

Korelace exprese markerů Ki-67, MCM2, MCM5 a p53 ve tkáních a cytoblocích u pacientů s uroteliálním karcinomem močového měchýře

Correlation of expression of Ki-67, MCM2, MCM5 and p53 in tissue specimens and cell blocks in patients with urothelial carcinoma

Jaromír Háček¹, Antonín Brisuda², Marcela Čechová², Marek Babjuk²

¹Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol, Praha

²Urologická klinika 2. LF UK v FN Motol, Praha

Došlo: 30. 10. 2018

Přijato: 7. 1. 2019

Kontaktní adresa:

MUDr. Jaromír Háček

Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK
a FN Motol

V Úvalu 84, 150 06 Praha 5

e-mail: jaromir.hacek@fnmotol.cz

Střet zájmů: Žádný.

Prohlášení o podpoře:

Práce byla podpořena grantem 15-33266AZV, Česká republika.

SOUHRN

Háček J, Brisuda A, Čechová M, Babjuk M. Korelace exprese markerů Ki-67, MCM2, MCM5 a p53 ve tkáních a cytoblocích u pacientů s uroteliálním karcinomem močového měchýře.

Hlavní stanovisko práce: Studie se zabývá využitím imunocytochemie jako doplňkového vyšetření k močové cytologii. Předkládáme výsledky korelace exprese vybraných imunohistochemic-

kých markerů ve tkáni a cytobloku u pacientů s uroteliálním karcinomem močového měchýře.

Cíl: Cílem studie je ověřit, zda koreluje exprese vybraných imunochemických markerů v biotickém a cytologickém materiálu u pacientů s uroteliálním karcinomem močového měchýře.

Materiál a metodika: U 77 pacientů (25 s diagnózou low-grade uroteliálního karcinomu, 52 s diagnózou high-grade uroteliálního karcinomu) jsme provedli imunochemické vyšetření vybraných protilátek Ki-67, MCM2, MCM5 a p53 ve tkáňových řezech z resekátu nádoru a v řezech z cytobloků z moči odebrané před chirurgickým výkonem. Porovnávali jsme míru exprese uvedených markerů ve tkáni a cytobloku každého pacienta.

Výsledky: Zjistili jsme signifikantní rozdíly v expresi všech zkoumaných markerů mezi low-grade a high-grade uroteliálními karcinomy, a to jak v tkáňových řezech, tak v řezech z cytobloků. U všech markerů jsme prokázali korelaci exprese ve tkáňovém řezu s expresí v cytobloku.

Závěr: Imunocytochemické vyšetření materiálu z adekvátně buněčného cytobloku má obdobnou výpovědní hodnotu jako imunohistochemické vyšetření nádorové tkáně.

KLÍČOVÁ SLOVA:

Imunocytochemie, močová cytologie, uroteliální karcinom.

SUMMARY

Háček J, Brisuda A, Čechová M, Babjuk M. Correlation of expression of Ki-67, MCM2, MCM5 and p53 in tissue specimens and cell blocks in patients with urothelial carcinoma.

Major statement: The study deals with immunocytochemistry as an additional method to urinary cytology examination. We present the correlation of selected immunochemical markers expression in tissues and cell blocks in patients with urinary bladder urothelial carcinoma.

Aim: The aim of the study is to verify whether expression of selected immunochemical markers in tumor tissue of patients with urinary bladder urothelial carcinoma correlates with expression in cytology (cell block) material.

Material and methods: In 77 patients (25 with low-grade urothelial carcinoma, 52 with high-grade carcinoma) we performed the immunochemical examination of Ki-67, MCM2, MCM5 and p53 markers in tumor tissues and cell blocks from urine collected before surgical resection. Thereafter we correlated the expression rate of each marker in tissue specimen and cell block in every patient.

Results: There were significant differences in expression of all examined markers between low-grade and high-grade urothelial carcinomas in tissue specimens and cell blocks. Expression of all markers in tissue specimens correlated with expression in cell blocks.

Conclusion: Immunocytochemical examination of material retrieved from cell block with adequate cellularity has similar value as immuno-histochemical examination of tumor tissue.

KEY WORDS

Immunocytochemistry, urine cytology, urothelial carcinoma.

.....

ÚVOD

Cytologické vyšetření moči je dostupnou, relativně levnou a neinvazivní metodou, která je široce používána v diagnostice karcinomů močového měchýře a při sledování pacientů po léčbě. Močová cytologie má vysokou senzitivitu i specifitu v detekci high-grade uroteliálního karcinomu (HGUC), zatímco senzitivita v detekci low-grade uroteliálních nádorů (LGUN) je nízká (1, 2, 3). Dalším úskalím této metody je také interpersonální variabilita při hodnocení a interpretaci nálezů, stejně jako existence různých klasifikačních systémů. V posledních letech vyústila snaha o sjednocení hodnocení, které by bylo postavené na jasně daných kritériích, ve vznik Pařížské klasifikace pro hodnocení močových cytologií (4).

Dvěma základními metodami zpracování vzorků moči je tzv. konvenční cytologie a liquid-based cytologie (LBC). Konvenční cytologie zahrnuje zpracování vzorku moči cytocentrifugací. Touto metodou je možné zhotovit jak cytospinové preparáty, tak cytobloky, ve kterých je materiál dlouhodobě uchován a může být využit pro další, např. imunocytochemická, vyšetření. Nevýhodou této metody je především nízká buněčnost vzorků. LBC přináší díky fixaci materiálu možnost lepšího zachování buněk a delší skladování vzorku pro případná dodatečná vyšetření. V porovnání s konvenční cytologií mají preparáty lepší kvalitu (vyšší buněčnost, přehlednější tenká vrstva buněk bez překrývání). Nevýhodou je cena vyšetření, do které se promítají náklady na přístrojové vybavení. Porovnání těchto dvou metod nepřináší jednoznačné závěry ve prospěch jedné z nich, především co se týče senzitivity zachytu nádoru (1, 5, 6, 7).

Snahy o zvýšení senzitivity cytologického vyšetření moči vedly k zavádění pomocných vyšetření využívajících metody molekulární genetiky (UroVysion® detekující chromozomální aberace pomocí fluorescenční in situ hybridizace) či imunocytochemie (Immunocyt/uCyt+® založený na imunofluorescenční detekci proteinů). Jde však o metody nákladné a vzhledem k nutnosti speciálního vybavení i hůře dostupné. Kombinace klasické imunocytochemie s močovou cytologií se jeví jako dostupnější metoda, která má potenciál

zvýšit diagnostickou sílu cytologického vyšetření, podobně jako tomu je v histopatologii (8). Dosud však hraje v cytologické diagnostice uroteliálních nádorů jen okrajovou roli.

V naší studii chceme ověřit možnosti použití imunocytochemického vyšetření vybraných markerů v materiálu získaném cytocentrifugací a zpracovaném metodou cytobloků. S vědomím limitů konvenční cytologie a cytobloku (tj. především nízké buněčnosti) (9) jsme se v první fázi rozhodli korelovat výsledky imunocytochemického vyšetření cytobloků a imunohistochemického vyšetření tkáňových vzorků resekovaného nádoru u stejných pacientů.

Na základě rešerše literatury jsme pro studii použili markery Ki-67, MCM2, MCM5 a p53. Ki-67 je jaderný protein, marker buněčné proliferace. U karcinomu močového měchýře jeho zvýšená exprese koreluje s horším přežitím a vyšší mírou rekurence (10). MCM2 a MCM5 jsou jaderné proteiny, které se účastní buněčné proliferace. Exprese těchto markerů může zlepšit detekci uroteliálního karcinomu močovou cytologií (11, 12, 13). P53 je tumor supresorový gen, jehož mutaci lze nepřímo imunohistochemicky detekovat v nádorové tkáni (10, 14).

MATERIÁL A METODIKA

Studijní soubor

Do studie bylo zařazeno 77 pacientů, u kterých bylo dostupné cytologické vyšetření vzorku moči odebrané před chirurgickým výkonem s optimálně celulárním cytoblokem (9) a histologické vyšetření resekovaného tumoru (25 pacientů s histologickou diagnózou low-grade (LG) uroteliálního karcinomu a 52 pacientů s histologickou diagnózou high-grade (HG) uroteliálního karcinomu).

Histologické vyšetření

Tkáň byly po makroskopickém popisu a zpracování zalaty do parafinových bloků. Řezy z parafinových bloků byly obarveny hematoxylinem-eosinem a další řezy byly použity pro imunohistochemické vyšetření. U každého vzorku byl stanoven typ nádoru, grade a stadium. Použita byla WHO klasifikace 2016 (15).

Tab. 1. Přehled použitých primárních protilátek

Tab. 1. An overview of used primary antibodies

protilátka	výrobce	ředění
Ki-67	Dako, Santa Clara, CA, USA	1 : 150
p53	Dako, Santa Clara, CA, USA	1 : 50
MCM2	Abcam, Cambridge, United Kingdom	1 : 300
MCM5	Abcam, Cambridge, United Kingdom	1 : 100

Příprava cytopspinových preparátů a cytobloků

Z každého vzorku moči byly cytocentrifugací (10 min., 1 000 ot./min.) připraveny dva preparáty, které byly po zaschnutí obarveny technikou May-Grünwald-Giemsa-Romanowsky.

Cytobloky byly připraveny plazma-trombinovou metodou. Po centrifugaci vzorku moči (10 min., 1 000 ot./min.) a slití supernatantu byla k sedimentu přidána krevní plazma s trombinem, aby se vytvořila kohezivní peleta, která byla dále zpracována ve tkáňovém procesoru. Z cytobloku byl připraven řez barvený hematoxylinem-eosinem a další řezy pro následnou imunocytochemickou analýzu. Cytologický nález v cytopsinech a cytobloku byl klasifikován podle PAP klasifikace a Pařížského systému 2016.

Imunocytochemické a imunohistochemické vyšetření

Imunochemické vyšetření bylo provedeno na řezech z cytobloku a tkáňového bloku. Řezy byly po deparafinizaci, blokování endogenní peroxidázy 3% roztokem H_2O_2 a demaskování antigenů inkubovány s primárními protilátkami (Tab. 1). K detekci byl použit kit Mouse/Rabbit PolyDetector HRP with DAB (BioSB, Santa Barbara, CA, USA).

Hodnotili jsme pozitivní reakci protilátek v jádrech epitelových buněk (síla positivity 2+ a 3+ na škále 0 až 3+); ve tkáňových vzorcích jsme určili procentuální zastoupení pozitivních buněk, v cytoblocích jsme zjišťovali počet pozitivních buněk v deseti sousedících zorných polích (zvětšení 400x).

Statistická analýza

Pro testování rozdílů exprese jednotlivých markerů mezi low-grade a high-grade, pro cytobloky i tkáň,

Tab. 2. Rozdíly exprese jednotlivých markerů mezi low-grade a high-grade nádory, zvlášť pro cytobloky a pro tkáň

Tab. 2. Differences in markers expression in low-grade and high-grade tumors separately for cytoblocks and tissues

marker	grade	minimální hodnota	maximální hodnota	medián	95% CI	p
cytoblok (počet pozitivních buněk/10 HPF)						
Ki-67	LG	0,0	5,0	0,0	0,0–1,0	< 0,001
	HG	0,0	42,0	5,0	4,0–9,0	
MCM2	LG	0,0	5,0	0,0	0,0–0,0	< 0,001
	HG	0,0	18,0	2,0	0,0–2,7	
MCM5	LG	0,0	17,0	0,0	0,0–1,0	< 0,0001
	HG	0,0	104,0	7,5	6,0–11	
p53	LG	0,0	3,0	0,0	0,0–0,0	0,0004
	HG	0,0	109,0	3,5	1,9–6,0	
tkáň (% pozitivních buněk)						
Ki-67	LG	1,0	20,0	3,0	2,0–5,0	< 0,0001
	HG	1,0	70,0	25,0	20,0–30,0	
MCM2	LG	1,0	10,0	3,0	1,1–5,0	< 0,0001
	HG	1,0	50,0	15,0	10,0–20,0	
MCM5	LG	1,0	70,0	5,0	5,0–10,0	< 0,0001
	HG	2,0	85,0	30,0	40,0–60,0	
p53	LG	0,0	80,0	10,0	5,0–10,0	0,0003
	HG	0,0	95,0	35,0	20,0–50,0	
HPF – high power field (zorné pole, zväčšenie 400x); LG – low-grade karcinom; HG – high-grade karcinom						

HPF – high power field (zorné pole, zvětšení 400x); LG – low-grade karcinom; HG – high-grade karcinom

je použit Mann-Whitneyův test. Pro určení korelace mezi expresemi v cytobloku a ve tkáni je použit Spearmanův korelační koeficient (rank correlation). Jako signifikantní je považována hodnota $p < 0,05$.

Statistická analýza byla provedena programem MedCalc Statistical Software verze 17.9.6 (Med Cals Software bvba, Ostend, Belgie).

VÝSLEDKY

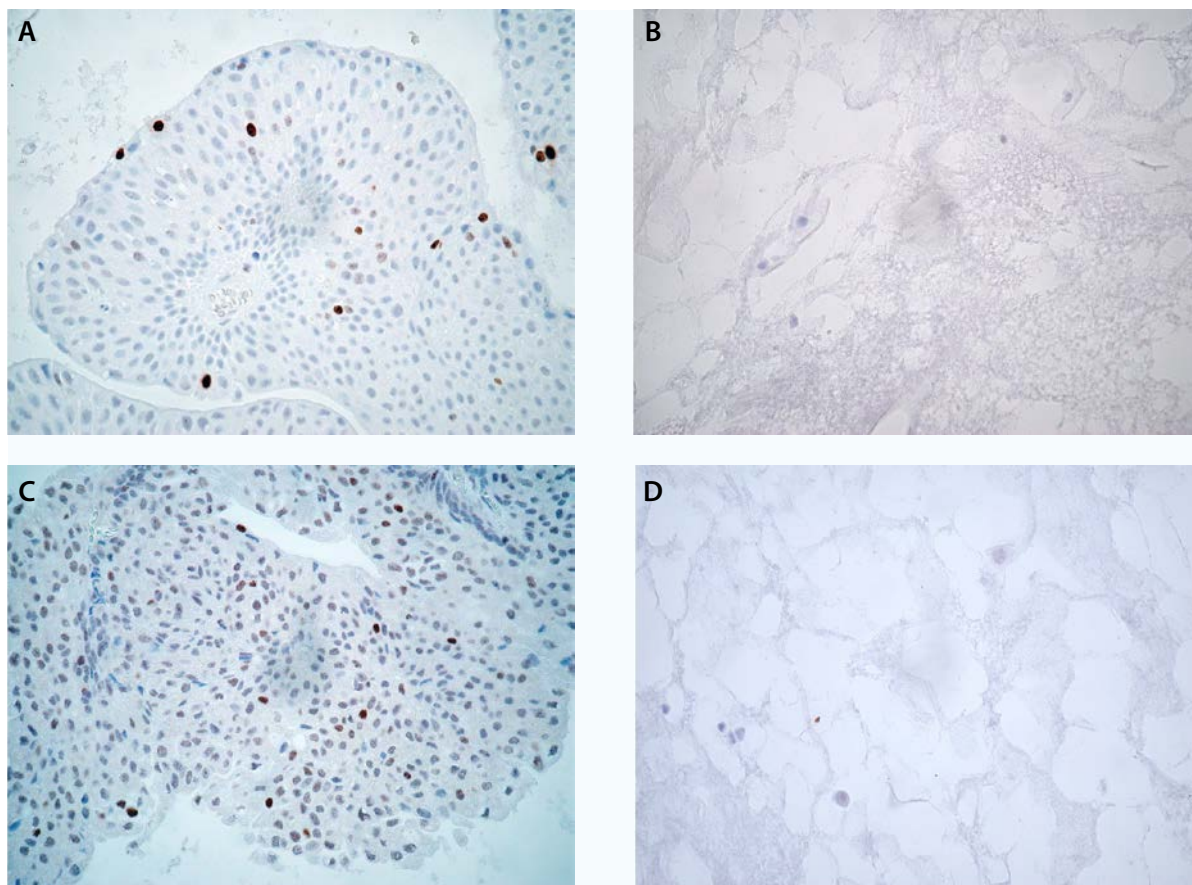
Pacienti byli rozděleni do skupiny low-grade ($n = 25$) či high-grade ($n = 52$) nádorů na základě histologické diagnózy.

Imunocytochemické vyšetření všech markerů v řezech z cytobloků vykazovalo signifikantní rozdíly mezi low-grade a high-grade nádory. Podobně imunohistochemické vyšetření všech zkoumaných markerů ve tkáňových řezech vykazovalo rozdíly mezi low-grade a high-grade nádory. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 2.

Míra exprese všech markerů v cytoblocích korelovala s jejich expresí ve tkáních, pokud jsme posuzovali celou skupinu (tedy LG i HG nádory) dohromady. V případě rozdělení na LG a HG nádory nebyl výsledek signifikantní u markerů MCM2 a p53 ve skupině LG nádorů (Tab. 3). Ve skupině HG nádorů byly signifikantní korelace mezi cytobloky a tkáněmi u všech protilátek kromě MCM2. Na mikrofotografiích jsou příklady exprese vybraných markerů vždy ve tkáni a cytobloku u LG nádoru, kde je exprese nízká (Obr. 1) a HG nádoru, kde je exprese vysoká (Obr. 2).

DISKUZE

Zlatým standardem v diagnostice a dispenzaci pacientů s uroteliálním karcinomem je cystoskopické vyšetření močového měchýře doplněné cytologickým vyšetřením moči. Močová cytologie je jednoduchým, široce dostupným, neinvazivním



Obr. 1. Low-grade uroteliální karcinom, imunochemické vyšetření markeru Ki-67 ve tkáni (A) a v cytobloku (B) a markeru p53 ve tkáni (C) a v cytobloku (D), zvětšení 400×

Fig. 1. Low-grade urothelial carcinoma, expression of Ki-67 in tissue section (A) and in cell block section (B) and expression of p53 in tissue section (C) and in cell block section (D), magnification 400×

a levným vyšetřením, které má vysokou specifitu (83–99 %). Její senzitivita závisí na stupni diferenciace nádoru, u LG karcinomů klesá až na 26 % (16).

Imunohistochemie má již desítky let široké uplatnění v histopatologické diagnostice, přispívá nejen k diagnostice, ale i k hodnocení prognostických a prediktivních ukazatelů. Imunochemické metody se užívají čím dál více i v oblasti cytologické diagnostiky. Rozšíření cytologického vyšetření moči o imunocytochemii by tak mohlo přispět ke zvýšení senzitivity tohoto vyšetření.

Možnost použití této metody však závisí na adekvátní buněčnosti cytologického vzorku. V tomto ohledu se jeví výhodněji zpracování vzorku moči metodou LBC, která zajistí dostatečnou buněčnost, a která je používána ve většině publikovaných studiích týkajících se imunocytochemického vyšetření moči.

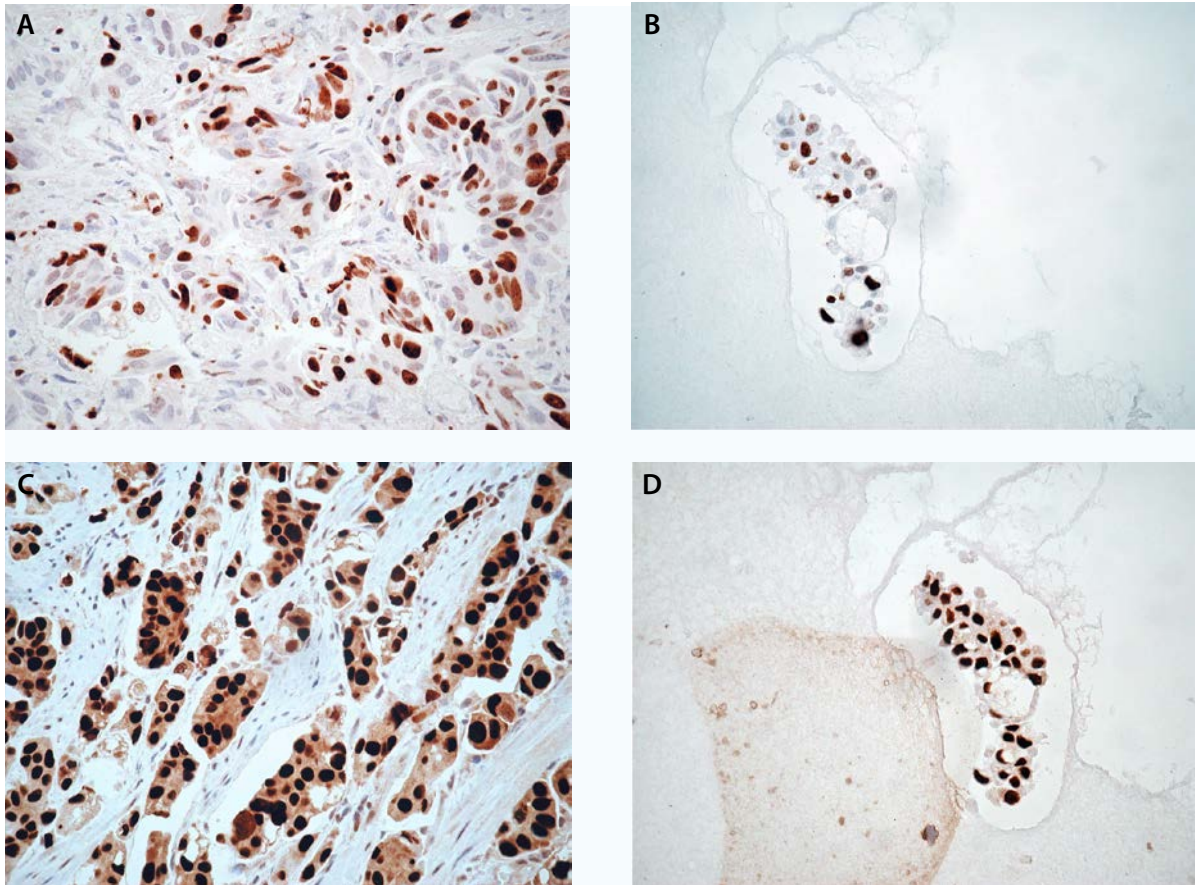
Metoda cytobloku je na rozdíl od LBC levná a dostupná ve většině cytologických laboratořích. Ne-

Tab. 3. Prostá korelace mezi expresí ve tkáni a v cytobloku

Tab. 3. Rank correlation between tissue and cell block expression

marker	grade	Spearmanův korelační koeficient	p
Ki-67	všechny	0,638	< 0,0001
	LG	0,404	0,045
	HG	0,335	0,015
MCM2	všechny	0,500	0,0001
	LG	0,385	0,06
	HG	0,187	0,19
MCM5	všechny	0,715	< 0,0001
	LG	0,665	0,0003
	HG	0,425	0,002
p53	všechny	0,689	0,0001
	LG	0,214	0,3
	HG	0,715	<0,0001

LG – low-grade karcinom; HG – high-grade karcinom



Obr. 2. High-grade uroteliální karcinom, imunochemické vyšetření markeru Ki-67 ve tkáni (A) a v cytobloku (B) a markeru p53 ve tkáni (C) a v cytobloku (D), zvětšení 400×

Fig. 2. High-grade urothelial carcinoma, expression of Ki-67 in tissue section (A) and in cell block section (B) and expression of p53 in tissue section (C) and in cell block section (D), magnification 400×

vyžaduje speciální přístrojové vybavení. Největším úskalím této metody je však dosažení dostatečné buněčnosti vzorku (9, 17, 18).

V této studii jsme prokázali významné rozdíly v expresích vybraných protilátek mezi LG a HG nádory, ať už se jednalo o cytobloky nebo tkáň nádoru. Za předpokladu adekvátní buněčnosti cytobloku má tedy imunocytochemické vyšetření stejnou výpovědní hodnotu jako imunohistochemické vyšetření tkáně. Navíc přináší výhodu prakticky neomezeného skladování cytologického materiálu pro vyšetření v budoucnosti.

Ze zkoumaných protilátek jsou neslibnější zejména protilátky Ki-67 a MCM5, u nichž korelovaly exprese mezi tkáněmi a cytobloky v případě LG i HG nádorů.

Limitujícím faktorem je ve skupině LG nádorů především nízká buněčnost cytobloků. Z toho

důvodu mohlo být v této fázi zařazeno do studie pouze 25 pacientů s diagnózou LG nádoru. Nízká proliferační aktivita LG nádorů se projeví nižší reaktivitou buněk při imunocytochemickém průkazu proliferačních markerů, což snižuje výtěžnost imunocytochemie v porovnání s HG nádory.

ZÁVĚRY

Reaktivita všech zkoumaných protilátek vykazuje signifikantní rozdíly mezi low-grade a high-grade nádory, a to jak v tkáňových řezech (v imunohistochemickém vyšetření), tak v řezech z cytobloků (v imunocytochemickém vyšetření).

U všech zkoumaných protilátek jsme prokázali korelaci exprese ve tkáňovém řezu s expresí

v řezu z cytobloku. Imunocytochemické vyšetření materiálu z cytobloku s adekvátní buněčností má stejnou výpovědní hodnotu jako imunohis-

tochemické vyšetření nádorové tkáně. Tím rozšiřuje možnosti neinvazivního vyšetření pacientů s uroteliálními nádory.

LITERATURA

1. Ondič O, Slunéčko R, Švadler M ml. Postavenie a význam cytologie moča v diagnostike uroteliálních nádorov. *Cesk Patol* 2014; 50(4): 142–145.
2. Yafi FA, Brimo F, Steinberg J, et al. Prospective analysis of sensitivity and specificity of urinary cytology and other urinary biomarkers for bladder cancer. *Urol Oncol* 2015; 33(2): 66.e25–31.
3. Yafi FA, Brimo F, Auger M, et al. Is the performance of urinary cytology as high as reported historically? A contemporary analysis in the detection and surveillance of bladder cancer. *Urol Oncol* 2013; 32: e1–6.
4. Rosenthal DL, Wojcik EM, Kurtycz DFI. The Paris system for reporting urinary cytology. Switzerland Springer; 2016.
5. Luthra UK, Dey P, George J. Comparison of ThinPrep and conventional preparations: urine cytology evaluation. *Diagn Cytopathol* 1999; 21: 364–366.
6. Nassar H, Ali-Fehmi R, Madan S. Use of ThinPrep monolayer technique and cytospin preparation in urine cytology: a comparative analysis. *Diagn Cytopathol* 2003; 28: 115–118.
7. Piaton E, Faynel J, Hutin K, Ranchin MC, Cottier M. Conventional liquid-based techniques versus Cytoc Thinprep processing of urinary samples: a qualitative approach. *BMC Clin Pathol* 2005; 5: 9.
8. Böhm M, Schostak M, Hakenberg OW. Urinary immunocytology – promise or nonseller? A review with an opinion. *Urol Oncol* 2014; 32(4): 383–390.
9. Brisuda A, Háček J, Čechová M, Škapa P, Babjuk M. Clinical and cytopathological factors affecting the cellularity of urinary cell blocks and the implication for the diagnosis and follow-up of the urinary bladder urothelial carcinoma. *Cytopathology* 2018; 6. doi: 10.1111/cyt.12580.
10. Courtade-Saïdi M, Aziza J, d'Aure D, et al. Immunocytochemical staining for p53 and Ki-67 helps to characterise urothelial cells in urine cytology. *Cytopathology* 2016; 27(6): 456–464.
11. Kelly JD, Dudderidge TJ, Wollenschlaeger A, et al. Bladder cancer diagnosis and identification of clinically significant disease by combined urinary detection of Mcm5 and nuclear matrix protein 22. *PLoS One* 2012; 7(7): e40305.
12. Saeb-Parsy K, Wilson A, Scarpini C, et al. Diagnosis of bladder cancer by immunocytochemical detection of minichromosome maintenance protein-2 in cells retrieved from urine. *Br J Cancer* 2012; 107(8): 1384–1391.
13. Burger M, Denzinger S, Hartmann A, et al. Mcm2 predicts recurrence hazard in stage Ta/T1 bladder cancer more accurately than CK20, Ki67 and histological grade. *Br J Cancer* 2007; 96(11): 1711–1715.
14. Hainaut P, Hernandez T, Robinson A, et al. IARC database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: Updated compilation, revised formats, and new visualization tools. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 205–213.
15. Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE. WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs. Lyon: IARC; 2016.
16. Bastacky S, Ibrahim S, Wilczynski SP, Murphy WM. The accuracy of urinary cytology in daily practice. *Cancer* 1999; 87(3): 118–128.
17. Saqi A. The state of cell blocks and ancillary testing: past, present and future. *Arch Pathol Lab Med* 2016; 140(12): 1318–1322.
18. Barkan GA. Enough is enough: adequacy of voided urine cytology. *Cancer Cytopathol* 2016; 124(3): 163–166.