

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANAMARIJA KU HAR

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKE
BIOMEDICINE

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANAMARIJA KU HAR

MAGISTRSKA NALOGA

**OBSTOJNOST ANTIGENOV ZA IMUNOCITOKEMIJO V HIŠNEM
MEDIJU ZA TEKOČINSKO CITOLOGIJO**

**IMMUNOCYTOCHEMICAL STABILITY OF ANTIGENS IN
IN-HOUSE LIQUID-BASED MEDIUM**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA
BIOMEDICINA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Oddelku za citopatologijo Onkološkega inštituta v Ljubljani pod somentorstvom izr. prof. dr. Veronike Kloboves Prevodnik, dr. med., spec. patol. in mentorstvom prof. Darka Černeta, mag. farm, spec. med. biokem.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem somentorici izr. prof. dr. Veroniki Kloboves Prevodnik, dr. med, spec. patol. za ponujeno priložnost, vso strokovno pomoč, usmerjanje in nasvete pri nastajanju magistrske naloge. Zahvalila bi se tudi dr. Nataši Nolde za vse nasvete in pomoč pri zasnovi in izvedbi raziskovalne naloge.

Zahvaljujem se tudi dr. Ulriki Klopčič dr. med, spec. patol., da si je vzela čas in ocenila citološke preparate. Prav tako se zahvaljujem vsem zaposlenim v laboratoriju Oddelka za citopatologijo Onkološkega inštituta v Ljubljani za pomoč pri zbiranju vzorcev. Hvala mentorju prof. dr. Darku Černet, mag. farm. za pregled naloge.

Zahvala gre tudi družini, najbližnjim prijateljem in Eriku za vse lepe trenutke in vzpodbudne besede tekom študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod somentorstvom izr. prof. dr. Veronike Kloboves Prevodnik, dr. med, spec. patol. in mentorstvom prof. Darka Černeta, mag. farm, spec. med. biokem.

Ljubljana, junij 2018

Študentkin podpis

KAZALO VSEBINE

1. UVOD	1
1.1 Vzorci za citopatološko preiskavo	1
1.2 Vloga imunocitokemije.....	3
1.3 Tumorski označevalci	6
1.4 Dejavniki, ki vplivajo na barvanje ICK	11
1.4.1 Predanalitični dejavniki.....	11
1.4.2 Analitični dejavniki	12
1.4.3 Postanalitični dejavniki	14
2. NAČRT ZA DELO IN HIPOTEZA	15
3. MATERIALI IN METODE	16
3.1 MATERIALI	16
3.1.1 BIOLOŠKI VZORCI	16
3.1.2 KEMIKALIJE IN UPORABLJENI REAGENTI	19
3.1.3 PUFRI IN RAZTOPINE	22
3.1.4 APARATURE IN PRIBOR	24
3.2 METODE.....	24
3.2.1 Izdelava citospinov: citocentrifugiranje in fiksacija	24
3.2.2 Imunocitokemično barvanje citoloških preparatov	26
3.2.3 Ocenjevanje rezultatov imunocitokemičnih reakcij.....	29
3.2.5 Statistična obdelava podatkov	32
4. REZULTATI.....	35
4.1 Ujemanje ocen med ocenjevalci	35
4.2 Kriterij UK NEQAS za imunocitokemijo.....	36
4.2 Rezultati ocenjevanja posameznih parametrov.....	42
4.2.1 ODSOTITEK IMUNOCITOKEMIČNO OBARVANIH CELIC.....	42
4.2.2 INTENZITETA BARVANJA ICK.....	49
4.2.3 OZADJE.....	53
4.2.4 MORFOLOGIJA.....	56
4.2.5 KONTRASTIRANJE.....	59
5. RAZPRAVA.....	62
6. SKLEP.....	69
7. VIRI.....	71
8. PRILOGE	74

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz metode streptavidin-biotin imunocitokemičnega barvanja	4
Slika 2: A-D: Priprava citopinov	25
Slika 3: Mikroskopske slike prikaza ICK kalretinina	46
Slika 4: Reakcija na ER, 40-kratna povečava	52
Slika 5: Nespecifično ozadje pri barvanju CK AE1/AE3	55
Slika 6: Mikroskopski sliki NK	58
Slika 7: Mikroskopska slika barvanja ICK melanomskega koktejla	59
Slika 8: Primer primernega in neprimernega kontrastiranja	61

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Pregled protiteles CK AE1/AE3	8
Preglednica II: Citološki vzorci za testiranje obstojnosti CK AE1/AE3 in citopatološke diagnoze posameznih vzorcev	16
Preglednica III: Citološki vzorci za testiranje obstojnosti kalretinina in citopatološke diagnoze posameznih vzorcev	17
Preglednica IV: Citološki vzorci za testiranje obstojnosti MOC-31 in citopatološke diagnoze posameznih vzorcev	17
Preglednica V: Citološki vzorci za testiranje obstojnosti LCA in citopatološke diagnoze posameznih vzorcev	18
Preglednica VI: Citološki vzorci za testiranje obstojnosti ER in citopatološke diagnoze posameznih vzorcev	18
Preglednica VII: Citološki vzorci za testiranje obstojnosti melanomskega koktejla in citopatološke diagnoze posameznih vzorcev	19
Preglednica VIII: Uporabljena protitelesa	22
Preglednica IX: Kriterij ocenjevanja preparatov	30
Preglednica X: Obrazec ocenjevanja preparatov za posamezen antigen	31
Preglednica XI: Kriterij imunocitokemičnega barvanja po UK NEQAS ICK	32
Preglednica XII: Kategorije v shemi zunanje kontrole kakovosti UK NEQAS ICK	32
Preglednica XIII: Kriterij vrednosti kape	33
Preglednica XIV: Ujemanje ocen reakcije, intenzitete, ozadja, morfologije in kontrastiranja med vsemi kombinacijami parov ocenjevalcev z uporabo utežene in Cohenove kape	35

Preglednica XV: Ujemanje rezultatov posameznih parametrov med vsemi štirimi ocenjevalci in samo tremi ocenjevalci z uporabo Fleissove kape	36
Preglednica XVI: Rezultati ocenjevanja za CK AE1/AE3 po UK NEQAS ICK.....	37
Preglednica XVII: Rezultati ocenjevanja za kalretinin po UK NEQAS ICK	38
Preglednica XVIII: Rezultati ocenjevanja za MOC-31 po UK NEQAS ICK.....	39
Preglednica XIX: Rezultati ocenjevanja za LCA po UK NEQAS ICK.....	39
Preglednica XX: Rezultati ocenjevanja za ER po UK NEQAS ICK	41
Preglednica XXI: Rezultati ocenjevanja za melanomski koktejl po UK NEQAS ICK	41
Preglednica XXII: Statistično značilne razlike med posameznimi pari dnevov po shemi UK NEQAS ICK.....	42
Preglednica XXIII: Rezultati reakcij ICK (v odstotkih) na citokeratin CK AE1/AE3, kalretinin, MOC-31, LCA, ER in melanomski koktejl.	43
Preglednica XXIV: Rezultati intenzitete barvanja ICK za citokeratin AE1/AE3, kalretinin, MOC-31, LCA, ER in melanomski koktejl	49
Preglednica XXV: Statistično značilne razlike med posameznimi pari dnevov:intenziteta	51
Preglednica XXVI: Rezultati ozadja posameznih antigenov	53
Preglednica XXVII: Statistično značilne razlike med posameznimi pari dnevov: ozadje ...	55
Preglednica XXVIII: Rezultati morfologije v testnih vzorcih za citokeratin AE1/AE3, kalretinin, MOC-31, LCA, ER in melanomski koktejl in v negativnih kontrolah.....	56
Preglednica XXIX: Statistično značilne razlike med posameznimi pari dnevov pri ocenjevanju morfologije na negativnih kontrolah.....	57
Preglednica XXX: Rezultati kontrastiranja v testnih vzorcih za citokeratin AE1/AE3, kalretinin, MOC-31, LCA, ER in melanomski koktejl in v negativnih kontrolah.....	59

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Odstotek obarvanih celic za CK AE1/AE3 za posamezne vzorce po dnevih.....	45
Graf 2: Odstotek obarvanih celic za kalretinin za posamezne vzorce po dnevih	45
Graf 3: Odstotek obarvanih celic za MOC-31 za posamezne vzorce po dnevih.....	47
Graf 4: Odstotek obarvanih celic za LCA za posamezne vzorce po dnevih	47
Graf 5: Odstotek obarvanih celic za ER za posamezne vzorce po dnevih	48
Graf 6: Odstotek obarvanih celic za melanomski koktejl za posamezne vzorce po dnevih.	48

Povzetek

Imunocitokemija je tehnika prikaza antigenov na citoloških vzorcih z uporabo specifičnih protiteles za določen antigen. Z imunocitokemičnimi reakcijami si pomagamo pri opredelitvi vrste neoplazme in izvora zasevkov v citoloških vzorcih. Imunocitokemija je tako dragocena dodatna metoda ob rutinski morfološki oceni preparatov, pripravljenih iz celičnih vzorcev. Pri zahtevnejših diagnostičnih primerih je potrebna izdelava dodatnih citoloških preparatov iz vzorca celic v celičnem mediju za dokazovanje antigenov tudi nekaj dni po odvzemu vzorca, pri čemer nismo gotovi, da so antigenske in morfološke lastnosti celic še tako ohranjene kot na dan odvzema vzorca.

V magistrski nalogi smo hoteli preveriti koliko časa so antigenske in morfološke lastnosti celic v hišnem celičnem mediju ohranjene v tolikšni meri, da lahko varno izvajamo dodatne diagnostične metode na osnovi imunocitokemičnih reakcij. Z uporabo imunocitokemičnega barvanja smo preverili obstojnost šestih različnih antigenih označevalcev (citokeratina AE1/AE3, kalretinina, epitelu sorodnega antigena MOC-31, levkocitnega skupnega antigena LCA, estrogenskega receptorja in melanomskega koktejla) tako, da smo citološke preparate pripravili na dan odvzema vzorcev ter drugi, četrti, peti in osmi dan po odvzemu. Po pregledu citoloških preparatov smo ugotovili, da so se antigenske lastnosti epiteljskih antigenih označevalcev citokeratina AE1/AE3 in MOC-31, limfomskega označevalca LCA, hormonskega označevalca estrogenskega receptorja ter melanomskega koktejla ohranile tudi 8 dni po odvzemu vzorca. Reakcija in intenziteta le teh sta bili osmega dne primerljivi z rezultati prvega dne. Imunocitokemično barvanje kalretinina je pokazalo najslabše rezultate izmed šestih testiranih antigenov. Pri dokazovanju kalretinina smo ugotovili, da celice v primerjavi z ostalimi testiranimi označevalci, ohranijo nespremenjene antigenske lastnosti za kalretinin le do vključno četrtega dne po odvzemu vzorca. Morfologija celic se je v vseh testiranih vzorcih z dodanimi protitelesi in vzorcih, kjer protitelesa niso bila dodana (negativnih kontrolah), skozi čas spremenila, vendar ne v tolikšni meri, da bi ogrozila interpretacijo imunocitokemičnih reakcij. Intenziteta nespecifičnih reakcij se je s časom povečevala, predvsem pri vzorcih plevralnih in abdominalnih izlivov. Kljub povečevanju intenzitete nespecifične reakcije (t.j. ozadja) pri testiranih vzorcih z dodanimi protitelesi in pri nekaterih negativnih kontrolah, to ni imelo velikega vpliva na imunocitokemični prikaz antigena. Kontrastiranje je bilo v večini primerov slabo, zaradi prekratke inkubacije s hematokilinom in/ali reagentom za modrenje jeder ali pa zaradi slabše kvalitete uporabljenih

reagentov. Zaključili smo, da lahko preparate za imunocitokemična barvanja pripravljamo tudi več dni po odvzemu vzorca, če je le-ta spran v hišnem mediju za tekočinsko citologijo, vendar moramo za vsak antigen, ki ga želimo dokazovati, določiti čas po katerem je to še varno v smislu diagnostične interpretacije. Ključna parametra za oceno oziroma prikaz obstojnosti antigenov za imunocitokemijo v hišnem mediju za tekočinsko citologijo sta delež obarvanih celic in intenziteta obarvanja.

Ključne besede: imunocitokemija, tekočinska citologija, antigenski označevalci, citološki vzorci, citospin

Abstract

Immunocytochemistry is a technique used to detect the presence of antigens in cell suspensions by the use of specific antibodies. With the help of immunocytochemistry we define the type of neoplasm and the origin of metastases in cytological samples. Immunocytochemistry is thus a valuable ancillary method in routine morphological evaluation of preparations prepared from cell samples. In more demanding diagnostic cases the preparation of additional cytological preparations from a cell sample in in-house liquid based medium to prove tumor markers is also required within a few days after the sample is taken, and it is not certain whether morphological and antigen properties of the cells are still preserved as on the day of the sampling.

In the master's thesis we present how long the antigen and morphologic properties of cells in the cell suspension have been preserved to such an extent that we can safely perform additional diagnostic methods based on immunocytochemical reactions. Using immunocytochemical staining, we tested the stability of six different antigen markers (cytokeratin AE1/AE3, calretinin, MOC-31, LCA, estrogen receptor and triple melanoma cocktail). Cell samples were prepared on the day of sampling and on the second, fourth, fifth and eighth day after sample collection. We found out that antigen properties of the epithelial antigen markers CK AE1/AE3 and MOC-31, lymphoma marker LCA, hormonal marker estrogen receptor and the melanoma cocktail were maintained 8 days after samples were taken. The reaction of positive cells and intensity of these markers were on the eighth day comparable with the results of the first day. Immunocytochemistry of calretinin showed the worst results of six tested antigens. When studying calretinin, we found out that cells retain unchanged antigen properties for calretinin only until the fourth day after the collection of sample. Cell morphology in all tested samples with added antibodies and negative controls changed over time, but not to the extent that it would undermine the interpretation of immunocytochemical reactions. The intensity of nonspecific reactions increased over time, especially in pleural and abdominal effusions. The increase of intensity of the non-specific reactions (background staining) in tested samples with added antibodies and in some negative controls did not have a significant effect on the immunocytochemical determination of antigen. Contrasting was in most cases poor because of low incubation time with hematoxylin and/or bluing reagent or because of the poor quality of reagents used. We conclude that immunocytochemical staining can also be carried out several days after taking the sample.

However, for each antigen we need to determine the time in which it can still be proved by immunocytochemistry. The proportion of cells with a positive reaction and intensity of staining are key parameters for assessing the detection of antigens for immunocytochemistry in in-house medium for liquid cytology.

Keywords: immunocytochemistry, liquid-based cytology, cytological specimens, cytopins

Seznam okrajšav

ABTI – aspiracijska biopsija s tanko iglo

ANOVA – analiza variance

CK – citokeratin

CK AE1/AE3 – citokeratin, klona AE1 in AE3

DAB – diaminobenzidin

ER – estrogenski receptor

H₂O₂ – vodikov peroksid

HMB45 – klon protiteles proti melanosomu

ICK – imunocitkemija

LCA – skupni levkocitni antigen

LSAB – metoda z veznim streptavidinom in biotinom (angl. labeled streptavidin biotin)

MOC-31 – epiteliju soroden antigen

NK – negativna kontrola

PBS – izotonični fosfatni pufer (angl. phosphate buffer saline)

reakcija ICK – imunocitkemična reakcija

TRIS EDTA – trometamol in etilendiamintetraocetna kislina

UK NEQAS – nacionalna zunanja ocena kakovosti (angl. The United Kingdom National External Quality Assessment Service)

1. UVOD

Citopatologija je veja patologije, ki proučuje bolezenske procese na osnovi pregledovanja celic s svetlobnim mikroskopom. Celice lahko odvzamemo iz telesa z različnimi postopki in preučujemo spontano odluščene celice ali celice, ki jih aspiriramo iz tumorjev s tanko iglo. Citopatološka preiskava vzorcev je pomembna predvsem za hitro diagnostiko benignih ali malignih neoplazem. V diagnostiki malignih neoplazem jo uporabljamo za opredelitev primarnih neoplazem, zasevkov ali za potrditev ponovitve maligne bolezni. Citopatološka preiskava je hitra, zanesljiva, večinoma bolniku prijazna, malo invazivna in poceni diagnostična metoda, pri kateri so zapleti pri odvzemu vzorcev redki in večinoma blagi. Za zanesljivo citopatološko diagnozo je nujno potrebno, da so vzorci za citopatološko preiskavo pravilno odvzeti, ustrezno fiksirani in ob odvzemu pravilno označeni. V laboratoriju morajo biti nadaljnji postopki obdelave vzorcev standardizirani ter ustrezati zahtevam kakovosti dela v laboratorijih.

Številne bolezenske procese lahko opredelimo le z mikroskopskim pregledom in diagnozo postavimo le na podlagi morfoloških značilnosti celic. Pri bolj zapletenih primerih si pomagamo z dodatnimi metodami. Na podlagi pregleda vzorca pod mikroskopom se odločimo, katero dodatno metodo bomo uporabili. Najbolj pogosto uporabljene metode so metoda imunocitokemije, imunofenotipizacije s pretočnim citometrom in molekularno genetske preiskave (1,2).

Citopatološka preiskava s svetlobnim mikroskopom temelji na ocenjevanju celičnih morfoloških značilnosti, organizaciji celičnih skupin in drugih izvenceličnih sestavin v vzorcu. Ne moremo pa, kot v primeru histoloških vzorcev, ocenjevati strukture spremenjenega tkiva in njegovega strukturnega odnosa do okolnega tkiva. Bistvena razlika med citopatološko preiskavo in histopatološko preiskavo je, da v celičnih vzorcih v primerjavi s histološkimi, ne glede na način in mesto odvzema, struktura tkiva ni ohranjena. S histopatološko preiskavo pregledujemo na poseben način pripravljene tkivne rezine, ki so dvodimenzionalen prerez skozi tkivo z ohranjeno strukturo (2).

1.1 Vzorci za citopatološko preiskavo

Citopatologijo delimo na eksfoliativno, eksfoliativno/abrazivno in aspiracijsko citopatologijo. Eksfoliativna citologija preučuje spontano odluščene celice, ki jih najdemo v

različnih telesnih tekočinah in jih pacient izloči sam (urin, izmeček) ali pa jih pridobimo s punkcijo (izlivi, likvor). Eksfoliativna/abrazivna citopatologija preučuje celice, ki jih pobrišemo, postrgamo, popraskamo ali speremo iz različnih sluznic ali kože. Aspiracijska citopatologija preučuje celice, ki jih iz tumorjev pridobimo z aspiracijsko biopsijo s tanko iglo (ABTI).

- eksfoliativna citopatologija – odluščene celice:
 - izlivi v telesne votline: plevralni, perikardialni, abdominalni izliv (ascites),
 - urin,
 - likvor,
 - sputum,
 - izcedki (iz dojke, vaginalni izloček),
 - vsebine cist in psevdocist

Izliv tekočine v telesno votlino je posledica različnih bolezenskih procesov. Glede na lokacijo razlikujemo plevralni izliv (v prsno votlino), perikardialni izliv (v osrčnik) in abdominalni izliv ali ascites (v trebušno votlino). Razlikujemo transudate in eksudate. Transudat nastane najpogosteje zaradi motenj v krvnem obtoku (odpovedovanje srčne mišice zaradi ishemične bolezni srca, arterijske hipertenzije) ali nefrotičnega sindroma in je ultrafiltrat plazme. Ima nizko vsebnost beljakovin in maloštevilne celice: mezotelijske celice, makrofage in levkocite. Eksudat nastane zaradi povečane kapilarne prepustnosti pri vnetjih in malignih boleznih. Ima visoko vsebnost beljakovin in številne celice. Sestava celic je odvisna od bolezenskega procesa, ki je sprožil nastanek eksudata. Pri vnetjih najdemo številne levkocite in reaktivno spremenjene mezotelijske celice. Pri primarni maligni neoplazmi seroze – mezoteliomu – najdemo številne maligne mezotelijske celice, pri zasevkih pa karcinomske celice (najpogosteje zasevajo na serozne površine adenokarcinom pljuč, dojke, jajčnika, želodca), redkeje limfomske celice. Zdravnik, ki pošlje izliv v citopatološko preiskavo, največkrat želi odgovor na vprašanje, ali so v izlivu maligne celice in kje je primarni tumor (1,2).

- eksfoliativna/abrazivna citopatologija - celice, odstranjene s pomočjo krtačenja, loparčka, igle ali s spiranjem:
 - bris materničnega vratu,
 - krtačenje delov respiratornega ali gastrointestinalnega trakta,
 - izpiranje delov respiratornega trakta (bronhoalveolarna lavaža),
 - izpiranje sečnega mehurja,

- skarifikat

Podobno kot pri vzorcih s spontano odluščenimi celicami, tudi v vzorcih eksfoliativne abrazivne citologije iščemo maligne celice ali celice s predrakavimi spremembami, ki jih skušamo čim natančneje opredeliti glede na tip ali izvor. Diagnosticiramo tudi vnetne ali reaktivne procese. S sprememb na koži, ki so sumljive za karcinom, strgamo celice z iglo (skarifikat).

- aspiracijska citopatologija – celice, ki jih aspiriramo s tanko iglo

ABTI je poseg s katerim iz tumorja s tanko iglo potrgamo in posesamo celice za pregled s svetlobnim mikroskopom. Poseg lahko napravimo pod kontrolo očesa, ultrazvoka, računalniške tomografije (CT), rentgena ali endoskopsko. Poseg je enostaven, hiter, malo invaziven, skoraj neboleč, učinkovit in poceni. S to metodo lahko dobimo celične vzorce iz sprememb, ki jih tipamo na površini telesa ali netipnih sprememb v področju glave, vratu, v trebušni in prsni votlini, mehkih tkivih, kosteh ... Celični vzorec iz igle izbrizgamo na objektno steklo, s pomočjo drugega objektnega stekla pa naredimo tanek (enoslojen) in enakomeren razmaz. Za dodatne preiskave (npr. imunocitokemično barvanje) lahko vzorec iz igle speremo v epruveto s celičnim medijem, ki ohrani morfološke in antigenske lastnosti celic.

S citopatološko preiskavo lahko preučujemo tudi tkivne vzorce, če jih primerno obdelamo in pripravimo za pregled s svetlobnim mikroskopom. Tkivo lahko na stekla odtisnemo ali obrišemo (odtis ali bris biopsije), ali pa z iglo, skalpelom ali posebnim aparatom dezintegriramo tkivo in pripravimo celično suspenzijo. Taka priprava vzorcev je pomembna v intraoperativni diagnostiki, npr. za pregled odtisa varovalne bezgake pri pacientkah s karcinomom dojke ali za imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom in molekularno genetske preiskave.

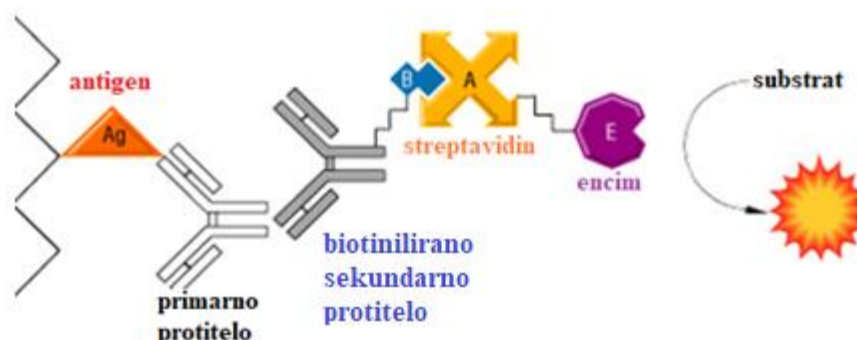
1.2 Vloga imunocitokemije

Imunocitokemija je tehnika prikaza antigenov na citoloških vzorcih z uporabo specifičnih protiteles za določen antigen. Z imunocitokemičnimi reakcijami si pomagamo pri opredelitvi vrste neoplazme in izvora zasevkov v citoloških vzorcih. Njena uporaba je tako lahko dragocena dodatna metoda, vendar ne more nadomestiti morfološkega pregleda po Giemsi in Papanicolaou pobarvanih citoloških vzorcev s svetlobnim mikroskopom. Z imunocitokemijo pridobimo dodatne informacije, ki nam omogočijo natančnejšo klasifikacijo vrste neoplazme,

kadar tega ne moremo oceniti z morfološko oceno. Za uspešno uporabo imunocitokemičnih metod v citopatologiji je potrebno upoštevati specifične lastnosti citoloških vzorcev (2,3).

Imunocitokemična barvanja temeljijo na encimsko-immunskih barvnih reakcijah. Z njimi prikazujemo tiste sestavine celic in tkiv, ki imajo lastnosti antigenov. To so večinoma proteinske molekule, redkeje sladkorji, hormoni, bakterije ali virusi. Antigene v vzorcu identificiramo tako, da nanje vežemo specifična monoklonska ali poliklonska protitelesa. Na voljo imamo veliko komercialno pripravljenih monoklonskih in poliklonskih protiteles. Osnovni princip je vezava specifičnega protitelesa na antigen v vzorcu, ki ga skušamo dokazati in prikaz mesta vezave antigen-protitelo z barvno reakcijo za pregled s svetlobnim mikroskopom. Za prikaz antigenov v vzorcu obstajajo neposredne in posredne encimsko-immunske metode. V citologiji uporabljamo posredne, večstopenjske metode, ki so bolj občutljive. Na primarno protitelo, ki je specifično vezano na antigen, se najprej veže biotinizirano sekundarno protitelo, nanj pa vezna molekula, ki je konjugirana z encimom hrenova peroksidaza. V preteklosti so za vezno molekulo uporabljali avidin. Avidin je kasneje nadomestil bolj občutljiv streptavidin, v novejšem času pa avidin-biotinski oziroma streptavidin-biotinski kompleks nadomeščajo razni polimeri, ki še bolj doprinesejo k občutljivosti in specifičnosti reakcije ter manjšanju nespecifičnega ozadja. Hrenova peroksidaza, vezana na avidin, streptavidin ali polimer v prisotnosti kromogena DAB (3',3' diaminobenzidintetrahidroklorid) ob dodatku substrata (H_2O_2) pretvori kromogen iz reducirane brezbarvne oblike v oksidirano barvno (rjavo), ki precipitira na mestu antigena in jo lahko opazujemo s svetlobnim mikroskopom (slika 1). Pri reakciji sodelujejo še bakrovi ioni v vlogi katalizatorja (5,6,7).

V nalogi smo uporabili uporabili detekcijski sistem na osnovi streptavidin-biotinskega kompleksa, kot prikazuje slika 1.



Slika 1: Prikaz metode streptavidin-biotin imunocitokemičnega barvanja (povzeto po 8)

Najpogosteje uporabljena encima pri imunocitokemičnih reakcijah sta hrenova peroksidaza in alkalna fosfataza, najpogosteje uporabljena kromogena pa DAB (rjav precipitat) in fast red (rdeč precipitat). V nalogi smo uporabili oba načina prikaza antigena. Princip delovanja encima hrenova peroksidaza in DAB smo že opisali. V nadaljevanju bomo opisali še drugi princip.

Princip delovanja encima alkalna fosfataza in kromogena Fast Red

Alkalna fosfataza hidrolizira naftolfosfatni ester kot substrat v fenolno zmes in fosfat. Glavni kovinski aktivatorji za alkalno fosfatazo so ioni Mg^{2+} , Mn^{2+} in Ca^{2+} . Fenoli tvorijo z brezbarvnimi diazonijevimi solmi, ki služijo kot kromogen (Fast Red), netopna obarvana azo barvila. Nastane svetlo rdeč končni produkt, ki je topen v alkoholu in drugih organskih topilih. Za pokrivanje je zato potreben vodni medij, dehidracija in bistrenje pa morata biti zelo kratka. Glavna prednost v primerjavi z zgoraj opisano metodo (hrenova peroksidaza - DAB) je odsotnost interferenc s celičnim vzorcem in s tem pojava nespecifičnega ozadja zaradi endogene peroksidaze in endogenega biotina.

V citologiji je izvedba imunocitokemičnih barvanj odvisna od števila celic v citoloških vzorcih. Reakcije lahko izvedemo le, če vzorci vsebujejo dovolj celic. Zato predstavljata priprava dovolj kakovostnih in ustrezno fiksiranih preparatov za reakcije ICK in priprava ustreznih pozitivnih in negativnih kontrol velik izziv. Za morfološko mikroskopsko oceno iz citoloških vzorcev običajno pripravimo dva razmaza, ki ju pobarvamo po Giemsi in Papanicolaou. Iz preostanka vzorca lahko nato pripravimo še dodatne razmaze za barvanja ICK. Za zanesljivo opredelitev procesa ICK pa potrebujemo od 2 do 6 ali celo več dodatnih preparatov z ustrezno ohranjenimi reprezentativnimi celicami in ustrezno ohranjenimi antigeni. Rutinska priprava tako velikega števila razmazov iz citoloških vzorcev ni možna, ker je količina citološkega vzorca premajhna. Tak način dela bi bil tudi neracionalen, saj brez predhodnega pregleda razmazov po Giemsi in Papanicolaou, ne moremo določiti vrste fiksacije in števila preparatov, ki jih bomo potrebovali za imunocitokemične reakcije. Poleg tega se običajno šele pri mikroskopskem pregledu rutinsko pripravljenih in pobarvanih razmazov izkaže ali bodo za opredelitev patološkega procesa reakcije ICK sploh potrebne. Zato za pripravo dodatnih preparatov za morebitno dokazovanje antigenov pripravimo suspenzijo celic iz dela vzorca, ki ga nismo porabili za pripravo razmazov za mikroskopski pregled. Dodatne preparate pripravimo po potrebi s citocentrifugo in jih fiksiramo v raztopini Delaunay ter jih pobarvamo po Papanicolaou ali jih fiksiramo v metanolu. Kadar dodatnih

preparatov ne moremo pripraviti, si lahko delno pomagamo z izvedbo imunocitokemičnih reakcij na citoloških razmazih, predhodno fiksiranih v raztopini Delaunay in pobarvanih po metodi Papanicolaou. Na ta način lahko na istih citoloških razmazih po morfološki oceni procesa ICK dokažemo še prisotnost antigenov. Če pa za opredelitev procesa potrebujemo cel panel protiteles, je potreben ponoven odvzem vzorca in priprava zadostnega števila preparatov (2).

Večina trenutno uporabljenih primarnih protiteles za prikaz antigenov ni povsem specifična in se nahajajo v več kot le eni vrsti celic. Poudariti je treba tudi, da označevalci ICK, ki so trenutno na voljo, ne omogočajo razlikovanja med neoplastičnimi in ne-neoplastičnimi celicami ter med benignimi in malignimi celicami. Zato je opredelitev patološkega procesa zanesljiva le, če uporabljamo panele primarnih protiteles oziroma kombinacijo vsaj dveh primarnih protiteles.

Za zanesljive rezultate imunocitokemije je izjemno pomembna dosledna uporaba ustreznih pozitivnih in negativnih kontrol, ki so pripravljene in fiksirane na enak način kot testni vzorec. S pozitivnimi kontrolami preverjamo ustreznost posameznih primarnih protiteles in pravilnost postopka. Z negativnimi kontrolami pa preverjamo nespecifične vezave reagentov na komponente v vzorcu (2,3,4).

1.3 Tumorski označevalci

Rezultat maligne transformacije je maligna celica, iz katere nastaneta ob vsaki nadaljnji delitvi novi maligni celici. V tem procesu pridobijo maligno spremenjene celice nekaj novih lastnosti, po katerih se razlikujejo od nemalignih celic istega izvora. Nastale spremembe se odražajo v spremenjeni morfologiji, fiziologiji in rasti celice. Razlike med normalnimi in maligno spremenjenimi celicami uporabljamo za dokazovanje benignih in malignih neoplazem. Snovi, ki jih pri tem spremljamo, so tumorski označevalci. Ustaljena definicija tumorskih označevalcev v klinični onkologiji zajema predvsem snovi, ki so produkt malignih celic, ali snovi, ki so nastale v drugih celicah pod vplivom delovanja malignih celic in jih lahko določamo v telesnih tekočinah. Tumorski označevalci so bodisi na novo sintetizirane snovi, bodisi snovi, ki so v normalno delujočem organizmu prisotne v veliko nižjih koncentracijah. Določanje tumorskih označevalcev nam pomaga pri diagnozi bolezni in napovedovanju njenega poteka, pri določanju stadija bolezni in izbiri načina zdravljenja ter pri zgodnjem odkrivanju ponovitve in razširitve bolezni (9).

V citopatološki diagnostiki se najpogosteje uporabljajo nekateri od spodaj naštetih tumorskih označevalcev:

epitelijski označevalci	citokeratini, epitelijski membranski antigen, tkivni polipeptidni antigen
mezenhimski označevalci	kalretinin, vimentin, dezmin
limfomski označevalci	LCA, CD3, CD20
hormonski označevalci	estrogenski in progesteronski receptor
melanomski označevalci	HMB-45, melan A, S-100
proliferativni označevalci	Ki-67
nevronski označevalci	glialni fibrilarni kisli protein, glutamin sintetaza, S-100, mielin bazični protein
nevroendokrini označevalci	nevronska specifična enolaza, adrenalin, noradrenalin, kromogranini
virusni označevalci	Eppstein-Barr virus

V nadaljevanju so podrobneje opisani tisti tumorski označevalci, ki smo jih testirali.

Epitelijski tumorski označevalci

Protitelesa proti citokeratinom uporabljamo za prikaz epitelijskih celic oziroma raka epitelijskega izvora. Citokeratini so družina vodotopnih proteinov z molekulskimi masami 40 – 70 kDa, ki tvorijo citoskelet epitelijskih celic. Poznanih je več kot 20 citokeratinov, ki jih razvrščamo v dva tipa glede na molekulsko maso in njihov izoelektrični pH. Tip I so relativno kisli citokeratini, tip II pa bazični. Njihovo izražanje je odvisno od tipa in diferenciacije epitelijskega tkiva.

Reagent **CK AE1/AE3** je mešanica dveh različnih monoklonskih protiteles, AE1 in AE3, usmerjenih proti citokeratinskima antigenoma AE1 in AE3. Zaznavata določene citokeratine z visoko in nizko molekulsko maso. Protitelo CK AE1 odkriva citokeratine z visoko molekulsko maso 10, 13, 14, 15, 16 ter CK 19 z nizko molekulsko maso. Protitelo CK AE3 zaznava citokeratine z visoko molekulsko maso 1, 2, 3, 4, 5, 6 ter CK 7 in 8 z nizko molekulsko maso (preglednica I). S kombinacijo obeh protiteles dobimo reagent s širokim spektrom reaktivnosti proti citokeratinom z visoko in nizko molekulsko maso, razen proti

citokeratinu 18, enemu od preprostih epitelijskih citokeratinov, ki se izraža v neoplazmi jeter in številnih drugih karcinomih. CK AE1/AE3 kaže vzorec citoplazemskega obarvanja in ga lahko uporabljamo za identifikacijo normalnih in neoplastičnih epitelijskih celic ter za določanje tumorskih celičnih linij. Citokeratin je specifičen epitelijski označevalec, ki se izraža v vseh epitelijskih celicah. Ker se reagent CK AE1/AE3 veže na širok spekter epitopov (= specifično mesto na antigenu, na katerega se veže protitelo) se imenuje tudi »pan citokeratin« (čeprav ne zazna CK 18). Reagent CK AE1/AE3 je zelo primerna za razlikovanje epitelijskih od ne-epitelijskih neoplazem, vendar negativen rezultat na CK AE1/AE3 še ni dovolj za izključitev karcinoma. Eden izmed najbolj poznanih karcinomov, ki je negativen na CK AE1/AE3 je hepatocelularni karcinom (10).

Preglednica I: Pregled protiteles CK AE1/AE3

	Bazični CK (tip II)	Kisli CK (tip I)
protitelo CK AE1 (CK z visoko molekulska maso)	CK-1 CK-2 CK-3 CK-4 CK-5 CK-6	CK-9 CK-10 CK-11 CK-12 CK-13 CK-14 CK-15 CK-16 CK-17
protitelo CK AE3 (CK z nizko molekulska maso)	CK-7, CK-8	CK-18 CK-19 CK-20

Citokeratini z nizko molekulska maso (40–54 kD) se pogosto izražajo v enoplastnem visoko prizmatskem epiteliju, medtem ko se citokeratini z visoko molekulska maso pogosto izražajo v večplastnem epiteliju. Monoklonska protitelesa proti različnim citokeratinom (48–67 kD) se lahko uporabljajo za določanje izvora slabo diferenciranih malignih tumorjev. Ker so citokeratinski peptidi povezani z epitelijskimi celicami, so klinično pomembni označevalci, ki pomagajo razlikovati karcinome od malignih neoplazem neepitelijskega izvora, kot so limfomi in sarkomi. CK AE1/AE3 odkrije skoraj vse karcinome razen hepatocelularnega karcinoma, kromofobnega karcinoma in onkocitoma ledvice. Ker lahko navzkrižno reagira z drugimi intermediranimi filamenti, kot so glialni fibrilarni kisli proteini, lahko pride do lažno pozitivnega barvanja v glijalnih tumorjih (10,11,12).

MOC-31 ali **epitelu soroden antigen** (angl. Epithelial related antigen) je eden od zanesljivejših tumorskih označevalcev za razlikovanje med metastatskim adenokarcinomom in reaktivnimi ali malignimi mezotelijskimi celicami. Zaradi podobnih morfoloških lastnosti adenokarcinomskih in mezotelijskih celic, jih le s pregledom s svetlobnim mikroskopom pogosto ni mogoče razlikovati. Protitelesa, ki v vzorcih izlivov prepoznajo adenokarcinome so: anti-MOC-31, anti-CEA, anti-B72.4, anti-BER-Ep4. Protitelesa, ki v vzorcih izlivov prepoznajo celice mezotelijskega izvora so anti-kalretinin, anti-D2-40, anti-CK5/6, anti-WT-1 in anti-mezotelin.

Protitelo anti-MOC-31 je usmerjen proti 40-kD adhezijski molekuli epiteljskih celic (epitelu sorodnemu antigenu ali EpCAM), transmembranskemu glikoproteinu, ki je prisoten v normalnih epiteljskih celicah večine tkiv in v različnih tumorjih. Monoklonsko protitelo anti-MOC-31 so kot imunogen pripravili iz celic drobnoceličnega karcinoma pljuč, obdelanih z nevramidazo. MOC-31 je transmembranski glikoprotein, ki posreduje pri adheziji med celicami, njegovo izražanje je povezano s povečano epiteljsko proliferacijo in je v negativni soodvisnosti z diferenciacijo celic. MOC-31 se izraža v skoraj vseh adenokarcinomih pljuč in samo v 8 do 35 % malignih mezoteliomov (14). Antigen v mezoteliomih se običajno šibko izraža v malih zaplatah celic. Protitelesa proti epitelu sorodnemu antigenu MOC-31 so koristna pri razlikovanju adenokarcinomov od malignih mezoteliomov. Prekomerno izražanje MOC-31 so ugotovili pri številnih tumorjih, ki izvirajo iz požiralnika, želodca, debelega črevesa, sečnega mehurja, jeter, trebušne slinavke, prostate, jajčnikov, endometrija, testisov in dojke (15, 16).

Mezenhimski tumorski označevalci

Kalretinin je protein z molekulsko maso 25 kDa, veže kalcij in je član družine EF-ročnih proteinov, ki vključujejo tudi protitelo S-100. EF-ročni proteini so znani po svojem zvitju vijačnica-zanka-vijačnica, ki deluje kot mesto za vezavo kalcija. Kalretinin vsebuje šest takih ročnih regij EF. Kalretinin je izražen v normalnem in reaktivnem mezotelu, ekrinih žlezah kože, Sertolijevih celicah testisov, ovarijskih stromalnih celicah in adrenalnih kortikalnih celicah. Kalretinin je prisoten v večini malignih mezotelijskih celic in lahko zato pomaga pri identifikaciji mezotelioma ter razlikovanju malignega mezotelioma od adenokarcinoma pljuč ali drugih karcinomov. Protitelo anti-kalretinin obarva jedro in citoplazmo (12,13,16,17).

Limfomski označevalci

Med limfomske označevalce spada **CD45** ali LCA (angl. Leukocyte Common Antigen.). LCA je izražen na citoplazemski membrani celic hematopoetskega izvora (limfocitov T in B, monocitov, makrofagov, mastocitov ter delno tudi granulocitov), ne izraža se le na eritrocitih. Makrofagi, histiociti in monociti reagirajo manj intenzivno. Polimorfonuklearni granulociti so navadno negativni, občasno šibko reaktivni. CD45 je glikoprotein, ima aktivnost fosfataze in aktivira tirozin proteinsko kinazo. Protitelo proti CD45 ne reagira z večino oblik neoplazem epiteljskega in nevralnega izvora, malignega melanoma in rabdomyosarkoma. Uporabljamo ga pri razlikovanju hematopoetskih neoplazem, predvsem limfoidnega tipa, od slabo diferenciranih tumorjev epiteljskega, mezenhimskega ali nevralnega izvora (23).

Hormonski označevalci

Mednje spada estrogenski receptor (ER). Navadno se ga določa skupaj s progesteronskim receptorjem (PR). ER spada med jedrne receptorje in se izraža v približno 85 % invazivnih rakov dojke. Obstajata dve izoformi estrogenskega receptorja, ER-alfa in ER-beta. Je močan napovedni dejavnik za odziv na hormonsko terapijo (20).

ER so proteinske molekule v jedru celic. Te se nahajajo v vseh tkivih, ki so tarča delovanja estrogena (maternica, nožnica, mlečne žleze, sprednji režanj hipofize in jajčnikih, v manjšem obsegu tudi v jetrih, ledvicah). Estrogen se veže na estrogenski receptor, nastali kompleks estrogen-receptor se veže na molekulo DNA in sproži prepisovanje nekaterih genov. V celicah dojke (duktalne celice) ta proces sproži proliferacijo celic. Status ER se danes rutinsko določa pri vsakem raku dojke, ker je močan napovedni dejavnik za odziv na hormonsko zdravljenje in obdobja brez bolezni pri bolnicah z rakom dojke. Pred operacijo lahko ER določamo z imunocitokemično metodo na vzorcih aspiracijskih biopsij. Ta metoda je pomembna pri načrtovanju predoperativnega zdravljenja raka dojke in kadar operacija ni mogoča (12). ER določamo tudi, kadar se rak dojke ponovi, saj se izražanje med napredovanjem bolezni lahko spremeni (22).

Melanomski označevalci

Melanomski koktejl je mešanica mišjih monoklonskih protiteles proti trem antigenom, ki označujejo melanocite in so izraženi v večini melanocitnih lezij: melanosom (HMB-45), melan A (A103) in tirozinaza (T311). Koktejl obarva citoplazmo, uporabljamo ga za pomoč pri identifikaciji melanoma. Vsako od posameznih protiteles kaže citoplazemsko obarvanje.

Melanomski koktejl glede na pridobljene podatke zagotavlja prednosti pred uporabo posameznih protiteles (povečana občutljivost) pri zaznavanju melanoma, pri čemer se specifičnost testa ne poslabša. **Melan-A** (angl. MART-1, melanoma associated antigen recognized by T cells) je transmembranski protein, izražen v melanocitih ter močno izražen v malignih melanomih. Protitelo proti antigenu **HMB-45** (angl. Human Melanoma Black) je monoklonsko protitelo, ki prepozna nezrele melanosome oziroma melanosomski glikoprotein gp100. Prepoznava melanocite, v katerih se tvorijo nezreli melanosomi v normalni koži, nevusih in celicah melanoma. Pozitivni rezultati pomagajo pri razvrščanju lezij melanomov in melanocitov ter pri razločevanju zasevkov amelanotičnih melanomov od drugih slabše diferenciranih tumorjev nepojasnjenega izvora. Prisotnost antigena označuje aktivno tvorjenje melanosomov in s tem diferenciacijo melanocitov. Izražen je tudi v normalnih melanocitih fetusa, ne pa v normalnih mirujočih melanocitih pri odraslih, ne glede na stopnjo pigmentacije. **Tirozinaza** je ključni encim, vključen v začetno fazo biosinteze melanina. Tirozinaza je metaloglikoprotein in je ena od tarč, ki jo prepoznajo citotoksične celice T pri pacientih z melanomom (18,19,20).

1.4 Dejavniki, ki vplivajo na barvanje ICK

Da je citopatološka diagnoza zanesljiva morajo biti vzorci za citopatološko preiskavo pravilno odvzeti, ustrezno fiksirani in pravilno označeni. V laboratoriju morajo biti nadaljnji postopki obdelave vzorcev standardizirani ter ustrezati zahtevam kakovosti dela v laboratorijih.

1.4.1 Predanalitični dejavniki

V predanalitično fazo štejemo procese, ki se začnejo že ob odvzemu biološkega materiala, končajo pa s pripravo citospinov ali razmazov. Odvzete vzorce (izlive ali vzorce ABTI) suspendiramo v celični medij (spiralna tekočina) in iz alikvota suspendiranega celičnega vzorca s citocentrifugo pripravimo citospin. Na kakovost preparata pripravljenega s citocentrifugo pomembno vplivata gostota celične suspenzije in volumen vzorca, ki ga dodamo v komoro. Če je suspenzija pregosta, jo moramo razredčiti z dodatkom hišnega celičnega medija, v katerem so celice suspendirane, v nasprotnem primeru, nam lahko celice odpadejo s stekla. Citospin moramo takoj po pripravi ustrezno fiksirati. Celice, ki smo jih iz suspenzije celičnega medija prenesli na objektno steklo, je potrebno takoj fiksirati, da ustavimo delovanje avtolitičnih encimov in da se celice ne posušijo na zraku, saj taki citospini

niso primerni za določanje antigenov z imunocitokemično metodo, razen za določanje membranskih antigenov (7). Poleg inaktivacije avtolitičnih encimov, s fiksacijo dosežemo tudi stabilizacijo oblike in strukture celic ter prepustnost celične membrane. Način fiksacije na poseben način spremeni celične sestavine, kar vpliva tudi na način vezave barvil na celične strukture. Citospine smo zato takoj fiksirali v 100% metanolu.

Pomemben predanalitičen dejavnik, ki ga moramo upoštevati, je sledljivost vzorcev. Vsak vzorec, ki prispe v laboratorij dobi svojo identifikacijsko številko. S tem zagotovimo, da smo na pravem vzorcu opravili pravo preiskavo ob pravem času in rezultat pravilno interpretirali.

1.4.2 Analitični dejavniki

Interpretacija imunocitokemičnih reakcij je zanesljiva le na preparatu, ki vsebuje dovolj morfološko ohranjenih reprezentativnih celic. Poleg tega je pomembna dosledna uporaba ustreznih pozitivnih in negativnih kontrol, ki so pripravljene in fiksirane na enak način kot preiskovani vzorec. S pozitivnimi kontrolami preverjamo delovanje posameznih protiteles in pravilnost postopka. Z negativnimi kontrolami pa preverjamo nespecifične vezave reagentov na komponente v celičnem vzorcu.

Zaradi fiksacije pride pri nekaterih antigenih do zakrivanja vezavnih mest za protitelesa. To se zgodi pri estrogenskem receptorju in še pri nekaterih drugih označevalcih. Pri dokazovanju ICK estrogenskih receptorjev na citospinu, je potrebno antigene najprej razkriti. Pri tem imajo velik pomen temperatura in čas razkrivanja antigenov ter vrednost pH raztopine za odkrivanje antigenov. Najpogosteje uporabljene metode za odkrivanje antigenov so metode toplotne predobdelave. Toplota in puferska raztopina sta ključ do želenega odkrivanja antigenov. Večina laboratorijev doseže visoko temperaturo s segrevanjem pufru v mikrovalovni pečici ali z uporabo vodnih kopeli. Uporabljajo temperaturo blizu vrelišča vode. Čas inkubacije variira od 3 min do 20 min. Vsak laboratorij mora določiti svojo najprimernejšo metodo in čas toplotne obdelave za svoje potrebe (7,24). V našem laboratoriju imamo dva različna postopka za odkrivanje antigenov: z inkubacijo v citratnem pufru, pH 6 z uporabo mikrovalovke, ter inkubacijo v pufru TRIS/EDTA s pH 9 pri 98°C. Če postopek odkrivanja ni pravilen, se po dodatku primarnih protiteles željen antigen ne obarva, saj se primarno protitelo ne more vezati na zakriti antigen. Druga možnost odkrivanja antigenov je s pomočjo proteolitičnih encimov (s proteazami). V imunocitokemiji razkrivanje z encimi ni priporočljivo, saj lahko povzroči odpadanje celic z objektnega stekla.

Pri imunocitokemičnem barvanju se lahko pokaže nespecifično ozadje (nespecifično obarvanje), kar ni zaželeno. Glavni vzrok za prisotnost nespecifičnega ozadja so ionske in hidrofobne interakcije ter aktivnosti endogenih encimov. Endogeni encimi lahko reagirajo s substratom. Primer je prisotnost endogene peroksidaze v celičnem vzorcu. Le ta je namreč podobna hrenovi peroksidazi, ki oksidira substrat v rjavo obarvan produkt. Zato je pomemben korak pred barvanjem inkubacija preparatov v raztopini vodikovega peroksida, ki blokira endogeno peroksidazo. Pomembna sta čas inkubacije in koncentracija raztopine za blokado. Prednost uporabe encima alkalne fosfataze v barvanju ICK je, da ne potrebuje blokade endogene peroksidaze. Aktivnost alkalne fosfataze je pogosto prisotna v celičnih vzorcih iz črevesja, ledvic, limfoidnega tkiva, placente ter v osteoblastih, na površini endotelijskih celic in stromalnih retikulumskih celicah. Zmanjšanje aktivnosti alkalne fosfataze lahko dosežemo s 5mM levamizolom v raztopini kromogena (6,7).

Nespecifično ozadje v celičnem vzorcu se lahko pojavi tudi zaradi prisotnosti endogenega biotina. Kot pomoč pri zmanjševanju nespecifičnega obarvanja v celicah uporabljamo reagent za blokado biotina (komplet Endogenous Biotin Blocking, angl.) Ozadje lahko preprečimo z nanosom avidina po aplikaciji biotina pred aplikacijo biotilimiranih reagentov za detekcijo. Analizni kit za blokado endogenega biotina zamaskira prisoten biotin v celicah z vezavo avidina. Sestavljen je iz dveh reagentov, reagent A se specifično veže na endogeni biotin v celicah, reagent B pa zasiči preostala mesta vezave beljakovine avidin iz blokerja A in s tem zmanjša nespecifično ozadje (26).

Nespecifično ozadje je pogosti problem v primeru eksudatov, ti so namreč s proteini bogate tekočine. Veliki skupki celic v citospinih se lahko obarvajo nespecifično in so lahko razlog za lažno pozitivne rezultate (27).

Ozadje se pogosto pojavi zaradi nekroze celic, lahko pa tudi zaradi difuzije antigenskega označevalca iz mesta nastanka v okolico. Pomembno je, da je fiksacija vzorca hitra, sicer se antigeni ne bodo ustrezno fiksirali in se zaradi naknadne obdelave preparata premaknili iz svojega mesta v celici. Ozadje moramo zato oceniti na negativni kontroli, to je preiskovani vzorec, na katerega ne dodamo protiteles. Pri vsaki seriji barvanja dodamo po eno negativno kontrolo za vsak vzorec/ primer, ki ga testiramo v tisti seriji. Z negativno kontrolo preverjamo ali so v vzorcu komponente, ki povzročajo nespecifične reakcije, ki jih moramo upoštevati pri interpretaciji rezultata.

Po encimski aktivaciji kromogena, ko se na mestu antigena pokaže vidno obarvan produkt, sledi kontrastiranje vzorca z raztopino hematoksilina. Pri nanosu hematoksilina se heterokromatin v jedru celic modro obarva. Temu sledi še modrenje jeder s šibko alkalno raztopino Li_2CO_3 (35,36). Za modrenje jeder uporabljamo vodno raztopino litijevega karbonata, Bluing reagent. Kombinirano delovanje litijevih ionov in dvig pH vrednosti za pufer spiranja modro obarva s hematoksilinom barvane citološke vzorce. Kontrastiranje se pokaže v bledi do temno modri obarvanosti jedra, kar je odvisno od časa inkubacije in koncentracije uporabljenega hematoksilina in reagenta za modrenje jeder. Prekomerno ali nepopolno kontrastiranje tudi lahko ogrozi interpretacijo rezultatov (28).

1.4.3 Postanalitični dejavniki

Postanalitični dejavniki obsegajo napačno interpretacijo rezultatov imunocitokemičnih reakcij, kar ima lahko za posledico napačno diagnozo, predolg čas do izdaje izvida, oz. napake pri pisanju izvida. V tej fazi citopatolog pod mikroskopom pregleda citospin in interpretira imunocitokemično barvanje ob uporabi negativne in pozitivne kontrole. Pravilnost rezultata imunocitokemičnega barvanja potrdimo z reakcijo na pozitivni in negativni kontroli, ki ju obdelujemo vzporedno s preiskovanim vzorcem. Pozitivna kontrola je vzorec, v katerem je prisoten antigen, ki ga dokazujemo. Potrdi funkcionalnost reagentov in pravilnost postopka. Negativna kontrola (NK) je preiskovani vzorec, na katerega ne naneseemo primarnih protiteles. Služi za oceno nespecifične reakcije, ki ni posledica vezave antigen-protitelo in jo moramo upoštevati pri interpretaciji rezultatov. Na podlagi mikroskopske morfološke slike in rezultatov imunocitokemičnih reakcij citopatolog postavi diagnozo in izda izvid, ki je osnova za odločitev o izboru nadaljnjih diagnostičnih postopkov in zdravljenja.

2. NAČRT ZA DELO IN HIPOTEZA

Na oddelku za citopatologijo, Onkološkega inštituta Ljubljana, se metoda imunocitokemičnega barvanja uporablja na citoloških preparatih (t.i. citospinih), pripravljenih iz suspenzije celic v celičnem mediju z uporabo citocentrifuge, ki jih fiksiramo z ustreznimi fiksativi. Pri zahtevnejših diagnostičnih primerih je potrebna izdelava dodatnih citospinov iz vzorca v celičnem mediju za dokazovanje antigenov tudi nekaj dni po odvzemu, pri čemer ne moremo biti gotovi, da so antigenske in morfološke lastnosti celic popolnoma enako ohranjene kot na dan odvzema vzorca. Podatkov o ohranjenosti antigenskih in morfoloških lastnosti celic v celični suspenziji v literaturi nismo našli in tudi raziskave na to temo še niso bile izvedene. Zato želimo preveriti, koliko časa so antigenske in morfološke lastnosti celic v celičnem mediju ohranjene v tolikšni meri, da lahko varno izvajamo dodatne diagnostične metode na osnovi imunocitokemičnih reakcij.

Preverili smo obstojnost antigenov v hišnem celičnem mediju z uporabo imunocitokemičnega dokazovanja šestih antigenskih označevalcev: citokeratin AE1/AE3, kalretinin, MOC-31, LCA, ER ter melanomski koktejl. Hišni celični medij smo pripravili sami na oddelku. Citospine vzorcev smo pripravili na dan odvzema vzorca ter drugi, četri, peti in osmi dan po odvzemu. Citospine smo takoj ustrezno fiksirali v metanolu, naredili ustrezno predobdelavo pred barvanjem in izvedli imunocitokemične reakcije po standardnem operativnem postopku barvanja ICK. Vsak označevalec smo prikazali na desetih različnih celičnih vzorcih v opisanih časovnih intervalih.

Naš namen je bil ugotoviti:

- kako dolgo celice ohranijo svoje antigenske in morfološke lastnosti v hišnem celičnem mediju in
- kakšen je čas od odvzema vzorca do izvedbe imunocitokemičnih reakcij, pri katerem so rezultati reakcij ICK zanesljivi za varno uporabo v diagnostiki.

Pri tem smo ocenjevali delež celic s pozitivno imunocitokemično reakcijo, intenziteto reakcije, ozadje, morfologijo celic ter kontrastiranje ter ugotavljali pomen posameznih parametrov pri ocenjevanju reakcij ICK.

Naša hipoteza je bila: celice v hišnem celičnem mediju ohranijo ustrezne antigenske in morfološke lastnosti vsaj tri do štiri dni po odvzemu vzorca.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 BIOLOŠKI VZORCI

V raziskavi smo uporabili ostanke bioloških vzorcev pacientov, ki jih nismo porabili za namene rutinske diagnostike in bi jih po izdaji izvida zavrgli. Uporabili smo 53 vzorcev, od tega 18 izlivov (15 plevralnih izlivov, 2 ascitesa in 1 perikardialni izliv), 28 ABTI (13 ABTI primarnih tumorjev dojke, 1 ABTI čela, 1 ABTI lica, 1 ABTI hrbta, 2 ABTI goleni, in 10 ABTI bezgavk). Nekatero vzorce smo porabili za testiranje dveh ali treh antigenov. Poleg treh plevralnih izlivov smo za barvanje LCA uporabili tudi 7 tkivnih vzorcev bezgavk, ki so jih odvzeli na Oddelku za patologijo, Onkološkega inštituta za pretočno citometrične meritve pri sumu na limfom. Na Oddelku za citologijo smo tkivne vzorce dezintegrirali in iz preostanka vzorca pripravili citospine.

Črka »O« pred laboratorijsko številko vzorca pomeni, da gre za izliv (eksudat), oznaka »P« pred laboratorijsko številko, da gre za punkcijo (ABTI) in oznaka »Bx« pomeni dezintegriran bioptični tkivni vzorec bezgavke. Številka »17« za laboratorijsko številko, pomeni leto odvzema vzorca. Laboratorijske številke vzorcev smo zakodirali s številkami od 1 do 53.

Na dan, ko smo testirali določen antigen smo iz vzorca pripravili dva citospina. Enega testnega, na katerem smo testirali obstojnost celičnega antigena, in drugega na katerem smo testirali nespecifične reakcije (negativna kontrola). Pred začetkom raziskave smo pridobili pozitivno mnenje Komisije RS za medicinsko etiko (0120-418-2017-4, 22.8.2017).

V preglednicah II – VII so prikazani vzorci, ki smo jih uporabili za testiranje obstojnosti posameznih antigenov.

Preglednica II: Citološki vzorci za testiranje obstojnosti CK AE1/AE3 in citopatološke diagnoze posameznih vzorcev

Št. vzorca	Vzorec	Citopatološka diagnoza
P 1/17	ABTI dojke	adenokarcinom dojke
O 2/17	plevralni izliv	karcinoza plevre zaradi adenokarcinoma pljuč
O 3/17	plevralni izliv	atipična mezoteljska proliferacija, brez malignih celic
P 4/17	ABTI bezgavke v pazduhi	zasevek adenokarcinoma
P 5/17	ABTI lica	zasevek nevroendokrinega drobnoceličnega karcinoma

P 6/17	ABTI bezgavke supraklavikularno	zasevek papilarnega karcinoma ščitnice
P 7/17	ABTI bezgavke ingvinalno	zasevek slabo diferenciranega adenokarcinoma
O 8/17	plevralni izliv	karcinoza plevre zaradi mikrocelularnega karcinoma pljuč
O 9/17	perikardialni izliv	karcinoza perikarda, izvor karcinoma ni poznan
P 10/17	ABTI dojke	adenokarcinom dojke

ABTI – aspiracijska biopsija s tanko iglo

Preglednica III: Citološki vzorci za testiranje obstojnosti kalretinina in citopatološke diagnoze posameznih vzorcev

Št. vzorca	Vzorec	Citopatološka diagnoza
O 11/17	plevralni izliv	proliferacija mezotela, brez malignih celic
O 12/17	plevralni izliv	atipična mezotelijska proliferacija, brez malignih celic
O 13/17	ascites	proliferacija mezotela, brez malignih celic
O 14/17	plevralni izliv	karcinoza plevre, izvor karcinoma ni poznan
O 15/17	plevralni izliv	proliferacija mezotela, brez malignih celic
O 16/17	ascites	proliferacija mezotela, brez malignih celic
O 17/17	plevralni izliv	atipična proliferacija mezotela, brez malignih celic
O 18/17	plevralni izliv	karcinoza plevre, izvor karcinoma ni poznan, proliferacija mezotela
O 19/17	plevralni izliv	atipična mezotelijska proliferacija, ni malignih celic
O 20/17	plevralni izliv	karcinoza plevre, izvor karcinoma ni poznan, proliferacija mezotela

Preglednica IV: Citološki vzorci za testiranje obstojnosti MOC-31 in citopatološke diagnoze posameznih vzorcev

Št. vzorca	Vzorec	Citopatološka diagnoza
P 4/17	ABTI bezgavke v pazduhi	zasevek adenokarcinoma
O 8/17	plevralni izliv	karcinoza plevre zaradi mikrocelularnega karcinoma pljuč
O 18/17	plevralni izliv	karcinoza plevre, izvor karcinoma ni poznan
O 2/17	plevralni izliv	karcinoza plevre zaradi adenokarcinoma pljuč
P 1/17	ABTI dojke	adenokarcinom dojke
O 21/17	plevralni izliv	karcinoza plevre, izvor karcinoma ni poznan
P 22/17	ABTI bezgavke supraklavikularno	zasevek adenokarcinoma

P 23/17	ABTI dojke	atipična proliferacija duktalnih celic ali dobro diferenciran adenokarcinom dojke
P 24/17	ABTI dojke	adenokarcinom dojke
O 9/17	plevralni izliv	karcinoza plevre, izvor karcinoma ni poznan

ABTI – aspiracijska biopsija s tanko iglo

Preglednica V: Citološki vzorci za testiranje obstojnosti LCA in citopatološke diagnoze posameznih vzorcev

Št. vzorca	Vzorec	Citopatološka diagnoza
O 25/17	plevralni izliv	atipična proliferacija mezotela, limfocitni izliv, brez malignih celic
O 26/17	plevralni izliv	limfom plaščnih limfocitov
O 19/17	plevralni izliv	atipična proliferacija mezotela, limfocitni izliv
Bx 27/17	ekscizija bezgavke	ne-Hodgkinov limfom
Bx 28/17	ekscizija bezgavke	sum na tuberkulozo
Bx 29/17	ekscizija bezgavke	Hodgkinov limfom
Bx 30/17	ekscizija bezgavke	limfom B
Bx 31/17	ekscizija bezgavke	limfoblastni limfom
Bx 32/17	ekscizija bezgavke	Hodgkinov limfom
Bx 33/17	ekscizija bezgavke	folikularni limfom

Preglednica VI: Citološki vzorci za testiranje obstojnosti ER in citopatološke diagnoze posameznih vzorcev

Št. vzorca	Vzorec	Citopatološka diagnoza
P 34/17	ABTI dojke	adenokarcinom dojke
P 35/17	ABTI dojke	adenokarcinom dojke
P 36/17	ABTI dojke	zasevek primarnega peritoalnega seroznega papilarnega karcinoma
P 37/17	ABTI dojke	adenokarcinom dojke
P 38/17	ABTI dojke	adenokarcinom dojke
P 39/17	ABTI dojke	adenokarcinom dojke
P 40/17	ABTI dojke	adenokarcinom dojke
P 41/17	ABTI dojke	adenokarcinom dojke
P 42/17	ABTI dojke	mucinozni karcinom dojke
P 43/17	ABTI bezgavke v pazduhi	zasevek adenokarcinoma dojke

Preglednica VII: Citološki vzorci za testiranje obstojnosti melanomskega koktejla in citopatološke diagnoze posameznih vzorcev

Št. vzorca	Vzorec	Citopatološka diagnoza
P 44/17	ABTI čela	zasevek melanoma
P 45/17	ABTI bezgavke ingvinalno	zasevek melanoma
P 46/17	ABTI bezgavke ingvinalno	zasevek melanoma
P 47/17	ABTI bezgavke ingvinalno	zasevek melanoma
P 48/17	ABTI goleni	zasevek melanoma
P 49/17	ABTI goleni	zasevek melanoma
P 50/17	ABTI bezgavke ingvinalno	zasevek melanoma
P 51/17	ABTI nadlahti	zasevek melanoma
P 52/17	ABTI na hrbtu	recidiv melanoma
P 53/17	ABTI dojke	zasevek melanoma

ABTI – aspiracijska biopsija s tanko iglo

3.1.2 KEMIKALIJE IN UPORABLJENI REAGENTI

Reagente smo pripravili po recepturah Oddelka za citopatologijo, Onkološkega inštituta Ljubljana. Uporabljene kemikalije, komercialni reagenti, opisi postopkov priprave reagentov in njihove recepture so navedeni v nadaljevanju.

Pri pripravi preparatov in za dokazovanje specifičnih antigenov smo uporabili naslednje kemikalije:

- metanol (kataloška št. 32213-2.5L) Honeyxell Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija
- etanol 96 % (kataloška št.: 24194-2.5L) Honeyxell Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija
- ksilen, CARLO ERBA (kataloška št. 492301) Val de Reuil, Francija
- balzam za pokrivanje preparatov Tissue-Tek coverslipping resine (kataloška št.: 44494), Sakura Finetek, ZDA
- vodikov peroksid, 35% (kataloška št.: 1086001000) Merck, Nemčija
- detekcijski komplet iView DAB (kataloška št.: 760-091) Ventana medical Systems, Inc. Tucson, ZDA

Vsebuje 6 razdeljevalcev z reagenti po 25 mL:

- Inhibitor endogene peroksidaze (raztopina vodikovega peroksida)

- sekundarna protitelesa označena z biotinom (kozja protitelesa proti mišjim IgG in IgM in kozja protitelesa proti zajčjim IgG) v fosfatnem pufru z dodatkom konzervansa.
 - konjugat streptavidin-HRP (hrenova peroksidaza označena s streptavidinom) z dodatkom stabilizatorja in konzervansa.
 - raztopina vodikovega peroksida (0,04 % - 0,08 %)
 - raztopina bakrovega sulfata kot katalizatorja reakcije v puferni raztopini z dodatkom konzervansa.
 - substrat DAB (diaminobenzidin, 2g/L v stabilizatorju z dodatkom konzervansa)
- detekcijski komplet Ultra View Universal Alkaline Phosphatase Red Detection kit (kataloška št.: 760-501) Ventana medical Systems, Inc. Tucson, ZDA
Vsebuje 5 razdeljevalcev z reagenti po 25 mL:
 - Sekundarna protitelesa označena z biotinom (kozja protitelesa proti mišjim IgG in IgM in kozja protitelesa proti zajčjim IgG) v fosfatnem pufru z dodatkom konzervansa.
 - Konjugat streptavidin-alkalna fosfataza (alkalna fosfataza označena s streptavidinom) v pufru TRIS z MgCl₂ in ZnCl₂.
 - Fast Red A v acetatnem pufru
 - Fast Red B v acetatnem pufru
 - Naftol v pufru TRIS
 - Katalizator MgCl₂ v vodni raztopini
 Kot konzervans je v reagentih uporabljen Proclin 300, ki je toksičen in zahteva primerno rokovanje. Fast Red in naftol povzročata draženje kože, zato je primerna uporaba rokavic.
 - hematoksilin (kataloška št.: 760-2021) Ventana medical Systems, Inc. Tucson, ZDA
 - Bluing reagent – sredstvo za modrenje jeder (kataloška št.: 760-2037) Ventana medical Systems, Inc. Tucson, ZDA
 - reagent za blokado endogenega biotina, Endogenous Biotin blocking kit (kataloška št. 760-050) Ventana medical Systems, Inc. Tucson, ZDA. Sestavljen je iz reagenta A (0,1 mg/mL), reagenta B (0,1 mg/mL).
 - Reaction buffer (Kataloška št.: 950-300) Ventana medical Systems, Inc. Tucson, ZDA
 - raztopina LCS– prekrivna tekočina, ki preprečuje hlapenje (kataloška št.:650-010) Ventana medical Systems, Inc. Tucson, ZDA

- EZ prep (kataloška št.: 950-102) Ventana medical Systems, Inc. Tucson, ZDA

Uporabljena protitelesa:

- monoklonsko protitelo proti citokeratinom, klonoma AE1 in AE3, Cytokeratin cocktail AE1/AE3 Mouse Monoclonal Antibody (kataloška št. M3515) DAKO, Glostrup, Danska
- zajčje monoklonsko protitelo proti kalretininu, klon SP4, anti-Calretinin Rabbit Monoclonal Primary Antibody (kataloška št.: 790-4667) Ventana, Tucson, ZDA
- monoklonska mišja protitelesa proti epiteliju sorodnemu antigenu (MOC-31), anti-Epithelial Related Antigen Mouse Monoclonal Primary Antibody (kataloška št.: M3525), DAKO, Glostrup, Danska
- mišje monoklonsko protitelo proti CD45 (LCA), klon 2B11+PD7/26, Mouse Monoclonal anti-LCA (Leucocyte Common Antigen) Antibody (kataloška št.: M0701) DAKO, Glostrup, Danska
- mišje monoklonsko protitelo proti estrogenskemu receptorju, Estrogen Receptor Clone 6F11 Mouse Monoclonal Antibody (kataloška št.: NCL-L-ER-6F11) Leica Biosystems, Wetzlar, Nemčija
- koktejl mišjih monoklonskih protiteles anti-melanosom (HMB45), anti-MART-1/MelanA (klon A103) in anti-tirozinaza (klon T311), Melanoma Triple Cocktail (HMB45+A103+T311) (kataloška št.:790-4677) Ventana medical Systems, Inc. Tucson, ZDA

Preglednica VIII: Uporabljena protitelesa

protitelo	izvor	klon	redčitev	odkrivanje antigenov	reakcija	proizvajalec	Detekcijski kit
CK AE1/AE3	M (mišje)	AE1/AE3	1:500	-	Citoplazemska	Dako	iView DAB
kalretinin	M (zajčje)	SP4	RTU	-	Citoplazemska in jedrna	Ventana	iView DAB
MOC-31	M (mišje)	MOC-31	1:500	-	Citoplazemska	Dako	iView DAB
LCA	M (mišje)	2B11+PD7/26	1:1000	-	Membranska	Dako	iView DAB
estrogenski receptor	M (mišje)	6F11	1:25	pufer Tris/EDTA, mikrovalovna pečica	Jedrna	Leica Biosystems	iView DAB
melanomski koktejl	M (mišje)	HMB45 A103 T311	RTU	-	Citoplazemska	Ventana	Ultra Fast Red

M = monoklonsko protitelo; RTU = angl. ready to use (redčenje protitelesa ni potrebno), iView DAB – rjav kromogen, Ultra Fast Red – rdeč kromogen

3.1.3 PUFRI IN RAZTOPINE

Priprava osnovne in delovne raztopine hišnega celičnega medija (spiralna tekočina):

Osnovna raztopina je sestavljena iz petih komponent, ki pripravimo vsako posebej:

1. HYMANS PBS pH 7,15:
 - NaCl 8,5 g
 - KH_2PO_4 1,36 g
 - H_2O 95 ml
 - s 4 N NaOH (16g NaOH/100 mL redistirane vode) uravnamo pH na 7,15
 - dodamo redistirano vodo do končnega volumna 100 mL
2. 5% EDTA: 5 g EDTA raztopljen v 100 mL redistirane vode
3. 20% BSA: 40 g BSA (goveji serumski albumin) raztopljen v 200 mL redistirane vode
4. 1000.000 IE penicilina raztopljen v 4 mL redistirane vode
5. Garamicin: 80 mg garamicina v 2 mL

Končno raztopino pripravimo tako, da zmešamo naslednje komponente:

1. HYMANS PBS pufer razredčimo z redistirano vodo v razmerju 1:10 (540 mL H₂O + 60 mL HYMANS PBS pufra)
2. 80 mL 5% EDTA
3. 200 mL 20% BSA
4. Uravnamo pH na 6,8 z Na₂CO₃
5. 360 µL penicilina (90 000 IE)
6. 100 µL garamicina
7. Sterilna filtracija (premer por Millipore Stericup SCGPU05RE: 0,22 µm)

- Končna raztopina ima pH 6,8.

Priprava osnovne in delovne raztopine PBS

Osnovna raztopina PBS, fosfatnega pufra (pH 7,2 – 7,4):

- 8g KH₂PO₄
- 46g Na₂HPO₄
- 8g KCl
- 320g NaCl
- 1620 mL redistirane vode

Delovno raztopino PBS pripravimo z redčenjem redistirano vodo v razmerju 1:20 (950 mL redistirane vode in 50 mL osnovne raztopine PBS)

Priprava osnovne in delovne raztopine za odkrivanje antigenov (pH 9)

Osnovna raztopina za odkrivanje antigenov (pH 9):

- 1,21 g TRIS
- 0,37 g EDTA
- 100 ml redistirane vode
- pH uravnamo na 9

Delovno raztopino pripravimo z redčenjem z redistirano vodo v razmerju 1:10 (5 mL osnovne raztopine za odkrivanje antigenov + 45 mL redistirane vode)

Priprava raztopine za blokado endogene peroksidaze

- 5 mL raztopine 35 % H₂O₂ zmešamo z 95 mL metanola.

3.1.4 APARATURE IN PRIBOR

- Citocentrifuga Cytospin 4 cytocentrifuge (Thermo Shandon Inc, Pittsburgh, ZDA)
- Benchmark GX (Ventana Medical Systems, Inc. Tuscon, Arizona ZDA)
- Hladilnik Panasonic MPR-721, Panasonic Healthcare Co.,Ltd, Japonska
- Laboratorijska mikrovalovna pečica BP-110 (Microwave Research and Applications, Inc.)
- Vortex Genie2 (Scientific industries, ZDA)
- Avtomatske pipete in nastavki (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- Računalniški program Ventana Medical Systems – Benchmark IHC/ISH staining module, (Ventana Medical Systems Inc. Tuscon, Arizona ZDA)

Drobni laboratorijski inventar:

- Kovinske sponke, plastična komora
- Filter papir za citospine
- Objektna stekla s peskanim predelom
- Krovna stekla
- Pasteurjeve pipete
- Plastične koničaste epruvete s pokrovčkom (1,5 mL) (Eppendorf Hamburg, Nemčija)
- Steklene kadičke (100 mL)
- Plastične okrogle kadičke (50mL)

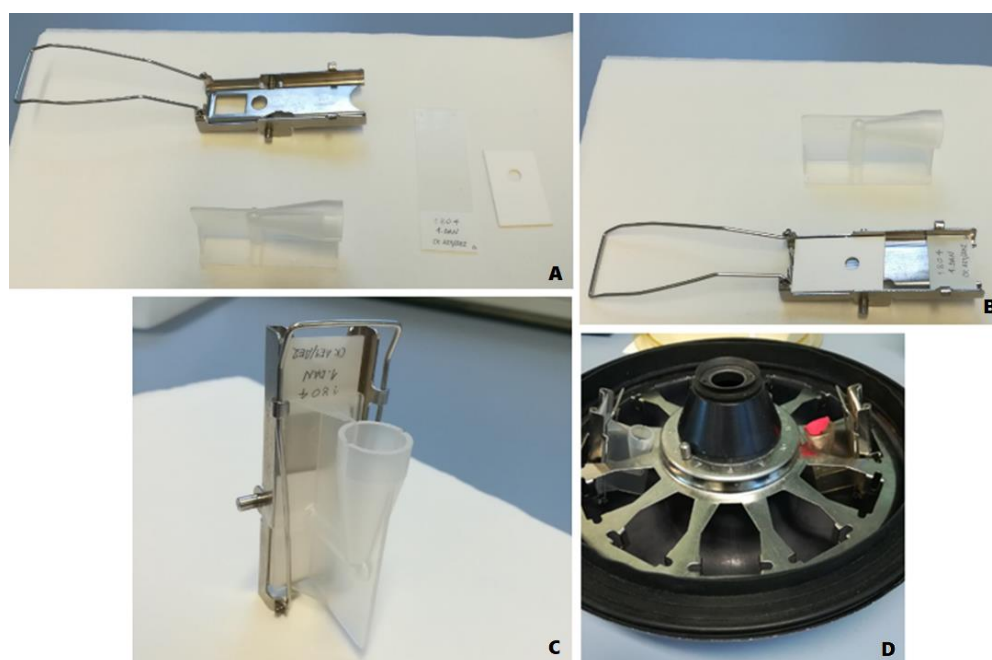
3.2 METODE

3.2.1 Izdelava citospinov: citocentrifugiranje in fiksacija

Iz ostanka citološkega vzorca, ki je bil primeren za nalogo, smo pripravili citološki preparat - citospin. Osnovni postopki priprave so: nanos celic na objektno steklo in fiksacija v metanolu.

Takoj po opravljeni ABTI, sprejemu izliva v laboratorij, oziroma dezintegraciji vzorca biopsije bezgavke, smo celični vzorec shranili v epruveti s hišnim celičnim medijem (uravnotežena raztopina soli s puferskim sistemom za vzdrževanje pH-vrednosti). Za oceno celične gostote vzorca in primernosti vzorca za magistrsko nalogo, smo pripravili testni citospin (tj. faza). Na peskani del objektnega stekla smo napisali laboratorijsko številko

vzorca in ga speli skupaj s filtrom in plastično komoro s kovinsko zaponko (slika 2). To smo vstavili v glavo citocentrifuge, s plastično Pasteurjevo pipeto v komoro nakapljali dve kaplji (približno 100 μ l) vzorca ter centrifugirali 4 minute pri 700 rpm. Ko se je citocentrifuga ustavila, smo odpeli zaponko, preparate takoj fiksirali v raztopini Delaunay, jih pobarvali z barvilom za hitro barvanje (Hemacolor solution 3, Merck 1-11957) ter jih pokrili s krovnim steklom (faza). Pod mikroskopom smo ocenili ali je gostota celic, nanešena na objektno steklo, primerna. V primeru, da je bila gostota celic prevelika, smo celični vzorec redčili z dodatkom nekaj kapljic hišnega celičnega medija.



Slika 2: A-D: Priprava citospinov. A: za pripravo citospinov potrebujemo objektno steklo z laboratorijsko številko vzorca, filter papir, zaponko za objektno steklo in komoro.

B: v zaponko najprej vložimo objektno steklo in filter.

C: Nato vstavimo še komoro in zaponko zapremo.

D: Rotor centrifuge z vstavljenjo zaponko z objektnim steklom, filtrom in komoro.

Ko smo ocenili, da je bila gostota celic na citospinu primerna, smo po enakem postopku pripravili po dva citospina iz vsakega testnega vzorca za vsak predviden dan testiranja in ju takoj fiksirali v metanolu. Priporočen čas fiksacije citospinov v metanolu pred imunocitokemičnim barvanjem je čez noč pri temperaturi 4 °C. Minimalen čas fiksacije je 30 minut.

3.2.2 Imunocitokemično barvanje citoloških preparatov

Predpriprava vzorcev

- Citospine, fiksirane v metanolu, ki so bili shranjeni v hladilniku pri temperaturi 2-6°C, smo prestavili v kadičko z metanolom, kjer smo jih pustili do blokade endogene peroksidaze.
- Pozitivne kontrole – citospine, ki so bili fiksirani v metanolu in zaščiteni s PEG, smo inkubirali v posebni kadički z metanolom najmanj 10 minut, oziroma dokler jih nismo prestavili v kadičko z blokado endogene peroksidaze.
- Vse citospine, ki smo jih zbrali v kadički za blokado endogene peroksidaze smo inkubirali 10 minut z raztopino za blokado endogene peroksidaze (95 mL+ 5mL 35% H₂O₂).
- Sledilo je odlivanje raztopine za blokado endogene peroksidaze in spiranje z delovno raztopino pufra PBS (vsaj 3-krat).

Odkrivanje antigenov

Pred blokado endogene peroksidaze smo v primeru dokazovanja ER v vzorcih izvedli še odkrivanje antigenov.

- Prestavljanje citospinov iz metanola v delovno raztopino PBS, inkubacija 10 minut, sobna temperatura
- Toplotna preobdelava: inkubacija v pufri TRIS-EDTA (pH 9), segretem na 98°C, 3 minute, inkubacija citospinov v delovni raztopini pufra PBS, 10 minut, sobna temperatura
- Inkubacija citospinov v delovni raztopini pufra PBS, 10 minut, sobna temperatura
- Blokada endogene peroksidaze

Vnos postopka za imunocitokemično barvanje v aparat Benchmark GX (Ventana) in tiskanje nalepk

Postopek ICK za določanje antigenov z barvalcem Benchmark GX (Ventana), poteka avtomatsko. Edini korak, ki ga opravimo ročno, je redčenje in dodajanje primarnega protitelesa, sicer pa barvalec sam dodaja reagente, potrebne za izvedbo reakcije ICK. Inkubacija na vsaki stopnji postopka barvanja ICK traja določen čas pri določeni temperaturi. Na koncu vsake inkubacijske stopnje barvalec spere preparate s spiralnim pufrom, da ustavi

reakcijo in odstrani nevezan material, ki bi oviral željeno reakcijo v naslednjih stopnjah. Na koncu doda sredstvo za prekrivanje, ki prepreči izhlapevanje vodnih reagentov iz objektnega stekla z vzorcem. Da celoten postopek nemoteno poteka, moramo v ustrezen program vnesti protokole za izvedbo barvanja ICK.

1. Vnašanje protokolov v primeru uporabe detekcijskega kompleta **iView DAB**

- V programu Ventana Medical Systems – Benchmark IHC/ISH staining module barvalca Benchmark GX (Ventana) izberemo postopek za neparafinske vzorce (DAB Non-Paraffin).
- Nastavimo čas inkubacije s primarnimi protitelesi na 32 minut.
- Izberemo kontrastiranje s hematoksilinom (4 min).
- Izberemo modrenje jeder z reagentom za modrenje (4min).
- Poimenujemo protokol (glede na fiksacijo in ime označevalca) in ga shranimo.

2. Vnašanje protokolov v primeru detekcijskega kompleta **Ultra View Universal Alkaline Phosphatase**

- V programu Ventana Medical Systems – Benchmark IHC/ISH staining module barvalca Benchmark GX (Ventana) izberemo postopek za neparafinske vzorce (Enhanced-V-Red Non-Paraffin).
- Nastavimo čas inkubacije s protitelesi na 24 minut.
- Izberemo kontrastiranje s hematoksilinom (4 min).
- Izberemo modrenje jeder z reagentom za modrenje (4min).
- Poimenujemo protokol (glede na fiksacijo in ime označevalca) in ga shranimo.

Za tiskanje nalepk smo za vsak posamezen označevalec, izbrali ustrezen protokol, vpisali diagnostično številko preparata in ustrezno redčitev protitelesa. Natisnili smo ustrezne nalepke s črtnimi kodami glede na izbrani postopek, jih nalepili na objektna stekla s citospini, inkubiranimi v delovni raztopini PBS, jih vstavili na ustrezne nosilce v barvalcu in jih omočili z raztopino Reaction Buffer.

- Na ustrezno mesto na barvalcu smo namestili za postopek potrebne vsebnike: detekcijski kit iView DAB (6 vsebnikov), reagenta A in B (2 vsebnika), hematoksilin (1 vsebnik) in reagent za modrenje jeder (2 vsebnika). Poleg tega smo morali poskrbeti, da so bile posode z reagenti, ki jih barvalec potrebuje za nemoten potek

celotnega postopka napolnjene z ustreznimi reagenti (Reaction Buffer, LCS, EZ Prep).

- Protitelesa smo ustrezno redčili z delovno raztopino PBS (preglednica VIII na strani 22). Na vsak preparat (razen na negativne kontrole) smo ob signalu barvalca dodali po 100 μ L primarnega protitelesa. Raztopin protiteles anti-kalretinin in anti-melanomski koktejl ni bilo potrebno redčiti, ker sta že pripravljena za takojšnjo uporabo. S konico nastavka pipete smo pazljivo predreli oljni sloj nad preparatom, jo postavili na del preparata, ki ne vsebuje celičnega vzorca in počasi izbrizgnili raztopino protiteles na preparat.
- Barvanje ICK na CK AE1/AE3, kalretinin, MOC-31, LCA, ER je po navedbi proizvajalca najbolj optimalno z uporabo analiznega kompleta iView DAB (rjav kromogen), barvanje ICK melanomskega koktejla pa z uporabo analiznega kompleta Ultra View Universal Alkaline Phosphatase Red Detection kit (rdeč kromogen).

Spiranje, dehidracija in bistrenje preparatov

- Po končanem barvanju smo vzeli preparate iz aparata in jih 3 do 4-krat sprali v vroči tekoči vodi.
- Nato smo jih sprali v 96 % etanolu in jih v njem dehidrirali 10 minut.
- Preparate smo nato sprali v ksilenu ter jih bistrili v ksilenu za 10 minut. Sledilo je pokrivanje z nanašanjem pokrivnega medija in krovnih stekel.
- V primeru barvanja ICK melanomskega koktejla, za katerega smo uporabili detekcijski kit Ultra Fast Red, smo izpustili inkubacijo v etanolu, saj le to povzroči bledenje preparatov. V etanolu smo jih le na hitro sprali, v ksilenu pa so se bistrili kot vsi ostali citospini.

Barvanje pozitivnih kontrol

Pozitivne kontrole smo barvali vzporedno s testnimi vzorci. Pozitivni kontroli za kalretinin in ER sta bili shranjeni v kadički z metanolom v hladilniku pri temperaturi 2-6°C, pozitivne kontrole za CK AE1/AE3, MOC-31, LCA in melanomski koktejl pa so bile fiksirane v metanolu, zaščitene s polietilen glikolom (PEG) in shranjene v škatlah na sobni temperaturi. Pozitivne kontrole, ki so bile spravljene v kadički z metanolom, smo lahko takoj inkubirali v blokadi endogene peroksidaze in nadaljevali s postopkom barvanja, medtem ko smo pozitivne kontrole zaščitene s PEG najprej inkubirali 10 minut

v kadički z metanolom, da smo odstranili zaščitni film s PEG, šele nato je sledila inkubacija v raztopini blokade endogene peroksidaze.

3.2.3 Ocenjevanje rezultatov imunocitokemičnih reakcij

Pod mikroskopom smo ocenili imunocitokemično barvanje posameznih antigenskih označevalcev ob upoštevanju rezultatov pozitivnih in negativnih kontrol. Pobarvane testne vzorce, pozitivne in negativne kontrole smo samostojno in neodvisno ocenile 4 ocenjevalke (dve citopatologinji (VKP in UK), samostojna analitičarka v laboratorijski medicini (NN) in študentka laboratorijske biomedicine (AK)). Pri ocenjevanju citoloških preparatov smo se oprli na smernice britanske nacionalne sheme UK NEQAS in na kriterije, ki jih uporabljajo v redni diagnostiki oddelka za citopatologijo Onkološkega inštituta v Ljubljani (preglednica IX). Pri ocenjevanju preparatov smo ovrednotili odstotek obarvanih celic (reakcija), intenziteto reakcije, prisotnost ozadja, morfologijo celic in kontrastiranje. Ocene so bile semikvantitativne. Izjema so bile ocene za reakcijo, kjer smo reakcijo ocenili semikvantitativno od 0 do 3 in kvantitativno z deležem pozitivnih celic.

Reakcija predstavlja delež obarvanih celic v odstotkih. Delež obarvanih celic smo ocenjevali glede na število vseh celic z jedri na preparatu. Ocena 0 pomeni, da se celice niso obarvale. Ocena 1 pomeni, da so obarvane posamezne celice z jedri (manj kot 5 %), ocena 2: 15 do 50 % obarvanih celic in ocena 3: nad 50 % obarvanih celic.

Intenziteto smo ocenjevali glede na obarvanost celic (jakost reakcije). Ocena 0 pomeni, da obarvanosti ni. Ocena 1 pomeni šibko obarvanje, ocena 2 zmerno obarvanje in ocena 3 močno obarvanje celic.

Ozadje pomeni prisotnost nespecifičnega obarvanja. Če ozadja ni bilo smo to ocenili z 2 točkama, šibko obarvano ozadje z 1 točko in močno obarvano ozadje z 0 točk.

Citospin z ohranjeno **morfologijo** smo ocenili z 1 točko, s spremenjeno morfologijo pa z 0 točk.

Primerno **kontrastiran** citospin smo ocenili z 1 točko, neprimerno kontrastiran z 0 točk.

Pri testnih vzorcih in njihovih negativnih kontrolah smo ocenjevali reakcijo, intenziteto, ozadje, morfologijo celic in kontrastiranje. Pri pozitivnih kontrolah smo ocenjevali le reakcijo, intenziteto in ozadje.

Za potrebe statistične analize smo končne ocene pripravili iz ocen štirih ocenjevalk. Kot končne rezultate semikvantitativnega ocenjevanja smo upoštevali tiste ocene, pri katerih so se glede vrednosti parametrov strinjale vse štiri ali vsaj tri ocenjevalke. Če se ocene posameznih ocenjevalk niso ujemale (npr.: dve ocenjevalki sta ocenili intenziteto antigena z 2, dve pa z 1) smo preparate ponovno ocenile vse štiri ocenjevalke in sprejele konsenz. Za končno oceno reakcije, ki smo jo opredelili kvantitativno z deležem pozitivnih celic v odstotkih, smo upoštevali povprečje ocen štirih ocenjevalk.

Preglednica IX predstavlja kriterije ocenjevanja, ki smo jih upoštevali pri raziskovalni nalogi in so kombinacija kriterijev, ki jih uporabljajo na oddelku za citopatologijo Onkološkega inštituta v Ljubljani (OIL), kjer ocenjujemo samo reakcijo, intenziteto ter ozadje in kriterijev, ki jih uporablja UK NEQAS ICK (intenziteta reakcije, ozadje, kontrastiranje). Ocenjevali smo tudi morfolologijo, ki ni zajeta niti pri ocenjevanju reakcij ICK na oddelku za citopatologijo OIL, niti v shemi zunanje kakovosti UK NEQAS ICK.

Preglednica IX: Kriterij ocenjevanja preparatov

REAKCIJA	3 – nad 50% obarvanih celic 2 – 15 - 50% obarvanih celic 1 – pod 15% obarvanih celic 0 – ni obarvanih celic
INTENZITETA	3 – močna 2 – zmerna 1 – šibka
OZADJE	2 – ni prisotno 1 – šibko ozadje 0 – močno ozadje
KONTRASTIRANJE	1 – primerno 0 – neprimerno
MORFOLOGIJA	1 – ohranjena 0 – spremenjena

Preglednica X prikazuje obrazec ocenjevanja rezultatov imunocitokemičnih reakcij za barvanje ICK posameznega antigena.

Preglednica X: Obrazec ocenjevanja preparatov za posamezen antigen

Antigen/ Vzorec	Ocenjevalni parameter	Testni vzorec 1. dan	NK	Testni vzorec 2. dan	NK	Testni vzorec 4. dan	NK	Testni vzorec 5.dan	NK	Testni vzorec 8.dan	NK
1	reakcija (%)										
	intenziteta										
	Ozadje										
	kontrastiranje										
	morfologija										
2	reakcija (%)										
	intenziteta										
	ozadje										
	kontrastiranje										
	morfologija										
3	reakcija (%)										
	intenziteta										
	ozadje										
	kontrastiranje										
	morfologija										
4	reakcija (%)										
	intenziteta										
	ozadje										
	kontrastiranje										
	morfologija										
5	reakcija (%)										
	intenziteta										
	ozadje										
	kontrastiranje										
	morfologija										
6	reakcija (%)										
	intenziteta										
	ozadje										
	kontrastiranje										
	morfologija										
7	reakcija (%)										
	intenziteta										
	ozadje										
	kontrastiranje										
	morfologija										
8	reakcija (%)										
	intenziteta										
	ozadje										
	kontrastiranje										
	morfologija										
9	reakcija (%)										
	intenziteta										
	ozadje										
	kontrastiranje										
	morfologija										
10	reakcija (%)										
	intenziteta										
	ozadje										
	kontrastiranje										
	morfologija										

NK= negativna kontrola

Ker je laboratorij Oddelka za citopatologijo vključen v UK NEQAS-ovo zunanjo shemo kontrole kakovosti za imunocitokemijo (ICK), smo rezultate ocenjevanj posameznih ocenjevalcev pretvorili tudi v točkovni sistem ocenjevanja UK NEQAS ICK (Preglednica XI).

Preglednica XI: Kriterij imunocitokemičnega barvanja po UK NEQAS ICK

ANTIGEN	odsoten = 0 točk prisoten → oceni se INTENZITETA reakcije šibka = 1 zmerna = 2 močna = 3
OZADJE	odsotno ozadje = 1 prisotno ozadje = 0
KONTRASTIRANJE	primerno = 1 neprimerno = 0

V shemi UK NEQAS ICK sodelujejo štirje zunanji ocenjevalci. Vsak od njih preparat oceni z 0 do 5 točk. Da dobijo končno oceno, točke vseh štirih ocenjevalcev seštejejo in glede na skupno oceno, ki ima lahko vrednost od 0 do 20, ocenjeni preparat uvrstijo v eno od štirih kategorij s komentarji oz. priporočili (preglednica XII) (32). Enako smo postopali tudi pri ocenjevanju reakcij ICK pri naši nalogi, le da smo pri ocenjevanju preparate ocenile tudi s polovičnimi ocenami (npr. 2,5).

Preglednica XII: Kategorije v shemi zunanje kontrole kakovosti UK NEQAS ICK

Skupno št. doseženih točk	Kategorija s priporočilom
≤ 9/20	Nesprejemljivo obarvanje (»unacceptable«). Potrebne so izboljšave
10–12/20	Mejno sprejemljivo obarvanje (»borderline«). Potrebne so izboljšave.
13–15/20	Sprejemljivo obarvanje (»acceptable«). Nekateri ocenjevalci menijo, da bi bile potrebne izboljšave.
16–20/20	Zelo dobro barvanje ICK (»excellent«).

3.2.5 Statistična obdelava podatkov

Statistično analizo smo izvedli s pomočjo programa IBM SPSS (Statistical Package for Social Sciences), verzija 22. Zbrane podatke smo uredili v programu Microsoft Office Excel. Pri opisni statistiki smo za deleže reakcij (delež celic s pozitivno reakcijo ICK) v odstotkih ter ocene po UK NEQAS ICK izračunali povprečje in standardni odklon (SD), pri ordinalnih spremenljivkah (intenziteta, ozadje) pa mediano in podali najvišjo in najnižjo vrednost.

Ker smo preparate posebej in neodvisno ocenjevale štiri osebe, smo najprej s statistiko kapa ovrednotili mero ujemanja med ocenjevalci (angl. inter-rater agreement). Izbor testa je bil odvisen od vrste spremenljivke, ki so jo ocenjevalci ocenjevali, in števila ocenjevalcev. Primerjali smo ocene med dvema, tremi in štirimi ocenjevalci. Z uporabo Cohenovega koeficienta kapa κ smo prikazali ujemanje rezultatov med dvema ocenjevalcema v morfologiji in kontrastiranju, kjer smo preverili ujemanje dihotomnih spremenljivk (ohranjena/spremenjena morfologija ter primerno/neprimerno kontrastiranje). Z uporabo uteženega koeficienta kapa κ_w smo prikazali ujemanje med dvema ocenjevalcema pri ocenjevanju parametrov z ordinalnimi spremenljivkami, ki so imele vrednosti od 0 do 3 pri reakciji in intenziteti oziroma od 0 do 2 pri ozadju. S Fleissovo kapo smo pokazali ujemanje rezultatov med vsemi štirimi ocenjevalci. Ker smo tri ocenjevalke (citopatologinja A, samostojna analitičarka, študentka) kriterij postavile pred začetkom ocenjevanja brez prisotnosti citopatologinje B, smo izračunali vrednost Fleissove kape tako med vsemi štirimi ocenjevalkami kot vrednost kape med samo tremi ocenjevalkami (brez citopatologinje B). Vrednost kape je med -1 in 1. V primeru, da se ocenjevalca popolnoma ujemata je $\kappa = 1$, če se ujemata le v številu primerov, kot bi pričakovali, če bi odgovarjala naključno, je $\kappa = 0$. Vrednost -1 pa pomeni, da strinjanja med ocenjevalcema ni bilo. V literaturi je več smernic, ki določajo vrednost κ . Za namen naše naloge smo uporabili klasifikacijo, ki sta jo določila Landis in Koch leta 1977. Preglednica XIII prikazuje stopnjo ujemanja med ocenjevalci po Landisu in Kochu (31,32,33).

Preglednica XIII: Kriterij vrednosti kape (klasifikacija Landisa in Kocha, 1977)

Vrednost kape κ	Ujemanje
< 0,2	slabo
0,21 - 0,40	rahlo
0,41 - 0,60	zadovoljivo
0,61 - 0,80	dobro
0,81 - 1,00	zelo dobro

Za primerjavo rezultatov ocen po kriteriju UK NEQAS ICK in analizo rezultatov deležev reakcij po dnevih smo uporabili enofaktorsko analizo variance s ponavljajočimi meritvami (angl. one way ANOVA repeated measures). Če je bila med testiranimi dnevi statistično značilna razlika, smo za parno primerjavo (angl. »pairwise comparison«) z Bonferronijevo korekcijo ugotavljali med katerima dnevoma je obstajala statistično značilna razlika.

Rezultate intenzitet in ozadja smo s analizirali Friedmanovim testom. Če smo dokazali statistično značilno razliko med testiranimi dnevi, smo nadaljevali s parno primerjavo med posameznimi dnevi (»pairwise comparison«), da smo dokazali med točno katerima dnevoma obstaja statistično značilna razlika. Intenziteto reakcije smo analizirali le na testnih vzorcih, ozadje pa na testnih vzorcih in na njihovih negativnih kontrolah. Statistično značilne razlike pri morfologiji in kontrastiranju med posameznimi dnevi smo analizirali s Cochranovim testom ter s McNemarjevim testom post hoc. Statistično obdelavo morfologije smo naredili na negativnih kontrolah. Razlike, pri katerih je bila značilnost testa (p) manjša od 0,05, smo opredelili kot statistično značilne.

4. REZULTATI

4.1 Ujemanje ocen med ocenjevalci

Ujemanja ocen reakcije, intenzitete, ozadja, morfologije in kontrastiranja barvanj ICK med vsemi kombinacijami parov ocenjevalk so prikazani v razpredelnici XIV.

Preglednica XIV: Ujemanje ocen reakcije, intenzitete, ozadja, morfologije in kontrastiranja med vsemi kombinacijami parov ocenjevalcev z uporabo utežene in Cohenove kape

Ocenjevalci		utežena kapa κ_w za reakcijo	utežena kapa κ_w za intenziteto	utežena kapa κ_w za ozadje	Cohenova kape za morfologijo	Cohenove kapa za kontrastiranje
citopatologinja A	citopatologinja B	0,843	0,115	0,160	0,181	0,164
citopatologinja A	samostojna analitičarka	0,951	0,113	0,476	0,374	0,068
citopatologinja A	Študentka	0,996	0,257	0,556	0,534	0,354
citopatologinja B	samostojna analitičarka	0,873	0,314	0,285	0,242	0,105
citopatologinja B	Študentka	0,847	0,170	0,071	0,158	0,229
samostojna analitičarka	študentka	0,955	0,190	0,367	0,517	0,182

Pri ocenjevanju deleža **reakcije** obarvanih celic smo ugotovili zelo dobro ujemanje med vsemi pari ocenjevalk. Vrednosti kapa za delež reakcije se gibljejo od 0,873 do 0,996. Ujemanje ocenjevanj za **intenziteto** barvanja ICK je bilo slabše, saj sta le citopatologinja A in študentka ($\kappa = 0,257$) ter citopatologinja B in samostojna analitičarka ($\kappa = 0,314$) dosegle rahlo strinjanje. Ostala ujemanja so bila slaba, s kapa vrednostjo pod 0,2.

Ujemanje ocenjevalcev pri ocenjevanju **ozadja** je bilo zadovoljivo med citopatologinjo A in samostojno analitičarko ($\kappa = 0,476$) ter citopatologinjo A in študentko ($\kappa = 0,556$). Rahlo ujemanje je bilo med citopatologinjo B in samostojno analitičarko ($\kappa = 0,285$) ter samostojno analitičarko in študentko ($\kappa = 0,367$). Ujemanje v ocenjevanju ozadja je bilo slabo med obema citopatologinjama ter citopatologinjo B in študentko z vrednostjo kapa pod 0,2. Dobro mero ujemanja smo ugotovili pri ocenjevanju **morfologije** med samostojno analitičarko in študentko ($\kappa = 0,517$) ter študentko in citopatologinjo A ($\kappa = 0,534$), ter rahlo ujemanje med samostojno analitičarko in citopatologinjo B ($\kappa = 0,242$). Slabo ujemanje je

bilo med citopatologinjima A in B, ter študentko in citopatologinjo B. Ujemanje ocenjevanj v **kontrastiranju** je bilo slabo. V dveh primerih smo dosegle le rahlo ujemanje – med citopatologinjo A in študentko ($\kappa = 0,354$) ter citopatologinjo B in študentko ($\kappa = 0,229$).

Celotno ujemanje (angl. overall agreement) med vsemi štirimi ocenjevalkami je prikazano v preglednici XV. Zelo dobro ujemanje vseh ocenjevalk smo ugotovili pri ocenjevanju reakcije barvanja ICK ($\kappa = 0,873$), pri ocenjevanju intenzitete, ozadja in morfologije smo dosegli rahlo ujemanje rezultatov (vrednosti kapa se gibljejo od 0,273 do 0,381). Pri ocenjevanju kontrastiranja je bilo ujemanje slabo ($\kappa = 0,143$). Skladnost ocen pri ocenjevanju reakcije, intenzitete in morfologije je bila med tremi ocenjevalkami, ki so uskladile kriterije ocenjevanja, višja kot med vsemi štirimi ocenjevalkami. Ujemanje ocen v kontrastiranju je bilo rahlo nižje med 3 ocenjevalkami v primerjavi z ujemanjem ocen vseh štirih ocenjevalk (preglednica XV).

Preglednica XV: Ujemanje rezultatov posameznih parametrov med vsemi štirimi ocenjevalci in samo tremi ocenjevalci z uporabo Fleissove kape

Ocenjevani parameter	Ujemanje ocen med 4 ocenjevalkami (Fleiss kapa ^A)	Ujemanje ocen med 3 ocenjevalkami (Fleiss kapa ^B)
Reakcija obarvanih celic	0,873	0,944
Intenziteta reakcije	0,273	0,296
Ozadje	0,381	0,510
Morfologija	0,329	0,473
Kontrastiranje	0,143	0,119

A – ujemanje rezultatov ocenjevalk citopatologinje A, citopatologinje B, samostojne analitičarke in študentke.

B – ujemanje rezultatov ocenjevalk citopatologinje A, samostojne analitičarke in študentke.

4.2 Kriterij UK NEQAS za imunocitokemijo

Preglednica XVI prikazuje ocene barvanja ICK CK AE1/AE3 po shemi UK NEQAS za 1., 2., 4., 5. in 8. dan. Povprečje ocen barvanja ICK se je za vsak testirani dan gibalo med 14,7 in 15,65. Do četrtega dne je povprečje ocen rahlo naraščalo, petega dne je bilo povprečje najnižje. Med ocenami za CK AE1/AE3 med posameznimi dnevi ni bilo statistično značilnih razlik ($p = 0,558$).

V vzorcu z laboratorijsko številko P 1/17 smo barvanje ICK CK AE1/AE3 1. in 2. dan vse štiri ocenjevalke ocenile za mejno sprejemljivo zaradi slabega kontrastiranja (0 točk) in prisotnosti ozadja (0 točk), kljub visoki oceni za intenziteto reakcije (ocena 3 za prvi dan in ocena 2 za drugi dan).

Preglednica XVI: Rezultati ocenjevanja za CK AE1/AE3 po UK NEQAS ICK

	Seštevek ocen štirih parametrov CK AE1/AE3				
	1.dan	2.dan	4.dan	5.dan	8.dan
P 1/17	12	11	14	13	14
O 2/17	15,5	15,5	14,5	14	14
O 3/17	15	15	15	10	14
P 4/17	15,5	17,5	20	20	19
P 5/17	14,5	13,5	14,5	14	14
P 6/17	15	15	14	15	16
P 7/17	16,5	16,5	17,5	17	18
O 8/17	13	13,5	13	15	16,5
O 18/17	18	17,5	16	13	12
P 10/17	19	19	18	16	18
aritmetična sredina	15,4	15,4	15,65	14,7	15,55
stand.odklon	2,09	2,35	2,20	2,67	2,29
Legenda:	Mejno sprejemljivo obarvanje (10-12 točk)				
	Sprejemljivo obarvanje (13-15 točk)				
	Zelo dobro obarvanje (16-20 točk)				

V preglednici XVII so predstavljeni rezultati ocen barvanja ICK **kalretinina** po shemi UK NEQAS ICK. Barvanje ICK na kalretinin smo v primerjavi z drugimi ocenjevanimi označevalci ICK najslabše ocenili. Povprečna vrednost desetih ocen prvega dne je bila najboljša 13,2 (kategorija sprejemljivo) in najnižja osmega dne 8,4 (nesprejemljivo). Opazili smo, da se je povprečje ocen od prvega do osmega dne s časom zmanjševalo. Standardni odklon se je s časom povečeval, kar pomeni, da so bile vrednosti ocen vedno bolj razpršene okoli aritmetične sredine.

Prvega dne so bile ocene barvanja ICK v petih od desetih primerov v kategorijah »sprejemljivo« (svetlo zelena barva) ali »zelo dobro« (temno zelena barva), trije so se uvrstili »mejno sprejemljivo«, dva v kategorijo »nesprejemljivo«. Drugi dan so se v kategorijo »sprejemljivo« uvrstili le še trije primeri, sedem jih je padlo v kategorijo »mejno sprejemljivo«. Četrtega dne je ostalo število primerov v kategoriji »sprejemljivo« nespremenjeno (n=3), v kategoriji »mejno sprejemljivo« so ostali samo štirje primeri, trije primeri so padli v nižjo kategorijo »nesprejemljivo«. Peti in osmi dan se je število primerov v kategoriji »nesprejemljivo« povišalo na pet od desetih primerov, kar predstavlja polovico vseh testiranih vzorcev. Vidimo, da se je od prvega proti osmemu dnevu število vzorcev v višjih, bolje ocenjenih kategorijah nižalo, v nižjih, slabše ocenjenih kategorijah pa višalo, kar nam dokazuje tudi statistično značilna razlika barvanja ICK kalretinina po dnevih ($p=0,001$). Največja statistično značilna razlika se je pokazala med prvim in osmim dnevom ($p = 0,028$).

V povprečju se je ocena kvalitete barvanja znižala iz dneva v dan za eno oceno, predvsem na račun šibke intenzitete, ozadja in neprimernega kontrastiranja, petega in osmega dne pa tudi zaradi negativne reakcije.

Preglednica XVII: Rezultati ocenjevanja za kalretinin po UK NEQAS ICK

	Seštevek ocen štirih parametrov za KALRETININ				
	1.dan	2.dan	4.dan	5.dan	8.dan
O 11/17	15	13	10	10	10,5
O 12/17	9,5	12,5	11	8,5	4
O 13/17	12,5	10,5	6,5	4	0
O 14/17	17,5	12	10	9,5	13
O 15/17	9,5	10	6,5	6,5	7
O 16/17	12	12	11	11	13,5
O 17/17	14	11	13	12,5	6,5
O 18/17	14,5	14,5	15	15	13
O 19/17	15,5	15	14,5	13,5	10,5
O 20/17	12	11	9,5	9	6
aritmetična sredina	13,2	12,15	10,7	9,35	8,4
stand.odklon	2,58	1,65	2,91	3,27	4,46
Legenda:	Nesprejemljivo obarvanje, ≤ 9 točk				
	Mejno sprejemljivo obarvanje, 10-12 točk				
	Sprejemljivo obarvanje, 13-15točk				
	Zelo dobro obarvanje, 16-20 točk				

V preglednici XVIII so prikazane ocene za **MOC-31** po shemi UK NEQAS ICK. Povprečje ocen od prvega do zadnjega dne se uvršča v kategorijo »sprejemljivo«. Najvišje povprečje desetih vzorcev je bilo četrtega dne (14,25), najnižje pa 1.dan (13,7). Standardni odklon ocen se je z vsakim dnem povečal. Prvi in drugi dan je bilo sedem vzorcev uvrščenih v kategoriji »sprejemljivo« ali »zelo dobro« in trije vzorci v kategorijo »mejno sprejemljivo«. Po osmih dneh je bilo v kategorijah »sprejemljivo« in »zelo dobro« uvrščenih šest vzorcev, v kategorijo »mejno sprejemljivo« trije in v kategorijo »nesprejemljivo« eden, kar pomeni, da se kvaliteta barvanja ICK s časom ni bistveno spreminjala. To je pokazala tudi statistična analiza, saj statistično značilnih razlik med testiranimi dnevi nismo dokazali ($p = 0,414$). Reakcija na antigen je bila v vseh vzorcih prisotna od prvega do osmega dne. Določeni vzorci so se uvrstili v kategorijo »mejno sprejemljivo« zaradi prisotnega ozadja in neprimernega kontrastiranja. V kategorijo »nesprejemljivo« je bil uvrščen en sam vzorec (O 18/17) in sicer četrti, peti in osmi dan, zaradi zmerne intenzitete reakcije ICK, prisotnega ozadja in neprimernega kontrastiranja.

Preglednica XVIII: Rezultati ocenjevanja za MOC-31 po UK NEQAS ICK

	Seštevek ocen štirih parametrov za MOC-31				
	1.dan	2.dan	4.dan	5.dan	8.dan
P 4/17	14,5	15,5	16	15	16,5
O 8/17	10,5	13	14,5	16	13,5
O 18/17	13	11	9,5	8	9,5
O 2/17	13,5	13,5	17	17	14,5
P 1/17	12,5	10	13,5	12,5	11,5
P 21/17	17	17	16	16	16
P 22/17	15	15	14	13	14,5
P 23/17	16	15,5	15,5	17	12,5
P 24/17	11	11	10,5	10,5	12
O 9/17	14	15	16	17	17
aritmetična sredina	13,7	13,65	14,25	14,2	13,75
stand.odklon	2,06	2,35	2,49	3,12	2,41
Legenda	Nesprejemljivo obarvanje, ≤ 9 točk				
	Mejno sprejemljivo obarvanje, 10-12 točk				
	Sprejemljivo obarvanje, 13-15točk				
	Zelo dobro obarvanje, 16-20 točk				

Povprečne vrednosti desetih ocen LCA po shemi UK NEQAS ICK so bile 1., 2., 5. in 8. dan na zgornji meji v kategoriji »sprejemljivo«, 4. dne pa na spodnji meji v kategorij »zelo dobro« (preglednica XIX). Razlike med vrednostmi ocen med vzorci so tako majhne, da statistično značilnih razlik v ocenah med posamenimi dnevi ni ($p = 0,403$). Najnižje povprečje desetih ocen je bilo 8. dan, najvišje pa 4. dan. Osem vzorcev je bilo ne glede na dan priprave visoko ocenjenih in so bili uvrščeni v kategoriji »zelo dobro« ali »sprejemljivo«. Vzorec O 26/17 (plevralni izliv) smo od prvega do osmega dne uvrščale v kategorijo »mejno sprejemljivo«, zaradi zmerne intenzitete reakcije, neprimernega kontrastiranja in prisotnega ozadja. Vzorec Bx 31/17 smo prvi in drugi dan uvrstile v kategorijo »mejno sprejemljivo«, zaradi šibke intenzitete reakcije in neprimernega kontrastiranja, četrti, peti in osmi dan pa v kategorijo »sprejemljivo«, na račun povečanja intenzitete reakcije.

Preglednica XIX: Rezultati ocenjevanja za LCA po UK NEQAS ICK

	Seštevek ocen štirih parametrov LCA (CD45)				
	1.dan	2.dan	4.dan	5.dan	8.dan
O 25/17	16	17	17,5	16	16
O 26/17	11	12	12,5	11,5	10,5
O 19/17	16	16,5	16,5	14,5	14,5
Bx 27/17	15,5	17,5	17	16,5	14
Bx 28/17	16	17	16,5	15	15
Bx 29/17	16	16,5	18	17	17
Bx 30/17	16	16,5	15	16,5	17

Bx 31/17	12	12	13,5	14	13,5
Bx 32/17	17,5	17	16,5	17	17
Bx 33/17	15	16	17	18	15,5
aritmetična sredina	15,1	15,8	16	15,6	15
stand.odklon	2,01	2,04	1,78	1,90	2,03
Legenda	Mejno sprejemljivo obarvanje, 10-12 točk				
	Sprejemljivo obarvanje, 13-15 točk				
	Zelo dobro obarvanje, 16-20 točk				

V preglednici XX vidimo, da se je povprečje desetih ocen ER po posameznih dnevih gibalo med 12 prvega dne (mejno sprejemljivo barvanje) in 13,25 četrtega dne (sprejemljivo barvanje). Povprečne ocene barvanja ICK na ER so se rahlo zviševale od prvega dne do četrtega dne. Razlog za višanje ocen posameznih vzorcev je v večanju intenzitete reakcije na ER po četrtem dnevu. Prvi dan je bilo v šestih od desetih primerov barvanje »mejno sprejemljivo«, eno »nesprejemljivo«. Razlog za nesprejemljivo barvanje vzorca P 35/17 prvega dne je bilo prisotno ozadje, neprimerno kontrastiranje in zmerna intenziteta. Drugi dan smo sedem od desetih primerov uvrstili v kategorijo »mejno sprejemljivo«. Četrta dan sta bila v kategorijo »mejno sprejemljivo« uvrščena dva, peti dan trije in osmi dan štirje vzorci. Razlogi za uvrščanje vzorcev v kategorijo »mejno sprejemljivo« sta bila prisotno ozadje in neprimerno kontrastiranje. Značilnih razlik med ocenami med posameznimi dnevi nismo dokazali ($p = 0,085$).

Preglednica XX: Rezultati ocenjevanja za ER po UK NEQAS ICK

	Seštevek ocen štirih parametrov ESTROGENSKEGA RECEPTORJA				
	1.dan	2.dan	4.dan	5.dan	8.dan
P 34/17	12	12	13	13,5	14
P 35/17	9,5	12	13,5	13,5	14,5
P 36/17	12	12,5	10,5	11	12
P 37/17	12,5	12	13	14	10
P 38/17	13	14	13,5	13,5	12,5
P 39/17	10,5	12,5	13	11,5	10,5
P 40/17	10,5	11,5	12	10,5	13
P 41/17	13,5	12,5	14,5	13,5	13,5
P 42/17	14	13,5	15,5	14,5	13
P 43/17	12,5	15	14	14	16
aritmetična sredina	12	12,75	13,25	12,95	12,9
stand.odklon	1,43	1,09	1,36	1,40	1,80
Legenda	Nesprejemljivo ≤ 9 točk				
	Mejno sprejemljivo, 10-12 točk				
	Sprejemljivo obarvanje, 13-15 točk				
	Zelo dobro, 16-20 točk				

Vzorci, na katerih smo imunocitokemično dokazovali melanomski koktejl, smo v primerjavi z ostalimi označevalci ICK najboljše ocenili (preglednica XXI). Povprečje rezultatov ocen po shemi UK NEQAS ICK po se je uvrstilo v najvišjo kategorijo za vse testirane dneve. Značilnih razlik med posameznimi dnevi nismo dokazali ($p > 0,05$).

Preglednica XXI: Rezultati ocenjevanja za melanomski koktejl po UK NEQAS ICK

	Seštevek ocen štirih parametrov MELANOMSKEGA KOKTEJLA				
	1.dan	2.dan	4.dan	5.dan	8.dan
P 44/17	18	17	18	16	15
P 45/17	18	17	18	17	17
P 46/17	16	16	16	17	15
P 47/17	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5
P 48/17	19	17	17	17	17
P 49/17	18	18	17	16	15
P 50/17	15,5	15,5	17	17	16,5
P 51/17	18	18	18	18	18
P 52/17	17	15	17	16	17
P 53	16,5	17	18,5	16	17
aritmetična sredina	17,35	16,8	17,4	16,75	16,5
stand.odklon	1,08	1,00	0,73	0,72	1,12
Legenda	Sprejemljivo obarvanje, 13-15 točk				
	Zelo dobro obarvanje, 16-20 točk				

V preglednici XXII so prikazani rezultati primerjave ocenjevanja po shemi UK NEQAS ICK med posameznimi pari dnevov.

Preglednica XXII: Statistično značilne razlike med posameznimi pari dnevov po shemi UK NEQAS ICK

IK NEQAS ICK	1.in 2.dan	1.in 4.dan	1. in 5.dan	1. in 8. dan	2. in 4.dan	2. in 5. dan	2. in 8. dan	4. in 5.dan	4. in 8. dan	5. in 8.dan
CK AE1/AE3	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
kalretinin	NS	NS	NS	p<0,005	NS	NS	NS	NS	NS	NS
MOC-31	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
LCA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ER	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
melanovski koktejl	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS – ni značilne razlike

Pri ocenjevanju štirih parametrov za šest antigenov v različnih časovnih intervalih po shemi UK NEQAS ICK smo ugotovili, da med posameznimi pari dnevov ni bilo statistično značilnih razlik, razen za kalretinin, med prvim in osmim dnevom.

4.2 Rezultati ocenjevanja posameznih parametrov

Kot končne rezultate semikvantitativnega ocenjevanja smo upoštevali tiste primere, pri katerih so se glede vrednosti parametrov strinjale vse štiri ali tri ocenjevalke, v primeru nestrinjanja pa rezultate konsenza. Vse štiri ali vse tri ocenjevalke so enega od parametrov reakcij ICK (reakcija, intenziteta, ozadje, morfologija, kontrastiranje) ocenile enako v 564 od 600 primerov. V 36 primerih so se ocene med ocenjevalkami tako razlikovale, da je bil potreben konsenz. Rezultate reakcij smo ocenjevale tudi kvantitativno. Končni rezultat je povprečje deleža pozitivnih celic štirih ocenjevalk in je prikazan v preglednici XXII. Končni rezultati barvanj ICK po posameznih parametrih za testne vzorce, njihove negativne in pozitivne kontrole so v prilogah 1 – 7.

4.2.1 ODSOTOK IMUNOCITOKEMIČNO OBARVANIH CELIC

Semikvantitativni in kvantitativni rezultati reakcije (odstotek obarvanih celic) posameznih imunocitokemičnih barvanj na citokeratin AE1/AE3, kalretinin, MOC-31, LCA, ER in melanovski koktejl so prikazani v predelnici XXIII. Rezultati semikvantitativnega ocenjevanja so prikazani z ocenami od 0 do 3, rezultati kvantitativnega ocenjevanja pa v odstotku celic s pozitivno reakcijo.

Preglednica XXIII: Rezultati reakcij ICK (v odstotkih) na citokeratin CK AE1/AE3, kalretinin, MOC-31, LCA, ER in melanomski koktejl.

Antigen	št.vzorca	1. dan	2. dan	4. dan	5. dan	8.dan
		N ₁ (N ₂)	N ₁ (N ₂)	N ₁ (N ₂)	N ₁ (N ₂)	N ₁ (N ₂)
CK AE1/AE3	P 1/17	2 (18)	2 (18)	2 (18)	2 (21)	2 (20)
	O 2/17	1 (10)	1 (14)	1 (10)	1(14)	1 (14)
	O 3/17	1(16)	1 (15)	1 (14)	1 (10)	1 (9)
	P 4/17	3(100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)
	P 5/17	1(1)	1 (1)	1(1)	1(1)	1(1)
	P 6/17	3 (96)	3 (96)	3 (95)	3 (95)	3 (95)
	P 7/17	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)
	O 8/17	3 (76)	3 (76)	3 (76)	3 (76)	3 (76)
	O 9/17	2 (26)	2 (26)	2 (29)	2 (34)	2 (34)
	P 10/17	3 (100)	3 (98)	3 (99)	3 (99)	3 (99)
mediana		2,5 (51)	2,5 (51)	2,5 (53)	2,5 (55)	2,5 (55)
razpon		1-3 (1-100)	1-3 (1-100)	1-3 (1-100)	1-3 (1-100)	1-3 (1-100)
KALRETININ	O 11/17	1(10)	1(10)	1(6)	1(3)	1(1)
	O 12/17	1(6)	1(6)	1(5)	0(0)	0(0)
	O 13/17	1(6)	1(5)	1(3)	0(0)	0(0)
	O 14/17	1(14)	1(14)	1(10)	1(7)	1(3)
	O 15/17	1(4)	1(2)	1(1)	1(1)	1(1)
	O 16/17	1(10)	1(10)	1(10)	1(5)	1(5)
	O 17/17	2(20)	2(20)	2(20)	2(20)	1(2)
	O 18/17	2(40)	2(40)	2(40)	2(40)	2(40)
	O 19/17	1(10)	1(10)	1(10)	1(10)	1(5)
	O 20/17	2(15)	2(15)	1(5)	1(5)	1(1)
mediana		1 (11)	1 (11)	1 (8)	1 (5)	1 (2)
razpon		1-2 (4-40)	1-2 (2-40)	1-2 (1-40)	0-2 (0-40)	0-2 (0-40)
MOC-31	P 4/17	3(100)	3(100)	3(100)	3(100)	3(100)
	O 8/17	3(66)	3(69)	3(69)	3(69)	3(55)
	O 18/17	1(4)	1(4)	1(4)	1(4)	1(4)
	O 2/17	1(14)	2(15)	2(15)	2(16)	1(14)
	P 1/17	2(16)	2(16)	2(16)	2(16)	1(13)
	P 21/17	2(35)	2(35)	2(35)	2(35)	2(35)
	P 22/17	3(71)	3(71)	3(71)	3(71)	3(71)
	P 23/17	3(88)	388	3(88)	3(88)	3(80)
	P 24/17	3(99)	3(99)	3(99)	3(99)	3(99)
O 9/17	2(38)	2(30)	2(35)	2(35)	2(35)	
mediana		2,5 (52)	2,5 (52)	2,5 (52)	2,5 (52)	2,5 (45)
razpon		1-3 (4-100)	1-3 (4-100)	1-3 (4-100)	1-3 (4-100)	1-3 (4-100)
LCA	št.vzorca	1. dan	2. dan	4. dan	5. dan	8.dan
	O 25/17	3(100)	3(100)	3(100)	3(100)	3(100)
	O 26/17	3(100)	3(95)	3(100)	3(100)	3(100)
	O 19/17	3(90)	3(90)	3(90)	3(94,5)	3(94,5)
Bx 27/17	3(100)	3(100)	3(100)	3(100)	3(100)	

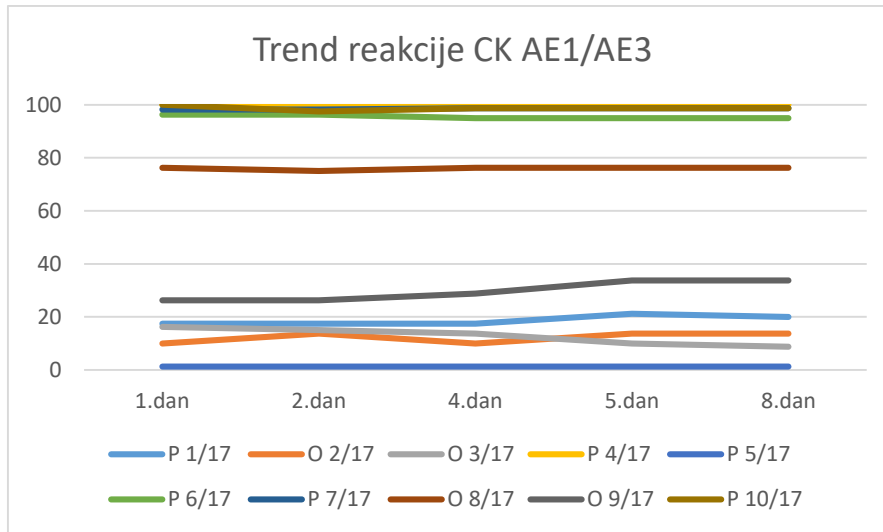
	Bx 28/17	3(100)	3(100)	3(100)	3(100)	3(100)
	Bx 29/17	3(100)	3(100)	3(100)	3(100)	3(100)
	Bx 30/17	3(100)	3(100)	3(100)	3(100)	3(100)
	Bx 31/17	2(50)	2(50)	3(60)	3(80)	3(80)
	Bx 32/17	3(100)	3(100)	3(100)	3(100)	3(100)
	Bx 33/17	3(100)	3(100)	3(100)	3(100)	3(100)
mediana		3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)
razpon		2-3 (55-100)	2-3 (55-100)	3-3 (60-100)	3-3 (69-100)	3-3 (73-100)
Antigen	št.vzorca	1. dan	2. dan	4. dan	5. dan	8.dan
		N ₁ (N ₂)	N ₁ (N ₂)	N ₁ (N ₂)	N ₁ (N ₂)	N ₁ (N ₂)
ESTROGENSKI RECEPTOR	P 34/17	3(100)	3(99)	3(94)	3(94)	3(94)
	P 35/17	3(99)	3(95)	3(86)	3(86)	3(86)
	P 36/17	2(36)	2(46)	2(40)	2(40)	2(36)
	P 37/17	3(80)	3(80)	3(90)	3(90)	3(90)
	P 38/17	3(100)	3(90)	3(95)	3(95)	3(95)
	P 39/17	3(100)	3(90)	2(73)	3(70)	2(49)
	P 40/17	3(99)	3(99)	3(100)	3(94)	3(94)
	P 41/17	3(97)	3(93)	3(89)	3(86)	3(84)
	P 42/17	3(93)	3(93)	3(91)	3(91)	3(84)
	P 43/17	3(100)	3(100)	3(100)	3(100)	3(99)
mediana		3 (99)	3 (94)	3 (91)	3 (91)	3 (88)
razpon		2-3 (37-100)	2-3 (47-100)	2-3 (40-100)	2-3 (40-100)	2-3 (37-99)
MELANOMSKI KOKTEJL	P 44/17	3(100)	3(100)	3(100)	3(100)	3(100)
	P 45/17	3(100)	3(100)	3(100)	3(100)	3(100)
	P 46/17	3(80)	3(78)	3(76)	3(75)	3(75)
	P 47/17	3(96)	3(96)	3(96)	3(96)	3(96)
	P 48/17	3(100)	3(100)	3(100)	3(100)	3(95)
	P 49/17	3(100)	3(100)	3(100)	3(100)	3(100)
	P 50/17	3(80)	3(80)	3(80)	3(80)	3(80)
	P 51/17	3(100)	3(100)	3(100)	3(100)	3(100)
	P 52/17	3(100)	3(100)	3(100)	3(100)	3(100)
	P 53/17	3(100)	3(100)	3(100)	3(100)	3(100)
mediana		3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)
razpon		3-3 (80-100)	3-3 (78-100)	3-3 (77-100)	3-3 (75-100)	3-3 (75-100)

N₁ = reakcija (0=ni pozitivnih celic, 1=posamezne pozitivne celice vendar ne več kot 15%; 2= 15 do 50% pozitivnih celic, 3= več kot 50 % pozitivnih celic),

N₂ = povprečna ocena (v odstotkih) vseh štirih ocenjevalk

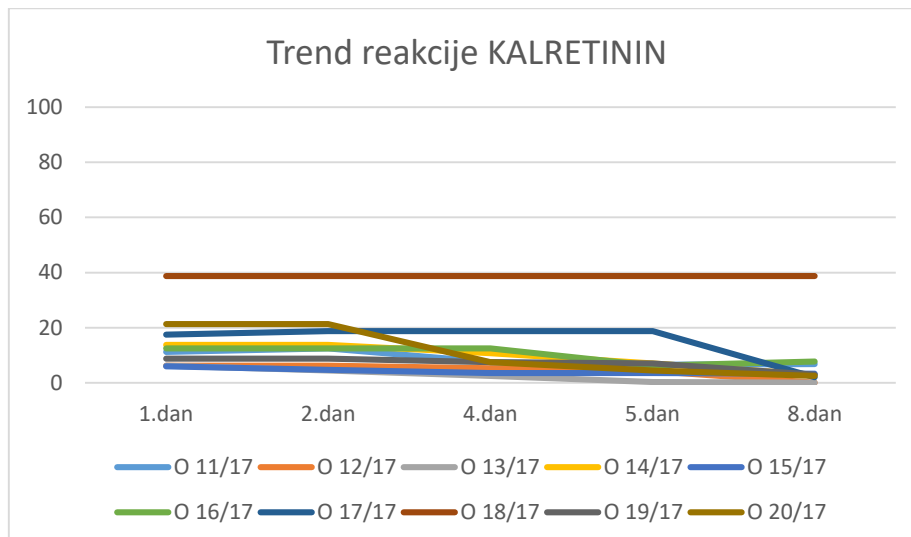
Za antigen **CK AE1/AE3** smo ugotovili šibko pozitiven trend (povprečni naklon $k = + 0,29$), kar pomeni, da se je od prvega do osmega dne odstotek obarvanih celic rahlo povečeval, vendar trend ni bil statistično značilen (graf 1). V osmih primerih se delež pozitivnih celic s časom ni spreminjal, v dveh primerih (P 1/17, P 2/17) se je delež pozitivnih celic po 4.dnevu zvišal za 3% oziroma 5%.

Graf 1: Odstotek obarvanih celic za CK AE1/AE3 za posamezne vzorce po dnevih

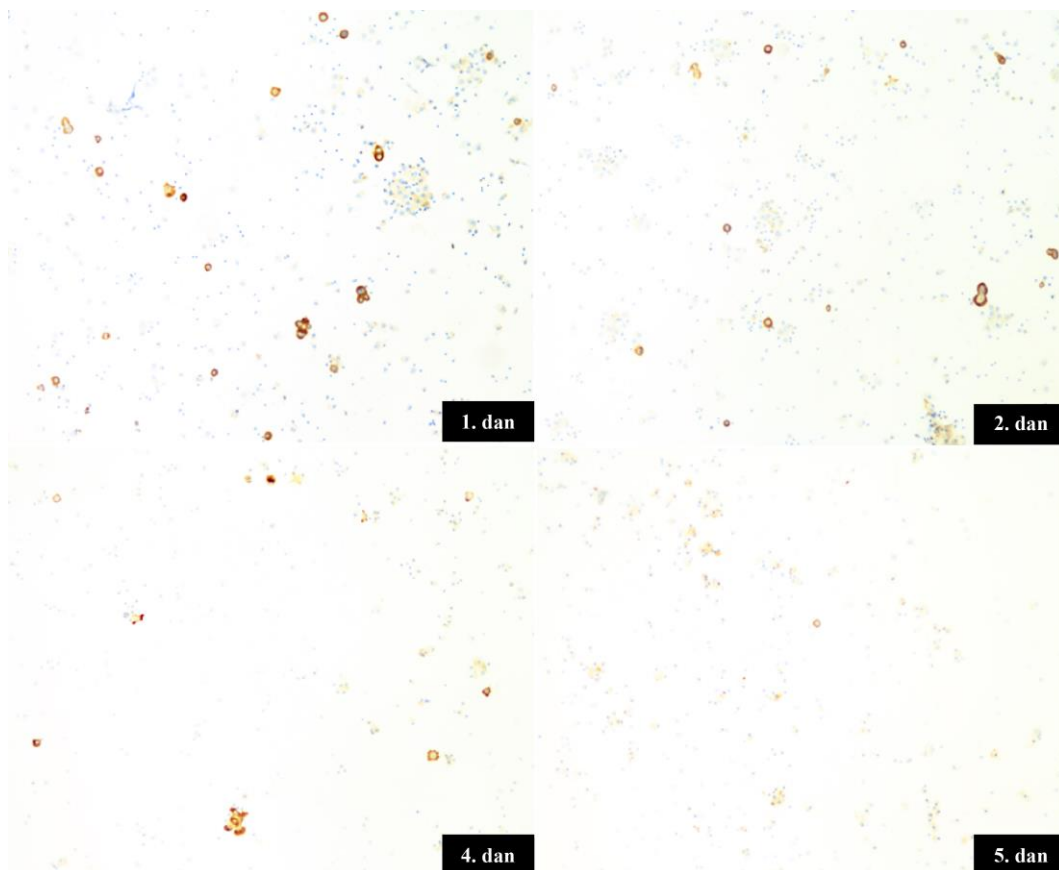


Trend reakcije obarvanih celic za **kalretinin** je bil negativen, s povprečnim naklonom $k = -1,77$. Trend reakcije za kalretinin je bil statistično značilen ($p < 0,05$). Odstotek reakcije je padel pri devetih vzorcih. V vzorcu, ki je imel prvi dan 40% obarvanih celic, se odstotek reakcije ni spreminjal s časom (graf 2). V enem primeru se je po 2. dnevu zmanjšal od 4 do 2%. Peti in osmi dan sta imela dva vzorca negativno reakcijo.

Graf 2: Odstotek obarvanih celic za kalretinin za posamezne vzorce po dnevih



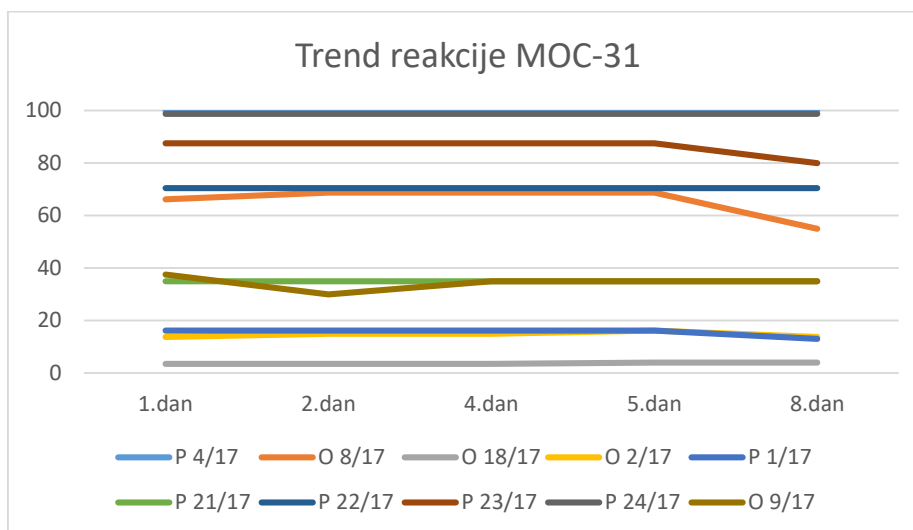
Na sliki 3 so prikazane mikroskopske slike barvanja ICK kalretinina v vzorcu plevralnega izliva (O 11/17) pod 10-kratno povečavo. Prvi in drugi dan je bilo v vzorcu 10% obarvanih celic, četrty dan 6 %, peti dan 3 %. Osmi dan reakcije na kalretinin ni bilo. V ozadju lahko vidimo nespecifično reakcijo, ki je je iz dneva v dan več.



Slika 3: Mikroskopske slike prikaza ICK kalretinina (vzorec O 11), 10-kratna povečava

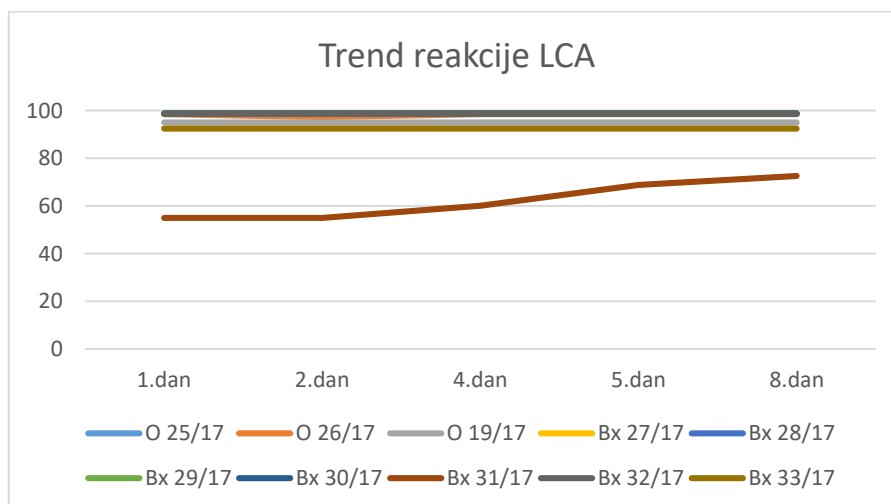
Trend reakcije za **MOC-31** je bil rahlo negativen s povprečnim naklonom $k = - 0,46$, kar pomeni da se je čez čas delež obarvanih celic v povprečju rahlo znižal. Trend reakcije za MOC-31 ni bil statistično značilen. V dveh primerih (vzorca O 8/17 in P 24/17) se je reakcija obarvanih celic od prvega do osmega dne močnejše znižala, iz 66% na 55%, ter iz 17,5% prvega dne na 13,75 % osmega dne. Pri ostalih osmih vzorcih se odstotek obarvanih celic ni bistveno spremenil (graf 3). V vseh primerih smo tudi 8. dan v vzorcih našli dovolj MOC-31 pozitivnih celic za postavitev diagnoze.

Graf 3: Odstotek obarvanih celic za MOC-31 za posamezne vzorce po dnevih



V osmih od desetih primerov je bila reakcija na **LCA** prvi dan od 90 do 100-odstotna in se s časoma ni spreminjala. Le v enem primeru se je delež reakcije od prvega do osmega dne bistveno povečal iz 50% na 80% (graf 4). Trend reakcije za LCA je bil pozitiven s povprečnim naklonom $k = 0,513$ in ni bil statistično značilen.

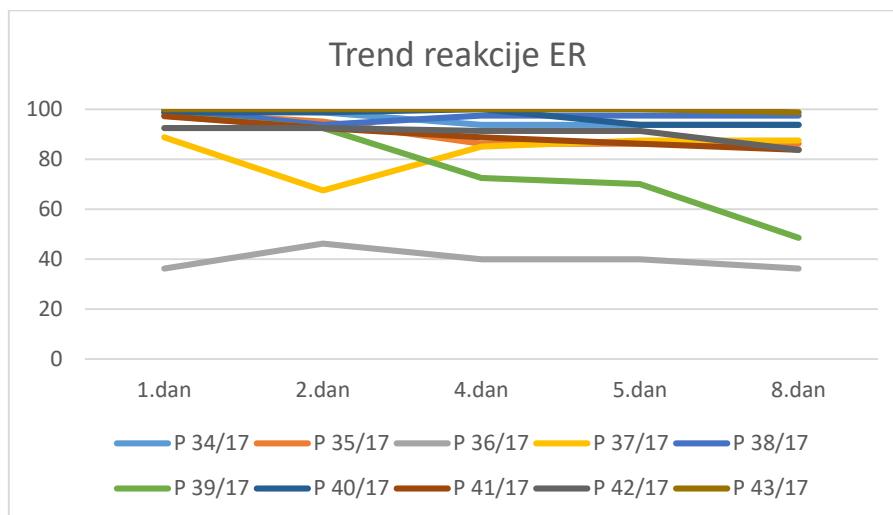
Graf 4: Odstotek obarvanih celic za LCA za posamezne vzorce po dnevih



Odstotki pozitivnih reakcij na **ER** se od 1. do 8. dne niso bistveno zmanjšali (graf 6). Od prvega do petega dne je imelo devet od desetih vzorcev več kot 50% celic pozitivno reakcijo in en vzorec reakcijo pod 50%. Osmi dan je imelo osem vzorcev imelo nad 50 % obarvanih celic, dva vzorca sta imela pod 50% obarvanih celic. Samo v enem primeru (vzorec P 39/17)

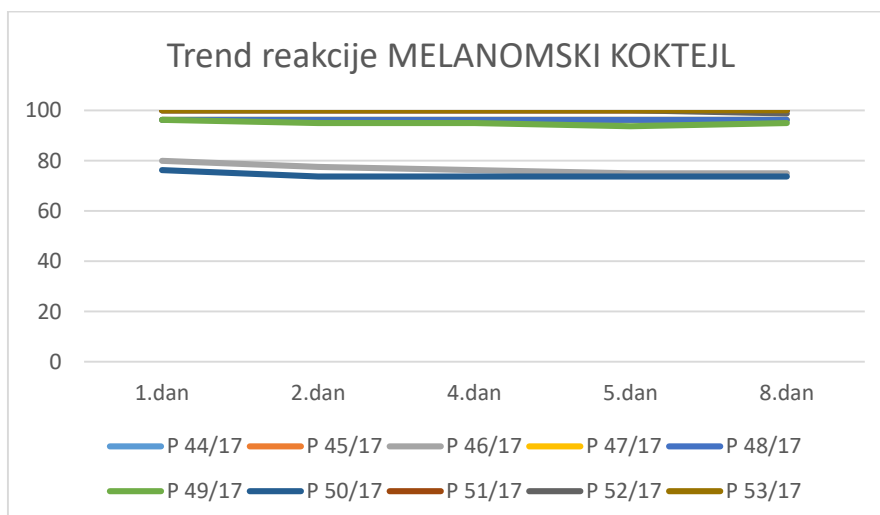
se je reakcija pozitivnih celic močnejše znižala, iz 98% obarvanih celic prvega dne na 49% osmega dne. Trend ni bil statistično značilen.

Graf 5: Odstotek obarvanih celic za ER za posamezne vzorce po dnevih



Reakcije **melanomskega koktejla** so bile v sedmih od desetih primerov 100- odstotne in se niso spreminjale s časom. Dva vzorca sta imela skozi vse časovne intervale reakcijo 70- oziroma 80 –odstotno. En vzorec je imel prvi in drugi dan 90- odstotno reakcijo, ki se je naslednji dan znižala na 80% (graf 6). Trend ni bil statistično značilen.

Graf 6: Odstotek obarvanih celic za melanomski koktejl za posamezne vzorce po dnevih



4.2.2 INTENZITETA BARVANJA ICK

Rezultati intenzitete reakcij ICK na citokeratin AE1/AE3, kalretinin, MOC-31, LCA, ER in melanomski koktejl so prikazani v preglednici XXIV. V preglednici XXV je prikazana primerjava ocen intenzitete reakcij ICK med posameznimi dnevi.

Preglednica XXIV: Rezultati intenzitete barvanja ICK za citokratin AE1/AE3, kalretinin, MOC-31, LCA, ER in melanomski koktejl

antigen	št.vzorca	Testni vzorec 1. dan	Testni vzorec 2. dan	Testni vzorec 4. dan	Testni vzorec 5. dan	Testni vzorec 8. dan
CK AE1/AE3	P 1/17	3	2	3	3	3
	O 2/17	2	2,5	3	3	3
	O 3/17	3	3	3	2,5	3
	P 4/17	2	2,5	3	3	2,5
	P 5/17	2	1,5	2	2	2
	P 6/17	3	3	3	3	3
	P 7/17	3	2,5	3	3	3
	O 8/17	2	2	2,5	3	3
	O 9/17	3	3	3	3	3
	P 10/17	3	3	3	3	3
mediana		3,0	2,5	3,0	3,0	3,0
razpon		(2 – 3)	(1,5-3)	(2-3)	(2-3)	(2-3)
KALRETININ	O 11/17	3	2,5	2	2	2
	O 12/17	1	2	1,5	0	0
	O 13/17	2,5	1	1	0	0
	O 14/17	2,5	2	2	2	2
	O 15/17	2	1	1	1,5	1
	O 16/17	2	2	2	2	2
	O 17/17	1,5	2	2	2	2
	O 18/17	2	2	2,5	2,5	2,5
	O 19/17	2	2	2	2	2
	O 20/17	1,5	1,5	1,5	1,5	0
mediana		2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
razpon		(1-3)	(1-2,5)	(1-2,5)	(0-2,5)	(0-2,5)
MOC-31	P 4/17	1,5	2	2	2	2
	O 8/17	1,5	2	2	2	1,5
	O 18/17	2,5	2	2	1,5	2
	O 2/17	2	2	3	3	2
	P 1/17	3	2	3	2,5	2
	P 21/17	3	3	3	3	3
	P 22/17	3	2	2	2	2,5
	P 23/17	2	2,5	3	3	3
	P 24/17	2	2	2	2	2,5
	O 9/17	2,5	2,5	3	3	3
mediana		2,25	2,0	2,5	2,25	2,25
razpon		(1,5-3)	(2- 3)	(2- 3)	(1,5- 3)	(1,5- 3)

antigen	št.vzorca	Testni vzorec 1. dan	Testni vzorec 2. dan	Testni vzorec 4. dan	Testni vzorec 5. dan	Testni vzorec 8. dan
LCA	O 25/17	2	3	3	3	3
	O 26/17	2	2	2,5	2	1,5
	O 19/17	2	2,5	2,5	2	2
	Bx 27/17	1,5	2	2	2,5	1,5
	Bx 28/17	2	2,5	3	2	2
	Bx 29/17	2	2,5	3	3	3
	Bx 30/17	2	3	2,5	3	3
	Bx 31/17	2	2	3	3	3
	Bx 32/17	2,5	2	2,5	3	3
	Bx 33/17	2	2,5	2,5	3	2
mediana		2,0	2,5	2,5	3,0	2,50
razpon		(1,5- 2)	(2- 3)	(2- 3)	(2- 3)	(1- 3)
ER	P 34/17	3	3	2,5	2,5	3
	P 35/17	2	3	3	3	3
	P 36/17	1	2	1,5	1,5	1,5
	P 37/17	2	2,5	2	3	2,5
	P 38/17	3	2,5	2,5	3	2,5
	P 39/17	2	3	3	3	3
	P 40/17	2	2	3	2	3
	P 41/17	3	3	3	3	3
	P 42/17	2,5	3	3	3	2,5
	P 43/17	2	3	3	3	3
mediana		2,0	3,0	3,0	3,0	3,0
razpon		(1 - 3)	(2 - 3)	(1,5- 3)	(1,5- 3)	(1,5- 3)
MELANOMSKI KOKTEJL	P 44/17	3	3	3	3	3
	P 45/17	3	3	3	3	3
	P 46/17	2	2	2	2	2
	P 47/17	3	3	3	3	3
	P 48/17	3	3	3	3	3
	P 49/17	3	3	2	2	2
	P 50/17	3	3	3	2,5	3
	P 51/17	3	3	3	3	3
	P 52/17	2	2	3	3	3
	P 53/17	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
mediana		3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
razpon		(2- 3)	(2- 3)	(2- 3)	(2- 3)	(2- 3)

Legenda: 3- močna intenziteta reakcije, 2 - zmerna intenziteta, 1- šibka intenziteta, 0- ni reakcije

Preglednica XXV: Statistično značilne razlike med posameznimi pari dnevov pri intenziteti

intenziteta	1.in 2.dan	1.in 4.dan	1. in 5.dan	1. in 8. dan	2. in 4.dan	2. in 5.dan	2. in 8.dan	4. in 5.dan	4. in 8. dan	5. in 8.dan
CK AE1/AE3	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
kalretinin	NS	NS	NS	p<0,005	NS	NS	NS	NS	NS	NS
MOC-31	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
LCA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ER	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
melanomski koktejl	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS – ni statistično značilne razlike

Statistično značilno razliko v intenziteti barvanja ICK med posameznimi dnevi smo našli za vzorce, barvane na kalretinin ($p = 0,02$). Razlika je bila značilna le med prvim in osmim dnem ($p < 0,005$). Med pari posameznih dni pri vseh drugih antigenskih označevalcih ni bilo statistično značilne razlike v intenziteti barvanja ICK (preglednica XXIV).

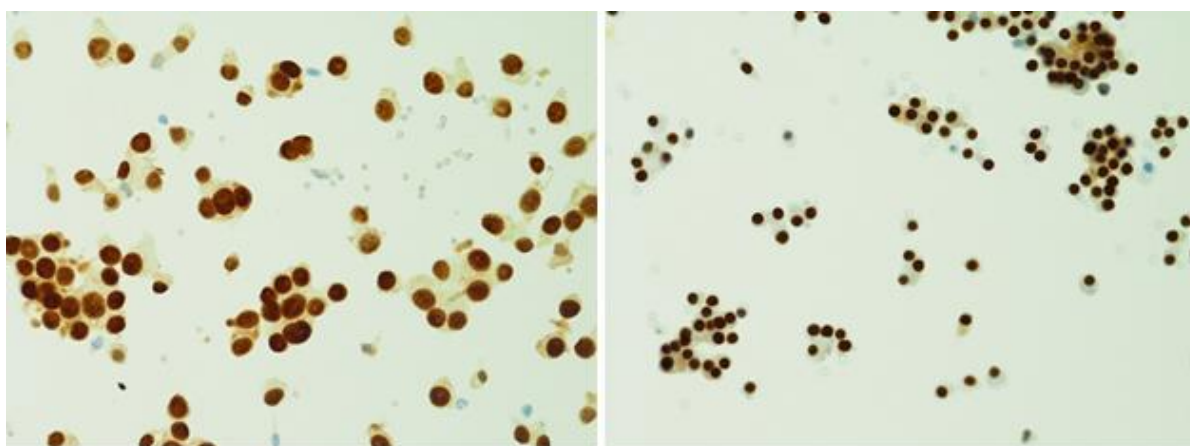
Pri vzorcih CK AE1/AE3 med časovnimi točkami nismo ugotovili značilne razlike med testiranimi dnevi v vrednostih intenzitete ($p = 0,61$). Mediana intenzitet prvega, četrtega, petega in osmega dne je enaka 3 (močna intenziteta) z razponom 3-2, le drugi dan je bila mediana 2,5 (zmerna do močna intenziteta) z razponom 1,5-3. Intenziteta barvanja citokeratina AE1/AE3 se s časom ni bistveno poslabšala.

V intenziteti barvanja kalretinina smo dokazali statistično značilno razliko med 1. in 8. dnem ($p < 0,005$). Mediana intenzitet je bila vse dni enaka 2 z razponom 1-3 prvi dan, 1-2,5 drugi in četrti dan ter 0-2,5 peti in osmi dan. V šestih od desetih primerov se je intenziteta skozi čas znižala. V štirih primerih od desetih so se intenzitete iz prvega na drugi dan znižale za vsaj eno oceno, v enem primeru od desetih se je intenziteta drugega dne povečala za pol točke, v štirih primerih od desetih se intenziteta drugega dne ni spremenila. Četrtega dne se je v dveh primerih od desetih intenziteta znižala, v enem primeru se je povečala za pol točke, pri ostalih primerih se ni spremenila glede na drugi dan. Pri dveh vzorcih (O 12/17 in O 13/17) petega dne ni bilo reakcije, zato smo intenziteti ocenili z 0. Osmi dan ni bilo pozitivne reakcije v treh vzorcih.

Statistično značilnih razlik med testiranimi dnevi intenzitet epitelu sorodnega antigena MOC-31 nismo dokazali ($p > 0,05$). Mediana intenzitet MOC-31 se je od prvega do osmega dne gibala okoli vrednosti 2 (zmerna intenziteta) z razponom 1,5-3 prvi, drugi in osmi dan, ter 2-3 drugi in četrti dan.

Statistično značilne razlike med dnevi v vrednostih intenzitete za antigen LCA nismo dokazali. Vzorci barvanja na LCA kažejo od prvega do osmega dne zmerno do močno intenziteto. Mediana intenzitet je bila najvišja petega dne (3 - močna intenziteta) z razponom 2-3, najnižja pa prvega dne (2 - zmerna intenziteta) z razponom 1,5-2.

Statistične značilne razlike pri intenziteti barvanja estrogenskega receptorja nismo dokazali. Intenziteta ER se je čez čas rahlo povečevala. Mediana intenzitete ER prvega dne je bila 2 (zmerna intenziteta) z razponom 1-3, nadaljne dni pa 3 (močna intenziteta), drugi dan z razponom 2-3 oziroma 1,5-3 četrti, peti in osmi dan. Slika 4 prikazuje intenziteto ER v vzorcu P 43/17 na citospinu, pripravljenega prvega dne odvzema vzorca (intenziteta ocenjena z oceno 2) in citospinu, pripravljenega osmega dne po odvzemu vzorca (intenziteta ocenjena z oceno 3).



Slika 4: Reakcija na ER, 40-kratna povečava (levo:1. dan, desno:8. dan)

Statistično značilne razlike v intenziteti barvanja ICK melanomskega koktejla nismo dokazali. Mediana intenzitet je bila vse dni enaka 3 z razponom 2-3.

4.2.3 OZADJE

Preglednica XXVI prikazuje ocenjevanje prisotnosti nespecifičnega ozadja. Posebej smo obravnavali rezultate ozadja negativnih kontrol ter rezultate ozadja vzorcev, na katere smo titrirali primarna protitelesa.

Preglednica XXVI: Rezultati ozadja posameznih antigenov

antigen	št.vzorca	Testni vzorec 1. dan	NK	Testni vzorec 2. dan	NK	Testni vzorec 4. dan	NK	Testni vzorec 5. dan	NK	Testni vzorec 8.dan	NK
CK AE1/AE3	P 1/17	1	2	1	1	1	1	1	1	0	1
	O 2/17	2	1	1	2	0	2	0	2	0	2
	O 3/17	1		1		1	1	1	1	1	1
	P 4/17	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	P 5/17	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	P 6/17	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2
	P 7/17	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	O 8/17	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1
	O 9/17	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1
	P 10/17	2	1	2	1	2	1	1	1	2	1
mediana		1,5	2,0	1,5	2,0	1,5	2,0	1,0	2,0	1,0	1,5
razpon		(1-2)	(1-2)	(1-2)	(1-2)	(0-2)	(1-2)	(0-2)	(1-2)	(0-2)	(1-2)
KALRETININ	O 11/17	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1
	O 12/17	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
	O 13/17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	O 14/17	2	2	1	2	1	2	1	2	1	2
	O 15/17	1	2	1	2	1	2	1	2	0	2
	O 16/17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	O 17/17	2	1	1	2	1	2	1	2	1	2
	O 18/17	2	2	2	2	1	2	2	1	1	1
	O 19/17	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
	O 20/17	2	1	0	1	0	1	0	1	0	1
mediana		1,0	1,0	1,0	1,5	1,0	1,5	1,0	1,0	1,0	1,0
razpon		(1-2)	(1-2)	(1-2)	(1-2)	(0-2)	(1-2)	(0-2)	(1-2)	(0-2)	(1-2)
MOC-31	P 4/17	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	O 8/17	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1
	O 18/17	1	2	1	2	1	2	0	1	1	1
	O 2/17	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2
	P 1/17	1	2	1	1	0	1	1	1	0	1
	P 21/17	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1
	P 22/17	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	P 23/17	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2
	P 24/17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	O 9/17	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1
mediana		1,0	2,0	1,5	2	1,5	2,0	1,5	1,5	1,0	1,0
razpon		(1-2)	(1-2)	(1-2)	(1-2)	(0-2)	(0-2)	(0-2)	(1-2)	(0-2)	(1-2)

antigen	št.vzorca	Testni vzorec 1. dan	NK	Testni vzorec 2. dan	NK	Testni vzorec 4. dan	NK	Testni vzorec 5. dan	NK	Testni vzorec 8.dan	NK
LCA	O 25/17	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2
	O 26/17	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1
	O 19/17	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1
	Bx 27/17	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Bx 28/17	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2
	Bx 29/17	2		2	2	2	2	2	2	2	2
	Bx 30/17	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Bx 31/17	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Bx 32/17	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Bx 33/17	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
mediana		2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
razpon		(2)	(1-2)	(2)	(1-2)	(2)	(1-2)	(2)	(1-2)	(1-2)	(1-2)
ESTROGENSKI RECEPTOR	P 34/17	1		1	2	2	2	2	2	1	2
	P 35/17	1		1	2	1	2	1	2	1	2
	P 36/17	2	2	1	2	2	1	1	2	1	2
	P 37/17	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2
	P 38/17	1		2	2	1	2	1	2	1	2
	P 39/17	1		1	2	1	2	1	2	1	2
	P 40/17	1		1	2	0	2	1	2	0	2
	P 41/17	1		1	2	1	2	1	2	1	2
	P 42/17	2		1	2	0	2	1	2	1	1
	P 43/17	1		1	2	1	2	1	2	2	2
mediana		1,0	2,0	1,0	2,0	1,0	2,0	1,0	2,0	1,0	2,0
razpon		(1-2)	(2)	(1-2)	(2)	(0-2)	(1-2)	(1-2)	(2)	(0-2)	(0-2)
MELANOMSKI KOKTEJL	P 44/17	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2
	P 45/17	2		2	2	2	2	2	2	2	2
	P 46/17	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2
	P 47/17	2	2	2	0	2	2	2	2	2	2
	P 48/17	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1
	P 49/17	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	P 50/17	2		2	1	2	2	2	2	1	1
	P 51/17	1	1	2	1	2	1	2	1	2	
	P 52/17	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	P 53/17	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
mediana		2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
razpon		(1-2)	(1-2)	(2)	(0-2)	(2)	(1-2)	(2-2)	(1-2)	(1-2)	(1-2)

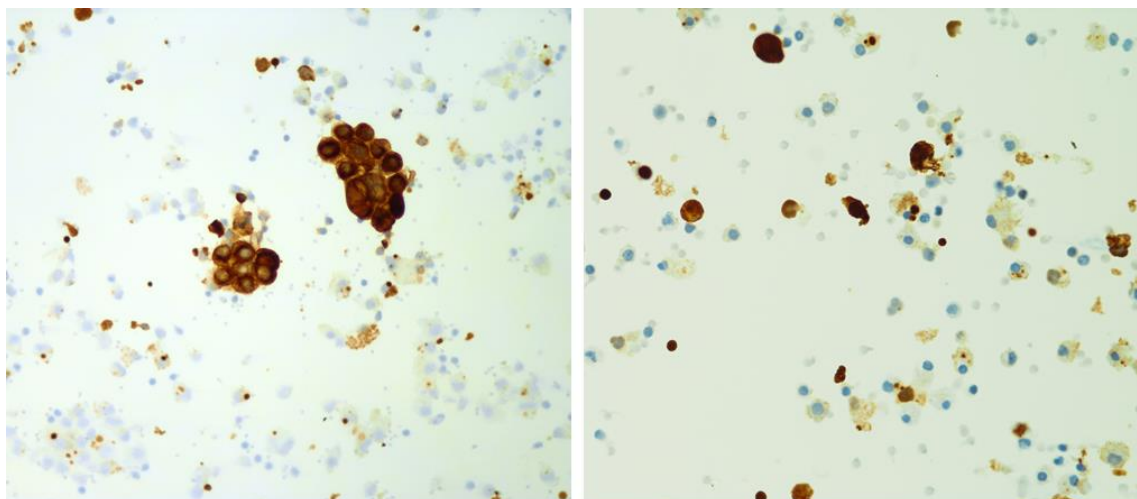
Preglednica XXVII: Statistično značilne razlike med posameznimi pari dnevov pri ocenjevanju ozadja

Ozadje	1.in 2.dan	1.in 4.dan	1. in 5.dan	1. in 8.dan	2. in 4.dan	2. in 5. dan	2. in 8. dan	4. in 5.dan	4. in 8. dan	5. in 8.dan
CK AE1/AE3	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
kalretinin	NS	NS	NS	p<0,005	NS	NS	NS	NS	NS	NS
MOC-31	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
LCA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ER	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
melanomski koktejl	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS- ni značilnih razlik

Statistično značilno razliko v ozadju med posameznimi dnevi smo pokazali le v testnih vzorcih, barvanih na kalretinin ($p < 0,05$) in sicer samo med 1. in 8. dnem ($p < 0,005$). Kljub temu, da smo opazili, da se intenziteta ozadja v vzorcih praviloma povečuje s časom, statistično značilnih razlik pri drugih označevalcih nismo dokazali. Prav tako nismo dokazali statistično značilne razlike v ozadju med posameznimi dnevi pri negativnih kontrolah vseh testiranih vzorcev.

Slika 6 prikazuje nespecifično ozadje pri barvanju vzorca P 4/17 na CK AE1/AE3 prvi in osmi dan testiranja.



Slika 5: Nespecifično ozadje pri barvanju CK AE1/AE3 pod 40-kratno povečavo (levo: 1. dan, desno: 8. dan)

4.2.4 MORFOLOGIJA

V preglednici XXVIII so prikazani rezultati morfologije testiranih antigenov (CK AE1/AE3, kalretinin, MOC-31, LCA, ER in melanomski koktejl) in NK med testiranimi dnevi.

Preglednica XXVIII: Rezultati morfologije v testnih vzorcih za citokeratin AE1/AE3, kalretinin, MOC-31, LCA, ER in melanomski koktejl in v negativnih kontrolah

antigen	št.vzorca	Testni vzorec 1. dan	NK	Testni vzorec 2. dan	NK	Testni vzorec 4. dan	NK	Testni vzorec 5. dan	NK	Testni vzorec 8.dan	NK
CK AE1/AE3	P 1/17	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	O 2/17	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	O 3/17	1		1		0	0	0	0	0	0
	P 4/17	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0
	P 5/17	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
	P 6/17	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	P 7/17	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O 8/17	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1
	O 9/17	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	P 10/17	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
KALRETININ	O 11/17	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	O 12/17	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	O 13/17	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O 14/17	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
	O 15/17	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	O 16/17	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	O 17/17	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O 18/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O 19/17	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O 20/17	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MOC-31	P 4/17	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	O 8/17	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
	O 18/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O 2/17	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
	P 1/17	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	P 21/17	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	P 22/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	P 23/17	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	P 24/17	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
	O 9/17	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
LCA	O 25/17	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0
	O 26/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O 19/17	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
	Bx 27/17	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
	Bx 28/17	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Bx 29/17	1		1	0	1	0	0	0	0	0
	Bx 30/17	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
	Bx 31/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Bx 32/17	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0

	Bx 33/17	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
antigen	št.vzorca	Testni vzorec 1. dan	NK	Testni vzorec 2. dan	NK	Testni vzorec 4. dan	NK	Testni vzorec 5. dan	NK	Testni vzorec 8.dan	NK
ESTROGENSKI RECEPTOR	P 34/17	1		1	1	0	0	0	0	0	0
	P 35/17	1		1	1	1	0	0	0	0	0
	P 36/17	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
	P 37/17	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
	P 38/17	1		1	0	0	0	0	0	0	0
	P 39/17	1		1	1	1	1	0	0	0	0
	P 40/17	1		1	1	1	1	0	0	0	0
	P 41/17	1		1	1	0	0	0	0	0	0
	P 42/17	1		1	1	0	0	0	0	0	0
	P 43/17	1		1	1	1	0	1	0	0	0
MELANOMSKI KOKTEJL	P 44/17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	P 45/17	1		1	1	1	1	1	0	1	0
	P 46/17	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	P 47/17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	P 48/17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	P 49/17	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
	P 50/17	1		1	1	1	1	1	1	0	0
	P 51/17	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
	P 52/17	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
	P 53/17	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0

Legenda: NK – negativna kontrola, 1 = ohranjena morfologija, 0= spremenjena morfologija

Preglednica XXIX: Statistično značilne razlike med posameznimi pari dnevov pri ocenjevanju morfologije na negativnih kontrolah

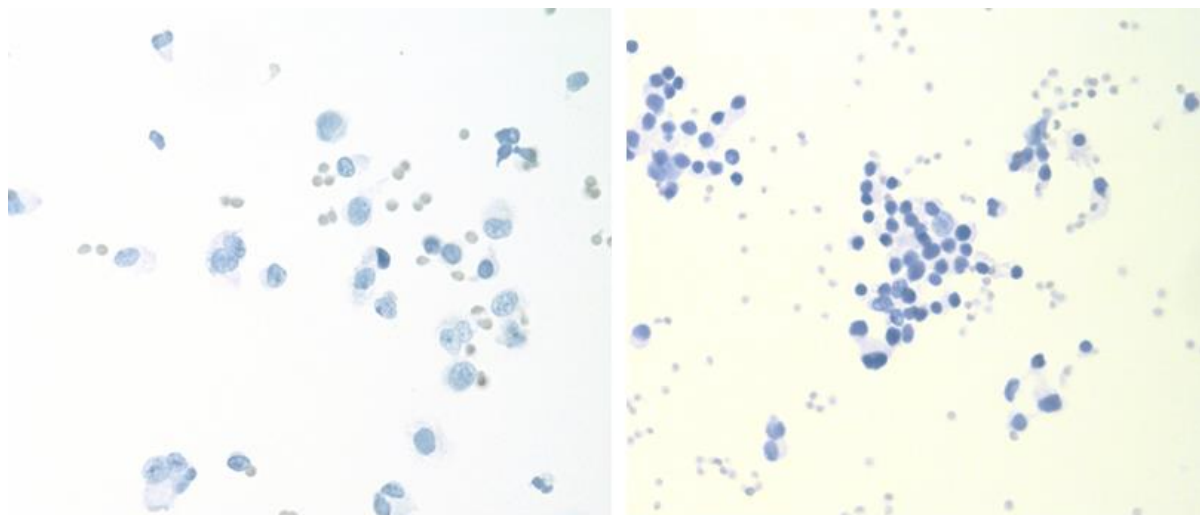
morfologija (NK)	1.in 2.dan	1.in 4.dan	1. in 5.dan	1. in 8. dan	2. in 4.dan	2. in 5. dan	2. in 8. dan	4. in 5.dan	4. in 8. dan	5. in 8.dan
CK AE1/AE3	NS	NS	p<0,005	p<0,005	NS	p<0,005	NS	NS	NS	NS
kalretinin	NS	NS	NS	p<0,005	NS	NS	NS	NS	NS	NS
MOC-31	NS	NS	p<0,005	p<0,005	NS	p<0,005	p<0,005	NS	NS	NS
LCA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ER	NS	NS	NS	NS	NS	p<0,005	p<0,005	NS	NS	NS
melanomski koktejl	NS	NS	NS	p<0,005	NS	NS	p<0,005		p<0,005	NS

NK – negativna kontrola NS – ni statistično značilne razlike

Statistično značilne razlike v morfologiji med vsaj enim parom posameznih dni smo dokazali za vzorce negativnih kontrol vseh testnih vzorcev razen za LCA, kar pomeni, da se je morfologija spreminjala s časom pri vseh antigenskih označevalcih, razen pri LCA, kjer je imelo že prvi dan osem od desetih vzorcev spremenjeno morfologijo, četrtega dne pa že vsi. Statistično značilna razlika v morfologiji pri CK AE1/AE3, ER in MOC-31 se je, glede na

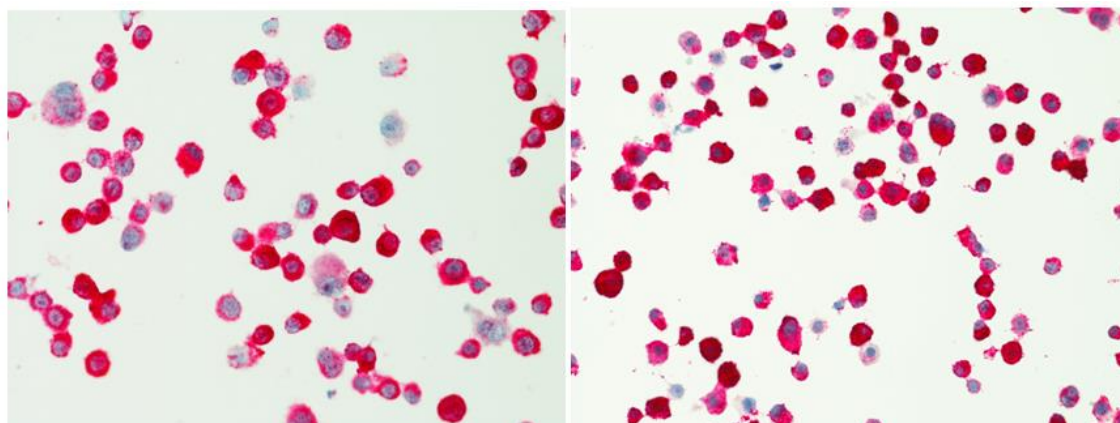
prvi dan (odvzem vzorca), pojavila 5. dan po odvzemu vzorca, pri kalretininu in melanomskem koktejlju šele 8.dan po odvzemu vzorca (preglednica XXIX). Statistično značilne razlike v morfologiji vzorcev za ER opazimo med 2. in 5. dnem po odvzemu vzorca.

Na sliki 6 je prikazana negativna kontrola za barvanje MOC-31 (vzorec P 4/17), pripravljena na dan odvzema vzorca (levo) in peti dan po odvzemu vzorca (desno). Na levi sliki lahko opazimo kromatin v jedru in nukleole. Na desni sliki opazimo degenerativne spremembe celice. Kromatin v jedru se je zgostil in se pomaknil na periferijo jedra (piknoza), citoplazma se je zgostila in celica se je skrčila.



Slika 6: Mikroskopski sliki NK (vzorec P 4/17) pod 60-kratno povečavo (levo: 1 dan, desno: 5. dan)

Slika 7 prikazuje mikroskopsko sliko barvanja preparata vzorca št. P 46/17 na melanomski koktejl, prvi in osmi dan odvzema vzorca. V vzorcu 1. dne lahko opazimo v celicah jedra in strukturo kromatina, v vzorcu 8.dne struktura kromatina ni več vidna.



Slika 7: Mikroskopska slika barvanja ICK melanomskega koktejla pod 40-kratno povečavo (levo:1.dan, desno: 8.dan)

4.2.5 KONTRASTIRANJE

V preglednici XXX so prikazani rezultati ocenjevanja kontrastiranja, tako na testiranih vzorcih (citokeratin AE1/AE3, kalretinin, MOC-31, LCA, ER in melanomski koktejl) kot na njihovih negativnih kontrolah.

Preglednica XXX: Rezultati kontrastiranja v testnih vzorcih za citokeratin AE1/AE3, kalretinin, MOC-31, LCA, ER in melanomski koktejl in v negativnih kontrolah

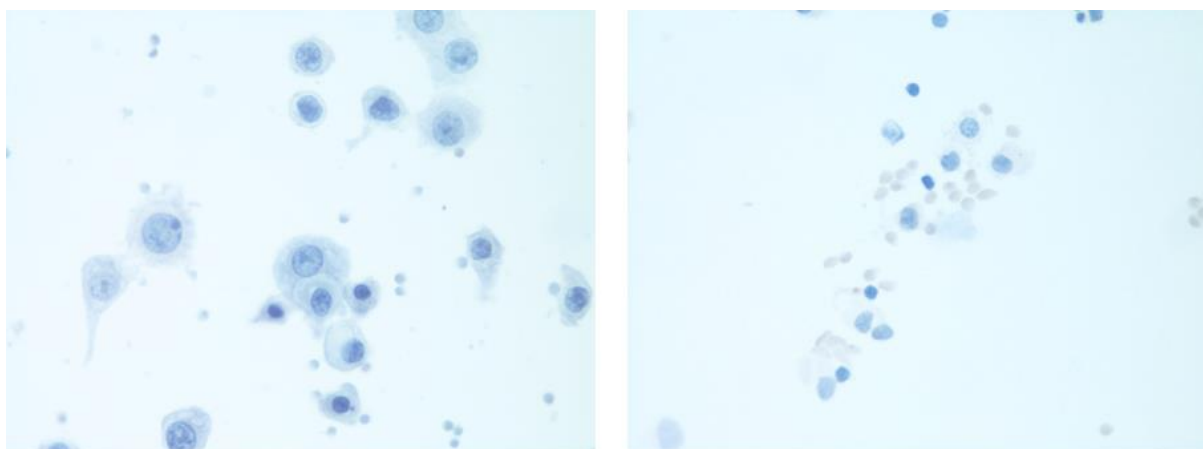
antigen	št.vzorca	Testni vzorec 1. dan	NK	Testni vzorec 2. dan	NK	Testni vzorec 4. dan	NK	Testni vzorec 5. dan	NK	Testni vzorec 8.dan	NK
CK AE1/AE3	P 1/17	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	O 2/17	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1
	O 3/17	1		1		1	1	0	1	1	1
	P 4/17	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
	P 5/17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	P 6/17	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1
	P 7/17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	O 8/17	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
	O 9/17	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0
	P 10/17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
KALRETININ	O 11/17	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
	O 12/17	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	O 13/17	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0
	O 14/17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	O 15/17	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
	O 16/17	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0
	O 17/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O 18/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O 19/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O 20/17	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0

antigen	št.vzorca	Testni vzorec 1. dan	NK	Testni vzorec 2. dan	NK	Testni vzorec 4. dan	NK	Testni vzorec 5. dan	NK	Testni vzorec 8.dan	NK
MOC-31	P 4/17	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0
	O 8/17	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
	O 18/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O 2/17	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
	P 1/17	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	P 21/17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	P 22/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	P 23/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	P 24/17	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0
O 9/17	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	
LCA	O 25/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O 26/17	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0
	O 19/17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Bx 27/17	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0
	Bx 28/17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	Bx 29/17	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
	Bx 30/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Bx 31/17	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
	Bx 32/17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Bx 33/17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
ESTROGENSKI RECEPTOR	P 34/17	0		0	1	0	1	0	1	0	1
	P 35/17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	P 36/17	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
	P 37/17	0		0	1	0	0	0	1	0	1
	P 38/17	0		0	1	1	1	0	1	0	1
	P 39/17	0		0	1	0	1	0	1	0	1
	P 40/17	0		0	1	1	1	0	1	0	1
	P 41/17	0		0	1	1	1	1	1	1	1
	P 42/17	0		0	1	0	1	0	0	1	1
P 43/17	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	
MELANOSMIKI KOKTEJL	P 44/17	1		1	0	1	0	1	0	1	0
	P 45/17	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	P 46/17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	P 47/17	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0
	P 48/17	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1
	P 49/17	0		0	1	1	1	1	1	1	1
	P 50/17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	P 51/17	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0
	P 52/17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P 53/17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	

Legenda: NK – negativna kontrola, 1 = primerno kontrastiranje, 0 = neprimerno kontrastiranje

Statistično značilnih razlik med dnevi nismo dokazali pri nobenem antigenu, tako na testnih vzorcih kakor tudi na njihovih negativnih kontrolah. Kontrastiranje je bilo na vzorcih barvanih na CK AE1/AE3 pri vseh testiranih dnevih boljše kakor na njihovih negativnih kontrolah.

Kontrastiranje pri kalretininu se je v treh od desetih primerov izkazalo za neprimerno pri vseh testiranih dnevih (vzorci O 17/17, O 18/17, O 19/17) in pri MOC-31 pri štirih vzorcih (vzorci O 8/17, O 18/17, P 22/17, P 23/17). Kontrastiranje pri barvanju LCA je bilo vse testirane dni primerno le pri treh od desetih vzorcih (O 19/17, Bx 32/17, Bx 33/17). Kontrastiranje je bilo večinoma neprimerno v vzorcih barvanih na ER, na njihovih negativnih kontrolah je bilo v večini vzorcev primerno. V treh vzorcih barvanja ICK melanomskega koktejla (P 48/17, P 52/17 in O 53/17) je bilo kontrastiranje primerno in se s časom ni spreminjalo. Slika 8 prikazuje primer primernega kontrastiranja (P46/17) na 1.dan odvzema vzorca in primer neprimernega kontrastiranja (P51/17) na 1. dan odvzema vzorca.



Slika 8:Levo: primerno kontrastiranje (P46/17), desno:neprimerno kontrastiranje (P51/17) pod 60-kratno povečavo

5. RAZPRAVA

Z imunocitokemijo pridobimo dodatne informacije, ki nam omogočijo natančnejšo klasifikacijo vrste neoplazme, kadar tega ne moremo oceniti z rutinsko morfološko oceno. Pri zahtevnejših diagnostičnih primerih je potrebna izdelava dodatnih citospinov iz vzorca v celičnem mediju za dokazovanje antigenov tudi nekaj dni po odvzemu, zato smo v magistrski nalogi preverili obstojnost antigenov in morfoloških lastnosti celic v hišnem celičnem mediju, ki ga sami pripravljajo na oddelku za citopatologijo Onkološkega inštituta Ljubljana. V skladu z dobro laboratorijsko prakso lahko pripravljamo preparate za ICK tudi dva dni po odvzemu vzorca in jamčimo, da so rezultati reakcij zanesljivi. Raziskav na to temo ni bilo veliko. V literaturi smo našli podatek, da so Kirbiš in sodelavci (2012) dokazali, da so spremembe v morfologiji celic in imunoreaktivnosti med kratkotrajnim shranjevanjem celic v celičnem mediju odvisne od vrste celic in antigena (37).

V nalogi smo želeli ugotoviti koliko časa od odvzema vzorca celice v hišnem celičnem mediju ohranijo antigenske in morfološke značilnosti v taki meri, da so rezultati reakcij ICK še vedno zanesljivi in jih lahko varno uporabimo za opredelitev neoplazem in njihovega izvora v rutinski citopatološki diagnostiki. Testirali smo obstojnost šestih antigenov, ki jih na oddelku za citopatologijo OIL v vsakdanjem rutinskem delu z metodo imunocitokemije najpogosteje določamo: CK AE1/AE3, kalretinin, MOC-31, LCA, ER, melanomski koktejl. Zanimalo nas je ali so morfološke značilnosti celic in antigeni, ki smo jih testirali na drugi, četrti, peti in osmi dan po odvzemu vzorca enake kot na dan odvzema vzorca. Zato smo pripravili citospine na dan odvzema vzorca, ter drugi, četrti, peti in osmi dan. Za vsak antigen smo testirali 10 celičnih vzorcev, vsak dan posebej skupaj z negativno kontrolo. Rezultate reakcij ICK (število pozitivnih celic in intenziteto), nespecifično reakcijo (ozadje), ohranjenost celic (morfologijo) in kontrastiranje so ocenjevale štiri ocenjevalke po načinu, ki se uporablja na Oddelku za citopatologijo Onkološkega inštituta Ljubljana (reakcija, intenziteta, ozadje) in po načinu, ki ga uporablja shema za zunanjo kontrolo kvalitete UK NEQAS ICK (intenziteta, ozadje, kontrastiranje). Čeprav nobena od shem za oceno reakcij ICK, ki smo jih uporabili v naši nalogi, ne vključuje ocene morfologije celic, smo ocenjevali tudi morfologijo celic, ker se spreminja v odvisnosti od časa, ki je potekel od odvzema vzorca do priprave citospina (38). Za pravilno interpretacijo rezultatov mora biti morfologija celic ohranjena v taki meri, da se lahko odločimo ali je rezultat reakcij ICK značilen za

neoplastične ali normalne celice. V številnih citoloških vzorcih so neoplastične celice pomešene z normalnimi, lahko pa se zgodi, da je število normalnih celic precej večje od neoplastičnih.

Najprej smo želeli preveriti v kolikšni meri na oceno rezultatov reakcij ICK vpliva variabilnost ocen med ocenjevalci. Štiri ocenjevalke smo najboljše ujemanje pri ocenjevanju dosegle pri ocenjevanju deleža obarvanih celic (statistika kapa; kapa = 0,873, kategorija »zelo dobro«). Pri ocenjevanju ostalih parametrov (intenziteta, ozadje, morfolologija in kontrastiranje) (preglednica XIV), je bila skladnost ocen precej slabša. Po kriterijih klasifikacije, ki sta jo za oceno skladnosti ocen več ocenjevalcev predlagala Landis in Koch, je bilo ujemanje za parametre intenziteta, ozadje in morfolologija le »rahlo« (kapa od 0,27 do 0,38), ujemanje za parameter kontrastiranja pa «slabo» (0,14), kar je lahko tudi posledica naključja.

Ujemanje v ocenjevanju za posamezne ocenjevane parametre, razen za kontrastiranje, tako med različnimi pari ocenjevalk (preglednica XIV), kot tudi celotno ujemanje med tremi v primerjavi s štirimi ocenjevalkami (preglednica XV), kaže na to, da ima začetno skupno pregledovanje preparatov in definiranje vrednosti posameznih parametrov pred začetkom ocenjevanja, velik vpliv na kasnejšo skladnost ocen. Citopatologinja A, študentka in samostojna analitičarka, ki so, še preden so začele s pregledovanjem preparatov vsaka posebej, skupaj pregledale okoli 30 različnih preparatov in na njih definirale vrednosti posameznih parametrov, so bile bolj usklajene pri ocenjevanju v primerjavi s citopatologinjo B, ki se začetnega pregledovanja ni udeležila. Da predhodno šolanje in usklajevanje vpliva na skladnost ocen med ocenjevalci, so ugotovili tudi Kloboves in sodelavci (2015) pri ocenjevanju dvojnega barvanja ICK na p16/Ki67 na brisih materničnega vratu (39).

Slabo ujemanje ocen med obema citopatologinjama nas je presenetilo, saj smo pričakovali ravno nasprotno. Ugotovitev kaže na to, da bi bilo na oddelku za citopatologijo Onkološkega inštituta Ljubljana potrebno poenotiti kriterije ocenjevanja reakcij ICK tako med citopatologi, kot med laboratorijskimi delavci. Poenotenje ocenjevanja bi najlažje dosegli z rednimi, skupnimi pregledovanji preparatov na večglavem diskusijskem mikroskopu. Tudi drugi avtorji opisujejo nezadovoljivo ujemanje v ocenjevanju imunocitokemičnih reakcij predvsem med ocenjevalci iz organizacije UK NEQAS ICK in patologi (ocenjevalci in-

house), in potrebo po poenotenju in standardizaciji ocenjevanja imunocitokemičnih reakcij na citoloških preparatih (40).

Ker je laboratorij Oddelka za citopatologijo Onkološkega inštituta v Ljubljani vključen v zunanjo shemo kontrole kakovosti UK NEQAS ICK smo rezultate ocenjevanj štirih ocenjevalcev, ki so sodelovali v naši raziskavi pretvorili v točkovni sistem ocenjevanja UK NEQAS ICK. Povprečja posameznih ocenjevanih označevalcev ICK, razen kalretinina, so se za vsak ocenjevani dan uvrstila v kategoriji od »sprejemljivo« do »zelo dobro«. Melanomski koktejl se je vse testirane dni uvrstil v najvišjo kategorijo »zelo dobro«, CK AE1/AE3 in LCA sta se uvrstila na mejo med kategorijama »sprejemljivo« in »zelo dobro«, MOC v kategorijo »sprejemljivo«, ER na mejo med kategorijama »mejno sprejemljivo« in »sprejemljivo«. Statistično značilnih razlik pri ocenjevanju CK AE1/AE3, MOC-31, LCA, ER in melanomskega koktejla med posameznimi dnevi ni bilo, kar pomeni, da bi vse označevalce, uvrščene v kategoriji »sprejemljivo« in »zelo dobro« lahko uporabljali v rutinski diagnostiki vseh 8 dni. Intenziteta reakcije je bila v večini primerov zelo dobro ocenjena (zmerna ali močna intenziteta), skupna ocena se je nižala predvsem zaradi prisotnosti nespecifične reakcije v ozadju in neprimernega kontrastiranja. V nekaterih primerih (MOC-31, LCA, ER) smo opazili povečanje intenzitete reakcije v času, kar je vplivalo na višanje skupne ocene. Pojav bi lahko razložili kot posledico degeneracije celic in programirane celične smrti zaradi česar se celice skrčijo, jedra pa postanejo piknotična (38).

V skladu s priporočili sheme UK NEQAS ICK bi morali pri vzorcih v kategoriji »mejno sprejemljivo«, sprejeti ukrepe za izboljšanje ICK. Izboljšali bi lahko kontrastiranje, kar bi izboljšalo oceno po shemi NEQAS na iz »mejno sprejemljiv« na »sprejemljivo«, saj je ozadje najverjetneje posledica bioloških značilnosti vzorca. Ocene bi lahko izboljšali tudi s poenotenjem kriterijev za ocenjevanje reakcij ICK, saj so rezultati naše raziskave pokazali, da je ujemanje ocen med štirimi ocenjevalci za intenziteto reakcije in ozadje le »rahlo«, za kontrastiranje pa »slabo«.

Barvanje ICK na kalretinin je v primerjavi z drugimi antigeni odstopalo. Povprečje ocen po UK NEQAS ICK kalretinina se je vsak dan znižalo za približno eno oceno, opazna je bila statistično značilna razlika med ocenami prvega in osmega dne. Prvi dan se je barvanje ICK na kalretinin uvrstilo v kategorijo »sprejemljivo«, 2. in 4. dan v kategorijo »mejno

sprejemljivo«, 5. in 8. dan pa v kategorijo »nesprejemljivo«. Ocene so se nižale ne samo na račun slabe morfologije in povečevanja nespecifične reakcije, ampak tudi zaradi nižanja intenzitete specifične reakcije. V dveh od desetih primerov peti in osmi dan po odvzemu v vzorcu ni bilo kalretinin pozitivnih celic. Glede na rezultate ocen po shemi NEQAS bi bilo najbolj optimalno, da bi vse vzorce, kjer je indicirano barvanje na kalretinin, pripravili 1. ali 2. dan po odvzemu biološkega materiala, saj bi 4. dan lahko že dobili nesprejemljivo prikazan antigen. V praksi bi to pomenilo, da bi vzorce, ki jih sprejmemo v laboratorij v petek, morali pripraviti takoj po sprejemu. V kolikor bi jih v skladu z dobro laboratorijsko prakso, ki trenutno velja na Oddelku za citopatologijo OIL, pripravili v ponedeljek (4. dan po odvzemu), bi bil rezultat barvanja ICK po UK NEQAS ICK lahko neustrezen.

Ocene po shemi UK NEQAS ICK nam pokažejo kvaliteto barvanja ICK za posamezen antigen. Na oceno barvanja vplivajo štiri parametri: intenziteta, ozadje in kontrastiranje ter variabilnost ocen med ocenjevalci, saj je končna ocena seštevek ocen štirih ocenjevalcev (43). Kako na oceno po shemi UK NEQAS ICK vplivata število pozitivnih celic in morfologija celic, iz ocene ni razvidno. Rezultati naše raziskave so pokazali, da je za oceno ustreznosti vzorca za barvanje ICK pomembno tudi število celic s pozitivno reakcijo ICK in variabilnost ocen med ocenjevalci. Shema UK NEQAS ICK zato ni najbolj primerna za spremljanje barvanja ICK posameznih antigenov skozi časovne intervale. Pri posameznih primerih CK AE1/AE3, MOC-31 in ER se je izkazalo, da smo ocenjevalke po shemi UK NEQAS ICK ocenile preparate kot nesprejemljive, čeprav so bile reakcije na antigene dobro prikazane.

Da bi ugotovili kako čas od odvzema vzorca do priprave citospina vpliva na rezultat reakcij ICK, smo skozi časovne intervale ocenjevali posamezne parametre. Ker so rezultati naše raziskave pokazali, da na oceno posameznega parametra pomembno vpliva variabilnost ocen med ocenjevalci, smo za vsak parameter upoštevali le ocene, kjer je bila ocena vsaj treh od štirih ocenjevalk enaka. Za primere, kjer ta kriterij ni bil dosežen, so štiri ocenjevalke rezultat še enkrat ocenile skupaj in sprejele oceno konsenza.

Odstotki obarvanih celic (preglednica XXIII) in intenziteta reakcije ICK (preglednica XXIV) na vzorcih, barvanih na CK AE1/AE3, MOC-31, LCA, ER in melanomski koktejl se skozi čas niso bistveno spreminjali, statistično značilne razlike med posameznimi dnevi pri zgoraj omenjenih označevalcih ni bilo. Kot smo že omenili zgoraj, smo v primeru ER in LCA opazili

povišano intenziteto reakcije, najverjetneje zaradi sprememb v morfologiji celic. Pri ER, kjer je reakcija jedrna, lahko to razložimo s piknotičnimi jedri, ki dajejo občutek navidezno močnejše intenzitete reakcij (slika 4).

Pri barvanju ICK kalretinina, je odstotek reakcije obarvanih celic s časom močno padel (graf 2). V nasprotju z rezultati po shemi UK NEQAS ICK, kjer so rezultati barvanje ICK na kalretinin sprejemljivi le 1. in 2. dan po sprejemu vzorca, je primerjava deleža pozitivnih celic po dnevih pokazala, da je barvanje na kalretinin zanesljivo do vključno 4. dne, kar je tudi uveljavljena praksa v laboratoriju Oddelka za citopatologijo.

Mediane intenzitet reakcij ICK pri dokazovanju kalretinina se sicer niso spreminjale skozi čas, vendar smo pri večini vzorcev opazili rahlo nižanje intenzitet. Statistično značilna razlika v reakciji ICK na kalretinin se pojavi med 1. in 8. dnevom priprave vzorca. Pri dveh vzorcih petega in osmega dne ni bilo reakcije ICK, ker v vzorcu ni bilo pozitivnih celic. Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da je ocenjevanje intenzitete reakcije na kalretinin v primerih pozitivne reakcije četrty dan zanesljivo, peti in osmi dan pa le v primerih, ko je v vzorcu več kot 20% mezotelijskih celic. Kadar je v vzorcu malo mezotelijskih celic moramo biti v primeru šibke ali celo negativne reakcije previdni, posebej če rezultati niso skladni z mikroskopsko, morfološko oceno preparatov pobarvanih po Giemsi in Papanicolaou. Vzrok za neskladne rezultate je lahko citoliza in upadanje antigenskih lastnosti vzorca s časom.

Nespecifično barvanje je pozitivno barvanje vzorca, ki ni rezultat vezave antigena v vzorcu in specifičnega primarnega protitelesa. Nespecifične reakcije so posledica hidrofobnih in ionskih interakcij med imunoglobulini in celičnimi komponentami, endogene encimske aktivnosti in nespecifične oziroma endogene vezave avidina. Vzrok nespecifičnih reakcij je lahko tudi navzkrižna reaktivnost protitelesa, kar pomeni njegove specifične interakcije z identičnimi epitopi, ki jih najdemo na dveh ali več različnih antigenskih molekulah, kot tudi interakcije protitelesa s podobnimi ali različnimi antigeni (27). Nespecifično barvanje (ozadje) lahko povzroča zavajajoče lažno pozitivne reakcije. Za zanesljivo interpretacijo imunocitokemičnih reakcij moramo zato uporabljati negativne kontrole in dodatne postopke za inhibicijo nespecifičnih reakcij. Največ ozadja smo opazili v vzorcih izlivov v telesne tekočine, ki so bogati s proteini (27). Na splošno nespecifične reakcije niso bile prisotne v tolikšni meri, da bi ogrozile interpretacijo barvanja ICK. Pri barvanju ER, kjer bi morala biti reakcija na antigen le jedrna, smo opazili nespecifično citoplazemsko obarvanje celic.

Intenziteta ozadja se je v testiranih vzorcih praviloma povečevala s časom, kar bi lahko razložili z lizo celic, vendar statistično značilnih razlik pri vseh testiranih označevalcih ICK, razen pri kalretininu, nismo našli. Pri kalretininu je bila statistično značilna razlika v ozadju opazna med 1. in 8. dnevom. Prav tako nismo dokazali statistično značilne razlike v ozadju med posameznimi dnevi pri negativnih kontrolah vseh testiranih vzorcev.

Nespecifično vezavo lahko do neke mere preprečimo ali zmanjšamo z uporabo raztopin, ki delujejo tako, da se vežejo na nespecifična vezavna mesta in preprečijo vezavo primarnih ali sekundarnih protiteles na nespecifične celične komponente (3% raztopina serumskega govejega albumina, ali serumski albumini drugih vrst). Receptorje Fc, ki lahko vežejo protitelesa, najdemo na celicah imunskega sistema (makrofagi in celice naravne ubijalke). To vezavo lahko preprečimo z dodajanjem seruma živalske vrste, iz katere izhaja sekundarno protitelo (44,45). Do nespecifičnega obarvanja lahko pride tudi zaradi poškodb celic, ki so dalj časa v celičnem mediju, lize celic in s tem do prenosa celičnih produktov v okolico, saj je znano, da se odmrle ali degenerirane celice pogosto nespecifično obarvajo in dajejo razpršen videz. Nespecifično vezavo, ki moti interpretacijo rezultatov, zaradi prisotnosti proteinov v suspenziji, lahko delno odstranimo z višjimi redčitvami protiteles (7).

Morfološke lastnosti celic smo ocenjevali tako na testnih vzorcih kot na njihovih negativnih kontrolah. V nekaterih primerih smo ocenili morfolologijo različno na testnem vzorcu in njegovi negativni kontroli, kljub temu, da sta bila citospina narejena iz istega vzorca istega dne. Na splošno smo morfolologijo na testnih vzorcih bolj ocenili, saj zaradi (močne) obarvanosti celic na testnem citospinu ni bilo mogoče natančno videti ali gre za ohranjeno ali spremenjeno morfolologijo, medtem ko se je na negativni kontroli morfolologija bolj razločno videla. Morfolologija celic se je, v primerjavi z dugimi ocenjevanimi parametri, skozi čas najbolj spremenila (preglednica XXVIII), na kar kažejo tudi statistično značilne razlike med posameznimi pari dnevov (preglednica XXIX). Najbolje ohranjeno morfolologijo smo opazili pri vzorcih, kjer smo dokazovali melanomski koktejl (morfolologija se je šele četrti oz. peti dan spremenila le pri dveh vzorcih), najslabše pa pri vzorcih, kjer smo dokazovali LCA. Devet od desetih vzorcev je imelo že od prvega dne dalje spremenjeno morfolologijo celic, najverjetneje zaradi fiksacije z metanolom, ki morfologije celic v vzorcih bezgavk ne ohrani optimalno. Pri vzorcih NK, na katerih nismo dokazovali CK AE1/AE3 in MOC, se je statistično značilna razlika pokazala med 1. in 5. dnevom priprave vzorca, pri kalretininu med

1. in 8. dnem. Pri posameznih vzorcih smo že drugi dan opazili degenerativne spremembe celic. Kromatin v jedru se je zgostil zaradi nespecifične razgradnje DNK. Citoplazma celic se je zgostila in celica se je skrčila (slika 6) (38).

Kontrastiranje na naših preparatih je bilo v veliki večini vzorcev neprimerno (preglednica XXX), saj se je pokazalo le v blede modri obarvanosti jedra. Kontrastiranje je parameter, ki ni odvisen od časa, temveč od uporabljenih reagentov za kontrastiranje na barvalcu. Za kontrastiranje smo uporabili reagent hematoksilin. Hematoksilin je naravno biološko barvilo rjave barve in postane modro barve šele po oksidaciji v hematein. Oksidacija poteče s pomočjo oksidantov (FeCl_3). Hematoksilin se spremeni v bazično jedrno barvilo šele takrat, ko iz hemateina in kovinske soli nastane kompleks s pozitivnim nabojem in ima kot tak afiniteto do negativno nabitih molekul in barva DNA, RNA in kislih proteinov. Hematein povzroči modro obarvanje heterokromatina v jedru celice. Kontrastiranje pride na vrsto na koncu barvanja ICK, ko se tarčni antigen že pokaže kot vidni produkt encimsko-immunske reakcije. Aparat za barvanje ICK je sam nanese hematoksilin na preparat in ga zmešal preko celotnega citološkega preparata. Po končanem inkubacijskem koraku je inštrument za avtomatizirano barvanje preparatov spral preparate za ustavitev reakcije in odstranitev neveznih reagentov. Temu je sledilo še modrenje jeder s šibko alkalno raztopino Li_2CO_3 (35,36). Za modrenje jeder smo uporabili vodno raztopino litijevega karbonata, Bluing reagent. Kombinirano delovanje litijevih ionov in dvig pH vrednosti modro obarva s hematoksilinom barvane citološke vzorce.

Zavedati se moramo, da lahko prekomerno ali nepopolno kontrastiranje ogrozi interpretacijo rezultatov. Zato bi bilo potrebno zagotoviti primernejše kontrastiranje imunocitokemičnega barvanja. Potrebno bi bilo preizkusiti kako različno dolge inkubacije preparatov s hematoksilinom ali reagentom za modrenje vplivajo na kakovost kontrastiranja. Tudi čas spiranja lahko vpliva na nezadostno kontrastiranje zaradi nepopolne odstranitve neveznih reagentov.

Dejavniki, ki vplivajo na kvaliteto barvanja so še izbira, vzdrževanje in ravnanje z barvili in reagenti. Čeprav danes večinoma uporabljamo komercialno dostopne mešanice barvil in reagentov, moramo upoštevati, da so med proizvajalci precejšnje razlike, tako v rezultatu barvanja kot v kakovosti barvil, reagentov.

6. SKLEP

V okviru magistrske naloge smo testirali kako dolgo celice ohranijo svoje antigenske in morfološke lastnosti v hišnem celičnem mediju oziroma do kdaj so še primerne za varno diagnostiko z uporabo imunocitokemije.

Po pregledu vseh preparatov, ki smo jih pripravili in na osnovi dobljenih rezultatov smo ugotovili naslednje:

- Antigenske lastnosti celic za epitelijska označevalca CK AE1/AE3, MOC-31, limfomski označevalec LCA, ter melanomski koktejl so se ohranile tudi do osmega dne po odvzemu vzorca. Morfološke lastnosti celic so se s časom sicer spreminjale, vendar se niso spremenile do te mere, da bi ogrozile interpretacijo imunocitokemičnega barvanja za diagnostične namene.
- Vzorci, barvani na mezenhimski antigeni označevalec kalretinin, so se najslabše izkazali pri vseh parametrih testiranja. Od prvega do četrtega dne po odvzemu vzorca se delež pozitivnih celic ni pomembno spremenil, zato so citološki vzorci v hišnem mediju tudi četrty dan še ustrezni za prikaz kalretinina z metodo imunocitokemije.
- Nespecifično ozadje je bilo prisotno tako na testnih vzorcih kot na negativnih kontrolah. Statistično značilno razliko pri pojavnosti ozadja med posameznimi dnevi smo dokazali le v primeru imunocitokemičnega barvanja na kalretinin, med 1. in 8. dnem. Barvanje ICK na MOC-31 in kalretinin je pokazalo največ nespecifičnega ozadja, kar lahko pripišemo lastnosti vzorca – izlivom, ki so bogati z beljakovinami.
- Ocene po shemi UK NEQAS ICK so splošen pokazatelj kakovosti imunocitokemičnega barvanja in so bile v večini naših testnih vzorcev primerljive z našimi ugotovitvami, ki smo jih pridobili s preučevanjem posameznih parametrov na podlagi ocenjevanja, ki je v veljavi v citopatološkem laboratoriju OIL. Splošna ocena po shemi UK NEQAS ICK lahko da slabši rezultat od ocenjevanja, ki se rutinsko uporablja na OIL, predvsem na račun ozadja, kontrastiranja in variabilnosti med ocenjevalci. Ocena je zato lahko nesprejemljiva ali mejno sprejemljiva, čeprav je antigen v celicah dobro predstavljen.
- Kontrastiranje preparatov je bilo večinoma slabo. Slabo kontrastiranje lahko pripišemo barvalcu za barvanje ICK (prekratek inkubacijski čas s hematoksilinom ali

z reagentom za modrenje jeder) ali pa spreminjajoči se kvaliteti uporabljenih reagentov (različni LOT-i reagentov).

- Pričakovali smo, da nam bodo vsi citoplazemski antigeni (CK AE1/AE3, kalretinin, MOC-31 in melanomski koktejl) dali podobne rezultate barvanj ICK. Barvanje ICK na CK AE1/AE3, MOC-31 in melanomski koktejl je bilo primerno tudi na citospinih, pripravljenih 8. dne po odvzemu vzorca. Medtem ko je bilo barvanje ICK kalretinina primerno le do 4. dne, kar pomeni, da moramo ustreznost vzorca testirati za vsa protitelesa, ki jih uporabljamo v rutinski diagnostiki.

7. VIRI

1. Zidar N, Gale N: Osnove patologije, 1. izdaja, Katedra za patologijo Medicinske fakultete, Ljubljana, 2011: 109-123
2. Srebotnik Kirbiš I, Strojan Fležar M: Laboratorijske tehnike v citopatologiji, Univerza Ljubljana, Medicinska fakulteta, Inštitut za patologijo, 2009: 1-12
3. Mehrdad N et al: Immunocytochemistry in Contemporary Cytology – The Technique and its Application, Laboratory Biomedicine, 25, 1994: 502-508
4. Vernau W: The Use of Immunocytochemistry in the Diagnosis of Neoplasia, 50° Congresso Nazionale Multisala, 2005, Rimini, Italija
5. Kocjan G, Nolde N, et al: Diagnostic Cytopathology Essentials, Edinburgh, Churchill Livingstone Elsevier, 2013: 398-404
6. Boenisch T: Handbook of immunochemical staining. 3rd Ed. Dako Corporation, Carpinteria, California,
7. Imunohistochemical Staining Methods, Dako Handbook, 6. izdaja, 2013 Denmark Taylor Clive
8. www.thermofisher.com/si/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/avidin-biotin-complex-method-ihc-detection, html dostopano: 12.2017
9. Novaković S: Tumorski označevalci v klinični onkologiji, Onkologija, 2004(38) 2:73-83
10. Specifikacijski list Dako Monoclonal mouse Anti Human Cytokeratin Clone AE1/AE3: <https://www.agilent.com/cs/library/packageinsert/public/123744001.PDF>
11. Ventana Specifikacijski list Anti-Pan Keratin Primary Antibody, Ventana medical systems, Arizona, ZDA
12. Pathology of Cell Receptors and Tumor Markers: Gustav Fischer, New York 1987:60-103
13. propath.org/companies/press-clippings/26-newsletters/271-cytokeratin-ae1-ae3-november-2003, html dostopano: 15.12.2017
14. Ventana Specifikacijski list anti-Epithelial Related Antigen MOC-31, Ventana medical systems, Arizona, ZDA
15. Kundu U: Use of the monoclonal antibody MOC-31 as an immunomarker for detecting metastatic adenocarcinoma in effusion cytology. Canc Cythopatol, 2011, 25:272-278
16. Oates J, Edwards C: HBME-1, MOC-31, WT1 and calretinin: an assessment of recently described markers for mesothelioma and adenocarcinoma. Histopatology, 2000, 36:341-347
17. VENTANA specifikacijski list CONFIRM anti-Calretinin(SP65) Rabbit Monoclonal Primary Antibody, Ventana medical systems, Arizona, ZDA
18. VENTANA specifikacijski list Melanoma Triple Cocktail (HMB45+A103+T311) Primary Antibody, Ventana medical systems, Arizona, ZDA

19. R, Bonetti F, Zamboni G, Scarpa A, Marino F, Tomezzoli A, Capelli P, Menestrina F, Chilosi M, Fiore-Donati L. Distribution of melanoma specific antibody (HMB-45) in benign and malignant melanocytic tumors. *Virch Arch A Pathol Anat* 1988; 413:17
20. Clevenger J et al: Reliability of immunostaining using pan-melanoma cocktail, SOX10, and mircophthalmia transcription factor in confirmins a diagnosis of melanoma on fine needle aspiration smears. *Cancer Pathology*, 2014, 10:779-784
21. Srebotnik Kirbiš I: Določanje estrogenskih receptorjev v vzorcih aspiracijskih biopsij raka dojke. *Onkologija*: 2003(8) 1:15-17
22. Leica Biosystems specifikazijski list za Estrogen Receptor Clone 6F11, Leics Biosystems Newcastle, Velika Britanija
23. VENTANA specifikacijski list anti.LCA (CD45) Primary Monoclonal Mouse Antibody, Ventana medical systems, Arizona, ZDA
24. Dodson A: Modern methods for diagnostic imunocytochemistry, *Current Diagnostic Patology*, 201, 8:113-122
25. Fetsch P et al: Comparison of Three Commonly Used Cytologic Preparations in Effusion Immunocytochemistry. *Diagnostic Cytopathology*, 26,1:61-66
26. Ventana specifikacijski list Endogenous biotin blocking kit namen in uporaba Ventana Medical Systems, Inc, 2008, Arizona, ZDA
27. Skoog L et al: Immunocytochemistry: an indenspensable technique in routine cytology, *Cytopathology* 2011, 22:2215-229
28. Ventana specifikacijski list Hematoxylin namen in uporaba Ventana Medical Systems, Inc, 2008, Arizona, ZDA
29. Ventana specifikacijski list DISCOVERY AMplification HQ Ki, namen in uporaba Ventana Medical Systems, Inc, 2011, Arizona, ZDA
30. VENTANA specifikacijski list iVIEW DAB Detection Kit, predvidena uporaba Ventana Medical Systems, Inc, 2012, Arizona, ZDA
31. <https://statistics.laerd.com/premium/spss/ck/cohens-kappa-in-spss.php>, dostopano 4.2.2018
32. Participants Manuel 2017 – 2018, UK NEQAS ICC & IHC, Cancer institute University College London
33. <https://statistics.laerd.com/premium/spss/ck/cohens-kappa-in-spss.php.html> dostopano 5.2.2018
34. <https://statistics.laerd.com/premium/spss/wk/weighted-kappa-in-spss.php.html> dostopano: 5.2.2018
35. Možina A, Staniša O: Laboratorijske tehnike v patologiji, Srednja šola za farmacijo in zdravstvo, Ljubljana, 1988: 91 – 92

36. Ventana specifikacijski list Bluing reagent namen in uporaba, Ventana Medical Systems, Inc, 2008, Arizona, ZDA
37. Kirbiš I, Prosen L et al: vpliv kratkotrajnega shranjevanja celic v celičnem mediju na morfologijo celic in imunoreaktivnost antigenov za imunocitokemične reakcije. *Novosti v citopatologiji: most med kliniko in diagnostično patologijo*. Ljubljana. Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta, 2012: 217-220
38. Valenciano A, Cowell R et al. *Atlas of Canine and Feline Peripheral Blood Smears*, Elsevier –Health Sciences Division, St. Louis, Montana, 2014: 204-206
39. Kloboves Prevodnik V et al.: P16/Ki67 dual immunocytochemical staining implementation in three cytopathology laboratories participating in Slovenian cervical cancer screening program ZORA : lecture at na XII International Workshop of Lower Genital Tract Pathology, Rome, 5-7 March 2015
40. Kirbiš I et al: External quality control for immunocytochemistry on cytology samples: a review of UK NEQAS ICC (cytology module) results. *Cytopathol.* 2011; 22. 230-237
41. Pohar Marinšek Ž, Nolde N, Kardum I et al: Multinational study of oestrogen and progesterone receptor immunocytochemistry on breast carcinoma fine needle aspirates. *Cytopathol.* 2013, 24:7-20
42. http://www.ukneqasiccish.org/wp/wp-content/uploads/2016/01/Participants-Manual-2015_2016.pdf dostopano 30.4.2018
43. <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/methods-block-endogenous-detection.html> dostopano 30.4.2018
44. Burry RW: Controls for immunocytochemistry: an update. *J Histochem Cytochem.* 2011; 59(1): 6-12
45. Buchwalow I, Samoilova V, Boecker W, Tiemann M. Non-specific binding of antibodies in immunohistochemistry: fallacies and facts. *Sci Rep.* 2011;1:28.

8. PRILOGE

Prilogi 1:

Rezultati ICK barvanja pozitivnih kontrol za posamezen antigen:

Pozitivne kontrole:	Št. vzorca	reakcija	intenziteta	ozadje
kontrola CK AE1/AE3	K 1729/17	2	2	0
	K 357/17	3	3	0
	K 4377/17	3	3	0
	K 1729 /17	2	3	0
	K 1729 /17	2	2	0
kontrola kalretinin	K 2202/17	2	3	0
	K 1672/17	1	2	0
	K 2683/17	1	3	0
	K 875/17	1	2	0
	K 2202/17	1	3	0
	K 2202/17	2	3	0
kontrola MOC-31	K O1726/17	2	3	0
	K O1502/17	3	3	0
	K 3623/17	3	2	0
	K 3623/17	2	3	0
	K 651/17	3	3	0
	K O 1726/17	3	3	0
kontrola LCA	K Bx 3312/16	3	3	0
	K O3312/16	3	2	0
	K Bx3312/16	3	3	0
	K Bx 2247/17	3	2	0
	K Bx 9952/17	3	3	0
	K Bx 9952 /17	2	2	0
kontrola ER	K 4770/17	2,5	2,5	0
	K 4792/17	3	2,5	1
	K 3854/17	3	3	0
	K 3854/17	3	3	0
	K 1781/17	3	3	1
	K 3854/17	3	3	0
	K 1781/17	3	3	1
kontrola melanomski koktejl	K 9005/17	2	3	0
	K 2554 /17	3	3	0
	K 2560 /17	3	3	0
	K 416 /17	3	3	0
	K 1833/17	3	3	0
	K 2561/17	3	3	0
	K 1833/17	3	3	0
	K 1833/17	3	3	0
	K 3781 /17	3	3	0
	K 6234 /17	3	3	0

Priloga 2: Rezultati ICK barvanja CK AE1/AE3

Vzorec	Ocenjevalni parameter	1. dan	NK	2. dan	NK	4. dan	NK	5. dan	NK	8.dan	NK
P 1	Reakcija (%)	2 (20)	0	2 (20)	0	2 (20)	0	2 (20)	0	2 (20)	0
	Intenziteta	3	0	2	0	3	0	3	0	3	0
	Ozadje	1	2	1	1	1	1	1	1	0	1
	Kontrastiranje	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	Morfologija	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
O 2	Reakcija (%)	1 (10)	0	1 (15)	0	1 (10)	0	1(15)	0	1 (15)	0
	Intenziteta	2	0	2,5	0	3	0	3	0	3	0
	Ozadje	2	1	1	2	0	2	0	2	0	2
	Kontrastiranje	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1
	Morfologija	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
O 3	Reakcija (%)	2(20)		1 (10)		1 (10)	0	1 (10)	0	1 (5)	0
	Intenziteta	3		3		3	0	2,5	0	3	0
	Ozadje	1		1		1	1	1	1	1	1
	Kontrastiranje	1		1		1	1	0	1	1	1
	Morfologija	1		1		0	0	0	0	0	0
P 4	Reakcija (%)	3(100)	0	3 (100)	0	3 (100)	0	3 (100)	0	3 (100)	0
	Intenziteta	2	0	2,5	0	3	0	3	0	2,5	0
	Ozadje	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Kontrastiranje	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
	Morfologija	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0
P 5	Reakcija (%)	1(1)	0	1 (1)	0	1(1)	0	1(1)	0	1(1)	0
	Intenziteta	2	0	1,5	0	2	0	2	0	2	0
	Ozadje	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Kontrastiranje	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Morfologija	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
P 6	Reakcija (%)	3 (90)	0	3 (90)	0	3 (90)	0	3 (90)	0	3 (90)	0
	Intenziteta	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0
	Ozadje	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2
	Kontrastiranje	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1
	Morfologija	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
P 7	Reakcija (%)	3 (100)	0	3 (100)	0	3 (100)	0	3 (100)	0	3 (100)	0
	Intenziteta	3	0	2,5	0	3	0	3	0	3	0
	Ozadje	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Kontrastiranje	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Morfologija	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O 8	Reakcija (%)	3 (70)	0	3 (70)	0	3 (70)	0	3 (70)	0	3 (70)	0
	Intenziteta	2	0	2	0	2,5	0	3	0	3	0
	Ozadje	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1
	Kontrastiranje	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
	Morfologija	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1
O 9	Reakcija (%)	2 (20)	0	2 (20)	0	2 (20)	0	2 (20)	0	2 (20)	0
	Intenziteta	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0
	Ozadje	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1
	Kontrastiranje	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0
	Morfologija	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
P 10	Reakcija (%)	3 (100)	0	3 (95)	0	3 (100)	0	3 (100)	0	3 (100)	0
	Intenziteta	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0
	Ozadje	2	1	2	1	2	1	1	1	2	1
	Kontrastiranje	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Morfologija	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0

Reakcijo smo ocenili z vrednostmi 0 - 3, v oklepaju so podani še procenti reakcije.

Priloga 3: Rezultati ICK barvanja kalretinina

Vzorec	Ocenjevalni parameter	1. dan	NK	2. dan	NK	4. dan	NK	5. dan	NK	8.dan	NK
O 11	Reakcija (%)	1(10)	0	1(10)	0	1 (2,5)	0	1 (1)	0	1(1)	0
	Intenziteta	3	0	2,5	0	2	0	2	0	2	0
	Ozadje	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1
	Kontrastiranje	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
	Morfologija	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
O 12	Reakcija (%)	1(5)	0	1(5)	0	1(1)	0	1(1)	0	0(0)	0
	Intenziteta	1	0	2	0	1,5	0	1	0	0	0
	Ozadje	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
	Kontrastiranje	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Morfologija	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
O 13	Reakcija (%)	1(5)	0	1(5)	0	1(1)	0	0(0)	0	0(0)	0
	Intenziteta	2,5	0	1	0	1	0	0	0	0	0
	Ozadje	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Kontrastiranje	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0
	Morfologija	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O 14	Reakcija (%)	1(10)	0	1(10)	0	1(3)	0	1(10)	0	1(3)	0
	Intenziteta	2,5	0	2	0	2	0	2	0	2	0
	Ozadje	2	2	1	2	1	2	1	2	1	2
	Kontrastiranje	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Morfologija	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
O 15	Reakcija (%)	1(2)	0	1(2)	0	1(1)	0	1(1)	0	1(1)	0
	Intenziteta	2	0	1	0	1	0	1,5	0	1	0
	Ozadje	1	2	1	2	1	2	1	2	0	2
	Kontrastiranje	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
	Morfologija	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
O 16	Reakcija (%)	1(10)	0	1(10)	0	1(10)	1	1(5)	0	1(5)	0
	Intenziteta	2	0	2	0	2	1,5	2	0	2	0
	Ozadje	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Kontrastiranje	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0
	Morfologija	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
O 17	Reakcija (%)	1(10)	0	1(10)	0	1(10)	0	1(10)	0	1(1)	0
	Intenziteta	1,5	0	2	0	2	0	2	0	2	0
	Ozadje	2	1	1	2	1	2	1	2	1	2
	Kontrastiranje	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Morfologija	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O 18	Reakcija (%)	2(25)	0	2(25)	0	2(25)	0	2(20)	0	2(20)	0
	Intenziteta	2	0	2	0	2,5	0	2,5	0	3	0
	Ozadje	2	2	2	2	1	2	2	1	1	1
	Kontrastiranje	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Morfologija	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O 19	Reakcija (%)	1(10)	0	1(10)	0	1(10)	0	1(10)	0	1(5)	0
	Intenziteta	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0
	Ozadje	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
	Kontrastiranje	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Morfologija	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O 20	Reakcija (%)	1(15)	0	1(15)	0	1(5)	0	1(5)	0	1(1)	0
	Intenziteta	1,5	0	1,5	0	1,5	0	1,5	0	0	0
	Ozadje	2	1	0	1	0	1	0	1	0	1
	Kontrastiranje	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
	Morfologija	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Reakcijo smo ocenili z vrednostmi 0 - 3, v oklepaju so podani še procenti reakcije.

Priloga 4: Rezultati ICK barvanja epiteljskega sorodnega antigena MOC -31

Vzorec	Ocenjevalni parameter	1. dan	NK	2. dan	NK	4. dan	NK	5. dan	NK	8.dan	NK
P 4	Reakcija (%)	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0
	Intenziteta	1,5	0	2	0	2	0	2	0	2	0
	Ozadje	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Kontrastiranje	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0
	Morfologija	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
O 8	Reakcija (%)	3(60)	0	3(60)	0	3(60)	0	3(60)	0	3(60)	0
	Intenziteta	1,5	0	2	0	2	0	2	0	1,5	0
	Ozadje	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1
	Kontrastiranje	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
	Morfologija	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
O 18	Reakcija (%)	1(5)	0	1(5)	0	1(5)	0	1(5)	0	1(5)	0
	Intenziteta	2,5	0	2	0	2	0	1,5	0	2	0
	Ozadje	1	2	1	2	1	2	0	1	1	1
	Kontrastiranje	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Morfologija	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O 2	Reakcija (%)	1(15)	0	1(20)	0	1(15)	0	1(20)	0	1(15)	0
	Intenziteta	2	0	2	0	3	0	3	0	2	0
	Ozadje	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2
	Kontrastiranje	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
	Morfologija	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
P 1	Reakcija (%)	2(20)	0	2(20)	0	2(20)	0	2(20)	0	2(20)	0
	Intenziteta	3	0	2	0	3	0	2,5	0	2	0
	Ozadje	1	2	1	1	0	1	1	1	0	1
	Kontrastiranje	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	Morfologija	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
P 21	Reakcija (%)	2(30)	0	2(30)	0	2(30)	0	2(30)	0	2(30)	0
	Intenziteta	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0
	Ozadje	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1
	Kontrastiranje	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	Morfologija	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
P 22	Reakcija (%)	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0
	Intenziteta	3	0	2	0	2	0	2	0	2,5	0
	Ozadje	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Kontrastiranje	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Morfologija	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P 23	Reakcija (%)	3(90)	0	3(90)	0	3(90)	0	3(90)	0	3(90)	0
	Intenziteta	2	0	2,5	0	3	0	3	0	3	0
	Ozadje	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2
	Kontrastiranje	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Morfologija	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
P 24	Reakcija (%)	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0
	Intenziteta	2	0	2	0	2	0	2	0	2,5	0
	Ozadje	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Kontrastiranje	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0
	Morfologija	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
O 9	Reakcija (%)	2(40)	0	2(30)	0	2(40)	0	2(40)	0	2(40)	0
	Intenziteta	2,5	0	2,5	0	3	0	3	0	3	0
	Ozadje	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1
	Kontrastiranje	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0
	Morfologija	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0

Reakcijo smo ocenili z vrednostmi 0 - 3, v oklepaju so podani še procenti reakcije.

Priloga 5: Rezultati ICK barvanja LCA (CD45)

Vzorec	Ocenjevalni parameter	1. dan	NK	2. dan	NK	4. dan	NK	5. dan	NK	8.dan	NK
O 25	Reakcija (%)	3(100)	0	3(100)	3	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0
	Intenziteta	2	0	3	3	3	0	3	0	3	0
	Ozadje	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2
	Kontrastiranje	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Morfologija	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0
O 26	Reakcija (%)	3(100)	0	3(95)	0	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0
	Intenziteta	2	0	2	0	2,5	0	2	0	1,5	0
	Ozadje	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1
	Kontrastiranje	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Morfologija	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O 19	Reakcija (%)	3(90)	0	3(90)	0	3(90)	0	3(90)	0	3(90)	0
	Intenziteta	2	0	2,5	0	2,5	0	2	0	2	0
	Ozadje	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1
	Kontrastiranje	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0
	Morfologija	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
Bx 27	Reakcija (%)	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0
	Intenziteta	1,5	0	2	0	2	0	2,5	0	1,5	0
	Ozadje	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Kontrastiranje	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Morfologija	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Bx 28	Reakcija (%)	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0
	Intenziteta	2	0	2,5	0	3	0	2	0	2	0
	Ozadje	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2
	Kontrastiranje	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0
	Morfologija	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bx 29	Reakcija (%)	3(100)		3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0
	Intenziteta	2		2,5	0	3	0	3	0	3	0
	Ozadje	2		2	2	2	2	2	2	2	2
	Kontrastiranje	1		1	1	1	1	1	1	1	0
	Morfologija	1		1	0	1	0	0	0	0	0
Bx 30	Reakcija (%)	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0
	Intenziteta	2	0	3	0	2,5	0	3	0	3	0
	Ozadje	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Kontrastiranje	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
	Morfologija	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
Bx 31	Reakcija (%)	2(50)	0	2(50)	0	3(60)	0	3(80)	0	3(80)	0
	Intenziteta	2	0	2	0	3	0	3	0	3	0
	Ozadje	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Kontrastiranje	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Morfologija	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bx 32	Reakcija (%)	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0
	Intenziteta	2,5	0	2	0	2,5	0	3	0	3	0
	Ozadje	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Kontrastiranje	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
	Morfologija	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Bx 33	Reakcija (%)	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0
	Intenziteta	2	0	2,5	0	2,5	0	3	0	2	0
	Ozadje	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Kontrastiranje	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Morfologija	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Reakcijo smo ocenili z vrednostmi 0 - 3, v oklepaju so podani še procenti reakcije.

Priloga 6: Rezultati ICK barvanja ER

Vzorec	Ocenjevalni parameter	1. dan	NK	2. dan	NK	4. dan	NK	5. dan	NK	8.dan	NK
P 34	Reakcija (%)	3(100)		3(95)	0	3(90)	3	3(90)	0	3(90)	0
	Intenziteta	3		3	0	2,5	2,5	2,5	0	3	0
	Ozadje	1		1	2	2	2	2	2	1	2
	Kontrastiranje	0		0	1	0	1	0	1	0	1
	Morfologija	1		1	1	0	0	0	0	0	0
P 35	Reakcija (%)	3(100)		3(90)	0	3(80)	0	3(80)	0	3(80)	0
	Intenziteta	2		3	0	3	0	3	0	3	0
	Ozadje	1		1	2	1	2	1	2	1	2
	Kontrastiranje	0		0	1	0	1	0	1	0	1
	Morfologija	1		1	1	1	0	0	0	0	0
P 36	Reakcija (%)	2(30)	0	2(40)	0	2(30)	0	2(40)	0	2(40)	0
	Intenziteta	1	0	2	0	1,5	0	1,5	0	1,5	0
	Ozadje	2	2	1	2	2	1	1	2	1	2
	Kontrastiranje	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Morfologija	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
P 37	Reakcija (%)	3(80)	0	3(80)	0	3(90)	0	3(90)	0	3(90)	0
	Intenziteta	2	0	2,5	0	2	0	3	0	2,5	0
	Ozadje	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2
	Kontrastiranje	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
	Morfologija	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
P 38	Reakcija (%)	3(100)		3(90)	0	3(95)	0	3(95)	0	3(95)	0
	Intenziteta	3		2,5	0	2,5	0	3	0	2,5	0
	Ozadje	1		2	2	1	2	1	2	1	2
	Kontrastiranje	0		0	1	0	0	0	1	0	1
	Morfologija	1		1	0	0	0	0	0	0	0
P 39	Reakcija (%)	3(100)		3(90)	0	2(70)	0	3(70)	0	2(49)	0
	Intenziteta	2		3	0	3	0	3	0	3	0
	Ozadje	1		1	2	1	2	1	2	1	2
	Kontrastiranje	0		0	1	1	1	0	1	0	1
	Morfologija	1		1	1	1	1	0	0	0	0
P 40	Reakcija (%)	3(95)		3(95)	0	3(100)	0	3(90)	0	3(90)	0
	Intenziteta	2		2	0	3	0	2	0	3	0
	Ozadje	1		1	2	0	2	1	2	0	2
	Kontrastiranje	0		0	1	0	1	0	1	0	1
	Morfologija	1		1	1	1	1	0	0	0	0
P 41	Reakcija (%)	3(95)		3(90)	0	3(90)	0	3(90)	0	3(80)	0
	Intenziteta	3		3	0	3	0	3	0	3	0
	Ozadje	1		1	2	1	2	1	2	1	2
	Kontrastiranje	0		0	1	1	1	0	1	0	1
	Morfologija	1		1	1	0	0	0	0	0	0
P 42	Reakcija (%)	3(90)		3(90)	0	3(90)	0	3(90)	0	3(80)	0
	Intenziteta	2,5		3	0	3	0	3	0	2,5	0
	Ozadje	2		1	2	0	2	1	2	1	1
	Kontrastiranje	0		0	1	1	1	1	1	1	1
	Morfologija	1		1	1	0	0	0	0	0	0
P 43	Reakcija (%)	3(100)		3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0
	Intenziteta	2		3	0	3	0	3	0	3	0
	Ozadje	1		1	2	1	2	1	2	2	2
	Kontrastiranje	0		0	1	0	1	0	0	1	1
	Morfologija	1		1	1	1	0	1	0	0	0

Priloga 7: Rezultati ICK barvanja melanomskega koktejlja

Vzorec	Ocenjevalni parameter	1. dan	NK	2. dan	NK	4. dan	NK	5. dan	NK	8.dan	NK
P 44	Reakcija (%)	3(100)	0	3	0	3	0	3	0	3	0
	Intenziteta	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0
	Ozadje	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2
	Kontrastiranje	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1
	Morfologija	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
P 45	Reakcija (%)	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0
	Intenziteta	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0
	Ozadje	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Kontrastiranje	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
	Morfologija	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
P 46	Reakcija (%)	3(70)	0	3(70)	0	3(70)	0	3(70)	0	3(70)	0
	Intenziteta	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0
	Ozadje	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2
	Kontrastiranje	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	Morfologija	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
P 47	Reakcija (%)	3(90)	0	3(90)	0	3(90)	0	3(80)	0	3(80)	0
	Intenziteta	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0
	Ozadje	2	2	2	0	2	2	2	2	2	2
	Kontrastiranje	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	Morfologija	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
P 48	Reakcija (%)	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0	3(95)	0
	Intenziteta	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0
	Ozadje	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1
	Kontrastiranje	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0
	Morfologija	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P 49	Reakcija (%)	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0
	Intenziteta	3	0	3	0	2	0	2	0	2	0
	Ozadje	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Kontrastiranje	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1
	Morfologija	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
P 50	Reakcija (%)	3(80)		3(80)	0	3(80)	3	3(80)	0	3(80)	0
	Intenziteta	3		3	0	3	2,5	2,5	0	3	0
	Ozadje	2		2	1	2	2	2	2	1	1
	Kontrastiranje	0		0	1	1	1	1	1	1	1
	Morfologija	1		1	1	1	1	1	1	0	0
P 51	Reakcija (%)	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0
	Intenziteta	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0
	Ozadje	1	1	2	1	2	1	2	1	2	1
	Kontrastiranje	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Morfologija	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
P 52	Reakcija (%)	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0
	Intenziteta	2	0	2	0	3	0	3	0	3	0
	Ozadje	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Kontrastiranje	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0
	Morfologija	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
P 53	Reakcija (%)	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0	3(100)	0
	Intenziteta	2,5	0	2,5	0	2,5	0	2,5	0	2,5	0
	Ozadje	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Kontrastiranje	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Morfologija	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0

Reakcijo smo ocenili z vrednostmi 0 - 3, v oklepaju so podani še procenti reakcije.