



Зайцева Л.П.¹✉, Надыров Э.А.²

¹ Гомельский областной клинический онкологический диспансер, Гомель, Беларусь

² Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

Ядрышковые организаторы (Nucleus organizers) обедненных клетками цитологических препаратов осадка мочи как информативный фактор дифференциальной диагностики различных форм патологии мочевого пузыря

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования, сбор материала, обработка, написание текста – Зайцева Л.П.; редактирование, проверка критически важного содержания, утверждение рукописи материалов статьи для публикации – Надыров Э.А.

Подана: 11.09.2024

Принята: 11.11.2024

Контакты: larysazaitsava2802@gmail.com

Резюме

Введение. Традиционно осуществляемое цитологическое исследование гипоцеллюлярных препаратов осадка мочи связано с потенциальным риском возникновения ложноположительных либо ложноотрицательных результатов, что заставляет изыскивать дополнительные критерии дифференциальной диагностики различных форм патологии мочевого пузыря.

Цель. Определить количественные и качественные морфологические параметры ядрышковых организаторов в гипоцеллюлярных цитологических препаратах осадка мочи при отдельных формах патологии мочевого пузыря.

Материалы и методы. Исследовано 600 уротелиальных клеток, окрашенных нитратом серебра, с использованием программы Motic Images Advanced 3.2, позволяющей проводить измерения в полуавтоматическом режиме количества ядрышковых организаторов (в том числе и мелкодисперсных зон), занимаемой ими площади в ядре и процентного (%) соотношения площади ядрышковых организаторов к площади ядра клетки.

Результаты. Показано, что рост степени злокачественности статистически значимо взаимосвязан с площадью ядрышковых организаторов ($r_s=0,442$, $p<0,0001$), с процентным выражением соотношения площади ядрышковых организаторов к площади ядра ($r_s=0,598$, $p<0,0001$) и с количеством ядрышковых организаторов ($r_s=0,769$, $p<0,0001$). Наибольшая площадь ядрышковых организаторов была установлена для уротелиальной карциномы High grade, которая в 2,4 раза превышала аналогичный показатель при реактивных изменениях ($p<0,0001$) и в 1,7 раза – при уротелиальной карциноме Low grade ($p<0,0001$). Показатель процентного соотношения площади ядрышковых организаторов к площади ядра имел максимальные значения при уротелиальной карциноме High grade и превышал аналогичный показатель при реактивных изменениях в 2,6 раза ($p<0,0001$) и уротелиальной карциноме Low



grade – в 2 раза ($p < 0,0001$). Количество ядрышковых организаторов на ядро клетки было максимальным при уротелиальной карциноме High grade и превышало аналогичные значения при уротелиальной карциноме Low grade в 1,83 раза ($p < 0,0001$) и реактивных изменениях в 2,75 раза ($p < 0,0001$). При уротелиальной карциноме Low grade количество ядрышковых организаторов на ядро клетки было в 1,5 раза выше в сравнении с реактивными изменениями ($p < 0,0001$).

Заключение. Для повышения надежности цитологического метода исследования в дифференциальной диагностике патологических изменений мочевого пузыря на дооперационном этапе необходимо оценивать ядрышковые организаторы, окрашивая цитологические препараты осадка мочи реагентом с нитратом серебра. Возрастание значений морфометрических параметров ядрышковых организаторов (площадь ядрышковых организаторов, процентного соотношения площади ядрышкового организатора к площади ядра, количество ядрышковых организаторов) отражает увеличение пролиферативной активности клеток при их злокачественной трансформации. Окраска ядрышковых организаторов нитратом серебра является простым в исполнении, не требующим больших материальных затрат методом и может быть использована как альтернатива сложному и дорогостоящему иммуноцитохимическому методу исследования при оценке пролиферативной активности клеток.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, цитологическое исследование, гипоцеллюлярный осадок мочи, дифференциальная диагностика, ядрышковые организаторы

Zaitsava L.¹✉, Nadyrov E.²

¹ Gomel Regional Clinical Oncological Dispensary, Gomel, Belarus

² Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

Nucleus Organizers of Cell-Depleted Cytological Preparations of Urine Sediment as Informative Factor in Differential Diagnosis of Various Bladder Pathologies

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: study concept and design, material collecting, processing, text writing – Zaitsava L.; editing, critical content checking, manuscript approval for publication – Nadyrov E.

Submitted: 11.09.2024

Accepted: 11.11.2024

Contacts: larysazaitsava2802@gmail.com

Abstract

Introduction. Conventional cytological tests of hypocellular urine sediments are associated with a potential risk of false-positive or false-negative results, forcing to search for further criteria for differential diagnosis of various bladder pathologies.

Purpose. To determine quantitative and qualitative morphological parameters of nucleus organizers in hypocellular cytological preparations of urine sediment in some bladder pathologies.

Materials and methods. 600 urothelial cells stained with silver nitrate were analyzed using the Motic Images Advanced 3.2 software allowing semi-automatic nucleus organizers

(including finely dispersed zones) quantification, as well as their area in the nucleus and the ratio (%) of their area to that of the cell nucleus measurement.

Results. It was shown that the increase in malignancy grade correlated statistically significantly with the area of nucleus organizers ($r_s=0.442$, $p<0.0001$), with the percent ratio of nucleus organizers area to nucleus area ($r_s=0.598$, $p<0.0001$), and with the number of nucleus organizers ($r_s=0.769$, $p<0.0001$). The largest area of nucleus organizers was identified in high grade urothelial carcinoma, and it was 2.4-fold higher than that in reactive changes ($p<0.0001$) and 1.7-fold higher than that in low grade urothelial carcinoma ($p<0.0001$). The percent ratio of nucleus organizers area to the nucleus area showed maximum values in high grade urothelial carcinoma and was 2.6-fold higher ($p<0.0001$) than in reactive changes and 2-fold higher ($p<0.0001$) than in low grade urothelial carcinoma. The number of nucleus organizers per cell nucleus was maximal in high-grade urothelial carcinoma and exceeded similar values in low grade urothelial carcinoma by 1.83-fold ($p<0.0001$) and reactive changes by 2.75-fold ($p<0.0001$). In low grade urothelial carcinoma, the number of nucleus organizers per cell nucleus was 1.5-fold higher than in reactive changes ($p<0.0001$).

Conclusion. To increase the reliability of cytology method in differential diagnosis of bladder pathological changes at preoperative stages, an evaluation of nucleus organizers is required by staining cytological preparations of urine sediment with silver nitrate reagent. Increasing values of morphometric parameters of nucleus organizers (area of nucleus organizers, percent ratio of nucleus organizer area to nucleus area, and nucleus organizers number) indicate an increase in cells proliferative activity in their malignant transformation. Silver nitrate staining of nucleus organizers is easy to perform and not requiring large material costs method, and can be used as an alternative to complicated and expensive immunocytochemical test method in assessing cells proliferative activity.

Keywords: bladder cancer, cytological examination, hypocellular urine sediment, differential diagnosis, nucleus organizers

■ ВВЕДЕНИЕ

Рак мочевого пузыря (РМП) остается важнейшей проблемой в структуре общей онкологической заболеваемости и составляет 3,1% всех злокачественных образований во всем мире. РМП является 13-м по частоте диагностируемым видом рака, с 614 тыс. вновь выявленных случаев рака и 220 тыс. смертей, произошедших в 2022 году [1]. По данным Белорусского канцер-регистра, в 2020 году в Беларуси был выявлен 1071 новый случай РМП, стандартизованный показатель заболеваемости составил 6,0 на 100 000 населения, у мужчин – 12,5, у женщин – 1,9 на 100 000 населения. Выявляемость по стадиям заболевания составила: I–II – 81,3%, III – 9,0%, IV – 7,8% [2]. Цитологическое исследование клеточного осадка мочи в Республике Беларусь включено в алгоритм диагностики и лечения РМП и применяется в качестве дополнительного метода исследования при первичном обследовании и как основной метод при наблюдении за пациентами, страдающими РМП [3].

Для улучшения взаимодействия между патологоанатомами, цитологами (врачами клинической лабораторной диагностики) и урологами в 2016 году было опубликовано первое издание Парижской системы отчетности для стандартизации



заключений цитологического исследования мочи (TPSRUC, Парижская система [TPS] 1.0). После 5–6 лет практики на основе критериев TPS 1.0 и проспективных исследований в 2022 году вышло второе издание (TPS 2.0) [4].

TPS 2.0 состоит из шести диагностических категорий: неинформативный материал (ND), отсутствие уротелиальной карциномы высокой степени злокачественности (NHGUC), атипичные уротелиальные клетки (AUC), подозрение на уротелиальную карциному высокой степени злокачественности (SHGUC), уротелиальная карцинома высокой степени злокачественности (HGUC) и другие злокачественные новообразования. При этом заключение об уротелиальной карциноме низкой степени злокачественности (LGUC) было отнесено к категории NHGUC – в связи с низкой диагностической чувствительностью в выявлении LGUC (21–53%) [5]. Основной целью TPS является: снижение процента неопределенных категорий (AUC) и сосредоточение на точной идентификации HGUC, что обеспечивает наивысшую диагностическую специфичность и диагностическую чувствительность в определении HGUC [4].

TPS 1.0 и 2.0 определили, что для постановки заключения HGUC в нижних и верхних мочевых путях достаточно более 5–10 недегенерированных, неповерхностных уротелиальных клеток с морфологическими признаками злокачественности (HGCs), которыми являются: гиперхромия ядра, неровный контур ядерной мембраны, хроматин грубой структуры и главный диагностический ориентир – ядерно-цитоплазматическое соотношение (ЯЦС) – $\geq 0,5$ – «увеличенное», $\geq 0,7$ – «высокое», также могут присутствовать видимые нуклеолы, плотная или вакуолированная цитоплазма, митозы, некроз [6]. Этот количественный параметр (5–10 клеток HGCs) до недавнего времени оставался спорным, однако исследованиями Momin T. Siddiqui et al., 2023, было подтверждено, что современный критерий TPS, предусматривающий наличие ≥ 5 клеток HGCs в нижних отделах тракта, является надежным с риском развития злокачественной опухоли высокой степени (ROHM), равным 100%. Постановка же диагноза HGUC при наличии < 5 клеток HGCs сопряжена с риском снижения ROHM [7].

Следует отметить, что цитологическая интерпретация осадка мочи может быть затруднена в гипоцеллюлярных препаратах (5–10 клеток), из-за инфекций мочевыводящих путей, камней или внутрипузырных инстилляций; по данным зарубежной литературы, специфичность метода также зависит и от квалификации врача [8]. Предоставление ложноположительного цитологического заключения при низкой точности образца мочи приводит к неверным диагностическим решениям.

Для повышения диагностической надежности использования цитологического метода в установлении форм патологии мочевого пузыря предложено применить дополнительный метод исследования – окрашивание цитологических препаратов осадка мочи нитратом серебра для выявления ядрышковых организаторов.

Ядрышковые организаторы (англ. Nucleolus organizer regions, NOR) – участки хромосом, образующие внутри ядра клетки ядрышко. У человека ЯО представлены участками, расположенными на коротких плечах акроцентрических хромосом 13, 14, 15, 21, 22 и содержащими гены 45S рPHK – предшественника 5.8S, 18S, 28S рPHK [9].

Известно, что при трансформации нормальных клеток в опухолевые уровень ЯО в них меняется в сторону повышения, появляется специфическая морфологическая картина и в самих ЯО, и в ядрышках в целом. Данные изменения отражают пролиферативную активность опухолевых клеток и служат объективным маркером злокачественности [9].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определить количественные и качественные морфологические параметры ядрышковых организаторов в гипоцеллюлярных цитологических препаратах осадка мочи при отдельных формах патологии мочевого пузыря.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом анализа являлись гипоцеллюлярные цитологические препараты осадка мочи, приготовленные методами жидкостной цитологии и цитоцентрифугирования и окрашенные по Романовскому – Гимзе. Исследование проводилось на базе централизованной цитологической лаборатории учреждения «Гомельский областной клинический онкологический диспансер».

На дооперационном этапе цитологические заключения были сформулированы с учетом положений TPS 2.0:

- NHGUC (реактивные изменения уротелия) – 25 препаратов (из них 5 соответствовали гистологически верифицированному циститу, в остальных 20 случаях необходимости проведения гистологического исследования не было, так как по результатам визуализирующих методов исследования (КТ, УЗИ) объемная и пристеночная патология не была установлена);
- AUC (атипичные клетки уротелия, в том числе и реактивная атипия) – 21 случай, гистологически верифицированы 17 случаев, из них: уротелиальная карцинома *in situ* – 1, уротелиальная карцинома Low grade – 12, уротелиальная карцинома High grade – 4, в 4 случаях гистологического исследования не было;
- SHGUC – 15 случаев, из них в 2 случаях гистологически верифицировали уротелиальную карциному *in situ*, в 8 – уротелиальную карциному Low grade, в 4 – уротелиальную карциному High grade, в 1 случае гистологического исследования не было;
- HGUC – 35 случаев, из них гистологически верифицировали цистит с участками дисплазии в 3 случаях, уротелиальную карциному *in situ* – 5, уротелиальную карциному Low grade – 10, уротелиальную карциному High grade – 11, в 4 случаях гистологического исследования не было.

Далее по результатам гистологического исследования с верифицированной степенью дифференцировки опухоли (или ее отсутствием) ретроспективно были отобраны соответствующие гипоцеллюлярные цитологические препараты (n=96) и дополнительно окрашены нитратом серебра.

В исследовании использовался импрегнационный метод выявления ЯО в ядрах клеток, предложенный Коржевским Д.Э. в 1995 году, который заключался в следующем: исследуемый материал фиксировали в 96% этаноле в течение 10 минут, далее препарат высушивали на воздухе. После полного высыхания препарат погружали в дистиллированную воду на 1 минуту. Затем на исследуемую зону наконечником наносили 2 объема 50% раствора серебра и 1 объем раствора желатина с муравьиной кислотой. Растворы незамедлительно перемешивали, накрывали покровным стеклом и помещали их на 7–15 минут в темное место. Далее препараты промывали в трех порциях дистиллированной воды по 1–2 мин. При необходимости контрастирования фон препарата подкрашивали [10].

В результате реакции серебрения в ядре определялись ЯО в виде зерен коричнево-черного цвета различных размеров и форм – место контакта серебра в клетке с соответствующими кислотными белками транскрипции и трансформации рРНК [11].



При помощи системы Motic Easy Scan препараты были отсканированы, и программой Motic Images Advanced 3.2 полуавтоматически проведена оценка морфофункциональных особенностей ЯО. На примере 600 уротелиальных клеток были измерены следующие параметры: площадь ядра клетки, количество объектов ЯО (в том числе и мелкодисперсных зон), занимаемая ими площадь в ядре и % соотношения площади ЯО к площади ядра клетки. Статистическую обработку проводили с использованием пакета статистических программ Graph Pad Prism 8.3. Проверка нормальности распределения проводилась с использованием критерия Шапиро – Уилка. Числовые данные отличались от закона нормального распределения, и результаты были представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха $[Q^1-Q^3]$. Сравнительный анализ проводился с использованием критерия Манна – Уитни. Корреляционный анализ проводился с использованием критерия Спирмена (r_s).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

NHGUC (в том числе реактивные изменения уротелия) при окраске по Романовскому – Гимзе характеризовались отсутствием признаков атипии в поверхностных клетках уротелия, отмечались вакуолизация цитоплазмы, равномерное перераспределение хроматина в ядре (рис. 1А). При окраске нитратом серебра в промежуточных клетках уротелия определялись немногочисленные крупные по размерам ЯО, с четким, ровным контуром. При этом в клетках также отсутствовали признаки атипии (рис. 1В).

Так как карцинома LGUC по классификации TPS 2.0 добавлена в категорию NHGUC в связи с низкой диагностической чувствительностью в ее выявлении, связанной

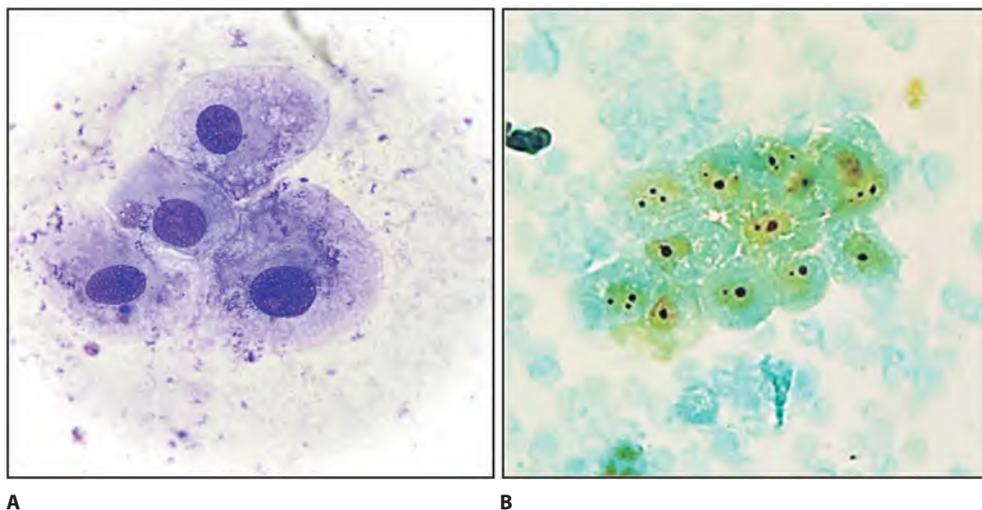
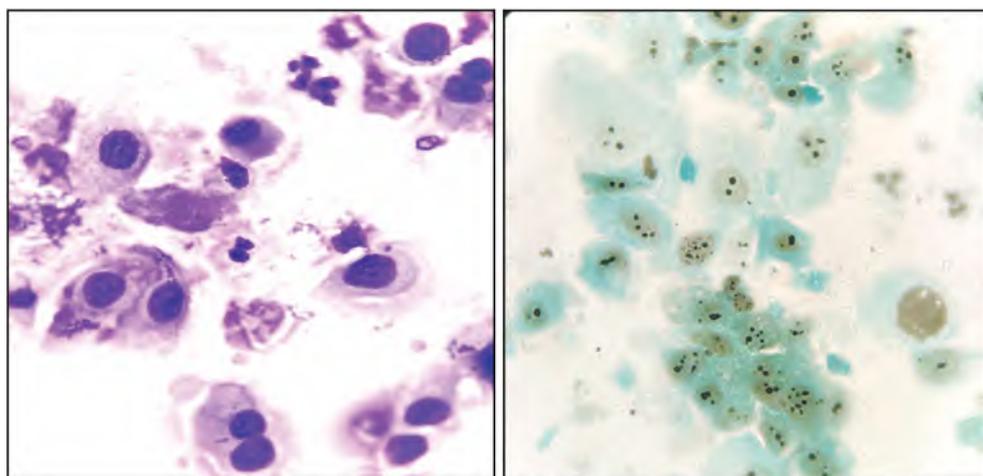


Рис. 1. Цитологический препарат клеточного осадка мочи с признаками реактивных изменений, NHGUC, увеличение $\times 1000$. А – окраска по Романовскому – Гимзе; В – окраска нитратом серебра, окраска фона Fastgreen

Fig. 1. Cytological preparation of urine cell sediment with signs of reactive changes, NHGUC, magnification $\times 1000$. А – Romanovsky – Giemsa staining; В – silver nitrate staining, Fastgreen background staining

Ядрышковые организаторы (Nucleus organizers) обедненных клетками цитологических препаратов осадка мочи как информативный фактор дифференциальной диагностики различных форм патологии мочевого пузыря

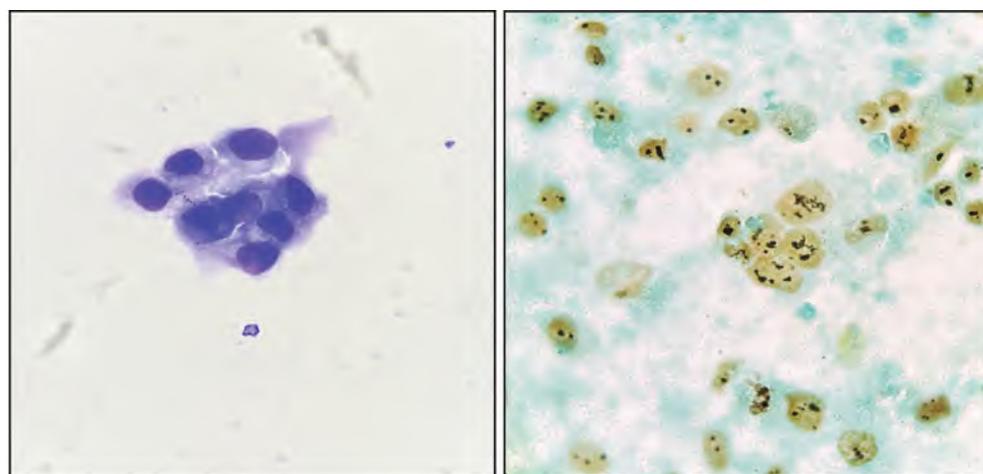


A

B

Рис. 2. Цитологический препарат клеточного осадка мочи, NHGUC (LGUC), увеличение $\times 1000$. А – окраска по Романовскому – Гимзе; В – окраска нитратом серебра, окраска фона Fastgreen
Fig. 2. Cytological preparation of urine cell sediment, NHGUC (LGUS), magnification $\times 1000$.
A – Romanovsky – Giemsa staining; B – silver nitrate staining, Fastgreen background staining

с перекрестной цитологической картиной с доброкачественными клетками уротелия, ретроспективно были изучены цитологические препараты пациентов, гистологическое заключение которых соответствовало уротелиальной карциноме Low grade.



A

B

Рис. 3. Цитологический препарат клеточного осадка мочи, HGUC, увеличение $\times 1000$. А – окраска по Романовскому – Гимзе; В – окраска нитратом серебра, окраска фона Fastgreen
Fig. 3. Cytological preparation of urine cell sediment, HGUC, magnification $\times 1000$. A – Romanovsky – Giemsa staining; B – silver nitrate staining, Fastgreen background staining



При этом в клетках уротелия, окрашенных по Романовскому – Гимзе, выраженные морфологические признаки атипии отсутствовали (ЯЦС $\leq 0,5$, контур ядерной мембраны четкий, равномерное распределение хроматина, хроматин более грубый, чем при NHGUC). Однако при оценке ЯО оказалось, что их количество возросло в ядре клетки по сравнению с категорией NHGUC, появился и полиморфизм ЯО (рис. 2А, В).

Цитологическое заключение о наличии HGUC подтверждалось при окраске по Романовскому – Гимзе морфологическими признаками злокачественности опухолевых клеток (гиперхромией ядра, неровным контуром ядерной мембраны, грубой структурой хроматина и высоким ЯЦС – $\geq 0,7$), а при окраске нитратом серебра четко визуализировались многочисленные полиморфные ЯО, сливающиеся между собой (рис. 3А, В).

На следующем этапе был проведен морфометрический анализ уротелиальных клеток с использованием программы Motic Images Advanced 3.2. Данная программа обеспечила автоматический расчет параметров, необходимых для уточняющей диагностики степени дифференцировки уротелиальной карциномы на дооперационном этапе (см. таблицу). Следует отметить, что в столбце таблицы «Заключение» представлено гистологическое послеоперационное заключение, что является «золотым стандартом» морфологической диагностики. В колонках с морфометрическими показателями (площадь ЯО, % соотношения площади ЯО к площади ядра и количество ЯО в ядре) представлены результаты автоматизированного цитоморфометрического анализа уротелиальных клеток в цитологических препаратах, соответствующих гистологической верификации.

Как видно из таблицы, параметры ЯО изменяются при увеличении степени злокачественности опухоли. Рост степени злокачественности был статистически значимо взаимосвязан с площадью ЯО ($r_s = 0,442$, $p < 0,0001$), с % соотношения площади ЯО к площади ядра ($r_s = 0,598$, $p < 0,0001$) и с количеством ЯО ($r_s = 0,769$, $p < 0,0001$). Наибольшая площадь ЯО была установлена для уротелиальной карциномы High grade, которая в 2,4 раза превышала аналогичный показатель при реактивных изменениях ($p < 0,0001$) и в 1,7 раза – при уротелиальной карциноме Low grade ($p < 0,0001$).

Морфометрические параметры уротелиальных клеток по результатам гистологического и автоматизированного цитоморфометрического анализа
Morphometric parameters of urothelial cells according to the results of histological and automated cytormorphometric analysis

Заключение	Площадь ядрышкового организатора	% соотношения площади ядрышкового организатора к площади ядра	Количество ядрышкового организатора
Реактивные изменения (1)	524,0 [372,0–864,0]	5,7 [4,0–6,9]	4,0 [2,0–7,0]
Уротелиальная карцинома Low grade (2)	715,0 [373,0–1144,0]	7,45 [4,9–10,6]	6,0 [4,0–8,5]
Уротелиальная карцинома High grade (3)	1247,0 [907,0–2113,0]	14,8 [10,2–20,3]	11,0 [6,0–21,0]
p	$P_{1,2} = 0,173$ $P_{1,3} < 0,0001$ $P_{2,3} < 0,0001$	$P_{1,2} = 0,0003$ $P_{1,3} < 0,0001$ $P_{2,3} < 0,0001$	$P_{1,2} < 0,0001$ $P_{1,3} < 0,0001$ $P_{2,3} < 0,0001$

Показатель % соотношения площади ЯО к площади ядра также имел максимальные значения при уротелиальной карциноме High grade и превышал аналогичный показатель при реактивных изменениях в 2,6 раза ($p < 0,0001$), а при уротелиальной карциноме Low grade – в 2 раза ($p < 0,0001$).

Количество ЯО на ядро клетки было максимальным при уротелиальной карциноме High grade и превышало аналогичные значения при уротелиальной карциноме Low grade в 1,83 раза ($p < 0,0001$), а при реактивных изменениях в 2,75 раза ($p < 0,0001$). При этом при уротелиальной карциноме Low grade количество ЯО на ядро клетки было в 1,5 раза выше в сравнении с реактивными изменениями ($p < 0,0001$). С высокой долей вероятности этот критерий можно использовать в дифференциальной диагностике между реактивными изменениями и уротелиальной карциномой Low grade.

■ ВЫВОДЫ

1. Для повышения точности цитологического метода исследования в дифференциальной диагностике патологических изменений мочевого пузыря на дооперационном этапе необходимо оценивать ядрышковые организаторы (ЯО), окрашивая цитологические препараты осадка мочи нитратом серебра.
2. Возрастание значений морфометрических параметров ЯО (площадь ЯО, % соотношения площади ЯО к площади ядра, количество ЯО) отражает увеличение пролиферативной активности клеток при их злокачественной трансформации.
3. Окраска нитратом серебра цитологических препаратов осадка мочи позволяет дифференцировать карциному LGUC, которая включена в категорию NHGUC Парижской классификации 2.0, при этом следует использовать критерий количества ЯО в ядре клетки, а также морфологические особенности ЯО.
4. Для повышения точности цитологического исследования гипоцеллюлярных цитологических препаратов в диагностике HGUC в дополнение к оценке морфологических признаков злокачественности уротелиальных клеток необходимо использовать количественные и качественные критерии ЯО, которые позволят избежать гиподиагностики в цитологических заключениях врача клинической лабораторной диагностики (цитолога).
5. Окраска ЯО нитратом серебра является простым в исполнении, не требующим больших материальных затрат методом и может быть использована как альтернатива сложному и дорогостоящему иммуноцитохимическому методу исследования при оценке пролиферативной активности клеток.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Freddie B., Mathieu L., Hyuna S. et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2024;74(3):229–363. doi: 10.3322/caac.21834
2. Okeanov A. et al. *Cancer in Belarus: figures and facts. Analysis of data from the Belarusian Cancer Registry for 2011–2020*. Minsk. Professional Editions, 2022;302 p. (in Russian)
3. *Algorithms of diagnosis and treatment of malignant diseases. Decree of the Ministry of Health of the Republic of Belarus of July 06, 2018*. 60:539 p. (in Russian)
4. Fei Chen, Xiaoqi Lin. The Paris System for Reporting Urinary Cytology: An Updated Review. *Journal of Clinical and Translational Pathology*. 2023;3(2):59–74. doi: 10.14218/JCTP.2022.00035
5. Barkan G.A., Wojcik E.M., Nayar R. The Paris System for Reporting Urinary Cytology: The Quest to Develop a Standardized Terminology. *Advances in Anatomic Pathology*. 2016;23(4):193–201. doi: 10.1097/PAP.0000000000000118



6. Zhang M.L., Guo A.X., Vanden Bussche C.J. Morphologists overestimate the nuclear-to-cytoplasmic ratio. *Cancer Cytopathol.* 2016;124:669–77. doi: 10.1002/cncy.21735
7. Olawunmi S. Folarin, Momin T. Siddiqui. Are we on track for diagnosing high-grade urothelial carcinoma with a minimum quantity of five malignant cells in lower tract specimens? Critical analysis of The Paris System Quantitation Criteria. *Cancer Cytopathol.* 2023;131:708–715. doi: 10.1002/cncy.22749
8. Tian W., et al. Significant reduction of indeterminate (atypical) diagnosis after implementation of The Paris System for Reporting Urinary Cytology: A single-institution study of more than 27,000 cases. *Cancer Cytopathol.* 2021;129:114. doi: 10.1002/cncy.22349
9. Il'ina T., Kazachkov E., Sergijko S. Predictive assessment of micro RNA expression level and number of nucleolar organizer regions with follicular thyroid tumor of -undetermined malignant potential. *Ural Medical Journal.* 2023;22(2):75–83. doi: 10.52420/2071-5943-2023-22-2-74-83
10. Korzhevsky D., Gilyarov A. *Fundamentals of histological technique.* Saint Petersburg: SpetsLit, 2010. 95 p. (in Russian)
11. Hubbell H.R. *Stain Technol.* 1985;60(5):285–94. doi: 10.3109/10520298509113926