

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,