604-7.

14. Monaghan H, Salter DM, Al-Nafussi A. Giant cell tumour of tendon sheath (localised nodular tenosynovitis): clinicopathological features of 71 cases. Journal of clinical pathology. 2001;54(5):404-7.

15. Brouwer M, de Ley L, Feltkamp CA, Elema J, Jongsma AP. Serum-dependent "cannibalism" and autodestruction in cultures of human small cell carcinoma of the lung. Cancer research. 1984;44(7):2947-51.

16. Caruso RA, Muda AO, Bersiga A, Rigoli L, Inferrera C. Morphological evidence of neutrophil-tumor cell phagocytosis (cannibalism) in human gastric adenocarcinomas. Ultrastructural pathology. 2002;26(5):315-21.

17. Ohsaki H, Haba R, Matsunaga T, Nakamura M, Kiyomoto H, Hirakawa E. 'Cannibalism' (cell phagocytosis) does not differentiate reactive renal tubular cells from urothelial carcinoma cells. Cytopathology : official journal of the British Society for Clinical Cytology. 2009;20(4):224-30.