Ovisnost celularnosti uzorka urina i izraženosti degenerativnih promjena na stanicama urotela o načinu priprave uzorka za citološku pretragu

Zekić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:259180

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Studij medicine

Ivana Zekić

OVISNOST CELULARNOSTI UZORKA URINA I IZRAŽENOSTI DEGENERATIVNIH PROMJENA NA STANICAMA UROTELA O NAČINU PRIPRAVE UZORKA ZA CITOLOŠKU PRETRAGU

Diplomski rad

Osijek, 2017.

Rad je ostvaren u Kliničkom bolničkom centru Osijek.

Mentor rada: izv. prof. prim. dr. sc. Valerija Miličić, dr. med., specijalist kliničke citologije

Rad ima 28 listova, 7 tablica i 5 slika.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Citologija urina 2

1.2. Načini prikupljanja uzoraka za citološku pretragu 2

1.2.1. Spontano izmokreni urin 2

1.2.2. Uzorci dobiveni instrumentacijom 3

2. CILJ RADA 4

3. ISPITANICI I METODE 5

3.1. Ustroj studije 5

3.2. Ispitanici 5

3.3. Metode 5

3.3.1 Citocentrifuga 6

3.3.2 Bojanje metodom po Papanicolaou 7

3.3.3 Bojanje po May-Grünwald Giemsi (MGG bojanje) 10

3.4 Statističke metode 11

4. REZULTATI 13

5. RASPRAVA 19

6. ZAKLJUČAK 22

7. SAŽETAK 23

8. SUMMARY 24

9. LITERATURA 26

10. ŽIVOTOPIS 28

POPIS KRATICA

EA	eosin azure
HCl	klorovodična kiselina
KBC	klinički bolnički centar
MGG bojanje	bojanje uzoraka po May-Grünwald-Giemsi
N/C omjer	omjer jezgre i citoplazme
PAPA bojanje	bojanje po Papanicolaou

1. UVOD

Urinarni sustav dijelimo u tri regije: bubrezi, gornji urotrakt (kaliksi, pelvisi, ureteri) i donji urotrakt (mokraćni mjehur i uretra). Veći je dio urinarnog trakta prekriven prijelaznim epitelom (urotelom) koji je specijaliziran za ovo područje, a karakteriziran je sposobnošću ekspanzije i kontrakcije i čini barijeru prema toksičnom urinu. Pločasti se epitel može naći u urinu budući da je cijela ženska uretra i dio muške uretre obložen pločastim epitelom te se normalno može naći u trigonumu 10 % muškaraca i 50 % žena. Osim epitelnih stanica u urinu nalazimo leukocite, histocite, makrofage, eritrocite i kristale. Ne-celularne elemente u urinu čine cilindri, sluz te kontaminacije (1).

Citologija urina je jedina neinvazivna metoda za otkrivanje karcinoma prijelaznog epitela (urotela), visoko učinkovita za detekciju urotelnih tumora visokog stupnja, ali insuficijentna u prepoznavanju prisutnosti urotelnih tumora niskog stupnja (2 – 7). Citološka pretraga urina i interpretacija rezultata zahtjeva veliko iskustvo. Citolog proučava morfologiju stanica, prvenstveno njezinu jezgu, N/C omjer (omjer jezgra/citoplazma), prisutnost i izgled nukleola te prisutnost patoloških mitoza (8).

Najčešće indikacije za citološki pregled urina su: dizurija, algurija nepoznatog uzroka, mikrohematurija, makrohematurija, preoperativno predviđanje stupnja diferencijacije urotelnih tumora, postoperativno praćenje urotelnih tumora, suspektna vezikoentralna fistula, invazija ne-uroloških tumora (1).

Tehnička se obrada uzoraka urina u različitim laboratorijima vrši na različite načine ovisno o tehničkoj opremljenosti laboratorija i edukaciji laboratorijskog osoblja te liječnika specijalista. U nekim se laboratorijima uzorak obrađuje samo u citocentrifugi, dok se u nekima obrađuje i u citocentrifugi i u centrifugi. Također, celularnost uzorka urina jako je ovisna o tome uzima li se uzorak s vrha, sredine ili dna posude za uzorkovanje te je li i koliko isti stajao i sedimentirao se prirodnim putem prije njegove tehničke obrade. U nekim je laboratorijima uobičajno ostaviti uzorke urina da sedimentiraju pod utjecajem gravitacije i po nekoliko sati, no obzirom da je urin agresivan medij postavlja se pitanje učinka istog na morfologiju stanica.

1.1. Citologija urina

Citologija urina važan je dopunski test u urološkoj dijagnostici. Korisnost citologije ovisi o nekoliko čimbenika, uključujući adekvatnost prikupljanja uzorka te posebno vještinu citologa (9). Adekvatan je citološki uzorak jedan od glavnih čimbenika za uspješnu citološku analizu (10). Upravo radi toga priprema uzorka za citološku pretragu treba biti obavljena na primjeren i propisan način. Priprema uzorka urina za citološku pretragu je skup metoda za optimiziranje i standardizaciju prikupljanja, pripreme i analize uzoraka na načine koji potiču otkrivanje stanica od interesa i precizno tumačenje nuklearne morfologije. Priprema uzorka uključuje analizu svakog koraka, metode prikupljanja uzoraka te morfološku analizu mikroskopom (9).

1.2. Načini prikupljanja uzoraka za citološku pretragu

Citološki pregled urina obuhvaća analizu urina koji može biti spontano izmokren ili urin dobiven instrumentacijom (11). Za citologa je vrlo važno znati način na koji je uzorak dobiven jer su dijagnostičke pogreške specifične za pojedine uzorke. Spomenute kategorije urina morfološki se razlikuju po celularnosti jer su stanice u spontano izmokrenom urinu dobivene spontanom deskvamacijom te je celularnost takvih uzoraka slaba, osim u slučaju kada je ista pojačana zbog postojanja bolesti (1).

1.2.1. Spontano izmokreni urin

Urin je agresivan medij koji ne pogoduje očuvanju morfoloških karakteristika stanica pa dugotrajno stajanje stanica u urinu tijekom noći dovodi do degenerativnih promjena koje otežavaju analizu. Stoga se za citološku analizu kostisti drugi urin izmokren nakon ustajanja, (tzv. jutarnji) urin, za razliku od noćnog kojeg pacijent izmokri prvog nakon ustajanja. Ukoliko nije moguće uzorkovati prvi jutarnji urin preporuka je uzeti bilo koji urin tijekom dana. Ujutro nakon ustajanja potrebno je popiti pola litre tekućine, mokriti, obaviti temeljnu i detaljnu higijenu spolovila te doći u ustanovu gdje se pretraga vrši. Poželjno je da se urin da na odjelu za citologiju te se ne donosi od kuće. U iznimnim situacijama (slabo pokretni pacijenti) može se prihvatiti urin uzet kod kuće, ali uz uvjete da se vrijeme od uzimanja

uzorka urina do donošenja istog na citologiju skrati na najmanju mogući mjeru (optimalno do pola sata) (1).

Preporuka je da se treba uzeti srednji mlaz urina, no autori *The Paris System for Reporting Urinary Cytology* navode kako je poželjno uzeti prvi mlaz jer je on celularniji (1, 9). Potrebno je izmokriti više od 30 ml urina u neprekinutom mlazu u čistu posudicu te čvrsto zatvoriti posudicu poklopcem ne dotičući ga prstima s unutrašnje strane. Kod muškaraca je potrebno obrisati vrh spolovila čistom papirnatom maramicom, ispustiti prvi mlaz urina u zahod te ponoviti postupak i prikupiti urin u čistu posudicu (9, 12). Tako prikupljen uzorak neće biti kontaminiran stanicama iz drugih sustava i bit će adekvatan uzorak za citološku pretragu (1). Uzorci se uzimaju na odjelu za citologiju kroz tri dana. Neki autori preporučuju uzeti 1 gram C-vitamina noć prije pregleda urina jer je niski pH bolji za očuvanje stanica (13). Uzorak treba dostaviti u laboratoriju u roku od pola sata, ukoliko to nije moguće uzorak treba pohraniti na + 4 °C i dostaviti u laboratorij najkasnije unutar 24 sata od uzimanja uzorka (12). U nekim laboratorijima pacijent dobije posudicu u kojoj se nalazi fiksativ te mokri u nju i takav se uzorak može naknadno dostaviti u laboratorij jer je fiksiran, ali se takvi uzorci ne mogu bojati po May-Grünwald-Giemsi (MGG bojanje).

1.2.2. Uzorci dobiveni instrumentacijom

Uzorak dobiven instrumentacijom uključuje kateterizirani urin (kateterizacija mokraćnog mjehura), ispirke mokraćnog mjehura, desnog i lijevog uretera te uzorke uretera, uretre ili mokraćnog mjehura dobivene četkanjem. Ispirak može biti uzet iz bilo kojeg dijela urinarnog trakta, u praksi je to najčešće iz mokraćnog mjehura. U šupljinu interesa injicira se otopina soli odnosno elektrolita koja se zatim usiše, ovakvi uzroci su najosjetljiviji zbog svoje celularnosti jer se ne radi o spontanoj deskvamaciji nego o deskvamaciji uzrokovanoj potiskom tekućine. Osobito zahtjevni za analizu su ispirci gornjeg urinarnog trakta jer sadrže stanice renalnih sabirnih duktusa, pelvisa i uretera (1).

Nedostatak uzimanja ispirka invazivnost je metode i moguće reaktivne promjene stanica koje mogu izgledati poput displastičnih ili tumorskih stanica, a posljedica su instrumentalne manipulacije (14). Nedostatci tehnike četkanjem su bol, potreba za upotrebom anestezije i artefakti (14, 1).

2. CILJ RADA

Cilj je ove presječne studije:

1. Procijeniti celularnost uzorka urina ovisno o dužini trajanja prirodne sedimentacije – 15 minuta nakon uzorkovanja te 2 i 4 sata nakon uzorkovanja.
2. Procijeniti izraženost degenerativnih promjena na stanicama prijelaznog epitela 15 minuta nakon uzorkovanja te 2 i 4 sata nakon uzorkovanja.
3. Utvrditi optimalno trajanje prirodne sedimentacije uzorka urina s obzirom na celularnost i izraženost degenerativnih promjena.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ustroj studije

Ovo je presječna studija (15) u kojoj su se prikupljali uzorci urina na Kliničkom zavodu za kliničku citologiju Kliničkog bolničkog centra Osijek.

3.2. Ispitanici

Presječnom studijom obuhvaćeno je 84 ispitanika (52 muškaraca i 32 žene) upućenih na Klinički zavod za kliničku citologiju Kliničkog bolničkog centra Osijek tijekom četiri tjedna radi citodijagnostike sedimenta urina s ciljem utvrđivanja maligniteta, izraženosti degenerativnih promjena te utvrđivanje optimalnog trajanja prirodne sedimentacije uzoraka urina s obzirom na celularnost i izraženost degenerativnih promjena. Uveden je sustav šifriranja prema kojem nije moguće utvrditi identitet osobe čiji su podatci korišteni u daljnjem tijeku istraživanja.

3.3. Metode

Po preuzimanju uzorka urin je izmiješan i ostavljen da se stanice prirodno sedimentiraju. Nakon 15 minuta, 2 i 4 sata pipetom su pipetirane dvije kapljice urina s dna čašice za uzorkovanje te je uzorak centrifugiran u citocentrifugi na 1500 okretaja kroz tri minute. Nakon sedimentacije u citocentrifugi uzorci su fiksirani na zraku ili u 95 %-tnom alkoholu i bojani metodom po May-Grünwald Giemsi i Papanicolaou.

3.3.1 Citocentrifuga

Citocentrifuga je uređaj koji vrti stanice u tekućoj suspenziji koje se zatim talože na staklenu podlogu (16). U laboratoriju KBC Osijek uzorak se prikuplja svjež bez dodatka alkohola te se zatim uzorci centrifugiraju u uređaju Cytospin 4, 3 minute na 1500 okretanja (Slika 1.). Nakon centrifugiranja uzorci se fiksiraju te bojaju metodom po Papanicolaou i May-Grünwald Giemsi (MGG bojanje).



Slika 1. Uređaj za citocentrifugu

(iz fundusa Kliničkog zavoda za Kliničku citologiju KBC-a Osijek)

3.3.2 Bojanje metodom po Papanicolaou

Bojanje po Papanicolau se sastoji od nekoliko glavnih koraka koji uključuju: fiksiranje, bojanje jezgre, bojanje citoplazme i čišćenje. Prednosti su bojanja po Papanicolaou jasni nuklearni detalji, očuvana transparentnost citoplazme (i pri prisutnom preklapanju stanica), mogućnost razlikovanja stupnja stanične diferencijacije pločastog epitela te stabilnost bojanja nakon dužeg vremenskog razdoblja (17).

Nakon uzimanja uzroka potrebno ih je fiksirati. Fiksacija uzorka je vrlo bitna jer ona čuva stanice od isušivanja te omogućuje bojanje i diferencijaciju stanica. Ukoliko se uzorak prekasno fiksira, na uzorku se mogu pronaći artefakti, koji ujedno i otežavaju postavljanje dijagnoze. Upravo radi toga dobra je fiksacija preduvjet za postavljanje točne dijagnoze. Za bojanje uzoraka metodom po Papanicolaou fiksaciju je moguće izvršiti na tri načina. Mokra fiksacija označava uranjanje uzorka u 95 %-tni alkohol i to odmah nakon centrifugiranja uzorka. Drugi način je također mokra fiksacija, ali naknadnim sušenjem na zraku. Uzorak se odmah nakon sedimentiranja uroni u 95 %-tni alkohol, a zatim se izvadi i ostavi da se osuši na zraku. Tako fiksirani uzorak pogodan je za, ukoliko postoji potreba, slanje u drugi laboratorij gdje se prije bojanja fiksacija mora dovršiti ponovnim uranjanjem u 95 %-tni alkohol (Slika 2.).



Slika 2. Uranjanje uzoraka u 95 %-tni alkohol pri mokroj fiksaciji

(iz fundusa Kliničkog zavoda za Kliničku citologiju KBC-a Osijek)

Za fiksaciju se mogu koristiti i različiti komercijalni *spray* fiksativi. To su vodeno-alkoholne otopine koje sadrže polietilni-glikol. Nakon uzimanje uzorka potrebno je na uzorak nanijeti *spray* fiksativ prema uputama proizvođača. Tako je fiksirane uzorke u laboratorijima, prije bojanja, potrebno uroniti u 95 %-tni alkohol. U nedostatku fiksativa kao sredstvo fiksacije može poslužiti i lak za kosu (18, 19).

Idući korak u pripremi uzorka jest bojanje jezgre. Za to se koristi prirodna boja hematoksilin, a najčešće se koristi Harris hematoksilin. Ova boja dobro prikazuje strukturu kromatina normalne ili abnormalne stanice. Ona se veže na sulfatne skupine DNA molekule. Boja se ispire destiliranom vodom i izbjeljuje 0,025 %-tnom otopinom HCl koja se također ispire (18, 19).

Bojanje citoplazme odvija se u dvama koracima. Prvo se koristi monokromatska Orange boja koja boja keratin u narančasto. Na tržištu se još mogu naći Orange G koja boja keratin u žućkasto-narančasto te Orange II koja boja keratin u crvenkasto-narančasto. Ovom se bojom dobro prikazuje prisutnost prekeratoze, hiperkeratoze i keratiniziranih malignih stanica. Drugi je korak bojanje citoplazme polikromatskom EA (*eosin azure*) bojom. Boja se sastoji od eozina, svijetlo zelene i Bismarck smeđe boje. Eozin boja citoplazmu zrelih pločastih stanica, nukleole i cilije boji u ljubičasto. Svijetlo zelena boja boji citoplazmu metabolički aktivnih stanica u plavo. Bismarck smeđa ne daje karakterističnu boju citoplazmi. Nakon toga slijedi uranjanje u apsolutni alkohol koji uzrokuje kompletnu dehidraciju koja služi kao priprema za čišćenje uzorka (Slika 3.) (18, 19).



Slika 3. Aparat za bojanje uzoraka metodom po Papanicolau

(iz fundusa Kliničkog zavoda za Kliničku citologiju KBC-a Osijek)

Završni je korak čišćenje uzorka za koje se koristi ksilol. Ksilol je bezbojan, kemijski nereaktivan i ima gotovo isti indeks loma kao staklo, što je vrlo važno zbog transparentnosti uzorka tijekom mikroskopiranja. Idući korak je uklapanje. Za uklapanje se koristi ljepilo koje povezuje staklo i pokrovnicu, čuva preparat od skvrčavanja i isušivanja te sprječava oksidaciju i blijeđenje uzorka (Slika 4.) (18, 19).



Slika 4. Shematski prikaz bojanja razmaza po Papanicolau

(iz fundusa Kliničkog zavoda za Kliničku citologiju KBC-a Osijek)

3.3.3 Bojanje po May-Grünwald Giemsi (MGG bojanje)

Bojanje po May-Grünwald Giemsi je bojanje za koje je potrebno fiksirati uzorak sušenjem na zraku. May-Grünwald Giemsa je bojanje koje nam omogućuje detekciju jezgre, citoplazme i bakterija. Prilikom bojanja ovom metodom jezgre i bakterije se bojaju plavo, dok se citoplazma očituje crvenkastim obojenjem. Otopine May-Grünwald Giemsa reagensa komercijalno su dostupne od nekoliko različitih proizvođača. Vrlo je bitno pratiti upute proizvođača prilikom pripreme samog uzorka, kako bi rezultati bili zadovoljavajući i točni (16).

Uzorke je potrebno sušiti najmanje 2 sata, no ukoliko se radi o hitnom slučaju, ovisno o debljini sedimenta, uzorci se mogu osušiti i za pola sata. Uzorci se nakon fiksacije sušenjem na zraku slažu na stalak i zatim se preliju s otopinom May-Grünwalda i tako se ostave 3 minute. Nakon 3 minute uzorci se ispiru destiliranom vodom, potom se dodaje razrijeđena otopina Giemse i tako se uzorci ostave 15 minuta. Giemsa se razrijeđuje u omjeru 7 ml

Giemse i 100 ml destilirane vode. Nakon 15 minuta uzorci se ponovno ispiru destiliranom vodom, a suhom se krpom obriše višak vode i uzorci se tako ostavljaju da se do kraja osuše. Kada su se uzorci osušili slijedi šifriranje uzorka i potom su uzorci spremni za mikroskopiranje (Slika 5.).



Slika 5. Bojanje po May-Grünwald Giemsi (MGG bojanje)

(iz fundusa Kliničkog zavoda za Kliničku citologiju MBC-a Osijek)

3.4 Statističke metode

Kategorijski su podatci predstavljeni apsolutnim i relativnim frekvencijama. Numerički su podatci opisani medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Razlike kategorijskih varijabli testirane su Fisherovim egzaktnim testom. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli bit će testirana Shapiro-Wilk testom. Razlike u celularnosti i degenerativnim promjenama u uzorku nakon 15 minuta, 2 sata i 4 sata testirane su McNemar-Bowkerovim testom (20, 21). Sve P vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti je postavljena na Alpha = 0,05.

Za statističku analizu koristio se statistički program MedCalc Statistical Software version 14.12.0 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; http://www.medcalc.org; 2014) (22).

4. REZULTATI

Istraživanje je provedeno na 85 ispitanika, od kojih je 53 (62 %) muškaraca i 32 (38 %) žena. Središnja vrijednost (medijan) dobi ispitanika je 60 godina (interkvartilnog raspona od 50 do 72 godine) u rasponu od 9 do 83 godine. Nema značajnih razlika u celularnosti i broju degenerativnih stanica s obzirom na dužinu trajanja prirodne sedimentacije (Tablica 1. i 2.).

Tablica 1. Celularnost u uzorku nakon dva i četiri sata prema celularnosti nakon 15 minuta

		broj (%) ispitanika prema celularnosti nakon 15 minuta				P*
		1	2	3	ukupno	
celularnost nakon 2 sata	1	17 (65)	4 (17)	0	21 (25)	0,39
	2	8 (31)	14 (61)	8 (22)	30 (35)	
	3	1 (4)	5 (22)	28 (78)	34 (40)	
	Ukupno	26 (100)	23 (100)	36 (100)	85 (100)	
celularnost nakon 4 sata	1	20 (77)	2 (9)	0	22 (26)	0,16
	2	3 (12)	17 (74)	9 (25)	29 (34)	
	3	3 (12)	4 (17)	27 (75)	34 (40)	
	Ukupno	26 (100)	23 (100)	36 (100)	85 (100)	

*McNemar-Bowkerov test

Tablica 2. Izraženost degenerativnih promjena u uzorku nakon dva i četiri sata prema izraženosti degenerativnih promjena nakon 15 minuta u uzorcima urina čuvanim na sobnoj temperaturi

		broj (%) ispitanika prema izraženosti degenerativnih promjena na stanicama nakon 15 minuta				P*
		1	2	3	ukupno	
degenerativne stanice nakon 2 sata	1	56 (95)	0	0	56 (66)	0,14
	2	3 (5)	22 (100)	1 (25)	26 (31)	
	3	0	0	3 (75)	3 (3,5)	
	ukupno	59 (100)	22 (100)	4 (100)	85 (100)	
degenerativne stanice nakon 4 sata	1	55 (93)	2 (9)	0	57 (67)	0,41
	2	4 (7)	20 (91)	0	24 (28)	
	3	0	0	4 (100)	4 (4,7)	
	ukupno	59 (100)	22 (100)	4 (100)	85 (100)	

*McNemar-Bowkerov test

Žene imaju značajno više pločastih stanica 2 i 3 u odnosu na muškarce (Fisherov egzaktni test, $P < 0,001$) (Tablica 3.).

Tablica 3. Raspodjela broja pločastih stanica prema spolu

	broj (%) ispitanika prema broju pločastih stanica				P*
	1	2	3	Ukupno	
Muškarci	42 (84)	11 (41)	0	53 (62)	**< 0,001**
Žene	8 (16)	16 (59)	8/8	32 (38)	
Ukupno	50 (100)	27 (100)	8/8	85 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Hematurija je prisutna kod 24 (28 %) ispitanika. Celularnost u uzorku nakon 15 minuta ne razlikuje se značajno kod ispitanika s obzirom na hematuriju, dok je nakon 2 sata značajno više ispitanika s hematurijom imalo celularnost 3 (Fisherov egzaktni test, P = 0,03), kao i u uzorku nakon 4 sata značajno više ispitanika s hematurijom imaju više vrijednosti celularnosti (Fisherov egzaktni test, P = 0,009) (Tablica 4.).

Tablica 4. Raspodjela ceularnosti prema prisutnosti hematurije

	broj (%) ispitanika prema hematuriji			P*
	ne	da	ukupno	
celularnost nakon 15 minuta				
1	22 (36)	4 (17)	26 (31)	
2	17 (28)	6 (25)	23 (27)	0,12
3	22 (36)	14 (58)	36 (42)	
celularnost nakon 2 sata				
1	19 (31)	2 (8)	21 (25)	
2	22 (36)	8 (33)	30 (35)	**0,03**
3	20 (33)	14 (58)	34 (40)	
celularnost nakon 4 sata				
1	21 (34)	1 (4)	22 (26)	
2	19 (31)	10 (42)	29 (34)	**0,009**
3	21 (34)	13 (54)	34 (40)	
Ukupno	61 (100)	24 (100)	85 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Ispitanici s hematurijom nemaju značajno različite degenerativne promjene u uzorku nakon 15 minuta, tako i nakon 2 i 4 sata (Tablica 5.).

Tablica 5. Raspodjela degenerativnih promjena prema prisutnosti hematurije u uzorcima urina čuvanim na sobnoj temperaturi

	broj (%) ispitanika prema hematuriji			P*
	ne	da	ukupno	
degenerativne promjene nakon 15 minuta				
1	45 (74)	14 (58)	59 (69)	
2	15 (25)	7 (29)	22 (26)	0,09
3	1 (2)	3 (13)	4 (5)	
degenerativne promjene nakon 2 sata				
1	43 (70)	13 (54)	56 (66)	
2	17 (28)	9 (38)	26 (31)	0,14
3	1 (2)	2 (8)	3 (4)	
degenerativne promjene nakon 4 sata				
1	43 (70)	14 (58)	57 (67)	
2	17 (28)	7 (29)	24 (28)	0,12
3	1 (2)	3 (13)	4 (5)	
Ukupno	61 (100)	24 (100)	85 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Upalu ima 18 (21 %) ispitanika koji imaju i značajno veću celularnost u uzorku nakon 15 minuta, i nakon 2 i 4 sata (Fisherov egzaktni test, P < 0,001) (Tablica 6.).

Tablica 6. Raspodjela celularnosti prema prisutnosti upale

	broj (%) ispitanika prema upali			P*
	ne	da	ukupno	
celularnost nakon 15 minuta				
1	26 (39)	0	26 (31)	
2	21 (31)	2 (11)	23 (27)	< **0,001**
3	20 (30)	16 (89)	36 (42)	
celularnost nakon 2 sata				
1	21 (31)	0	21 (25)	
2	27 (40)	3 (17)	30 (35)	< **0,001**
3	19 (28)	15 (83)	34 (40)	
celularnost nakon 4 sata				
1	22 (33)	0	22 (26)	
2	26 (39)	3 (17)	29 (34)	< **0,001**
3	19 (28)	15 (83)	34 (40)	
Ukupno	67 (100)	18 (100)	85 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Oni ispitanici koji imaju upalu, značajno imaju više degenerativnih promjena u uzorku nakon 15 minuta (Fisherov egzaktni test, P = 0,002), nakon dva sata (Fisherov egzaktni test, P = 0,002) te nakon četiri sata (Fisherov egzaktni test, P = 0,005) (Tablica 7.).

Tablica 7. Raspodjela degenerativnih promjena prema prisutnosti upale u uzorcima urina čuvanim na sobnoj temperaturi

	broj (%) ispitanika prema upali			P*
	ne	da	ukupno	
degenerativne promjene nakon 15 minuta				
1	52 (78)	7 (39)	59 (69)	
2	14 (21)	8 (44)	22 (26)	**0,002**
3	1 (1)	3 (17)	4 (5)	
degenerativne promjene nakon 2 sata				
1	50 (75)	6 (33)	56 (66)	
2	16 (24)	10 (56)	26 (31)	**0,002**
3	1 (1)	2 (11)	3 (4)	
degenerativne promjene nakon 4 sata				
1	50 (75)	7 (39)	57 (67)	
2	16 (24)	8 (44)	24 (28)	**0,005**
3	1 (1)	3 (17)	4 (5)	
Ukupno	67 (100)	18 (100)	85 (100)	

*Fisherov egzaktni test

5. RASPRAVA

Već površan pregled znanstvene literature upućuje da općeprihvaćena metoda skupljanja i citološke obrade uzoraka urina ne postoji. Različiti navodi vode suprotnim zaključcima o prednostima i nedostacima spontano izmokrenog urina u odnosu na kateterizirani urin, odnosno ispirke mjehura; broj uzoraka urina; treba li se isti obraditi svjež ili odmah fiksirati; treba li ga držati na sobnoj temperaturi ili u hladnjaku; koliko sati; koliko je uzoraka potrebno za prihvatljivu osjetljivost; koja je metoda obrade najbolja i koliki se broj stanica u uzorku može prihvatiti kao adekvatan.

U našoj se državi način obrade, analize i izvještavanja nalaza urina razlikuje od laboratorija do laboratorija, što u konačnici rezultira nerazumijevanjem citološkog nalaza od strane kliničara, što je osobito izraženo pri odlasku pacijenata s citološkim nalazom iz jedne sredine u drugu, obično iz manjeg grada u Zagreb. No, i u Zagrebu se različiti laboratoriji oslanjaju na različite škole i tradicije te se i njihova obrada uzoraka i način izvještavanja nalaza urina uvelike razlikuju, čak štoviše, u svom značenju mogu biti totalno suprotni.

Kad novi laboratorijski djelatnik dođe raditi u neki laboratorij, bude podučen načinu obrade uzorka kako se ona vrši u tom laboratoriju, što ponajviše ovisi o dostupnoj aparaturi i školi koju slijede citolozi tog laboratorija. Neki laboratoriji posjeduju i centrifugu i citocentrifugu te uzorke prvo centrifugiraju u centrifugi, a zatim u citocentrifugi te time dobivaju veću celularnost uzorka. Ta se metoda može unaprijediti tako što se nakon odlijevanja supernatanta ostatak uzorka resuspendira s nekoliko mililitara balansirane otopine elektrolita. U nekim se laboratorijima za bolje očuvanje i vidljivost kromatina dodaje i 0,25 ml 2 %-tnog carbowaxa *(Carbowax PEG 1450)* (9, 23). Laboratoriji koji nemaju centrifugu sedimentiraju uzorke samo u citocentrifugi što vodi još većim različitostima u celularnosti urina. Za citocentrifugu potrebno je odpipetirati samo dvije kapi urina od ukupnog volumena (optimalno oko 30 ml). Logično je za zaključiti da postoje značajne razlike u celularnosti uzorka urina ukoliko se te dvije kapi uzimaju s vrha, sredine ili dna posude za uzorkovanje ili ukoliko se uzorak prije uzimanja dviju kapi dobro izmiješa. Posljedica je to činjenice da se svi zaprimljeni uzorci ne mogu obraditi neposredno nakon zaprimanja uzorka pa oni neko vrijeme stoje te zbog veće gustoće stanica u odnosu na tekućinu prirodno sedimentiraju što za posljedicu ima nejednak broj stanica na vrhu, u sredini i na dnu uzorka. Budući da su sve te premise proizašle iskustveno i na osnovu logičnog zaključivanja, željeli smo isto ispitati u

kontroliranim uvjetima. Osim toga, kada citolozi daju uputu pacijentu o ispravnom načinu davanja uzorka, jedan od glavnih naglasaka bit će na bitnosti dobivanja svježeg urina za citološku obradu. U laboratoriju Kliničkog zavoda za Kliničku citologiju inzistira se da urin ne bude stariji od pola sata kad se donosi s drugog odjela ili eventualno od kuće kod nepokretnih bolesnika. Postavlja se pitanje koje je krajnje vrijeme za obradu uzorka da degenerativne promjene na stanicama ne utječu na osjetljivost metode u detekciji malignih stanica.

U ovom istraživanju celularnost je analizirana nakon 15 minuta nakon davanja uzorka, 2 i 4 sata, pri čemu je uočeno da nema značajnih razlika u celularnosti s obzirom na dužinu trajanja prirodne sedimentacije. Može se pretpostaviti da je 15 minuta stajanja uzorka dostatno da se stanice prirodno sedimentiraju te daljnja odgoda obrade uzorka ne pridonosi boljoj celularnosti uzorka. Također, rezultati ukazuju da nema značajnih razlika u izraženosti degenerativnih promjena na stanicama prijelaznog epitela ukoliko se uzorak obradi u vremenskom intervalu do četiri sata nakon uzorkovanja. To eventualno može značiti da citolozi ne moraju biti toliko strogi u inzistiranju da rodbina donese uzorak nepokretnog pacijenta od kuće za najduže pola sata. Vremenski interval od uzimanja do obrade uzorka urina prije oštećenja stanica ovisi o pH, sadržaju proteina, enzimskoj aktivnosti (degeneracija stanica autolitičkim enzimima) i prisutnosti bakterija (24). Izraženost degenerativnih promjena istraživali su Hussain i suradnici na način da su prikupljeni uzorak urina podijelili u tri dijela, jedan su fiksirali odmah po uzorkovanju, drugi nakon dva sata, a treći nakon četiri sata te bojali metodom po Papanicolaou. Zaključili su da odgoda fiksacije značajno utječe na očuvanost stanica i kvalitetu bojenja, dok sterilnost posude za prikupljanje uzorka, osobito ako je uzorak odmah fiksiran, ne utječe na izraženost degenerativnih promjena i kvalitetu bojenja (24). Veljković i suradnici (25) analizirali su vrijednosti leukocitne esteraze, pH, specifične težine, hemoglobina, proteina, nitrata, glukoze i ketona te leukocite, eritrocite, epitelne stanice i bakterije u urinima nakon dva sata te nakon četiri sata od uzimanja uzorka urina. Zaključili su da se urin može držati na sobnoj temperaturi do četiri sata bez značajnih promjena na rezultate analize.

U istraživanju su dodatno istraženi kontaminacija stanicama pločastog epitela te utjecaj hematurije i upale na celularnost i degenerativne promjene stanica u uzorcima urina ovisno o vremenu proteklom od uzorkovanja.

Pri analizi uzoraka urina žena citolozima kontaminacija pločastim epitelom iz genitalnog trakta žena često predstavlja problem. Ono što iskustveno citolozi znaju potvrdili su i naši rezultati – žene u uzorcima imaju značajno više stanica pločastog epitela u odnosu na muškarce.

Hematurija je u ovoj studiji bila prisutna u 28 % ispitanika. Citolozi iskustveno očekuju da uzorci s većom količinom krvi imaju i veću celularnost što se nije potvrdilo ovim istraživanjem. No, zanimljivo je što se celularnost uzoraka s izraženom hematurijom značajno povećela nakon dva, odnosno četiri sata. Pretpostavka je da u studiji nije obrađen dostatan broj uzoraka koji bi potvrdili povećanje celularnosti uzoraka pri prisutnoj hematuriji odmah nakon uzimanja uzorka ili eventualno proces prirodne sedimentacije u krvavim uzorcima duže traje, što bi trebalo ispitati nekom narednom studijom.

Produženo vrijeme do obrade uzoraka urina koji sadrže više krvi ne utječe na izraženost degenerativnih promjena u uzorku urina obrađenom petnaest minuta nakon uzorkovanja, nakon dva, odnosno četiri sata u odnosu na uzorke urina koji nemaju izraženu hematuriju. Isto je također u suprotnosti s iskustvenim stajalištem citologa.

Promjene celularnosti i izraženosti degenerativnih promjena u uzorcima urina s prisutnom upalom u skladu je s opažanjima citologa u svakodnevnom radu. Uzorci s upalom imaju značano veću celularnost u sva tri vremenska razdoblja promatranja, a isto vrijedi i za izraženost degenerativnih promjena.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti:

- Dužina trajanja prirodne sedimentacije ne dovodi do značajnih razlika u celularnosti i broju degenerativnih stanica u uzorcima urina analiziranim 15 minuta nakon uzorkovanja te dva i četiri sata nakon uzorkovanja.
- Kod žena je potvrđen značajno veći broj pločastih stanica u odnosu na muškarce.
- Hematurija znatno utječe na celularnost u uzorcima nakon 2 sata pri čemu je više ispitanika imalo celularnost 3 te u uzorcima nakon 4 sata kada su ispitanici s hematurijom imali značajno veće vrijednosti celularnosti uzoraka.
- Hematurija nije znatno utjecala na izraženost degenerativnih promjena u uzorku nakon 15 minuta, 2 i 4 sata.
- Prisutnost upale značajno utječe na povećanje celularnosti u uzorcima nakon 15 minuta, 2 i 4 sata u odnosu na uzorke bez izražene upale.
- Upala je značajno povezana s jače izraženim degenerativnim promjenama u uzorcima nakon 15 minuta, nakon 2 sata te nakon 4 sata.

7. SAŽETAK

CILJ ISTRAŽIVANJA. Procijeniti celularnost uzorka urina i izraženost degenerativnih promjena na stanicama urotela ovisno o dužini trajanja prirodne sedimentacije – 15 minuta, 2 i 4 sata nakon uzorkovanja. Utvrditi optimalno vrijeme prirodne sedimentacije urina s obzirom na celularnost i izraženost degenerativnih promjena.

USTROJ STUDIJE. Presječna studija.

ISPITANICI I METODE. Presječnom studijom obuhvaćeno je 84 ispitanika upućenih na Klinički zavod za kliničku citologiju Kliničkog bolničkog centra Osijek tijekom četiri tjedna radi citodijagnostike sedimenta urina s ciljem dijagnostike prisutnosti malignih stanica.

REZULTATI. Nema značajnih razlika u celularnosti i izraženosti degenerativnih promjena obzirom na dužinu trajanja prirodne sedimentacije. Žene imaju značajno veći broj pločastih stanica u uzorcima u odnosu na muškarce. Hematurija je pristuna kod 28 % ispitanika, kod kojih je celularnost uzorka značajno veća u uzorcima nakon 2 sata te nakon 4 sata prirodne sedimentacije. Ispitanici s hematurijom nemaju značajno izraženije degenerativne promjene u uzorcima nakon 15 minuta i nakon 2 i 4 sata. Izraženu upalu ima 21 % ispitanika koji imaju i značajno veću celularnost u uzorcima nakon 15 minuta te nakon 2 i 4 sata prirodne sedimentacije. Ispitanici s upalnim promjenama imaju i značajno jače izražene degenerativne promjene u uzorku nakon 15 minuta, nakon dva sata te nakon četiri sata.

ZAKLJUČAK. Prirodna sedimentacija uzoraka urina radi povećavanja celularnosti uzorka za citološku pretragu ne treba trajati duže od petnaest minuta, budući da se celularnost uzorka protrahiranim stajanjem uzorka ne povećava. Odgađanje obrade uzoraka urina može se produžiti na četiri sata obzirom da se izraženost degenerativnih promjena u tom vremenskom intervalu značajno ne mijenja.

KLJUČNE RIJEČI. celularnost; degenerativne promjene; sedimentacija; urin.

8. SUMMARY

THE DEPENDENCE OF URINE SAMPLE CELLULARITY AND THE PREVALENCE OF DEGENERATIVE CHANGES INUROTHELIAL CELLS ON THE MANNER OF SAMPLE PREPARATION FOR CYTOLOGICAL EXAMINATION

OBJECTIVES. To estimate cellularity of the urine sample depending on the duration of natural sedimentation - 15 minutes after sampling and 2 and 4 hours after sampling. To estimate the prevalence ofdegenerative changes in urothelial cells 15 minutes after sampling and 2 and 4 hours after sampling. To determine the optimal time of natural sedimentation of the urine sample with regard to cellularity and the prevalence of degenerative changes.

STUDY DESIGN. A cross-sectional study.

PARTICIPANTS AND METHODS. A cross-sectional study included 84 respondents (52 men and 32 women) who were referred to the Department of Clinical Cytology, University Hospital Center Osijek, for cytodiagnostic urine sedimentation testing within four weeks todetect the presence of malignant cells.

RESULTS. There are no significant differences in cellularity and the prevalence of degenerative changes regarding the duration of natural sedimentation. Women havea significantly higher number of plate cells in samples than men. Hematuria occurs in 28% of respondents, whose cellularity is significantly higher in samples after 2 hours and after 4 hours of natural sedimentation. Patients with hematuria do not exhibit significantly more pronounced degenerative changes in samples after 15 minutes and after 2 and 4 hours. Pronounced infection occurs in 21% of respondents who also have a significantly higher cellularity in samples after 15 minutes and after 2 and 4 hours of natural sedimentation. Respondents who have changes associated with infections also have significantly more pronounced degenerative changes in the sample after 15 minutes, after 2 hours and after 4 hours.

CONCLUSION. Natural sedimentation of urine samples with the aim of increasing the cellularity of the sample for cytological examination should not last longer than fifteen minutes, since the cellularity of the sample does not increase during its prolonged storage. The delay in the processing of urine samples can be extended to four hours, as the prevalence of degenerative changes does not significantly change in that time interval.

KEYWORDS. cellularity; urine; degenerative changes; sedimentation.

9. LITERATURA

1. Miličić V, Prvulović I. Mogućnosti citodijagnostike bolesti mokraćnog sustava. U: Miličić V, Tomašković I, Butković-Soldo S, urednici. Suvremeni pristup infektivnim i neoplastičnim bolestima mokraćnog sustava. Osijek: Studio HS internet d.o.o., Udruga Edumos; 2015. str. 34-48.
2. Esposti PL, Zajicek J. Grading of transitional cell neoplasms of the urinary bladder from smears of bladder washings. A critical review of 326 tumors. Acta Cytol. 1972; 16:529-37
3. Lewis RW, Jackson Jr AC, Murphy WM et al. Cytology in the diagnosis and follow up of transitional cell carcinoma of the urothelium: a review with a case series. J Urol. 1976;116:43-6.
4. Murphy WM, Soloway MS, Jukkola AF et al. Urinary cytology and bladder cancer. The cellular features of transitional cell neoplasms. Cancer. 1984;5(3):1555-65.
5. Koss LG, Deitch D, Ramanathan R, Sherman AB. Diagnostic value of cytology of voided urine. Acta Cytol. 1985;29(5):810-6.
6. Raab SS, Lenel JC, Cohen MB. Low-grade transitional cell carcinoma of the bladder. Cancer. 1994;74 (5):621-6.
7. Nabi G, Greene DR, O'Donnell M. How important is urinary cytology in the diagnosis of urological malignancies? Eur Urol. 2003;43:632-6
8. Peruško Kozina P, Besser Silconi Ž, Lozić AAB. Uloga citologije u otkrivanju urotelnih tumora. Glasnik pulske bolnice. 2013;10(10). str. 15-17.
9. Rosenthal DI, Wojcik EM, Kurtycz DFI, The Paris System for Reporting Urinary Cytology. 1.izd. Philadelphia. Springer; 2016.
10. Tesser Poloni JA, Bosan IB, Garigali G, Fogazzi GB. Urinary red blood cells: not only glomerular or nonglomerular. Nephron Clin Pract. 2012;120:c36-c41.
11. Rathert P, Roth S. Indications for Urinary Cytology. U: Rathert P, Roth S, Soloway MS, urednici. Urinary cytology, Manual and Atlas. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 1991;9-13.
12. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Upute za uzimanje i slanje uzoraka. Dostupno na adresi: http://www.hzjz.hr/sluzbe/sluzba-za-mikrobiologiju/upute-za-uzimanje-i-slanje-uzoraka/. Datum pristupa: 22.3.2017.

13. Trutin Ostovic K. Urine Cytology with ancillary tests. In Book of 3rd Annual European Tutorial ed. Anagnostopoulou I, Hellenic Society of Clinical Cytology, Kimi-Evia- Greece, 2010;22-6.
14. Roth S. Urinary Erthrocyte Morphology and Diagnosis of Hematuria. U: Rather P, Roth S, Soloway MS. Urinary Cytology, Manual and Atlas. 2.izd. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 1991. str. 187-204.
15. Kolčić I, Vorko-Jović A, ur. Epidemiologija. 1. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2012.
16. Koss LG, Melamed MR, ur. Koss' diagnostic cytology and its Histopathologic Bases. 5.izd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
17. Gray W, Kocjan G. Diagnostic Cytopathology. 3. izd. Churchill Livingstone: Elsevier; 2010.
18. Singer Z. Priručnik za ginekološku citologiju. 2. izd. Zagreb: Vlastita naklada; 1994.
19. Miličić-Juhas V. Dysplasia media (cervikalna intraepitelna neoplazija II) - realna i/ili nužna citološka dijagnoza. [Doktorska disertacija]. Osijek: Sveučilište J. J. Strossmayera, Medicinski fakultet; 2008.
20. Horvat J, Mijoč J. Osnove statistike. 2. izd. Zagreb: Naklada Ljevak; 2012.
21. Milošević Z, Bogdanović D. Statistika i informatika u oblasti medicinskih nauka. 1. izd. Niš: Galaksija; 2012.
22. MedCalc Statistic Software. Dostupno na adresi: https:// www.medcalc.org/. Datum pristupa: 24.5.2017.
23. Richard Severance. Cytology Specimen Collection. Dostupno na adresi: http://www.shastapathologyassociates.com/SPA%20PDFs/Cytology%20Specimen%20Collection.pdf. Datum pristupa: 11.6.2017.
24. Ahmed HG, Tom MA.The consequence of delayed fixation on subsequent preservation of urine cells.Oman Med J. 2011 Jan;26(1):14-8
25. Veljkovic K, Capote KR, Bhayana V, Pickersgill R, Beattie J, Clark L, i sur. Assessment of a four hour delay for urine samples stored without preservatives at room temperature for urinalysis. Clin Biochem. 2012 Jul;45(10-11):856-8.

10. ŽIVOTOPIS

Ivana Zekić, studentica 6. godine

Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

Medicinski fakultet Osijek

Studij medicine

Cara Hadrijana 10E

Tel. +385-31-51-28-00

Datum i mjesto rođenja:

23. 8. 1991., Zagreb

Kućna adresa:

Ul. kralja Tomislava 138, 44330 Novska

Tel. +385-91-348-21-19

E-mail: ivana.zekic23@gmail.com

OBRAZOVANJE:

2006. – 2010. Opća gimnazija Novska

2010. – 2017. Studij medicine, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera

OSTALE AKTIVNOSTI:

11. - 13. svibnja 2017. sudjelovala na 12.-im osječkim urološkim danima i 5.-im osječkim nefrološkim danima (predavanje „Citološka dijagnostika neinvazivnih karcinoma prijelaznog epitela visokog stupnja“ i „Citologija u dijagnostici karcinoma prijelaznog epitela niskog stupnja“).