

Nove možnosti citopatološke diagnostike raka sečnega mehurja s testom UroVysion™

Margareta Strojan Fležar in Irena Srebotnik Kirbiš

Citopatološka diagnostika in pojavnost raka sečnega mehurja v Sloveniji

Citopatološka preiskava urina je že desetletja standardna neinvazivna metoda za odkrivanje malignih celic pri bolnikih s kliničnimi znaki, sumljivimi za rak sečnega mehurja. V večini primerov je vodeči klinični znak raka sečnega mehurja neboleča hematurija (1). Če s citopatološko preiskavo potrdimo prisotnost malignih celic v urinu, klinik nadaljuje z diagnostičnimi postopki za potrditev bolezni; prva standardna diagnostična metoda je cistoskopija, ki je invaziven poseg, neprijeten za bolnika.

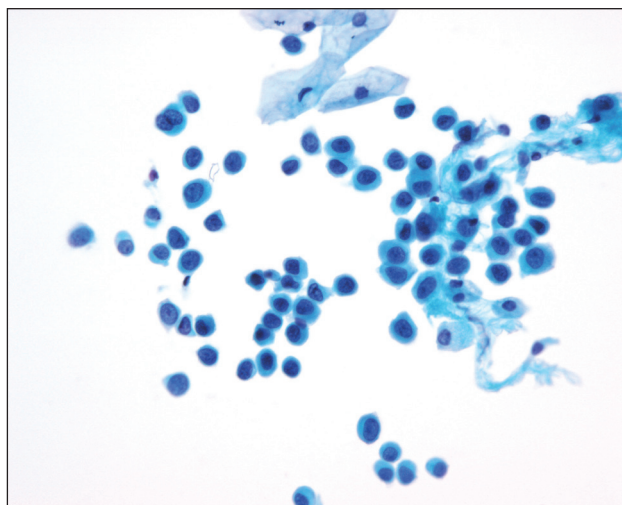
Karcinom sečnega mehurja je v Sloveniji med vsemi raki pri moških na 7. mestu, pri ženskah pa je razmeroma redek (2). Pojavnost narašča in je bila po zadnjih podatkih Registra raka za Slovenijo v letu 2005 21,5/100.000 pri moških in 6,3/100.000 pri ženskah. Rak sečnega mehurja se začne pojavljati po 45. letu, največ primerov odkrijemo med 70. in 75. letom pri moških in po 75. letu pri ženskah.

Čeprav rak sečnega mehurja ni pogost, se pogosto ponavlja. Neinvazijski papilarni urotelijski karcinomi se ponovijo v približno 70 %, v približno 5 % pa napredujejo v invazijski karcinom. Poseben klinični problem so bolniki, ki imajo ob prvi diagnozi plitko invazijo karcinoma v lamino propria. Pri 20 do 30 % teh bolnikov karcinom po določenem času napreduje z vraščanjem v mišični sloj, kar pomeni širjenje bolezni in lahko ogrozi bolnikovo življenje. Zato urologi bolnike, ki so bili zdravljeni zaradi raka sečnega mehurja, redno spremljajo. Citopatološka preiskava urina in izpirka iz sečnega mehurja z dodatnimi metodami ostaja ob cistoskopiji in slikovnodiaagnostičnih preiskavah pomembna diagnostična metoda za odkrivanje ponovitve bolezni ali morebitni pojav novega primarnega tumorja, posredno pa lahko tako ocenjujemo tudi učinek zdravljenja.

Citopatološka preiskava urina ali izpirka iz sečnega mehurja ima znane prednosti in omejitve (3). Z njo pregledujemo spontano odlučene celice v urinu ali celice, ki se odlučijo med spiranjem sečnega mehurja s fiziološko raztopino (izpirak iz sečnega mehurja). Spontano ali s pomočjo vbrizgavanja fiziološke raztopine odlučene celice nimajo stika z izvirnim urotelijem, zato citopatološko diagnozo postavimo samo na podlagi ocenjevanja celičnih in jedrnih značilnosti vzorca. Deloma k oceni pripomore način organiziranosti celic v odlučenih celičnih skupinah. Pri citopatološki preiskavi ocenjujemo tudi ozadje, ki vključuje vse sestavine, ki jih najdemo med urotelijskimi celicami (eritrociti, levkociti, nekrotični drobci, beljakovinski precipitat, bakterije in drugo).

Citopatološka preiskava je v večini primerov zelo zanesljiva za diagnostiko tumorjev, ki luščijo celice z jasno izraženimi celičnimi in jedrnimi znaki malignosti. To so papilarni urotelijski karcinomi visokega gradusa, invazivni urotelijski karcinomi in urotelijski karcinomi *in situ* (intraepitelijski) (4). Po drugi strani citopatološka preiskava ni zanesljiva za diagnostiko papilarnih

urotelijskih karcinomov nizkega gradusa ali drugih papilarnih urotelijskih neoplazij z neizrazitimi celičnimi in jedrnimi znaki malignosti (papilom, papilarna urotelijska neoplazma z majhnim malignostnim potencialom) (slika 1).



Slika 1. Urotelijske celice z zmerno celično in jedrno atipijo (Papnicolaou, 400-krat).

Zaradi navedenih omejitev citopatološke preiskave so se kmalu pojavile potrebe po izboljšanju citopatološke diagnostike raka sečnega mehurja z dodatnimi metodami.

Eden izmed prvih dodatnih testov v citologiji urina in izpirkov sečnega mehurja je bilo ugotavljanje DNA-ploidije, ki odraža skupno količino DNA v vzorcu. Izmerimo jo s pretočnim ali slikovnim citometrom. Znatno povečanje celotne količine DNA v vzorcu, največkrat v obliki aneuploidije, je odraz kompleksnih kromosomskih sprememb. V diploidnem vzorcu, ki ima enako količino DNA kot normalne celice, pa so manjše kromosomske spremembe lahko prikrite.

V 70. in 80. letih prejšnjega stoletja so bile objavljene mnoge študije o količini DNA (DNA-ploidiji) urotelijskih karcinomov (5). Izsledki so pokazali, da so bili urotelijski karcinomi visokega jedrnega gradusa in urotelijski karcinomi *in situ* aneuploidni. Bolniki s takimi karcinomi so imeli slabši potek bolezni. Papilarni urotelijski karcinomi gradusa II (ki jih po klasifikaciji SZO iz leta 2004 uvrščamo v visok gradus) so bili samo v polovici primerov aneuploidni, preostala polovica pa je bila diploidna. S citopatološkega vidika najbolj diagnostično težavni papilarni urotelijski karcinomi nizkega gradusa so bili diploidni.

Čeprav DNA-aneuploidija pomaga ugotoviti, da so citološko atipične ali sumljive urotelijske celice maligne, pa DNA-diploidija ne izključuje malignega tumorja. Še posebno

to velja za vzorce urina, v katerih je atipičnih ali sumljivih urotelijskih celic malo in so pomešane z drugimi vrstami atipičnih, vendar diploidnih celic (celice semenskih mešičkov, s polioma virusom okužene celice, zaradi prejšnjega zdravljenja spremenjene celice, celice ploščatega epitelija). Predvsem pa merjenje DNA-ploidije ni bistveno izboljšalo težavne in nezanesljive citopatološke diagnostike urotelijskih papilarnih tumorjev nizkega gradusa.

Test UroVysion™

Med številnimi novejšimi testi, ki poskušajo izboljšati rezultate citopatološke diagnostike raka sečnega mehurja, je najzanimivejši test UroVysion™ (Multi-color FISH probe mixture, Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, ZDA) (6, 7). Namenjen je ugotavljanju specifičnih kromosomskih nepravilnosti – aneuploidije kromosomov 3, 7, 17 in delecije lokusa 9p21 z metodo fluorescenčne hibridizacije *in situ* (FISH).

V citogenetskih študijah so ugotovili številne kromosomske nepravilnosti v celicah urotelijskega karcinoma. V urotelijskih karcinomih visokega gradusa so najpogostejše ugotovili pomnožitve kromosomov 3, 4, 8, 11, 17 in 18. Pri karcinomih nizkega gradusa pa so našli povečano število kromosomov 1 in 7 ter delecije 9p in 9q.

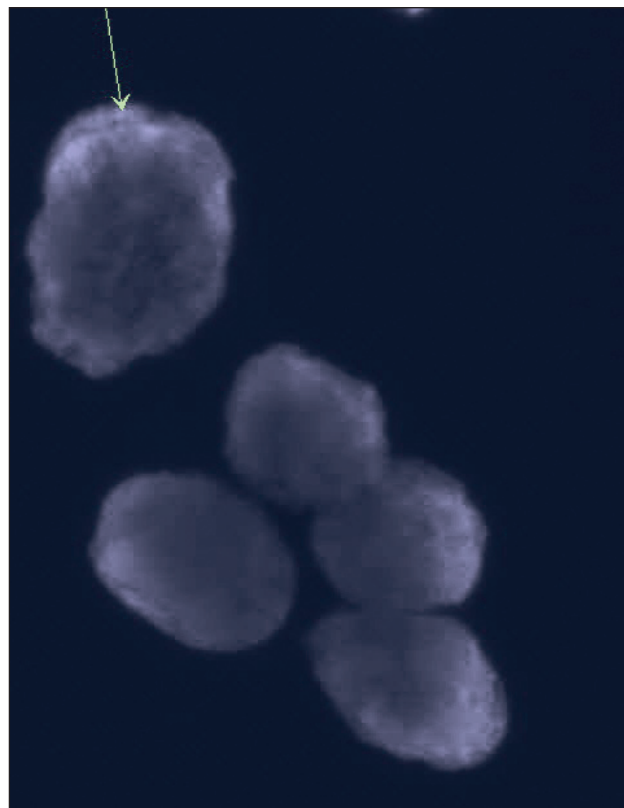
Za prikaz navedenih sprememb so metodo FISH začeli uporabljati na celicah karcinoma sečnega mehurja v 90. letih prejšnjega stoletja. Spoznanja so bila podlaga za izdelavo komercialno dostopnega testa UroVysion™, ki ga je ameriški Urad za živila in zdravila najprej odobril za odkrivanje ponovitve urotelijskega karcinoma (leta 2001), pozneje pa tudi za zgodnjo ali prvo diagnostiko urotelijskega karcinoma pri bolnikih s hematurijo (leta 2005).

Kit UroVysion™ vsebuje štiri DNA-sonde, obarvane z različnimi fluorokromi, za odkrivanje najpogostejših kromosomskih nepravilnosti, ki se pojavijo pri urotelijskih karcinomih. Tri sonde se vežejo na centromere kromosomov (angl. *chromosome enumeration probes*, CEP) in z njimi ugotavljamo število kromosomov 3 (sonda CEP 3, rdeče), 7 (sonda CEP 7, zeleno) in 17 (sonda CEP 17, svetlo modro). Četrta sonda je za lokus specifični označevalec (angl. *locus specific indicator*, LSI) in se veže na območje 9p21, ki ustreza genu p16 (sonda LSI 9p21, rumeno).

Test UroVysion™ lahko uporabljamo na neobarvanih vzorcih urina ali izpirkih sečnega mehurja, ki so pripravljeni na različne načine: s citocentrifugiranjem, membransko filtracijo, sistemom ThinPrep™ ali po postopku, ki ga predlaga proizvajalec testa Vysis. Test lahko izvajamo tudi na preparatih, prej obarvanih po Papanicolaou.

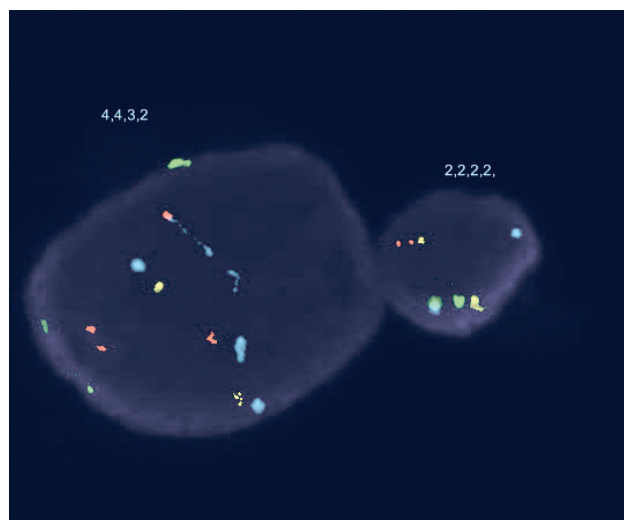
Po obdelavi celic z ustreznimi pufri denaturiramo DNA v enoverižno obliko, kar storimo s formamidom in segrevanjem. Sledi hibridizacija z mešanico sond iz kita UroVysion™, ki v hibridizacijski komori poteka približno 16 ur. Med hibridizacijo se fluorescenčno označeni enoverižni fragmenti DNA-sonde specifično vežejo na ustrezna območja denaturirane celične DNA. Po hibridizaciji s posebnimi postopki spiranja odstranimo nevezane sonde in jedra kontrastiramo s fluorescenčnim barvilom DAPI, ki omogoča opazovanje morfologije jeder.

Vzorec analiziramo v fluorescenčnem mikroskopu, opremljenem z ustreznimi filtri, s 600-kratno povečavo in ob uporabi imerzijskega olja. Pri pregledu celotnega hibridiziranega območja iščemo jedra, ki so morfološko atipična (sumljiva za karcinom). To so povečana jedra, jedra nepravilnih oblik, z barvilom DAPI lisasto obarvana jedra in celični skupki (slika 2).



Slika 2. Z barvilom DAPI obarvane urotelijske celice; s puščico označena celica je atipična.

V jedrih, ki izpolnjujejo vsaj enega izmed naštetih morfoloških meril, preštajemo signale za vse štiri sonde. Analiziramo najmanj 25 morfološko sumljivih jeder in zabeležimo vsako odstopanje od normalnega števila signalov (2 signala za vsako sondo) (slika 3).



Slika 3. Primer pozitivne celice z UroVysion™: FISH-aneuploidna (maligna) celica je na levi (pomnoženo število kopij kromosomov 3, 7, 17, 9p21). FISH-negativna, tj. diploidna celica (normalno število kopij kromosomov 3, 7, 17, 9p21) je na desni.

Test UroVysion™ je pozitiven, če:

- najdemo vsaj 4 jedra, ki imajo povečano število signalov (3 ali več) za vsaj dva kromosoma (3, 7 ali 17), ali
- najdemo vsaj 12 celic brez signalov za sondo 9p21.

Za kontrolo kakovosti izvajanja testa pri vsakem izvajanju testa pregledujemo tudi kontrolna stekelca s pozitivnimi in negativnimi tarčami.

Naše izkušnje s testom UroVysion™

Na Inštitutu za patologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani smo konec leta 2008 začeli uvajati test UroVysion™ na rutinskih vzorcih urinov in izpirkov sečnega mehurja. Vse tekočinske vzorce iz sečil za običajno citopatološko preiskavo pripravljamo z metodo membranske filtracije in nato barvamo z metodo po Papanicolaou. Zaradi uporabe po Papanicolaou obarvanih preparatov za test UroVysion™ smo morali najprej optimizirati postopek priprave preparatov pred hibridizacijo. Obarvane preparate smo razbarvali v kislem etanolu in ustrezno podaljšali encimsko razgradnjo pred denaturacijo DNA. Do sedaj smo uporabili 51 testov. 30 smo jih porabili za uvajanje metode in optimizacijo postopka za naš način priprave vzorcev urina in izpirkov iz sečnega mehurja. Drugih 21 testov smo izvedli na diagnostičnih vzorcih (tabela 1).

CITOLOGIJA	UroVysion™		
		Negativen	Pozitiven
	Negativna	3	-
	Blaga atipija	2	2
	Zmerna atipija	-	2
	Sumljivo za karcinom	1	5
	Karcinom	-	6
	Skupaj	6	15

Tabela 1. Izvidi testa UroVysion™ glede na prvotni citopatološki izvid v prvi seriji testov.

Ugotovili smo, da je test UroVysion™ pripomogel k diagnozi karcinoma pri neopredeljenih atipijah (zmerna atipija in sumljiva za karcinom) v 7 od 8 primerov. Test je bil pozitiven tudi pri 2 blagih atipijah, ki jih sicer obravnavamo kot negativne glede neoplazije; 1 bolnik je bil v preteklosti zdravljen zaradi papilarnega urotelijskega karcinoma nizkega gradusa. Test je bil pričakovano pozitiven pri 6 vzorcih z morfološko jasno malignimi celicami in zato s citopatološko diagnozo karcinoma. Pričakovano negativen pa je bil pri 3 bolnikih brez atipičnih celic v vzorcu urina.

Sklep

Test UroVysion™ je zanesljiva metoda, ki je zelo občutljiva in specifična za prepoznavanje celic raka sečnega mehurja v urinu in izpirkih iz sečnega mehurja. Z uporabo tega testa lahko ob standardni citopatološki preiskavi, ki je podobno specifična, vendar znatno manj občutljiva, izboljšamo prepoznavanje primarnih urotelijskih karcinomov in ponovitev bolezni. V novjših člankih poročajo, da test UroVysion™ zazna genetske spremembe pred nastankom morfoloških sprememb urotelijskih celic, ko tumor cistoskopsko še ni viden, in s tem napoveduje njegovo ponovitev (7). Med pomanjkljivostmi testa velja omeniti njegovo nepričakovano slabo občutljivost za odkrivanje urotelijskega karcinoma nizkega gradusa. Poleg tega ni poceni, njegovo izvajanje pa zahteva specialno opremljen laboratorij in ustrezno usposobljeno osebje. S citopatologovega stališča je test smiselno uporabljati na vzorcih, ki vsebujejo dovolj atipičnih celic, in sicer pri bolnikih s sumljivo klinično ali cistoskopsko sliko. Pri negativnem citološkem izvidu (brez atipičnih celic), kjer klinik želi test, pa je na mestu posvet s citopatologom o smiselnosti izvedbe testa. Prav gotovo pa testa ni treba izvajati, kadar v vzorcu urina ali izpirka sečnega mehurja najdemo jasno maligne celice, saj je v takem primeru citološki izvid dovolj specifičen.

Viri

1. Grossfeld GD, Litwin MS, Wolf JS Jr, et al. Evaluation of asymptomatic microscopic hematuria in adults: the American Urological Association best practice policy – part II: patient evaluation, cytology, voided markers, imaging, cystoscopy, nephrology evaluation, and follow-up. *Urology* 2001; 57: 604–10.
2. Cancer Registry of Slovenia. Cancer Incidence in Slovenia 2005. Report No. 47. Ljubljana: Institute of Oncology; 2008.
3. Bastacky S, Ibrahim S, Wilczynski SP, et al. The accuracy of urinary cytology in daily practice. *Cancer (Cancer Cytopathol)* 1999; 87: 118–28.
4. Curry JL, Wojcik EM. The effect of the current World Health Organisation/ International society of urologic pathologists bladder neoplasm classification system on urine cytology results. *Cancer* 2002; 96: 140–5.
5. Tribukait B. Flow cytometry in assessing the clinical aggressiveness of genitourinary neoplasms. *World J Urol* 1987; 5: 108–22.
6. Bubendorf L, Grilli B, Sauter G, et al. Multiprobe FISH for enhanced detection of bladder cancer in voided urine specimens and bladder washings. *Am J Clin Pathol* 2001; 116: 79–86.
7. Kipp BR, Tanasescu M, Else TA, et al. Quantitative fluorescent in situ hybridisation and its ability to predict bladder cancer recurrence and progression to muscle invasive bladder cancer. *J Mol Diagn.* 2009; 11(2): 148–54.