

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEJA KUKOVEC

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM
LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEJA KUKOVEC

MAGISTRSKA NALOGA

**IZRAŽANJE BILITRANSLOKAZE V BIOPTIČNIH VZORCIH
RAZLIČNIH STADIJEV RAKA DEBELEGA ČREVESA IN
DANKE**

**BILITRANSLOCASE EXPRESSION IN BIOPTIC SAMPLES
OF DIFFERENT STAGES OF COLON AND RECTUM
CANCER**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM
LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Matjaža Jerasa, mag.farm. in somentorja doc.dr. Uroša Rajčevića, dr.vet.med..

Vzorce monoklonskih protiteles proti trem peptidom bilitranslokaze smo dobili na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino (pripravili so jih v Službi za razvoj in raziskave).

Imunohistokemijska barvanja, mikroskopiranje in ocenjevanje preparatov smo izvedli v Splošni bolnišnici Izola.

Zahvala

Iskreno bi se rada zahvalila svojemu mentorju izr. prof. dr. Matjažu Jerasu, mag. farm. za možnost izdelave magistrske naloge, za pomoč pri pisanju naloge in za strokovnen pregled njene vsebine.

Še posebej se zahvaljujem somentorju doc. dr. Urošu Rajčeviću, dr. vet. med. za potrpežljivost, nasvete in vso strokovno pomoč pri delu v laboratoriju ter pisanju naloge.

Iskreno se zahvaljujem staršem, sestri, partnerju in prijateljem, ker so mi stali ob strani, me spodbujali in mi bili v podporo v času študija ter pri pisanju magistrske naloge.

Prav tako se zahvaljujem vsem sodelavkam in sodelavcem za nadomeščanja v času študija, spodbudo in razumevanje ter vodji Vivijani Snoj, dr. med., za spodbudo in strokovno pomoč pri ocenjevanju preparatov.

Prav tako bi se rada zahvalila vodstvu Splošne bolnišnice Izola, ki mi je omogočilo opravljanje praktičnega dela v laboratoriju za Dejavnost patologije in citologije.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm. in somentorja doc. dr. Uroša Rajčevića, dr. vet. med.

Člani komisije za zagovor in oceno magistrske naloge:

Predsednica: izr. prof. dr. Mojca Kerec Kos

Mentor: izr. prof. dr. Matjaž Jeras

Somentor: doc. dr. Uroš Rajčević

Član: doc. dr. Žiga Jakopin

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	III
KAZALO SLIK	VI
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO GRAFOV	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV	IX
POVZETEK	X
ABSTRACT	XI
1. UVOD	1
1.1. IMUNOHISTOKEMIJA	1
1.2. DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA IHK	2
1.2.1. Predanalitični dejavniki	3
1.2.2. Analitični dejavniki	5
1.2.3. Postanalitični dejavniki	9
1.3. BILITRANSLOKAZA IN PRIDOBIVANJE MONOKLONSKIH PROTITELES PROTI BILITRANSLOKAZI	10
2. NAČRT ZA DELO IN DELOVNA HIPOTEZA	12
3. BOLNIKI, MATERIALI IN METODE	13
3.1. FIKSACIJA IN PREPOJITEV TKIVA S PARAFINOM	13
3.2. IZDELAVA HISTOLOŠKIH PREPARATOV	14
3.3. BARVANJE HISTOLOŠKIH PREPARATOV Z METODO HEMATOKSILIN- EOZIN IN MIKROSKOPSKI PREGLED	15
3.4. PRIPRAVA HISTOLOŠKIH PREPARATOV ZA TESTIRANJE	15
3.5. UPORABLJENI REAGENTI, PUFERSKE RAZTOPINE IN BARVILA	16
3.5.1. Priprava koncentrirane in delovne raztopine fosfatnega pufra	16
3.5.2. Priprava 10% in 0,1% raztopine proteaze v fosfatnem pufru (PBS)	17
3.5.3. Priprava raztopin 0,1 M citronske kisline, 0,1 M natrijevega citrata in citratnega pufra s pH=6	18
3.5.4. Priprava pufra Tris-EDTA s pH=9	18
3.5.5. Priprava raztopine kromogena DAB (3,3'-diaminobenzidin)	18
3.5.6. Priprava Mayerjevega hematoksilina	19
3.5.7. Priprava pufra Scott	19
3.6. IMUNOHISTOKEMIČNA METODA, KI TEMELJI NA POLIMERNI VERIGI IZ DEKSTRANA	19

3.7. POSTOPEK IMUNOHISTOKEMIČNEGA TESTIRANJA	21
3.8. TESTIRANJE POSTOPKA PREDOBDELAVE IN UPORABLJENE KONTROLE.....	23
3.8.1. Načrt testiranja predobdelave tkivnih preparatov v pufru Tris-EDTA.....	24
3.8.2. Načrt testiranja predobdelave tkivnih preparatov v citratnem pufru.....	24
3.8.3. Načrt testiranja predobdelave tkivnih preparatov v fosfatnem pufru s proteazo	25
3.9. TESTIRANJE PROTITELES NA TKIVIH RAZLIČNIH STADIJEV RAKA DEBELEGA ČREVESA IN DANKE (DČD) TER UPORABLJENE KONTROLE	25
3.9.1. Načrt testiranja detekcijskih protiteles na tkivih raka DČD stadija I	26
3.9.2. Načrt testiranja detekcijskih protiteles na tkivih raka DČD stadija II.....	27
3.9.3. Načrt testiranja detekcijskih protiteles na tkivih raka DČD stadija III.....	28
3.9.4. Načrt testiranja detekcijskih protiteles na tkivih raka DČD stadija IV	29
3.10. OCENJEVANJE PREPARATOV	30
4. REZULTATI	31
4.1. REZULTATI TESTIRANJA PREDOBDELAVE TKIVNIH PREPARATOV V PUFRU Tris-EDTA.....	31
4.1.1. Deset minutna predobdelava preparatov v pufru Tris-EDTA	31
4.1.2. Petnajst minutna predobdelava preparatov v pufru Tris-EDTA.....	32
4.1.3. Dvajset minutna predobdelava preparatov v pufru Tris-EDTA	33
4.1.4. Statistična obdelava podatkov testiranja predobdelave preparatov v pufru Tris-EDTA.....	35
4.2. REZULTATI TESTIRANJA PREDOBDELAVE TKIVNIH PREPARATOV V CITRATNEM PUFRU	37
4.2.1. Deset minutna predobdelava preparatov v citratnem pufru.....	37
4.2.2. Petnajst minutna predobdelava preparatov v citratnem pufru	38
4.2.3. Dvajset minutna predobdelava preparatov v citratnem pufru	39
4.2.4. Statistična obdelava podatkov testiranja predobdelave preparatov v citratnem pufru	41
4.3. REZULTATI TESTIRANJA PREDOBDELAVE TKIVNIH PREPARATOV V FOSFATNEM PUFRU S PROTEAZO	43
4.3.1. Dvajset minutna predobdelava preparatov v fosfatnem pufru s proteazo .	43
4.3.2. Statistična obdelava podatkov testiranja predobdelave preparatov v fosfatnem pufru s proteazo	44
4.4. PRIMERJAVA REZULTATOV GLEDE NA VRSTO IN TRAJANJE PREDOBDELAVE PREPARATOV	46
4.5. PRIMERJAVA PREPARATOV V IZBRANI VRSTI PREDOBDELAVE	46

4.6. REZULTATI TESTIRANJA TKIV BOLNIKOV Z RAKOM DČD STADIJA I	47
4.7. REZULTATI TESTIRANJA TKIV BOLNIKOV Z RAKOM DČD STADIJA II	48
4.8. REZULTATI TESTIRANJA TKIV BOLNIKOV Z RAKOM DČD STADIJA III	49
4.9. REZULTATI TESTIRANJA TKIV BOLNIKOV Z RAKOM DČD STADIJA IV	50
5. RAZPRAVA.....	53
6. SKLEP	60
LITERATURA	61

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz neposredne in posredne metode vezave protitelesa na antigen.....	2
Slika 2: Razkrivanje antigena.....	6
Slika 3: Inhibicija endogenih peroksidaz.....	8
Slika 4: Prikaz predvidenega modela BTL ter prikaz segmentov, proti katerim so usmerjena preiskovana protitelesa (Pt) A (MAP), B (JACK) in C (MIKY).....	10
Slika 5: Prikaz pridobivanja monoklonskih protiteles s postopkom hibridizacije limfocitov B in mielomskih celic.....	11
Slika 6: Prikaz IHK metode, ki temelji na uporabi polimerne verige - nosilca iz dekstrana.....	20
Slika 7: Po vezavi sekundarnega protitelesa in inkubaciji stekelca v kromogenu DAB poteče oksidacijska reakcija pri kateri se tvori rjav produkt.....	21
Slika 8: Primerjava mikrofotografij preparatov po 10-minutnem testiranju predobdelave v pufru Tris-EDTA.....	32
Slika 9: Primerjava mikrofotografij preparatov po 15-minutnem testiranju predobdelave v pufru Tris-EDTA.....	33
Slika 10: Primerjava mikrofotografij preparatov po 20-minutnem testiranju predobdelave v pufru Tris-EDTA.....	34
Slika 11: Primerjava mikrofotografij preparatov po uporabi protiteles Pt A-S in Pt C-S pri vseh treh različnih časih trajanja predobdelave (10, 15 in 20 minut) v pufru Tris-EDTA. Vidimo, da je intenziteta obarvanja z vsakim 5 minutnim podaljšanjem močnejša.....	34
Slika 12: Primerjava mikrofotografij preparatov po 10-minutnem testiranju predobdelave v citratnem pufru.....	38
Slika 13: Primerjava mikrofotografij preparatov po 15-minutnem testiranju predobdelave v citratnem pufru.....	39
Slika 14: Primerjava mikrofotografij preparatov po 20-minutnem testiranju predobdelave v citratnem pufru.....	40
Slika 15: Primerjava mikrofotografij preparatov po uporabi protiteles Pt C-S v vseh treh testiranjih predobdelave (10, 15 in 20 minut) v citratnem pufru. Vidimo, da se intenziteta z vsakim 5-minutnim podaljšanjem inkubacije ne spreminja bistveno.....	40
Slika 16: Primerjava mikrofotografij preparatov protiteles Pt C-S po predobdelavi preparatov v pufru Tris-EDTA in citratnem pufru.....	40
Slika 17: Primerjava mikrofotografij preparatov po 20-minutnem testiranju predobdelave v fosfatnem pufru s proteazo.....	44
Slika 18: Primerjava mikrofotografij preparatov po uporabi različnih vrst protiteles v okviru najbolje ocenjene predobdelave, to je 15 minut v pufru Tris-EDTA.....	46
Slika 19: Prikaz IHK reakcij na prisotnost BTL na preparatih rakavih tkiv stadijev I, II, III in IV ter na tkivnih preparatih zdravega črevesja.....	52

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Predanalitični dejavniki, ki vplivajo na IHK.....	5
Preglednica II: Postopek prepojitve črevesnega tkiva s parafinom v tkivnem procesorju.....	14
Preglednica III: Postopek IHK testiranja.....	22
Preglednica IV: Načrt testiranja predobdelave tkivnih preparatov v pufru Tris-EDTA.....	24
Preglednica V: Načrt testiranja predobdelave tkivnih preparatov v citratnem pufru.....	24
Preglednica VI: Načrt testiranja predobdelave tkivnih preparatov v fosfatnem pufru s proteazo.....	25
Preglednica VII: Načrt testiranja protiteles na tkivih raka DČD stadija I.....	26
Preglednica VIII: Načrt testiranja protiteles na tkivih raka DČD stadija II.....	27
Preglednica IX: Načrt testiranja protiteles na tkivih raka DČD stadija III.....	28
Preglednica X: Načrt testiranja protiteles na tkivih raka DČD stadija IV.....	29
Preglednica XI: Prikaz rezultatov testiranja 10-minutne predobdelave preparatov v pufru Tris-EDTA.....	31
Preglednica XII: Prikaz rezultatov testiranja 15-minutne predobdelave preparatov v pufru Tris-EDTA.....	32
Preglednica XIII: Prikaz rezultatov testiranja 20-minutne predobdelave preparatov v pufru Tris-EDTA.....	33
Preglednica XIV: Prikaz rezultatov testiranja 10-minutne predobdelave preparatov v citratnem pufru.....	37
Preglednica XV: Prikaz rezultatov testiranja 15-minutne predobdelave preparatov v citratnem pufru.....	38
Preglednica XVI: Prikaz rezultatov testiranja 20-minutne predobdelave preparatov v citratnem pufru.....	39
Preglednica XVII: Prikaz rezultatov testiranja 20-minutne predobdelave preparatov v fosfatnem pufru s proteazo.....	43
Preglednica XVIII: Prikaz rezultatov testiranja na tkivnih vzorcih raka DČD stadija I.....	47
Preglednica XIX: Prikaz rezultatov testiranja na tkivnih vzorcih raka DČD stadija II.....	48
Preglednica XX: Prikaz rezultatov testiranja na tkivnih vzorcih raka DČD stadija III.....	49
Preglednica XXI: Prikaz rezultatov testiranja na tkivnih vzorcih raka DČD stadija IV.....	50

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Prikaz median intenzitet reakcij za posamezna protitelesa pri testiranjih 10-, 15- in 20-minutne predobdelave preparatov v pufru Tris-EDTA.....	35
Graf 2: Prikaz median odstotkov reakcij oz. % obarvanega tkiva v preparatih za posamezna protitelesa pri testiranjih 10-, 15- in 20-minutne predobdelave preparatov v pufru Tris-EDTA.....	35
Graf 3: Prikaz median ozadij reakcij za posamezna protitelesa pri testiranju 10-, 15- in 20-minutne predobdelave preparatov v pufru Tris-EDTA.....	36
Graf 4: Prikaz median intenzitet reakcij za posamezna protitelesa pri testiranjih 10-, 15- in 20-minutne predobdelave preparatov v citratnem pufru.....	41
Graf 5: Prikaz median odstotkov reakcij oz. % obarvanega tkiva v preparatih za posamezna protitelesa pri testiranju 10-, 15- in 20-minutne predobdelave preparatov v citratnem pufru.....	42
Graf 6: Prikaz median ozadij reakcij za posamezna protitelesa pri testiranju 10-, 15- in 20-minutne predobdelave preparatov v citratnem pufru.....	42
Graf 7: Prikaz median intenzitet reakcij za posamezna protitelesa pri testiranju 20-minutne predobdelave preparatov v fosfatnem pufru s proteazo.....	44
Graf 8: Prikaz median odstotkov reakcij oz. % obarvanega tkiva v preparatih za posamezna protitelesa pri testiranju 20-minutne predobdelave preparatov v fosfatnem pufru s proteazo.....	45
Graf 9: Prikaz median ozadij reakcij za posamezna protitelesa pri testiranju 20-minutne predobdelave preparatov v fosfatnem pufru s proteazo.....	45

SEZNAM OKRAJŠAV

Tris-EDTA - trometamol in etilendiamintetraocetna kislina

IHK - imunohistokemija

IHK barvanje - imunohistokemično barvanje

RNA- ribonukleinska kislina

DNA - deoksiribonukleinska kislina

MIB1 - klon protitelesa za dokazovanje antiga Ki-67

ER - estrogenski receptorji

HMB-45 - klon protitelesa za dokazovanje melanosoma

NaCl - natrijev klorid

PBS - izotonični fosfatni pufer (ang. Phosphate Buffered Saline)

HRP - hrenova peroksidaza

DAB - diaminobenzidin, reagent za vizualizacijo antigenov v tkivu

H₂O₂ - vodikov peroksid

H₂O - voda

BTL - bilitranslokaza

ZTM - Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino

Pt - protitelo

Pt A - protitelo A (MAP)

Pt B - protitelo B (Jack)

Pt C - protitelo C (Miky)

DČD - debelo čревo in danka

Pt A-S - protitelo A v supernatantu

Pt A-P - prečiščeno protitelo A

Pt B-S - protitelo B v supernatantu

Pt C-S - protitelo C v supernatantu

SBI - Splošna bolnišnica Izola

EIA - encimsko imunski testi (ang. Enzyme Immune Assay)

IgM - imunoglobulin razreda M

POVZETEK

Osnovni cilj magistrske naloge je bil z uporabo imunohistokemije ugotoviti razlike v izražanju membranskega proteina in potencialnega tumorskega označevalca bilitranslokaze na bioptičnih vzorcih normalnega (zdravega) tkiva in tkiv različnih stadijev raka na debelem črevesu in danki. Bilitranslokaza je membranski protein, ki služi kot prenašalec organskih anionov. Najdemo ga v membranah jetrnih celic kjer sodeluje pri prenosu bilirubina iz krvi vanje in v drugih tkivih, kot so: žilni endotelij, absorpcijski (želodčni ter črevesni) ter ekskretorni (ledvični) epitelij. Odkrili so, da se bilitranslokaza izraža tudi v rakastih celicah ledvic in v celični liniji raka debelega črevesa Caco-2. Uporabili smo monoklonska protitelesa proti trem peptidom (protitelo A, protitelo B in protitelo C), izbranih na osnovi modela primarnega zaporedja bilitranslokaze, ki so jih pripravili v Službi za razvoj in raziskave, Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino. Ker struktura bilitranslokaze še ni v celoti poznana, so monoklonska protitelesa na osnovi proteinskega modela edino biokemijsko orodje za njegovo raziskovanje. Izmed treh testiranih protiteles se je kot najboljše izkazalo protitelo C, kot najslabše pa protitelo B. Protitelo B namreč ni dalo nobene reakcije, zato ni primerno za uporabo v imunohistokemičnih metodah. S protitelesom C smo dobili najlepše rezultate po 15 minutni predobdelavi preparatov v pufru Tris-EDTA, zato smo te pogoje uporabili v vseh nadaljnjih testiranjih na tkivnih rezinah zdravih in tkivnih rezinah oseb z rakom debelega črevesa in danke. Tako na zdravem kot rakastem tkivu je bila intenziteta reakcij močna, obarvala pa se je večina tkiva. Na podlagi rezultatov smo prišli do zaključka, da ni razlik v izražanju bilitranslokaze na zdravem tkivu in tkivih različnih stadijev raka debelega črevesa in danke. Zaenkrat torej ne moremo trditi, da je protein bilitranslokaza primeren oz. pomemben za diagnostiko in odkrivanje ter razvoj proti njemu usmerjenih zdravil za zdravljenje raka debelega črevesa in danke.

Ključne besede: bilitranslokaza, imunohistokemija, tkivne rezne, rak debelega črevesa in danke

ABSTRACT

The main purpose of our thesis was to use immunohistochemistry to study the differences in expression of a membrane protein and potential tumor marker bilitranslocase on biptic samples of normal (healthy) tissue, as well as tissues taken from different stages of colorectal cancer. Bilitranslocase is a membrane protein that serves as an organic anion transporter. It can be found in membranes of liver cells, where it participates in the transfer of bilirubin from blood, as well as in other tissues, like endothelium of blood vessels, and absorptive (stomach and colon) or excretory (kidney) epithelium. Bilitranslocase has also been discovered in kidney cancer cells and the Caco-2 colon cancer cell line. We used monoclonal antibodies against three peptides (antibody A, antibody B and antibody C), prepared by the R&D service at the Blood Transfusion Centre of Slovenia, that were chosen according to the primary sequence model of bilitranslocase. As the structure of bilitranslocase is not fully known yet, monoclonal antibodies based on the protein model are currently the only available biochemical research tool. Among the three antibodies tested, antibody C proved to be the most useful, while the antibody B produced no reaction whatsoever and is thus not suitable for immunohistochemistry. With the antibody C we got the best results when the slides were pretreated for 15 minutes in Tris-EDTA buffer, therefore we used these conditions in all subsequent testings both, on healthy and colorectal cancer patient' tissue sections. Reaction intensities were good in both, healthy and cancerous tissue, as most of the preparations were coloured. We conclude that there are no differences in the expression of bilitranslocase in healthy tissue and tissue samples of different stages of colorectal cancer. However we cannot yet proclaim bilitranslocase to be suitable, i.e. important for detection diagnostics, prognostics and treatment monitoring of colorectal cancer.

Key words: bilitranslocase, immunohistochemistry, tissue slices, colorectal cancer

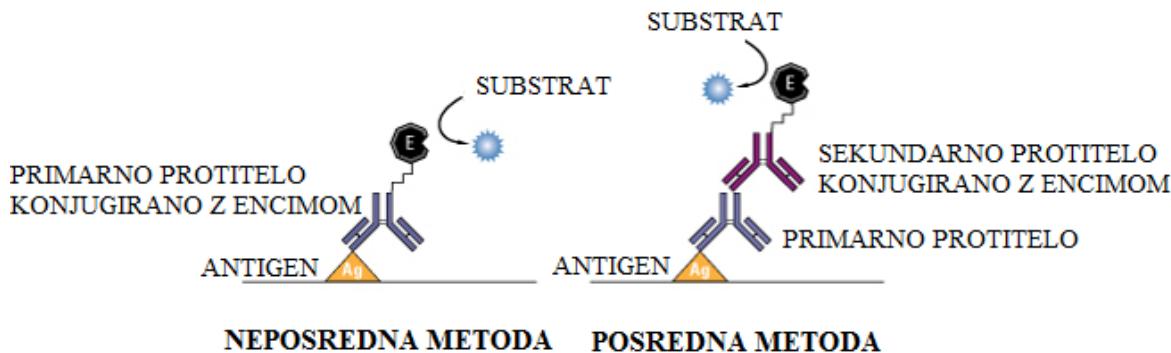
1. UVOD

V patologiji se bolezni kažejo kot morfološke in strukturne spremembe celic oziroma tkiv, ki jih preučujemo z metodami histopatologije. Strukturne spremembe so lahko vidne že s prostim očesom, tiste, ki so prostim očesom nevidne pa opazujemo mikroskopsko. Opazovanje tovrstnih sprememb pomaga patologu prepoznati in določiti vrsto bolezni ter tako postaviti patološko diagnozo. Morfološke spremembe celic in tkiv pogosto vodijo v njihove funkcionalne spremembe, s tem pa lahko pride tudi do sprememb klinične slike. Povzročajo lahko motnje normalnih funkcij organov, kar vpliva na klinične značilnosti (simptomi), potek in napoved bolezni (1). Histopatološka diagnoza vpliva na izbiro prave terapije in napoveduje potek bolezni. Pri preučevanju tkivnih vzorcev si pomagamo z različnimi tehnikami (2). To so histopatološke, citopatološke, hematopatološke, mikrobiološke, biokemijske, citogenetske, molekularne in avtopsijske tehnike (1).

1.1. IMUNOHISTOKEMIJA

Imunohistokemija (IHK) je metoda za dokazovanje specifičnih antigenov v tkivu, ki temelji na zaznavanju vezave specifičnega protitelesa in antiga. Razvijati se je začela pred več kot 70 leti, ko je Coons razvil imunofluorescenčno tehniko, da bi odkril antigene na rezinah zamrznjenega tkiva. V zadnjih 90-ih letih prejšnjega stoletja je IHK začela postajati vse bolj pomembna tudi v histologiji in diagnostiki. Veliko težavo je na začetku njene uporabe predstavljalо tkivo, fiksirano v formalinu in vklopljeno v parafin, saj je bila občutljivost zaznavanja nizka. Tako se je IHK postopoma razvila od uporabe enostavnih enostopenjskih do bolj zapletenih večstopenjskih detekcijskih metod (3). Pri enostopenjskih, neposrednih metodah se na antigen veže z reportersko molekulo označeno protitelo. To je lahko konjugirano bodisi s fluorescenčnim barvilom, pri čemer vezavo antigen - protitelo zaznavamo s fluorescenčno mikroskopijo bodisi z encimom, ki katalizira spremembo dodanega substrata vobarvan produkt. Le-tega nato zaznavamo s svetlobnim mikroskopom. Pri večstopenjskih, indirektnih metodah vežemo na antigen najprej specifično, neoznačeno primarno protitelo, to vezavo pa nato zaznamo z uporabo sekundarnega protitelesa, usmerjenega proti primarnemu kot antigenu. Pogosto so sekundarna protitelesa usmerjena proti antigenu gostitelja v katerem je nastalo primarno

protitelo. Na sekundarno protitelo je v tem primeru vezana reporterska molekula (fluorokrom, encim, ipd.), ki omogoči zaznavanje vezave. Poznamo tudi druge načine zaznavanja oz. reporterske molekule (npr. kovinski ioni, itd) (4).



Slika 1: Prikaz neposredne in posredne metode vezave protitelesa na antigen; prizjeno po (5).

Vedno boljše metode IHK so sčasoma postale nepogrešljive v patohistologiji za diagnosticiranje različnih bolezni, vključno z rakiom. S pomočjo te metode danes v tkivu določamo histološke označevalce, ki so vir diagnostičnih in prognostičnih informacij (4). Tumorski označevalci so snovi, ki so proizvod malignih celic ali pa snovi, ki nastajajo v drugih, nemalignih celicah, pod vplivom delovanja malignih. Lahko gre za novo sintetizirane snovi, ki jih v normalnem organizmu ne najdemo ali pa take, ki se v normalnem organizmu nahajajo v zelo nizkih koncentracijah. Z določanjem tumorskih označevalcev si pomagamo pri diagnozi bolezni, napovedovanju njenega poteka, pri določanju njenega stadija, izbiri načina zdravljenja ter pri zgodnjem odkrivanju njene ponovitve in razširitve (6).

1.2. DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA IHK

Cilj razvoja metod IHK v diagnostiki bolezni je patologom omogočiti standardizirano, zanesljivo, ponovljivo in dosledno dokazovanje antigenov v tkivu, ob minimalnem ozadju in naravni ohranitvi strukture tkiva. Vendar pa rezultati niso vedno takšni kot bi si želeli, saj na IHK metode vplivajo številni dejavniki, ki se pričnejo že v operacijski sobi, končajo

pa z interpretacijo patologa (3, 7). Za uspešno IHK barvanje moramo biti pozorni na predanalitične, analitične in postanalitične dejavnike (7).

1.2.1. Predanalitični dejavniki

Med predanalitične dejavnike uvrščamo procese, ki se začnejo že v operacijski dvorani ob odvzemu biopsije, končajo pa s pripravo tkivnih rezin. Tkivo mora po kirurški odstranitvi prispeti v laboratorij primerno ohranjenou. Ustrezno okolje zanj pogosto predstavlja primerna količina fiksativa. Kadar se tkivo pošilja sveže, mora v laboratorij prispeti v najkrajšem možnem času (7). Med in po operaciji se namreč v tkivu začnejo pojavljati škodljivi učinki zaradi tople in hladne ishemije zato je pomembno, da tkivo čim prej fiksiramo. Fiksativ ima nalogo, da ohrani celovitost tkivnih antigenov in omeji njihovo ekstrakcijo ali difuzijo ter preprečiti njihovo premestitev med procesiranjem tkiva. Morfološke značilnosti tkiva morajo biti ohranjene tudi po vklapljanju tkiva v parafin. Primerna oz. zadostna fiksacija je temelj za uspešno IHK barvanje. Dobra fiksacija predstavlja ravnotesje med premalo in preveč fiksacije. Pri idealni fiksaciji dosežemo ravnotesje med dobro morfologijo in dobro antigensko ohranjenostjo tkiva. Premalo fiksacije ali prepozna fiksacija privede do izgube antigenskih lastnosti ali difuzije antigenov v okoliško tkivo. Idealen, univerzalen fiksativ za prikaz vseh antigenov žal še ne obstaja. Izbira fiksativa je torej odvisna od vrste vzorca in tkivnih struktur, ki jih želimo ohraniti. V histopatologiji uporabljajo koagulantne fiksative (npr. etanol) in tiste, ki povzročijo navzkrižno povezovanje proteinov (npr. formaldehid). Obe vrsti fiksativov lahko povzročita spremembe v stični konfiguraciji proteinov, zaradi česar pride do zamaskiranja antigenskih vezavnih mest (epitopov) kar lahko vpliva na vezavo detekcijskih protiteles (3). Pri fiksaciji s formaldehidom nastajajo metilenski mostički ($-\text{CH}_2-$) zaradi reakcije med karbonilnimi skupinami ($-\text{C=O}$) formalina in amino skupinami ($-\text{NH}_2$) stranskih verig proteinov. Najpogosteje pride do navzkrižnega povezovanja med glutaminom in spojinami, ki vsebujejo vodikov atom (4, 8). Večina histopatoloških laboratoriјev kot fiksativ največkrat uporabi 10% nevtralno raztopino paraformaldehida v ustreznom pufru (10% formalin), saj omogoča dobro ohranitev morfologije tudi po dolgotrajni fiksaciji, dobro ohranjenost ogljikohidratnih antigenov, zaviranje spiranja proteinov v vodi in alkoholu zaradi navzkrižnega povezovanja proteinov in je tudi ekonomičen (3). Zelo pomemben predanalitični dejavnik je tudi sledljivost vzorcev. Vsi

vzorci prispeli v laboratorij morajo dobiti identifikacijsko številko, s katero zagotovimo njihovo sledljivost, ki je predpogoj za kakovosten laboratorijski rezultat. S sledljivostjo namreč zagotovimo, da smo prepričani o tem, da smo opravili pravo preiskavo, ob pravem času, na pravem vzorcu, s pravilno interpretacijo, itd. Dodelitvi identifikacijske številke sledi makroskopski pregled in opis biopta ter vzorčenje oziroma odvzem reprezentativnih delov vzorca. Pri tem mora patolog paziti na velikost in debelino vzorcev ter čas trajanja vzorčenja. Večji in debelejši kot so vzorci, dlje časa traja, da fiksativ prodre v njihovo sredino; daljši kot je čas vzorčenja, bolj se tkivo izsušuje. Reprezentativne vzorce nato v tkivnem procesorju dokončno fiksiramo in prepojimo s parafinom - procesiramo. Po procesiranju sledi vklop tkiva v parafinski blok. Pri tem moramo biti pozorni na vrsto tkiva in na primeren način vklapljanja. Tkivo moramo vklopiti v parafin tako, da bomo pri rezanju zajeli vse želene strukture. Izbera ustreznegra parafina je prav tako pomemben dejavnik pri procesiranju in vklapljanju vzorcev (7). V Preglednici I so opisani predanalitični dejavniki, ki lahko vplivajo na IHK.

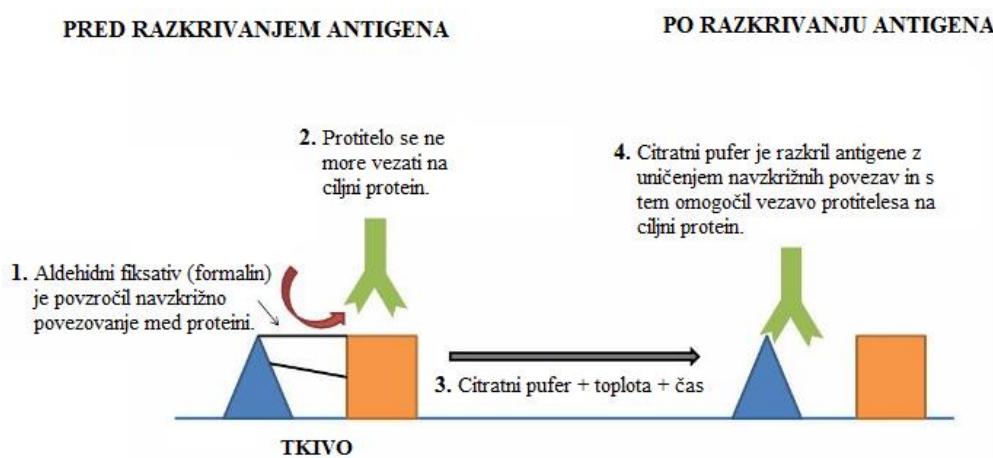
Preglednica I: Predanalitični dejavniki, ki vplivajo na IHK; povzeto po: (3).

<i>PREDANALITIČNI DEJAVNIKI</i>	<i>PROCES</i>	<i>UČINKI NA TKIVO</i>
Topla ishemija	Zapora žil med operacijo	Začetek nastanka anoksičnih poškodb
Hladna ishemija	Čas pred fiksacijo (transport, transportni medij...)	Pojav anoksičnih poškodb (razgradnja proteinov, RNA, DNA...)
Prevzemanje	Odločanje o velikosti in debelini odvzetega tkiva	Neenakomerna fiksacija večjih kosov tkiva
Fiksacija	Čas trajanja fiksacije, vrsta fiksativa, svežina tkiva in pH fiksativa	Navzkrižno povezovanje proteinov povzroči izgubo antigenosti
Procesiranje (dehidracija, bistrenje in prepojitev tkiva s parafinom)	Variiranje časa procesiranja v alkoholu, ksilenu in parafinu ter temperatura parafina	Deli tkiva, ki so bili slabo fiksirani v formalinu se fiksirajo v etanolu
Shranjevanje tkivnih blokov	Čas in pogoji shranjevanja	Učinki so neznani
Rezanje tkivnih rezin	Debelina tkivnih rezin, ostanki kapljic ter čas, ki preteče med rezanjem in barvanjem	Pri debelih rezinah se poveča intenziteta barvanja, kapljice lahko povzročijo nastanek artefaktov in izgubo antigenosti nekaterih proteinov

1.2.2. Analitični dejavniki

Zaradi fiksacije pride v tkivu do zamaskiranja antigenskega vezavnega mesta (epitopa), zato moramo pred postopki IHK antigene najprej razkriti. Pri tem imajo zelo velik pomen temperatura in čas razkrivanja ter vrednost pH raztopine za razkrivanje. Najprimernejše pogoje razkrivanja moramo določiti za vsak posamezen antigen posebej. Mason in O'Leary sta dokazala, da navzkrižno povezovanje proteinov ne povzroči opaznih sprememb v njihovi sekundarni strukturi in ugotovila, da temperatura med 70 in 90 °C

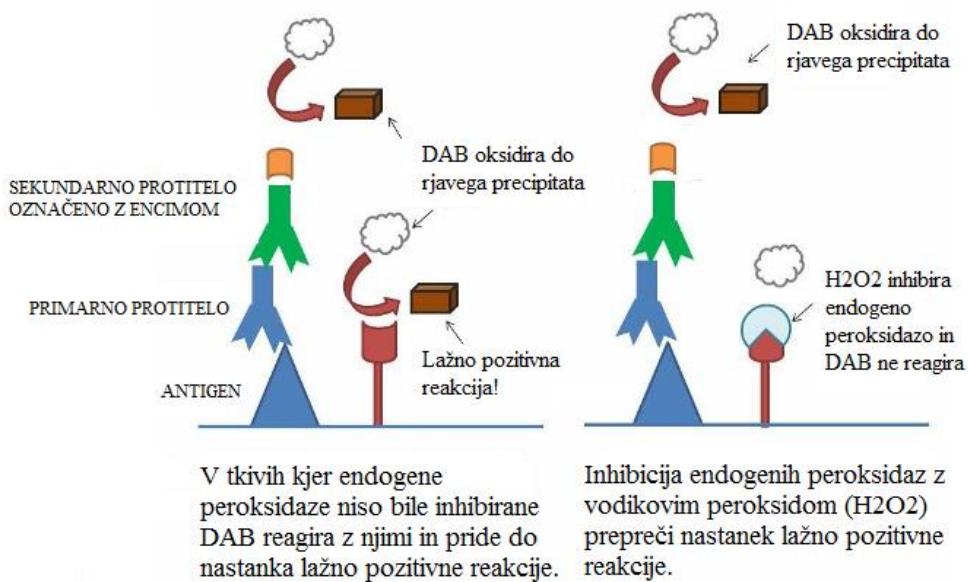
nima škodljivih učinkov na proteine, fiksirane s formalinom, kar pomeni, da so ti odpornejši na visoko temperaturo. Tako lahko sklepamo, da tehnike za razkrivanje antigenov izkoriščajo dejstvo, da navzkrižno povezovanje ščiti primarno in sekundarno strukturo proteinov pred denaturacijo med fazo ogrevanja. Z zmanjšanjem zgolj površinskih navzkrižno povezanih molekul se ohranijo antigenske lastnosti tkiva. Temperatura ogrevanja se je izkazala kot najpomembnejši dejavnik učinkovitosti razkrivanja antigenov, medtem ko sama kemijska sestava v ta namen uporabljene raztopine ni tako ključna za dobre rezultate. Poskusi so pokazali, da izpostavljanje tkivnih rezin raztopini katerega koli pufra, brez ogrevanja na rezultate vpliva le minimalno ali pa sploh ne, medtem ko njihova izpostavitev destilirani vodi, ogreti na visoko temperaturo, lahko močno izboljša IHK barvanje. Na razkrivanje nekaterih antigenov vpliva tudi pH raztopine za njihovo razkrivanje. Večina antigenov daje podobne rezultate pri njihovem razkrivanju z raztopinami z vrednostmi pH med 1 in 10. Pri razkrivanju določenih antigenov, še posebej jedrnih (npr. MIB1, ER), pa pride do dramatičnega zmanjšanja intenzitete reakcije, v kolikor uporabimo raztopine s pH vrednostmi iz sredine omenjenega območja. Zato pri teh antigenih uporabljamo raztopine z nizkimi pH vrednostmi, s katerimi dobimo optimalne rezultate. Majhna skupina antigenov (npr. HMB-45) pa daje negativne ali šibko pozitivne rezultate pri uporabi raztopin z nizkimi in odlične z uporabo raztopin z visokimi vrednostmi pH. Evers in Uylings sta prišla do zaključka, da ni pomembno katero raztopino uporabimo za razkrivanje antigenov, pomembno je le, da ima pravo vrednost pH (3).



Slika 2: Razkrivanje antiga; prirejeno po (9).

Pri metodah IHK se pogosto pojavlja tudi težava z nespecifičnim obarvanjem oziroma ozadjem. Ozadje je lahko specifično, npr. zaradi prisotnosti fibrinogena v krvnih žilah, ali nespecifično zaradi afinitete določenih tkivnih sestavin, npr. kolagena in retikulina, do protiteles uporabljenih za IHK barvanje. Glavni vzrok za pojav nespecifičnega ozadja so hidrofobne in ionske interakcije ter aktivnosti endogenih encimov. Hidrofobne interakcije so rezultat navzkrižnega povezovanja aminokislinskih ostankov proteinskih molekul zaradi vpliva fiksativa. Zmanjšanje vpliva hidrofobnih interakcij lahko dosežemo z dodajanjem npr. proteinskega inhibitorja, detergenta Triton X ali pufra z veliko vsebnostjo soli (2,5% NaCl). Nekateri priporočajo celo dodajanje proteinskega inhibitorja oz. neimunskega seruma (npr. 10% Non-Immune Rabbit Serum, Pierce™ Normal Goat Serum Control) k razredčeni raztopini primarnih protiteles. Nespecifično ozadje največkrat nastane zato, ker ima primarno protitelo afiniteto do močno nabitih skupin vezivnega tkiva (ionske interakcije). Posledično pride do lažno pozitivnega obarvanja. Najučinkovitejši način za zmanjšanje nespecifičnega ozadja je dodatek raztopine s proteini, ki ne škodijo tkivnim rezinam, in sicer še pred dodatkom primarnih protiteles. Dodani proteini nasičijo in nevtralizirajo nabite skupine, zato se primarna protitelesa lahko vežejo le na ciljni antigen. V takih raztopinah je najpogosteje prisoten neimunski serum živali iz katere izhajajo tudi sekundarna protiteesa. V praksi pa lahko uporabimo katerekoli proteine, npr. tudi kazein, pomembno je le, da ne reagirajo s primarnimi protitelesi (4).

Naslednji vzrok za pojav ozadja je prisotnost endogenih encimov, ki lahko reagirajo s substratom. Če se v tkivu nahajajo encimi podobni tistim, ki so vezani na sekundarno protitelo, lahko reagirajo s substratom in tako povzročijo težave pri interpretaciji reakcije. Da ne bi prišlo do lažno pozitivne reakcije moramo endogene encime zavreti. V primeru najpogosteje uporabljenega reporterskega proteina, to je hrenove peroksidaze, se za zaviranje endogenih peroksidaz po navadi uporablja absolutni metanol in 0,5% raztopina vodikovega peroksidisa, ki po 10 minutni inkubaciji skoraj popolnoma odpravita endogeno peroksidazno aktivnost in ne povzročita sprememb imunoreaktivnosti antiga (4).

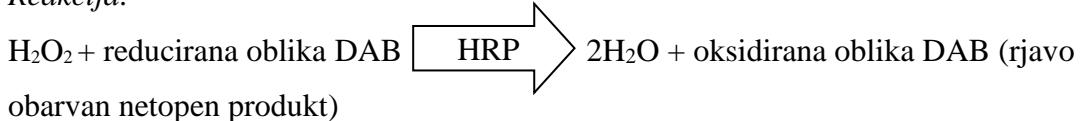


Slika 3: Inhibicija endogenih peroksidaz; prirejeno po (9).

Na IHK vpliva tudi spiranje preparatov, ki predstavlja zelo pomemben postopek po vsakem koraku IHK, razen po inhibiciji proteinov oz. blokiranju nespecifičnega ozadja z neimunskim serumom. Za spiranje rezin se najpogosteje uporablja 0,01 M raztopina fosfatnega pufra PBS s pH 7,4. Prav tako je za dobro specifičnost IHK barvanja pomemben tudi čas inkubacije primarnega protitelesa, ki je odvisen od njegove občutljivosti in koncentracije ter od kakovosti tkivne rezine. Čas inkubacije tkivne rezine in primarnega protitelesa so v nekaterih poskusih uspeli skrajšati z inkubacijo na 37°C v vlažni komori. Inkubacija v vlažni komori je priporočljiva, ne glede na temperaturo inkubacije, saj preprečuje izsuševanje tkivne rezine. Če se namreč tkivna rezina, na katero je vezano primarno protitelo izsuši, pride velikokrat do nastanka nespecifičnega ozadja. Vzrok za to je najverjetneje povečana koncentracija primarnega protitelesa na tkivni rezini. Inkubacijo lahko podaljšamo tudi čez noč, kar nam omogoča uporabo zelo razredčenih primarnih protiteles, s čimer zagotovimo odlične rezultate brez nespecifičnega ozadja. Na rezultate IHK močno vpliva tudi izbor detekcijskega sistema. Največkrat uporabljen detekcijski sistem za vizualizacijo antigenov v histopatologiji je kombinacija reporterskega encima hrenove peroksidaze (HRP), konjugirane na detekcijsko, bodisi primarno ali sekundarno protitelo in njenega substrata, diaminobenzidina (DAB) (3). Kromogen DAB je v reduciranim stanju topen, v oksidiranem pa se obori. Do oboritve in s tem vizualizacije antiga pride na mestu imunskega kompleksa antigen - protitelo. Da se DAB lahko

oksidira, potrebuje tako substrat (H_2O_2), ki služi kot oksidant kot tudi encim HRP, ki to reakcijo katalizira (10).

Reakcija:



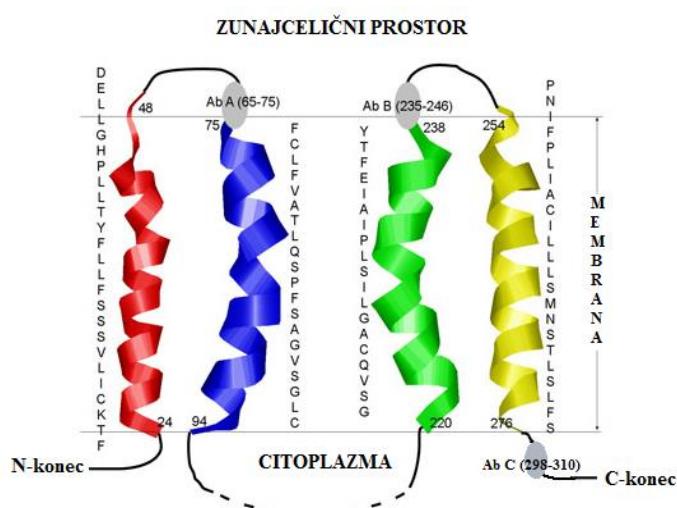
Nastali rjavo obarvan produkt je netopen v etanolu in ga lahko uporabljamo v kombinaciji z različnimi barvanji in pokrivnimi mediji (3, 10). Slaba lastnost DAB je, da škodi zdravju, zato moramo s čistim DAB delati ustrezzo zaščiteni z osebnimi zaščitnimi sredstvi. Zadnji korak pri IHK je kontrastno barvanje celičnih jeder s hematoksilinom in pokrivanje preparata s pokrivnim medijem. Kadar barvamo tkivno rezino na kateri smo že dokazovali jedrni antigen, moramo biti pri barvanju jeder s hematoksilinom previdni. Izogibati se namreč moramo prekomerni obarvanosti jeder, saj lahko v tem primeru zakrijemo obarvanje z DAB. Barvanju jeder sledi dehidracija tkivnih rezin v postopno naraščajočih koncentracijah etanola, na koncu pa še bistrenje preparata s ksilenom. Nato preparat prekrijemo s permanentnim pokrivnim medijem, ki omogoči njegovo dolgotrajno obstojnost. Pri tem moramo paziti, da nam pod krovno stekelce ne zaidejo zračni mehurčki, saj je tak del tkivne rezine težko ocenjevati pod mikroskopom, poleg tega pa zaščita preparata ni popolna (3).

1.2.3. Postanalitični dejavniki

V postanalitični fazi lahko pride do različnih nepravilnosti, npr.: napačne interpretacije izvida, predolgega časa do izdaje izvida, napake pri prepisovanju izvida ali pa celo do izgube izvida. V tej fazi patolog s pomočjo mikroskopa pregleda tkivno rezino in interpretira rezultate IHK barvanja, ob uporabi pozitivne in negativne kontrole. Rezultate oz. diagnozo sporoči zdravniku, ki je zahteval patološko preiskavo vzorca, ta se nato odloči za vrsto zdravljenja (7).

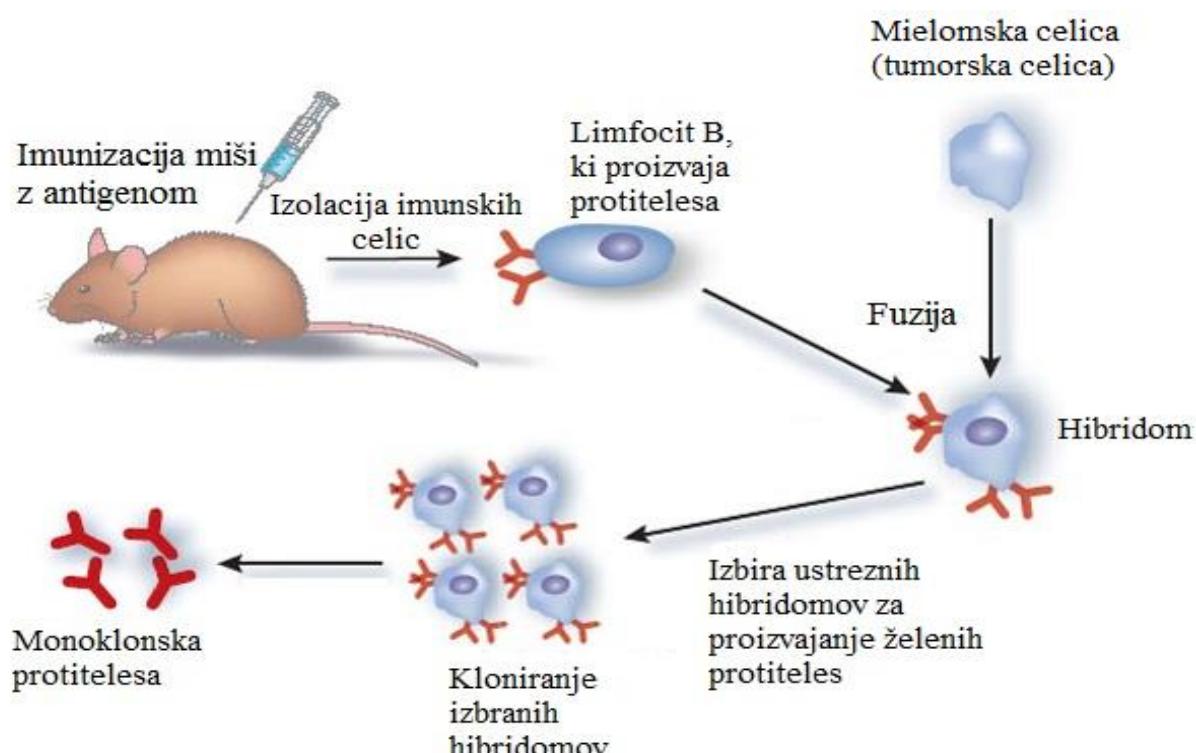
1.3. BILITRANSLOKAZA IN PRIDOBIVANJE MONOKLONSKIH PROTITELES PROTI BILITRANSLOKAZI

Bilitranslokaza (BTL) je membranski protein, ki služi kot prenašalec organskih anionov. Nahaja se v membranah jetrnih celic, kjer sodeluje pri prenosu bilirubina iz krvi v jetrne celice (11). Najdemo jo tudi v drugih tkivih kot so: žilni endotelij ter absorpcijski (želodčni in črevesni) ter ekskretorni (ledvični) epitelij (11, 12). Odkrili so tudi, da se BTL izraža v rakastih celicah ledvic in v celični liniji raka debelega črevesa Caco-2 (12, 13). Primarno strukturo človeške BTL so Battiston in sodelavci na Univerzi v Trstu predvideli z uporabo ekspresijske knjižnice komplementarne DNA podganjih jeter ter protiteles proti zaporedju BTL. Ugotovili so, da je protein BTL sestavljen iz štirih transmembranskih domen in da se N in C konec nahajata znotraj celice. Objavili so tako predvideno nukleotidno kot tudi aminokislinsko zaporedje BTL (14). V raziskovalni skupini Biomedicina na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino (ZTM) so pripravili monoklonska protitelesa (Pt) proti trem izbranim peptidom iz predvidenega primarnega zaporedja BTL. Prvo prepoznavava segment 65-EDSQGQHLSSF-75 in so ga poimenovali protitelo A (MAP), drugo protitelo B (JACK) je usmerjeno proti majhni zunajcelični domeni med aminokislinami 235-246, tretje pa so usmerili proti C-terminalnemu delu polipeptidne verige BTL in mu dali oznako C (MIKY) (15).



Slika 4: Prikaz predvidenega modela BTL ter prikaz segmentov, proti katerim so usmerjena preiskovana protitelesa (Pt) A (MAP), B (JACK) in C (MIKY); prizjeno po (16).

Omenjena monoklonska protitelesa so na ZTM pridobili s postopkom hibridizacije celic, ki sta jo Köhler in Milstein razvila že leta 1975 (15, 4). Metoda hibridomov omogoča združitev sposobnosti limfocitov B, ki proizvajajo specifična protitelesa in nesmrtnost neoplastičnih mielomskih celičnih linij. Pri združitvi obeh vrst celic dobimo hibridom, ki je nesmrten in tvori protitelesa. Izberemo tisto hibridomsko celično linijo, ki proizvaja želena protitelesa in jo kloniramo s primernim redčenjem. Tako dobimo monoklonske celične linije in posledično želena monoklonska protitelesa. Opisani postopek omogoča konstantno in zanesljivo oskrbo s čistim protitelesom znane specifičnosti (4).



Slika 5: Prikaz pridobivanja monoklonskih protiteles s postopkom hibridizacije limfocitov B in mielomskih celic; pritejeno po (17).

2. NAČRT ZA DELO IN DELOVNA HIPOTEZA

Ker se BTL izraža v črevesnem tkivu smo se odločili, da bomo z metodo IHK raziskali, ali obstaja razlika v njenem izražanju v normalnem (zdravem) tkivu in v tkivih različnih stadijev raka debelega črevesa in danke (DČD). V kolikor bi ugotovili, da obstaja razlika v izražanju BTL na dovolj veliki populaciji vzorcev, bi to lahko bilo pomembno za diagnostiko raka DČD. Ker je BTL membranski prenašalec bi lahko bilo poznavanje njegovega izražanja v različnih stadijih raka DČD pomembno tudi za odkrivanje in razvoj zdravil, ki prehajajo skozi celično membrano in bi lahko služila za zdravljenje te bolezni. Sočasno bomo preverili tudi ustreznost posameznih monoklonskih protiteles namenjenih za IHK barvanje črevesnega tkiva, ki so jih pripravili na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino.

Postopek optimizacije IHK določanja izražanja BTL na tkivnih rezinah debelega črevesa bomo začeli s testiranjem najustreznejše predobdelave tkiva. Temu pa bodo po potrebi sledila še testiranja redčenja najučinkovitejšega primarnega protitelesa, barvanja jeder z Mayerjevim hematoksilinom in trajanja posameznih stopenj IHK barvanja (inkubacija primarnega protitelesa, inkubacija sekundarnega protitelesa, inkubacija s peroksidazo in inkubacija s kromogenom DAB).

Naš namen je ugotoviti:

- katero od preizkušanih monoklonskih protiteles je najprimernejše za IHK barvanje in potencialno uporabo v diagnostične namene.
- optimalen postopek oz. kateri pogoji so najprimernejši za IHK določanje izražanja BTL.
- ali obstajajo razlike v izražanju BTL na normalnem (zdravem) tkivu in v tkivih bolnikov z rakom DČD, določene z uporabo IHK metode.

3. BOLNIKI, MATERIALI IN METODE

V okviru magistrske naloge smo testirali monoklonska protitelesa z oznakami Pt A-S, Pt A-P, Pt B-S in Pt C-S proti trem peptidom, izbranim na osnovi modela primarnega zaporedja BTL, ki so jih pripravili v raziskovalni skupini Biomedicina na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino (ZTM) (15). Protitelesa so bila neočiščena v kompletnem celičnem gojišču oz. supernatantu, njihova začetna koncentracija pa je bila neznana. Le protitelo proti peptidu A so pripravili tudi v očiščeni in koncentrirani obliki z začetno koncentracijo 1mg/ml. V okviru magistrske naloge smo želeli optimizirati postopek IHK za primerjalno določanje izražanja BTL na tkivnih rezinah zdravega tkiva debelega črevesa in tkivnih rezinah bolnikov z rakom DČD. Pred začetkom raziskave arhivskih tkiv normalnega črevesa in perspektivnih vzorcev bolnikov z rakom DČD smo pridobili pozitivno mnenje Komisije RS za medicinsko etiko (0120-415/2015-2; KME 78/10/15; 26. oktober 2015).

3.1. FIKSACIJA IN PREPOJITEV TKIVA S PARAFINOM

Kirurško odstranjene dele debelega črevesa so na oddelek za Dejavnost patologije in citologije Splošne bolnišnice Izola (SBI) poslali nefiksirane, takoj po odstranitvi. Patologinja je črevo pregledala in pretipala, da bi ugotovila kje se nahaja tumor. Nato je črevo prerezala s škarjami podolgem tako, da je tumor ostal cel. Odvzeto črevesno tkivo smo razpeli, ga z iglami pričvrstili na stiropor in zalili z 10% formalinom. Razprtje vzorca črevesa, ko je še sveže, je pomembno, ker fiksativ potrebuje določen čas, da prodre v notranjost tkiva. Po dveh dneh fiksiranja je patologinja odvzela reprezentativne vzorce črevesnega biopta, med katerimi so bili tako koščki rakavega tkiva kot tudi koščki tkiva zdravega dela črevesne sluznice. Odvzete vzorce smo dokončno fiksirali in prepojili s parafinom oz. jih procesirali (Preglednica II) v tkivnem procesorju (Tissue Processor ASP 6025, Leica). V tkivnem procesorju smo tkivo najprej prepojili z 10% formalinom. Temu je sledila dehidracija tkiva z redčitvami etanolov v naraščajočih koncentracijah od 58% do 99,8% (Sigma-Aldrich), bistrenje s ksilenom (Sigma-Aldrich) in prepojitev tkiva s parafinom (Paraplast Tissue Embedding Medium, McCormick Scientific). Nato smo tkivo

vklopili v parafin s pomočjo sistema za vklapljanje (Tissue Embedding System TBS88, Medite) in tako dobili trajne tkivne parafinske bloke z vzorci tkiv debelega črevesa.

Preglednica II: Postopek prepojitve črevesnega tkiva s parafinom v tkivnem procesorju.

REAGENT	ČAS (min)	TEMPERATURA (°C)	VAKUUM
10% formalin	60	37	/
Procesirna voda	2	/	/
70% etanol	40	45	/
80% etanol	40	45	/
96% etanol	40	45	/
100% etanol	60	45	/
100% etanol	60	45	/
100% etanol	60	45	/
Ksilen	90	45	/
Ksilen	90	45	/
Ksilen	90	45	/
Parafin	90	60	vakuum
Parafin	90	60	vakuum
Parafin	90	60	vakuum

3.2. IZDELAVA HISTOLOŠKIH PREPARATOV

Ko imamo pripravljen parafinski blok, sledi izdelava histološkega preparata. Tkivni parafinski blok smo ohladili na hladilni plošči (Cooling plate 4100, PFM MEDICAL) in na rotacijskem mikrotomu (Finesse ME+ Microtome, Thermo Scientific) odrezali 4 µm debele tkivne rezine. Hlajenje bloka je potrebno zato, da se parafin čim bolj strdi kar omogoča rezanje ustrezno tankih tkivnih rezin. Če je tkivni parafinski blok premalo ohlajen, je rezanje tankih tkivnih rezin nemogoče, saj se pri tem gubajo. Tkivne rezine smo nato s pomočjo čopiča prenesli v vodno kopel (Wasserbad 177, Bio Optica), ogreto na 48 °C. Na površini vode so se tkivne rezine raztegnile in zravnale, nato pa smo jih ujeli na predmetna stekelca (Microscope Slides, Marienfeld), označena z ustreznimi identifikacijskimi številkami vzorcev in jih vstavili v nosilec za barvanje. Neobarvane

histološke preparate smo za eno uro prenesli v termostat (WTC binder, Tip 17053099003120) na 72°C, da so se posušili. Tako smo odstranili odvečno vodo oz. vodne kapljice nastale pri rezanju, s tem pa omogočili pričvrstitev rezine na površino stekelca.

3.3. BARVANJE HISTOLOŠKIH PREPARATOV Z METODO HEMATOKSILIN - EOZIN IN MIKROSKOPSKI PREGLED

Po sušenju smo preparate reprezentativnih vzorcev prenesli v avtomatski barvalnik (ST 5020 Stainer, Leica) in jih pobarvali s hematoksilin - eozinom. Hematoksilin obarva jedra, eozin pa citoplazmo celic. Tako lahko z mikroskopskim pregledom prepoznavamo posamezne strukture tkiva. Po barvanju smo preparate pokrili s pokrivnim medijem (Tissue Tek Glas Mounting Media, Sakura) v posebnem aparatu (CV5030 Coverslipper, Leica). Pokrivni medij zaščiti tkivno rezino pred mehanskimi poškodbami, npr. praskami in ohrani intenziteto barv. Nato smo preparate dostavili patologinji, ki jih je pogledala pod mikroskopom. Po pregledu je izbrala tkivni blok z ustreznim vzorcem tkiva zdravega dela črevesne sluznice za nadaljnje testiranje s protitelesi proti določenim segmentom BTL.

3.4. PRIPRAVA HISTOLOŠKIH PREPARATOV ZA TESTIRANJE

Ko smo izbrali ustrezen tkivni parafinski blok, smo morali z njega odrezati primerno število 4 µm tkivnih rezin za testiranje, s katerimi smo postopali tako kot smo to opisali v poglavju 3.2.. Uporabljena predmetna stekelca SuperFrost (Adhesion Slides SuperFrost Plus, Thermo Scientific) so pozitivno nabita zato se zaradi elektrostatske adhezivnosti tkivne rezine nanje močno pričvrstijo, kar je zelo pomembno, saj histološke preparate med nadaljnjjim postopkom segrevamo tudi do temperature 98°C. Histološke preparate smo sušili v termostatu (WTC binder Tip 17053099003120) eno uro in pol na 72°C in dobili histološke preparate primerne za imunohistokemična testiranja.

3.5. UPORABLJENI REAGENTI, PUFERSKE RAZTOPINE IN BARVILA

Za imunohistokemično testiranje smo uporabljali nekaj že pripravljenih reagentov proizvajalca Dako, serumov s protitelesi in pa reagente, ki smo jih morali pred testiranjem narediti sami.

System (K 5007), ki je sestavljen iz reagentov A (HRP Rabbit/Mousse (ENV)), B (Substrate Buffer) in C (DAB+chromogen x 50). V reagentu A so polimeri konjugirani s sekundarnimi protitelesi in z encimom HRP. Sekundarna protitelesa se vežejo na primarna in s tem stabilizirajo celoten polimer, konjugiran s HRP, in sicer na mestu vezave antigen - protitelo. Reagent B vsebuje vodikov peroksid (H_2O_2), ki ga pomešamo z reagentom C. Ta vsebuje kromogen DAB (3,3'-diaminobenzidin). Po dodatku te mešanice (B+C) polimeru, konjugiranem s HRP, pride do reakcije in s tem vizualizacije kompleksa antigen - protitelo. Poleg omenjenega kompleta smo uporabljali še Dako REAL Peroxidase - Blocking Solution (S2023), ki se uporablja za zaviranje endogenih peroksidaz in Dako REAL Antibody Diluent (S2022), ki je namenjen redčenju primarnih protiteles. Že pripravljene so bile tudi raztopine preiskovanih protiteles A, B in C v centrifugiranem gojišču brez celic (supernatanti) ter raztopina koncentriranih in prečiščenih protiteles A. Sami pa smo si pripravili koncentrirano in delovno raztopino fosfatnega pufra; 10% in 0,1% raztopino proteaze v fosfatnem pufru; 0,1 M citronsko kislino, 0,1 M natrijev citrat in citratni pufer; pufer Tris-EDTA; raztopino kromogena DAB; Mayerjev hematoksilin in pufer Scott. Reagente in barvila smo pripravljali po recepturah enote za Dejavnost patologije in citologije Splošne bolnišnice Izola. Opisi postopkov priprave reagentov in recepture so navedeni v nadaljevanju.

3.5.1. Priprava koncentrirane in delovne raztopine fosfatnega pufra

KONCENTRIRANA RAZTOPINA FOSFATNEGA PUFRA S pH 7,2 – 7,4:

- | | |
|---------|---|
| 4 g | kalijevega dihidrogen fosfata (Merck) |
| 28,82 g | dinatrijevega hidrogen fosfat dihidrata (Lex) |
| 4 g | kalijevega klorida (Merck) |
| 160 g | natrijevega klorida (Merck) |
| 810 ml | destilirane vode (B. Braun) |

V čašo nalijemo 100 ml destilirane vode. Vanjo dodajamo vsak reagent posebej in raztapljanje pospešimo z rahlim segrevanjem. Dinatrijev hidrogen fosfat dihidrat se težko raztaplja, zato ga v vodo dodajamo postopoma. Ko so vsi reagenti raztopljeni dodamo še preostalo destilirano vodo in osnovno raztopino pufra hranimo na sobni temperaturi. Po potrebi uravnamo pH vrednost z dodajanjem klorovodikove kisline ali natrijevega hidroksida.

DELOVNA RAZTOPINA FOSFATNEGA PUFRA (PBS):

50 ml koncentrirane raztopine fosfatnega pufra
950 ml destilirane vode (B. Braun)

3.5.2. Priprava 10% in 0,1% raztopine proteaze v fosfatnem pufru (PBS)

PRIPRAVA 10% RAZTOPINE PROTEAZE V PUFRU PBS:

1 g proteaze P-5147 (Sigma)
10 ml delovne raztopine pufra PBS

Raztopino 10% proteaze razdelimo na alikvote po 0,5 ml, ki jih do naslednje uporabe hranimo v zamrzovalniku.

PRIPRAVA 0,1% RAZTOPINE PROTEAZE V PUFRU PBS:

0,5 ml 10% raztopine proteaze v pufru PBS
50 ml delovne raztopine pufra PBS

Delovno raztopino pufra PBS segrejemo na 37-40 °C in ji dodamo 10% raztopino proteaze ter dobro premešamo. Svežo raztopino pripravimo pred vsako uporabo.

**3.5.3. Priprava raztopin 0,1 M citronske kisline, 0,1 M natrijevega citrata
in citratnega pufra s pH=6**

PRIPRAVA 0,1 M CITRONSKE KISLINE:

10,5 g citronske kisline (Merck)
500 ml destilirane vode (B. Braun)

PRIPRAVA 0,1 M NATRIJEVEGA CITRATA:

14,7 g trinatrijevega citrata dihidrata (Kemika)
500 ml destilirane vode (B. Braun)

PRIPRAVA CITRATNEGA PUFRA s pH 6:

54 ml 0,1 M citronske kisline (Merck)
246 ml 0,1 M natrijevega citrata (Kemika)
2.700 ml destilirane vode (B. Braun)

3.5.4. Priprava pufra Tris-EDTA s pH=9

2,42 g TRIS T1378 (Sigma)
0,78 g EDTA (Fluka)
2.000 ml destilirane vode (B. Braun)

3.5.5. Priprava raztopine kromogena DAB (3,3'-diaminobenzidin)

1.000 µl substratni pufer (raztopina B) Dako REAL EnVision Detection System
(Dako K5007)
20 µl kromogen DAB (raztopina C) Dako REAL EnVision Detection System
(Dako K5007)

3.5.6. Priprava Mayerjevega hematoksilina

4 g	hematoksilina C.I. 75290 (Merck)
100 g	kalijevega aluminijevega disulfata dodekahidrata (Merck)
0,4 g	natrijevega jodata (Merck)
2 g	citronske kisline (Merck)
100 g	kloral hidrata (Merck)
2.000 ml	destilirane vode (B. Braun)

Destilirano vodo segrejemo in v njej raztopimo hematoksilin. Dodamo kalijev aluminijev disulfat in mešamo dokler se popolnoma ne raztopi. Raztopino segrejemo do vretja, odstavimo s kuhalnika in po 5 minutah previdno dodamo natrijev jodat, citronsko kislino in kloral hidrat. Barvilo dobro premešamo in pred uporabo ohladimo na sobno temperaturo.

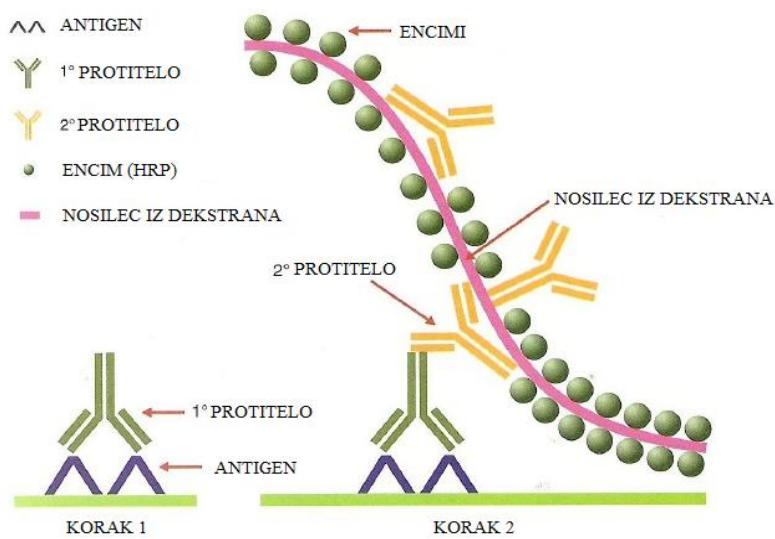
3.5.7. Priprava pufra Scott

123 g	magnezijevega sulfat heptahidrata (Lex)
7,5 g	natrijevega hidrogen karbonata (Lex)
3.000 ml	destilirane vode (B. Braun)

3.6. IMUNOHISTOKEMIČNA METODA, KI TEMELJI NA POLIMERNI VERIGI IZ DEKSTRANA

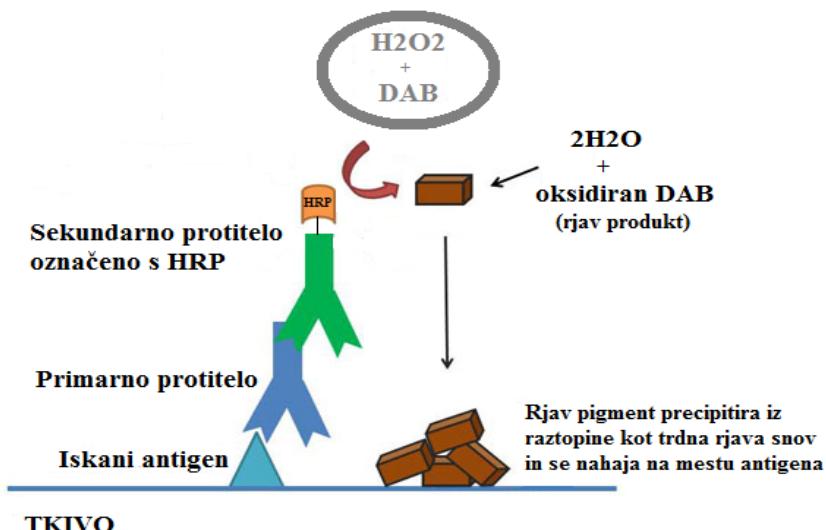
Pri IHK testiranju smo se posluževali principa encimsko imunskih testov (EIA), ki se uporablajo za detekcijo protiteles ali antigenov v vzorcih. Metode IHK temeljijo na specifični interakciji antigen - protitelo. Pri testiranju smo uporabljali posredno metodo, kjer na antigene najprej vežemo nekonjugirano specifično primarno protitelo, tega pa nato zaznamo s sekundarnim protitelesom konjugiranim z reportersko molekulo. Poznamo več vrst posrednih metod kot so npr. tehnike avidin - biotinskega kompleksa, peroksidaze-antiperoksidaze (PAP), imunofluorescenčne, ter tiste, ki temeljijo na polimerih, itd. Uporabili smo IHK metodo, pri kateri poteka zaznavanje interakcije antigen - primarno protitelo s konjugatom sekundarno protitelo - polimerna veriga iz dekstrana - HRP.

Tradicionalne metode IHK imajo številne slabosti, npr. veliko porabo časa, slabšo občutljivost zaznavanja ter težavno standardizacijo in detekcijo antigenov. Z uporabo polimernih verig iz dekstrana se lahko določenim slabostim, ki spremljajo druge tehnike, izognemo (3). Pri tej metodi na antigen najprej vežemo specifično primarno protitelo, čemur sledi vezava sekundarnega protitelesa nanj. Sekundarna protitelesa so pritrjena na nosilec, polimerno verigo iz dekstrana, na katero so pritrjene tudi molekule encima HRP (4). Nosilec iz dekstrana ima lahko nase pritrjenih do 100 molekul encima in 20 molekul sekundarnih protiteles (3).



Slika 6: Prikaz IHK metode, ki temelji na uporabi polimerne verige - nosilca iz dekstrana; prizrejeno po (18).

Po vezavi sekundarnega protitelesa tkivni preparat inkubiramo s kromogenom DAB, ki se aktivira v primeru stabilne vezave antigen - sekundarno protitelo - HRP. Encim HRP katalizira reakcijo oksidacije DAB pri kateri dobimo končni temno rjavo obarvani netopni produkt (oksidirani DAB) (3, 10).



Slika 7: Po vezavi sekundarnega protitelesa in inkubaciji stekelca v kromogenu DAB poteče oksidacijska reakcija pri kateri se tvori rjav produkt; prizjeno po (19).

Zaradi uporabe encima HRP moramo pred nanosom sekundarnega protitelesa blokirati endogene peroksidaze v vzorcu, da ne dobimo lažno pozitivnih reakcij. Metoda ima zelo dobro občutljivost, je hitra, zanesljiva in enostavna ter omogoča večje redčitve primarnega protitelesa. Lahko se uporablja tudi za dvojno IHK barvanje, ko na enem stekelcu hkrati dokazujemo dva antigena, pri čemer pa moramo uporabiti dva detekcijska sistema, ki dajeta produkta različnih barv. Metodo lahko izvajamo ročno ali pa avtomatsko, na imunobarvalnikih. Najpogosteje jo uporabljamo v patohistološki rutinski diagnostiki (4).

3.7. POSTOPEK IMUNOHISTOKEMIČNEGA TESTIRANJA

Uporabili smo postopek imunohistokemičnega barvanja (Preglednica III), ki se uporablja v Splošni bolnišnici Izola. Izvajali smo ga ročno, na tkivnih rezinah zdravega dela debelega črevesa, ki smo jih uporabili za pozitivne in nespecifične negativne kontrole, ter na tkivnih rezinah raka debelega črevesa in danke.

Preglednica III: Postopek IHK testiranja.

POSTOPEK	REAGENT	INKUBACIJA/ SPLAHOVANJE HP	Opombe
DEPARAFINIRANJE IN HIDRACIJA	Ksilen	10 minutna inkubacija	Izvajamo v kiveti.
	Absolutni etanol	3x speremo	
	96% etanol	3x speremo	
	Destilirana voda	3x speremo	
RAZKRIVANJE ANTIGENOV	Pufer s proteazo	20 minutna inkubacija	Po inkubaciji pufer s proteazo odlijemo in preparate prelijemo s hladnim pufrom PBS. Izvajamo v kiveti.
	Citratni pufer	10/15/20 minutna inkubacija	Po inkubaciji preparate pustimo v pufru in jih 15 minut ohlajamo v posodi s hladno vodo. Izvajamo v posodi s pufrom. Po ohlajanju preparate prestavimo v kiveto in jih speremo z destilirano vodo.
	Pufer Tris-EDTA	10/15/20 minutna inkubacija	
	Pufer PBS	3x speremo	Izvajamo v kiveti.
IMUNOHISTOKEMIČNO BARVANJE	Primarno protitelo	30 minutna inkubacija	Protitelesa predhodno ustrezno razredčimo. Izvajamo na posameznem preparatu.
	Pufer PBS	3x speremo	Izvajamo v kiveti.
	Raztopina za blokiranje peroksidaze	8 minutna inkubacija	Izvajamo na posameznem preparatu.
	Pufer PBS	3x speremo	Izvajamo v kiveti.
	Sekundarno protitelo	30 minutna inkubacija	Izvajamo na posameznem preparatu.
	Pufer PBS	3x speremo	Izvajamo v kiveti.
	DAB + substratni pufer	15 minutna inkubacija	Izvajamo na posameznem preparatu.
	Destilirana voda	3 x speremo	
	Mayerjev Hematoksilin	1 minutna inkubacija	
	Navadna voda	3 x speremo	
BARVANJE CELIČNIH JEDER	Scott pufer	1 minutna inkubacija	
	Navadna voda	3 x speremo	
	96% etanol	3x speremo	Izvajamo v kiveti.
	Absolutni etanol	3x speremo	
DEHIDRACIJA IN BISTRENJE	Ksilen	10 minutna inkubacija	

3.8. TESTIRANJE POSTOPKA PREDOBDELAVE IN UPORABLJENE KONTROLE

Po fiksiranju s formalinom pride v tkivu do navzkrižnih povezav med proteini, ki omogočajo ohranitev njihove primarne, sekundarne in delno tudi terciarne strukture. Posledica tega je lahko "zakritost" antigena za vezavo protiteles. To lahko popravimo s predobdelavo tkiva, ki je ključnega pomena pri IHK postopkih. Razkrivanje antigenov lahko izvedemo v pufru Tris-EDTA, citratnem pufru in pufru PBS s proteazo. Pri testiranju optimalnega postopka predobdelave smo uporabili tkivne rezine zdravega črevesa, ki so služile kot pozitivne in nespecifične negativne kontrole. Pozitivno kontrolo predstavlja tkivo, ki dokazano izraža antigen, ki ga želimo določiti in kvantificirati. Pri pozitivni kontroli so torej rezultati pričakovani, zato nam služi za kontrolo vseh korakov postopka IHK. Uporabljamo jo za prikaz pozitivne reakcije in kot primerjavo za semi kvantitativne reakcije (malo, srednje, močno pozitivno). Z njo potrjujemo vse stopnje analize, razen fiksiranja oz. procesiranja tkiva. Rezine zdravega dela črevesa, ki smo jih uporabili za pozitivne kontrole, smo barvali s primarnimi in sekundarnimi protitelesi, pri čemer so bila slednja označena s hrenovo peroksidazo (HRP). Poznamo tudi dve vrsti negativnih kontrol. Prva je specifična in vsebuje celice oz. tkivo, ki ne izraža preiskovanega antigena, zato ni reakcije po inkubaciji s protitelesi. Pripravimo jo popolnoma enako kot pozitivno kontrolo, in jo nato inkubiramo s primarnimi in sekundarnimi protitelesi. Z njeno pomočjo zaznamo morebitne neželene navzkrižne reaktivnosti detekcijskih protiteles z ostalimi antigeni na celicah oz. celičnih komponentah. Pri našem testiranju specifične negativne kontrole nismo uporabili. Druga vrsta negativne kontrole pa je nespecifična in vsebuje tkivo s celicami oz. celičnimi komponentami, ki so enake kot tkivo ki ga testiramo. Tudi to pripravimo enako kot specifično pozitivno kontrolo s tem, da nanjo nanesemo samo diluent brez primarnih detekcijskih protiteles ali pa s protitelesi, ki so nespecifična za iskani antigen in jih redčimo tako, kot če bi uporabili specifična protitelesa. Primer je izo-tipska kontrola, ki vsebuje primarno, za antigen nespecifično protitelo, pri čemer pa je enakega izo-tipa kot specifično. S to kontrolo ovrednotimo obseg neželenega obarvanja ozadja (3). Pri testiranju postopka predobdelave smo za nespecifično negativno kontrolo uporabili rezine zdravega dela črevesa in zgolj sekundarno protitelo, označeno s HRP.

V nadaljevanju je predstavljen načrt testiranja predobdelave.

3.8.1. Načrt testiranja predobdelave tkivnih preparatov v pufru Tris-EDTA

Preglednica IV: Načrt testiranja predobdelave tkivnih preparatov v pufru Tris-EDTA.

TRAJANJE PREDOBDELAVE	VRSTA PROTITELESA				
	<i>Pt A-S</i>	<i>Pt A-P</i>	<i>Pt B-S</i>	<i>Pt C-S</i>	<i>SEKUNDARNO Pt</i>
10 minut v pufru Tris-EDTA	3x pozitivna kontrola	3x pozitivna kontrola	3x pozitivna kontrola	3x pozitivna kontrola	1x negativna kontrola
15 minut v pufru Tris-EDTA	3x pozitivna kontrola	3x pozitivna kontrola	3x pozitivna kontrola	3x pozitivna kontrola	1x negativna kontrola
20 minut v pufru Tris-EDTA	3x pozitivna kontrola	3x pozitivna kontrola	3x pozitivna kontrola	3x pozitivna kontrola	1x negativna kontrola

3.8.2. Načrt testiranja predobdelave tkivnih preparatov v citratnem pufru

Preglednica V: Načrt testiranja predobdelave tkivnih preparatov v citratnem pufru.

TRAJANJE PREDOBDELAVE	VRSTA PROTITELESA				
	<i>Pt A-S</i>	<i>Pt A-P</i>	<i>Pt B-S</i>	<i>Pt C-S</i>	<i>SEKUNDARNO Pt</i>
10 minut v citratnem pufru	3x pozitivna kontrola	3x pozitivna kontrola	3x pozitivna kontrola	3x pozitivna kontrola	1x negativna kontrola
15 minut v citratnem pufru	3x pozitivna kontrola	3x pozitivna kontrola	3x pozitivna kontrola	3x pozitivna kontrola	1x negativna kontrola
20 minut v citratnem pufru	3x pozitivna kontrola	3x pozitivna kontrola	3x pozitivna kontrola	3x pozitivna kontrola	1x negativna kontrola

3.8.3. Načrt testiranja predobdelave tkivnih preparatov v fosfatnem pufru s proteazo

Preglednica VI: Načrt testiranja predobdelave tkivnih preparatov v fosfatnem pufru s proteazo.

TRAJANJE PREDOBDELAVE	VRSTA PROTITELESA				
	<i>Pt A-S</i>	<i>Pt A-P</i>	<i>Pt B-S</i>	<i>Pt C-S</i>	<i>SEKUNDARNO Pt</i>
<i>20 minut v fosfatnem pufru s proteazo</i>	3x pozitivna kontrola	3x pozitivna kontrola	3x pozitivna kontrola	3x pozitivna kontrola	1x negativna kontrola

3.9. TESTIRANJE PROTITELES NA TKIVIH RAZLIČNIH STADIJEV RAKA DEBELEGA ČREVESA IN DANKE (DČD) TER UPORABLJENE KONTROLE

Primerne vzorce rakavega tkiva DČD je izbrala patologinja. Pri tem je bila pozorna na to, da so izbrani vzorci predstavljali vse štiri stadije raka in tudi različne graduse. Stadije raka namreč ločimo glede na razširjenost obolenja. Pri stadiju I je tumor omejen na črevesno sluznico, pri stadiju II prerašča v mišični sloj črevesa in v okolno maščevje, pri stadiju III pa je že zasejan v področnih bezgavkah ter za stadij IV so značilni oddaljeni zasevki ter razširjenost bolezni tudi v druge organe (20). Glede na stopnjo malignosti delimo rake DČD v gradus 1 (dobro diferencirani), gradus 2 (srednje diferencirani), gradus 3 (slabo diferencirani) in gradus 4 (nediferencirani) (21). Za testiranje smo poleg vzorcev rakavega in zdravega tkiva bolnikov uporabili tudi eno pozitivno (poglavlje 3.8.) in dve negativni kontroli. Za pozitivno in negativno kontrolo smo uporabili tkivo zdravega črevesa. Pozitivno kontrolo smo uporabljali za kontrolo vseh korakov postopka IHK, nespecifično negativno kontrolo pa za zaznavanje neželenega obarvanja ozadja (poglavlje 3.8.). Vse vzorce rakavega in zdravega tkiva bolnikov ter pozitivne kontrole smo testirali z monoklonskim protitelesom, ki se je izkazalo kot najprimernejše za IHK barvanje in uporabo v diagnostične namene. Uporabljali smo dve vrsti nespecifičnih negativnih

kontrol. Pri prvi nismo uporabili primarnih protiteles, ampak le sekundarna. Pri drugi vrsti negativnih kontrol, t.i. izotipskih kontrolah, pa smo namesto primarnih uporabili izotipska protitelesa, ki so bila enakega razreda kot primarna, a so prepoznavala nek drug antigen (protitelesa proti IgM krvne skupine A). Pri vseh testiranjih smo uporabili pogoje, ki so se izkazali kot najprimernejši za določanje BTL.

3.9.1. Načrt testiranja detekcijskih protiteles na tkivih raka DČD stadija I

Preglednica VII: Načrt testiranja protiteles na tkivih raka DČD stadija I.

ŠTEVILKA BOLNIKA/ VRSTA KONTROLE	STADIJ BOLEZNI	GRADUS BOLEZNI	VRSTA TKIVNE REZINE
Bolnik 1	I	G1	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 2	I	G1	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 3	I	G1	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 4	I	G1	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 5	I	G2	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 6	I	G2	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 7	I	G2	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 8	I	G2	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 9	I	G2	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Pozitivna kontrola 1	/	/	1 x tkivo zdravega črevesa
Negativna kontrola 1	/	/	1 x tkivo zdravega črevesa
Izotipska kontrola 1	/	/	1 x tkivo zdravega črevesa

3.9.2. Načrt testiranja detekcijskih protiteles na tkivih raka DČD stadija II

Preglednica VIII: Načrt testiranja protiteles na tkivih raka DČD stadija II.

ŠTEVILKA BOLNIKA/ VRSTA KONTROLE	STADIJ BOLEZNI	GRADUS BOLEZNI	VRSTA TKIVNE REZINE
Bolnik 10	II	G1	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 11	II	G1	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 12	II	G1	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 13	II	G2	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 14	II	G2	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 15	II	G2	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 16	II	G2	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 17	II	G3	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 18	II	G3	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 19	II	G3	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Pozitivna kontrola 2	/	/	1 x tkivo zdravega črevesa
Negativna kontrola 2	/	/	1 x tkivo zdravega črevesa
Izotipska kontrola 2	/	/	1 x tkivo zdravega črevesa

3.9.3. Načrt testiranja detekcijskih protiteles na tkivih raka DČD stadija III

Preglednica IX: Načrt testiranja protiteles na tkivih raka DČD stadija III.

ŠTEVILKA BOLNIKA/ VRSTA KONTROLE	STADIJ BOLEZNI	GRADUS BOLEZNI	VRSTA TKIVNE REZINE
Bolnik 20	III	G1	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 21	III	G1	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 22	III	G1	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 23	III	G2	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 24	III	G2	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 25	III	G2	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 26	III	G3	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 27	III	G3	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 28	III	G3	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 29	III	G3	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Pozitivna kontrola 3	/	/	1 x tkivo zdravega črevesa
Negativna kontrola 3	/	/	1 x tkivo zdravega črevesa
Izotipska kontrola 3	/	/	1 x tkivo zdravega črevesa

3.9.4. Načrt testiranja detekcijskih protiteles na tkivih raka DČD stadija IV

Preglednica X: Načrt testiranja protiteles na tkivih raka DČD stadija IV.

ŠTEVILKA BOLNIKA/ VRSTA KONTROLE	STADIJ BOLEZNI	GRADUS BOLEZNI	VRSTA TKIVNE REZINE
Bolnik 30	IV	G1	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 31	IV	G2	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 32	IV	G2	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 33	IV	G2	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 34	IV	G2	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 35	IV	G2	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 36	IV	G2	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 37	IV	G2	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 38	IV	G3	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 39	IV	G3	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Bolnik 40	IV	G3	3 x tkivo rakavega vzorca črevesa 3 x tkivo zdravega vzorca črevesa
Pozitivna kontrola 4	/	/	1 x tkivo zdravega črevesa
Negativna kontrola 4	/	/	1 x tkivo zdravega črevesa
Izotipska kontrola 4	/	/	1 x tkivo zdravega črevesa

3.10. OCENJEVANJE PREPARATOV

Pri ocenjevanju preparatov smo vrednotili intenziteto reakcije, delež obarvanega tkiva in prisotnost ozadja.

Intenziteto smo ocenjevali glede na jakost reakcije oz. obarvanost tkiva (enterocitov). Ocena - pomeni, da obarvanosti tkiva ni, ocena +, da se je pojavila šibka obarvanost, ocena ++, da je obarvanost srednje močna, ocena +++ pa, da je obarvanost zelo močna.

Pri vrednotenju odstotka reakcije smo ocenjevali na kolikšnem deležu tkiva je prišlo do reakcije oz. obarvanja. Ocena - pomeni, da se tkivo ni pobarvalo, ocena +, da se je obarvala približno do 1/3 tkiva, ocena ++, da se je obarvalo med 1/3 in 2/3 tkiva, ocena +++ pa, da so se obarvale več kot 2/3 tkiva.

Ozadje je bilo prisotno, če se je obarval del tkiva v katerem naj ne bi prišlo do specifične reakcije protiteles z antigenom (ocena nespecifičnega ozadja). Ocena - pomeni, da se ni obarvalo nič nespecifičnega tkiva, ocena +, da je v nespecifičnem tkivu prišlo do šibke reakcije in da je takega tkiva malo, ocena ++, da je v nespecifičnem tkivu prišlo do srednje močne reakcije in da je takega tkiva nekaj več, ocena +++ pa, da je v nespecifičnem tkivu prišlo do zelo močne reakcije in da je takega tkiva veliko.

Rezultate smo statistično ovrednotili tako, da smo izračunali mediane ocenjenih parametrov za posamezno protitelo in jih predstavili v obliki grafov.

Ocene smo za statistično vrednotenje primerno pretvorili, in sicer: - v vrednost 0; + v vrednost 1; ++ v vrednost 2 in +++ v vrednost 3.

4. REZULTATI

Da bi ugotovili katero od preizkušanih protiteles je najprimernejše za uporabo v diagnostične namene, smo ocenjevali intenziteto in odstotke reakcij ter ozadje.

Histološke preparate je ocenjevala patologinja Vivijana Snoj, dr.med., vodja Dejavnosti patologije in citologije SBI.

4.1. REZULTATI TESTIRANJA PREDOBDELAVE TKIVNIH PREPARATOV V PUFRU Tris-EDTA

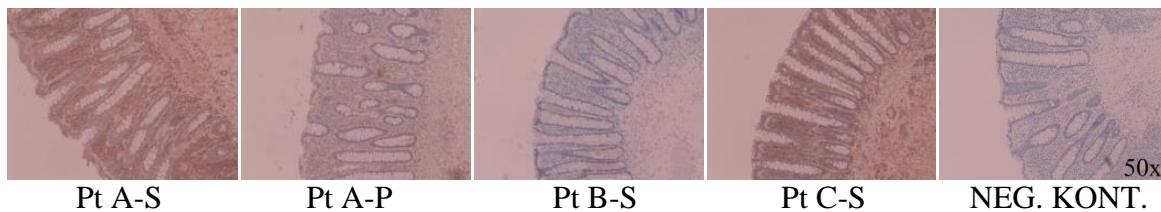
4.1.1. Deset minutna predobdelava preparatov v pufru Tris-EDTA

Preglednica XI: Prikaz rezultatov testiranja 10-minutne predobdelave preparatov v pufru Tris-EDTA.

VRSTA KONTROLE	OCENJEVALNI PARAMETER	VRSTA PROTITELESA				
		Pt A-S	Pt A-P	Pt B-S	Pt C-S	SEKUNDARNO Pt
<i>Pozitivna kontrola 1 (rezina št. 1)</i>	Intenziteta	+++	+	-	+++	/
	% reakcije	+++	+++	-	+++	/
	Ozadje	-	+	-	-	/
<i>Pozitivna kontrola 2 (rezina št. 2)</i>	Intenziteta	+++	+	-	+++	/
	% reakcije	+++	+++	-	+++	/
	Ozadje	-	+	-	-	/
<i>Pozitivna kontrola 3 (rezina št. 3)</i>	Intenziteta	+++	+	-	+++	/
	% reakcije	+++	+++	-	+++	/
	Ozadje	-	+	-	-	/
<i>Negativna kontrola</i>	Intenziteta	/	/	/	/	-
	% reakcije	/	/	/	/	-
	Ozadje	/	/	/	/	-

Iz Preglednice XI je razvidno, da so bila pri testiranju 10-minutne predobdelave preparatov v pufru Tris-EDTA najbolje ocenjena protitelesa Pt A-S in Pt C-S. Z njimi je bila reakcija močna in prisotna v vseh celicah pri čemer nismo zasledili nespecifičnih reakcij. Protitelesa Pt A-P so izzvala slabšo intenziteto obarvanosti preparatov v primerjavi s Pt A-S in Pt C-S, poleg tega pa smo opazili prisotnost šibkega ozadja. Obarvale pa so se prav

tako vse celice. Protitelo Pt B-S ni dalo nobene reakcije. Tudi v negativni kontroli ni bilo nobene reakcije.



Slika 8: Primerjava mikrofotografij preparatov po 10-minutnem testiranju predobdelave v pufru Tris-EDTA (IHK, 50 x povečava).

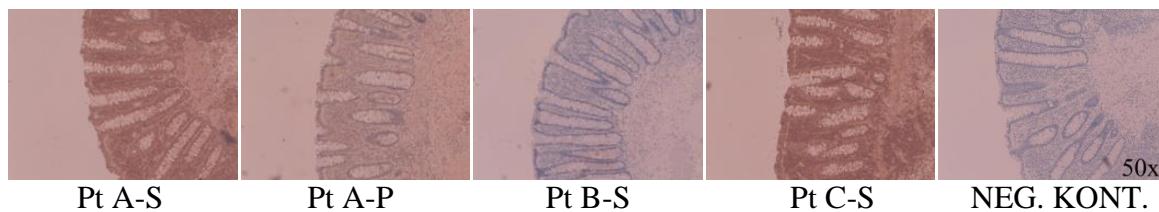
4.1.2. Petnajst minutna predobdelava preparatov v pufru Tris-EDTA

Preglednica XII: Prikaz rezultatov testiranja 15-minutne predobdelave preparatov v pufru Tris-EDTA.

VRSTA KONTROLE	OCENJEVALNI PARAMETER	VRSTA PROTITELESA				
		Pt A-S	Pt A-P	Pt B-S	Pt C-S	SEKUNDARNO Pt
<i>Pozitivna kontrola 1 (rezina št. 1)</i>	Intenziteta	+++	++	-	+++	/
	% reakcije	+++	+++	-	+++	/
	Ozadje	-	+	-	-	/
<i>Pozitivna kontrola 2 (rezina št. 2)</i>	Intenziteta	+++	++	-	+++	/
	% reakcije	+++	+++	-	+++	/
	Ozadje	-	+	-	-	/
<i>Pozitivna kontrola 3 (rezina št. 3)</i>	Intenziteta	+++	++	-	+++	/
	% reakcije	+++	+++	-	+++	/
	Ozadje	-	+	-	-	/
<i>Negativna kontrola</i>	Intenziteta	/	/	/	/	-
	% reakcije	/	/	/	/	-
	Ozadje	/	/	/	/	-

Vidimo (Preglednica XII), da so pri testiranju 15-minutne predobdelave v pufru Tris-EDTA prav tako najbolje obnesla protitelesa Pt A-S in Pt C-S. Pri uporabi obeh je bila reakcija močna in prisotna v vseh celicah, nespecifično obarvanje je bilo odsotno. Protitelesa Pt A-P so povzročila slabšo intenzitetno obarvanja kot Pt A-S in Pt C-S, a je ta bila kljub temu večja kot pri testiranju 10-minutne predobdelave v pufru Tris-EDTA. Ponovno je Pt A-P povzročalo le šibko ozadje, obarvale pa so se prav vse celice. S

protitelesi Pt B-S zopet nismo dobili nobene reakcije. Prav tako tudi pri negativni kontroli, kot smo pričakovali, nismo dobili nobene reakcije.



Slika 9: Primerjava mikrofotografij preparatov po 15-minutnem testiranju predobdelave v pufru Tris-EDTA (IHK, 50 x povečava).

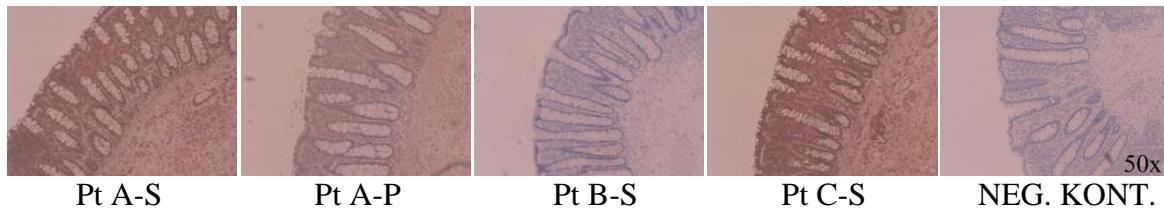
4.1.3. Dvajset minutna predobdelava preparatov v pufru Tris-EDTA

Preglednica XIII: Prikaz rezultatov testiranja 20-minutne predobdelave preparatov v pufru Tris-EDTA.

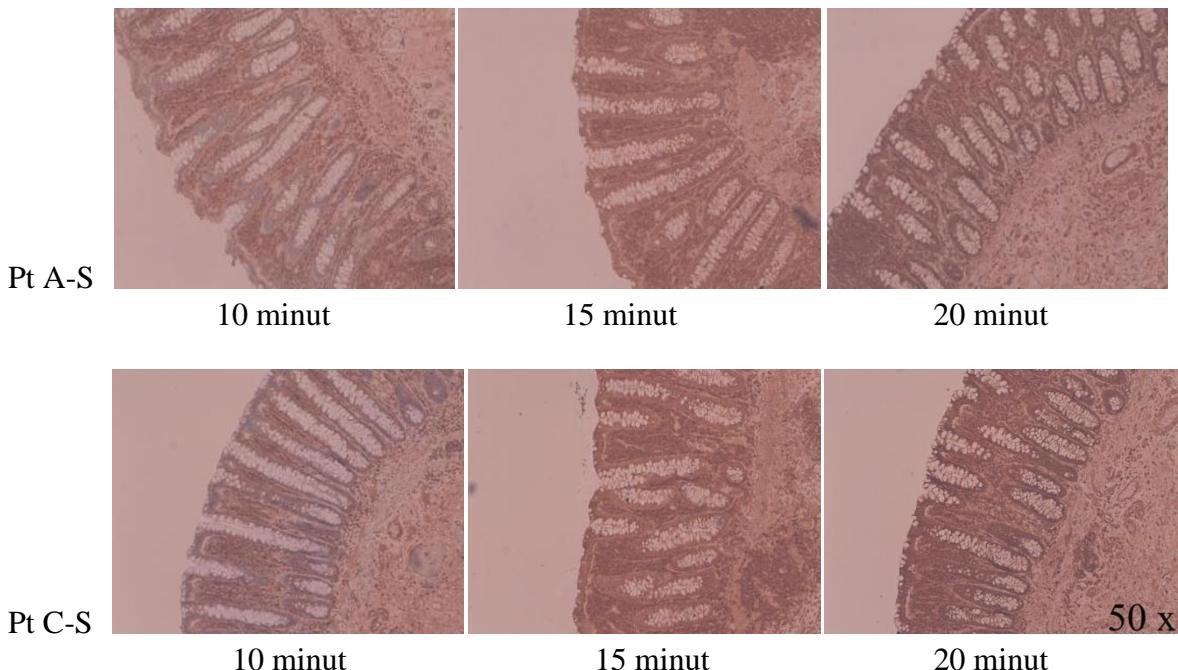
VRSTA KONTROLE	OCENJEVALNI PARAMETER	VRSTA PROTITELESA				
		Pt A-S	Pt A-P	Pt B-S	Pt C-S	SEKUNDARNO Pt
<i>Pozitivna kontrola 1 (rezina št. 1)</i>	Intenziteta	+++	++	-	+++	/
	% reakcije	+++	+++	-	+++	/
	Ozadje	-	+	-	-	/
<i>Pozitivna kontrola 2 (rezina št. 2)</i>	Intenziteta	+++	++	-	+++	/
	% reakcije	+++	+++	-	+++	/
	Ozadje	-	-	-	-	/
<i>Pozitivna kontrola 3 (rezina št. 3)</i>	Intenziteta	+++	++	-	+++	/
	% reakcije	+++	+++	-	+++	/
	Ozadje	-	+	-	-	/
<i>Negativna kontrola</i>	Intenziteta	/	/	/	/	-
	% reakcije	/	/	/	/	-
	Ozadje	/	/	/	/	-

Rezultati, navedeni v Preglednici XIII kažejo, da so bila pri testiranju 20-minutne predobdelave preparatov v pufru Tris-EDTA ponovno najbolje ocenjena protitelesa Pt A-S in Pt C-S. V obeh primerih je bila reakcija močna, prisotna v vseh celicah, nespecifičnih reakcij pa ni bilo. Opazili smo tudi, da so bile ocene pri uporabi protiteles Pt A-S in Pt C-S v vseh testiranjih predobdelave v pufru Tris-EDTA enake. Protitelesa Pt A-P so sicer izzvala slabšo intenziteto kot Pt A-S in Pt C-S, vendar pa je bila ta, enako kot pri testiranju

15-minutne predobdelave v pufru Tris-EDTA, boljša kot pri 10-minutni predobdelavi. Protitelesa Pt A-P so pri tem testiranju v dveh poskusih povzročila šibko ozadje, v enem pa ozadja ni bilo. Obarvale so se prav tako vse celice. S protitelesi Pt B-S tudi v tem primeru nismo dobili nobene reakcije. Tudi v negativni kontroli po pričakovanju nismo zabeležili nobene reakcije.

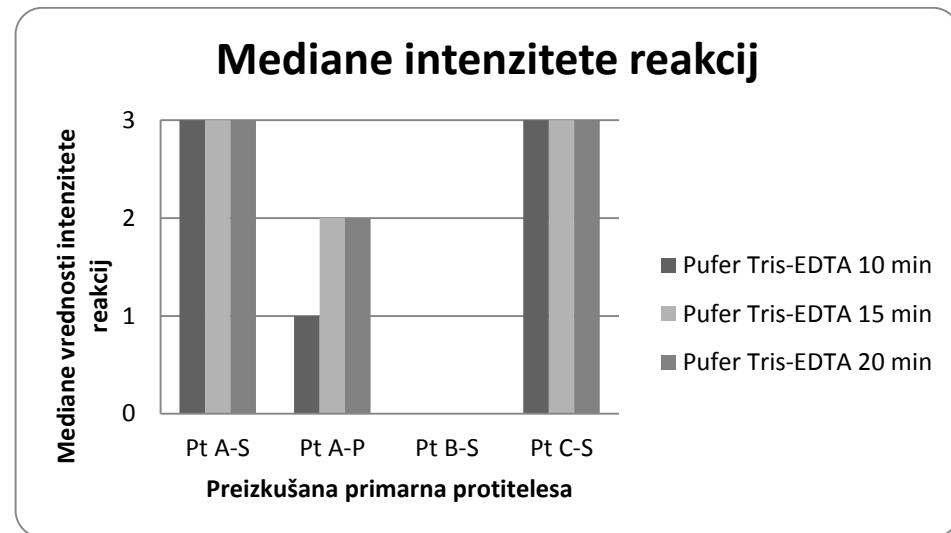


Slika 10: Primerjava mikrofotografij preparatov po 20-minutnem testiranju predobdelave v pufru Tris-EDTA (IHK, 50 x povečava).



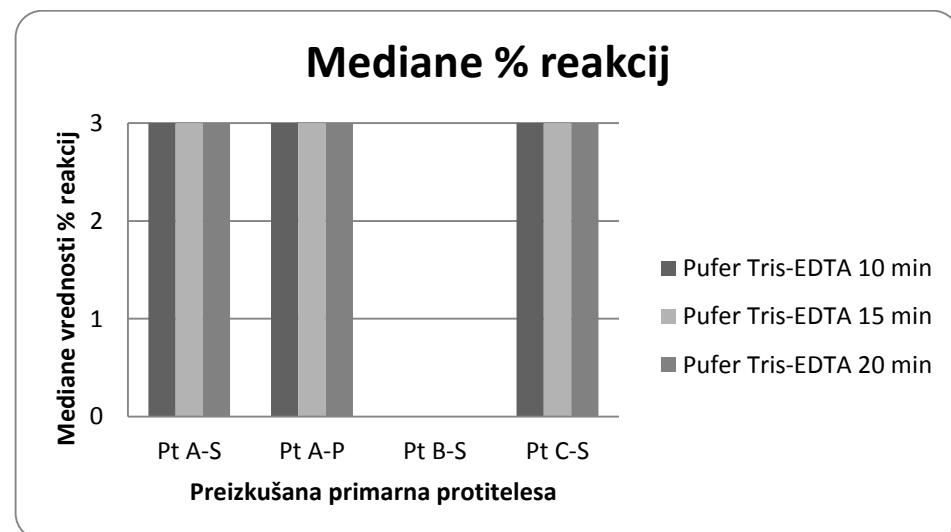
Slika 11: Primerjava mikrofotografij preparatov po uporabi protiteles Pt A-S in Pt C-S pri vseh treh različnih časih trajanja predobdelave (10, 15 in 20 minut) v pufru Tris-EDTA. Vidimo, da je intenziteta obarvanja z vsakim 5 minutnim podaljšanjem močnejša (IHK, 50 x povečava).

4.1.4. Statistična obdelava podatkov testiranja predobdelave preparatov v pufru Tris-EDTA



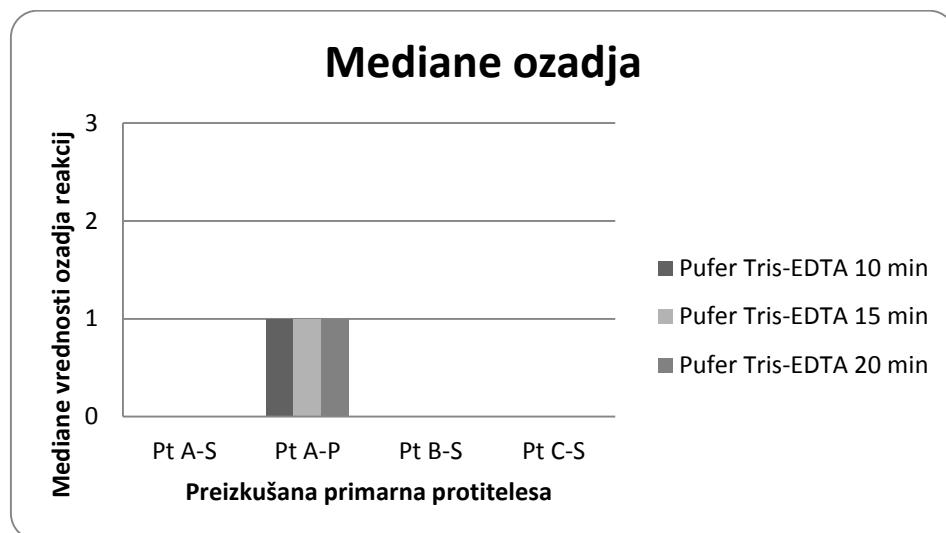
Graf 1: Prikaz median intenzitet reakcij za posamezna protitelesa pri testiranjih 10-, 15- in 20-minutne predobdelave preparatov v pufru Tris-EDTA.

Iz Grafa 1 je razvidno, da so pri testiranju 10-, 15- in 20-minutne predobdelave preparatov v pufru Tris-EDTA, imela protitelesa Pt A-S in Pt C-S najvišjo vrednost mediane intenzitete reakcij, in sicer 3. Protitelesa Pt A-P so pri 10-minutnem testiranju dosegla mediano 1, pri 15- in 20-minutnem testiranju pa 2. Pri protitelesih Pt B-S nismo zaznali obarvanja zato je bila mediana intenzitet reakcij enaka 0.



Graf 2: Prikaz median odstotkov reakcij oz. % obarvanega tkiva v preparatih, za posamezna protitelesa pri testiranjih 10-, 15- in 20-minutne predobdelave preparatov v pufru Tris-EDTA.

Graf 2 prikazuje vplive vseh treh uporabljenih časovno različnih predobdelav preparatov v pufru Tris-EDTA na mediane vrednosti % obarvanega tkiva. Pri protitelesih Pt A-S, Pt A-P in Pt C-S smo pri vseh vrstah predobdelave določili najvišjo mediano vrednost, to je 3. Pri protitelesih Pt B-S pa smo zaradi odsotnosti reakcije ponovno določili mediano vrednost 0.



Graf 3: Prikaz median ozadij reakcij za posamezna protitelesa pri testiranju 10-, 15- in 20-minutne predobdelave preparatov v pufru Tris-EDTA.

Vidimo (Graf 3), da smo pri testiranju vseh treh časov trajanja predobdelave preparatov s protitelesi Pt A-S, Pt B-S in Pt C-S določili mediano vrednost ozadja 0. Pri protitelesu Pt A-P pa se je pri vseh treh časih trajanja predobdelave pojavilo šibko ozadje in s tem vrednost mediane ozadja 1.

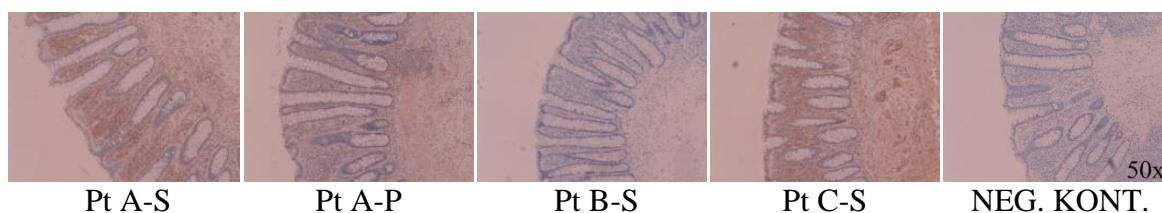
4.2. REZULTATI TESTIRANJA PREDOBDELAVE TKIVNIH PREPARATOV V CITRATNEM PUFRU

4.2.1. Deset minutna predobdelava preparatov v citratnem pufru

Preglednica XIV: Prikaz rezultatov testiranja 10-minutne predobdelave preparatov v citratnem pufru.

VRSTA KONTROLE	OCENJEVALNI PARAMETER	VRSTA PROTITELESA				
		Pt A-S	Pt A-P	Pt B-S	Pt C-S	SEKUNDARNO Pt
<i>Pozitivna kontrola 1 (rezina št. 1)</i>	Intenziteta	+	+	-	++	/
	% reakcije	+++	++	-	+++	/
	Ozadje	-	+	-	-	/
<i>Pozitivna kontrola 2 (rezina št. 2)</i>	Intenziteta	++	+	-	++	/
	% reakcije	+++	++	-	+++	/
	Ozadje	-	+	-	-	/
<i>Pozitivna kontrola 3 (rezina št. 3)</i>	Intenziteta	+	+	-	+	/
	% reakcije	+++	++	-	+++	/
	Ozadje	-	+	-	-	/
<i>Negativna kontrola</i>	Intenziteta	/	/	/	/	-
	% reakcije	/	/	/	/	-
	Ozadje	/	/	/	/	-

Rezultati, navedeni v Preglednici XIV kažejo, da smo pri testiranju 10-minutne predobdelave preparatov v citratnem pufru, pri uporabi protiteles Pt A-S, dobili šibko intenzitetno obarvanja, ozadja pa ni bilo. Obarvale so se vse celice. Pri tem testiranju smo opazili tudi, da je pozitivna kontrola št. 2 kazala močnejšo intenzitetno kot kontroli št. 1 in 3. Pri uporabi protiteles Pt A-P je bila večina celic šibko obarvanih, prisotno pa je bilo tudi šibko ozadje. Intenziteta in % reakcije sta bila slabša kot pri enako dolgi predobdelavi preparatov v pufru Tris-EDTA. Protitelesa Pt B-S tudi pri teh pogojih niso izzvala nobene reakcije. Pri uporabi protiteles Pt C-S je prišlo do srednje močne obarvanosti v vseh celicah, ozadja pa ni bilo. Tudi v tem primeru smo opazili, da je bila intenziteta obarvanja kontrole št. 3 malce šibkejša kot pri kontrolah št. 1 in 2. V negativni kontroli nismo zabeležili nobene reakcije.



Slika 12: Primerjava mikrofotografij preparatov po 10-minutnem testiranju predobdelave v citratnem pufru (IHK, 50 x povečava).

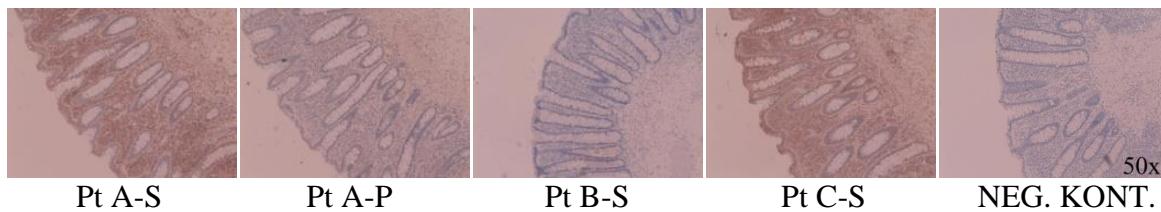
4.2.2. Petnajst minutna predobdelava preparatov v citratnem pufru

Preglednica XV: Prikaz rezultatov testiranja 15-minutne predobdelave preparatov v citratnem pufru.

VRSTA KONTROLE	OCENJEVALNI PARAMETER	VRSTA PROTITELESA				
		Pt A-S	Pt A-P	Pt B-S	Pt C-S	SEKUNDARNO Pt
<i>Pozitivna kontrola 1 (rezina št. 1)</i>	Intenziteta	++	+	-	++	/
	% reakcije	+++	++	-	+++	/
	Ozadje	-	+	-	-	/
<i>Pozitivna kontrola 2 (rezina št. 2)</i>	Intenziteta	++	+	-	++	/
	% reakcije	+++	++	-	+++	/
	Ozadje	-	+	-	-	/
<i>Pozitivna kontrola 3 (rezina št. 3)</i>	Intenziteta	++	+	-	++	/
	% reakcije	+++	++	-	+++	/
	Ozadje	-	+	-	-	/
<i>Negativna kontrola</i>	Intenziteta	/	/	/	/	-
	% reakcije	/	/	/	/	-
	Ozadje	/	/	/	/	-

Vidimo (Preglednica XV), da smo pri 15-minutnem testiranju predobdelave preparatov v citratnem pufru, pri uporabi protiteles Pt A-S, ocenili intenziteto kot srednje močno, pri čemer ozadja ni bilo. Obarvale so se vse celice. V primeru protiteles Pt A-P je bila večina celic šibko obarvana, prisotno je bilo tudi šibko ozadje. Intenzitete in % reakcij so bili slabši kot pri enako dolgi predobdelavi preparatov v pufru Tris-EDTA. Tudi pod temi pogojmi s protitelesi Pt B-S nismo dobili nobene reakcije. Pri uporabi protiteles Pt C-S smo zaznali srednje močno obarvanost v vseh celicah, pri tem pa ni bilo ozadja. Ocene so bile v tem primeru zelo podobne tistim pri 10 minutni predobdelavi v citratnem pufru. Če

primerjamo ocene protiteles Pt C-S in Pt A-S opazimo, da so le-te enake. Po pričakovanjih pri negativni kontroli nismo ugotovili nobene reakcije.



Slika 13: Primerjava mikrofotografij preparatov po 15-minutnem testiranju predobdelave v citratnem pufru (IHK, 50 x povečava).

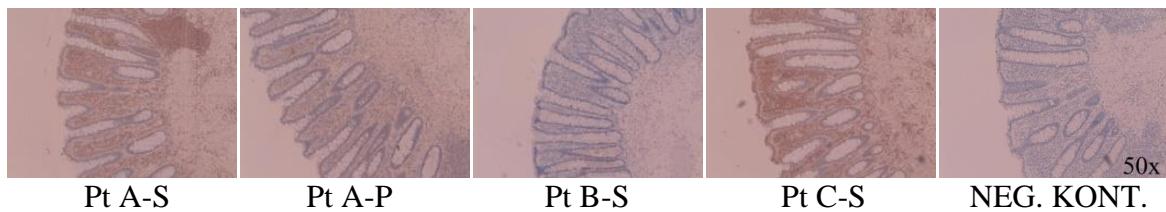
4.2.3. Dvajset minutna predobdelava preparatov v citratnem pufru

Preglednica XVI: Prikaz rezultatov testiranja 20-minutne predobdelave preparatov v citratnem pufru.

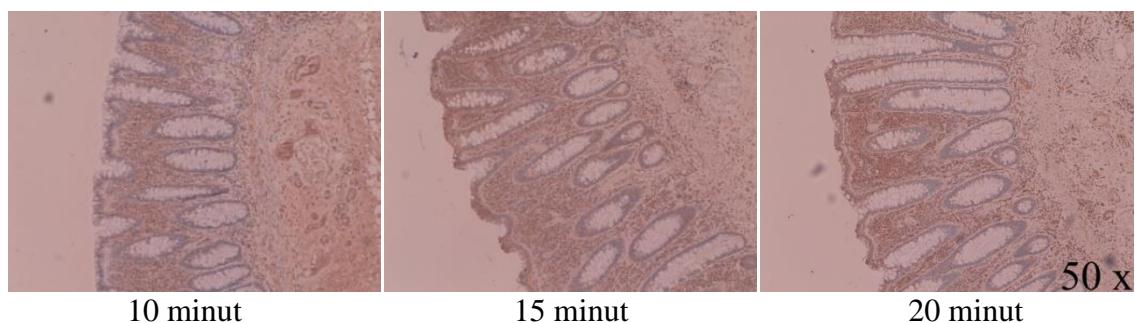
VRSTA KONTROLE	OCENJEVALNI PARAMETER	VRSTA PROTITELESA				
		Pt A-S	Pt A-P	Pt B-S	Pt C-S	SEKUNDARNO Pt
<i>Pozitivna kontrola 1 (rezina št. 1)</i>	Intenziteta	++	+	-	++	/
	% reakcije	++	+	-	+++	/
	Ozadje	-	+	-	-	/
<i>Pozitivna kontrola 2 (rezina št. 2)</i>	Intenziteta	++	+	-	++	/
	% reakcije	++	+	-	+++	/
	Ozadje	-	+	-	-	/
<i>Pozitivna kontrola 3 (rezina št. 3)</i>	Intenziteta	++	+	-	+++	/
	% reakcije	++	+	-	+++	/
	Ozadje	-	+	-	-	/
<i>Negativna kontrola</i>	Intenziteta	/	/	/	/	-
	% reakcije	/	/	/	/	-
	Ozadje	/	/	/	/	-

Rezultati navedeni v Preglednici XVI kažejo, da je bila pri uporabi protiteles Pt A-S intenziteta srednje močna in ozadja ni bilo. Obarvala se je večina celic. Pri protitelesih Pt A-P je bilo nekaj celic šibko obarvanih, prisotno pa je bilo tudi šibko ozadje. Intenzitete in % reakcij so bili v tem primeru slabši kot pri enako dolgi predobdelavi preparatov v pufru Tris-EDTA. Protitelesa Pt B-S ponovno niso bila sposobna generirati nobene reakcije. Pri uporabi protiteles Pt C-S smo videli, da je prišlo do srednje močne obarvanosti v vseh celicah, pri čemer ni bilo ozadja. Izjema je bila le kontrola št. 3 pri kateri je bila intenziteta

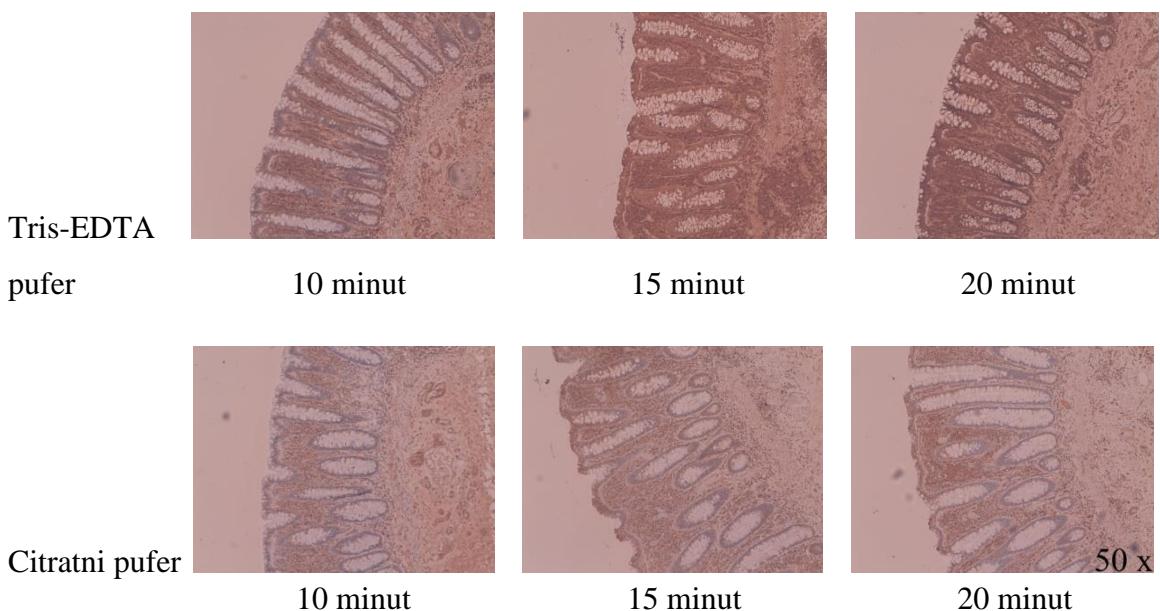
zelo močna, sicer pa so bile ocene zelo podobne tistim pri 10- in 15-minutni predobdelavi preparatov v citratnem pufru. Negativna kontrola je bila pričakovano negativna.



Slika 14: Primerjava mikrofotografij preparatov po 20-minutnem testiranju predobdelave v citratnem pufru (IHK, 50 x povečava).



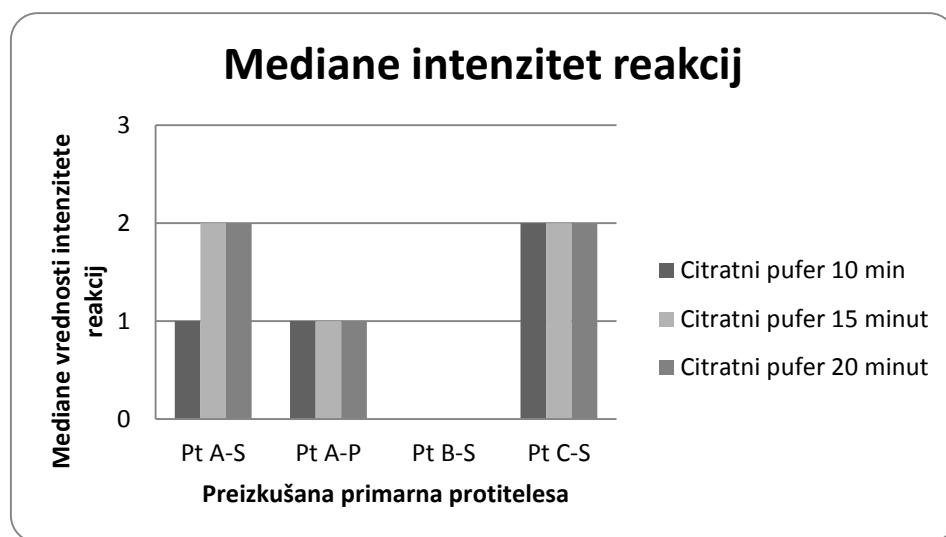
Slika 15: Primerjava mikrofotografij preparatov po uporabi protiteles Pt C-S v vseh treh testiranjih predobdelave (10, 15 in 20 minut) v citratnem pufru. Vidimo, da se intenziteta z vsakim 5-minutnim podaljšanjem inkubacije ne spreminja bistveno (IHK, 50 x povečava).



Slika 16: Primerjava mikrofotografij preparatov protiteles Pt C-S po predobdelavi preparatov v pufru Tris-EDTA in citratnem pufru (IHK, 50 x povečava).

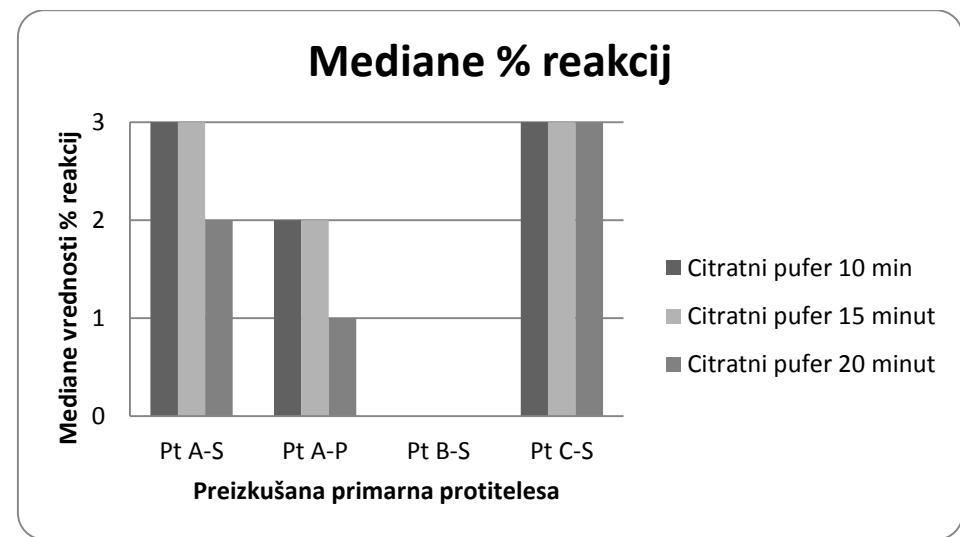
Vidimo, da protitelesa Pt C-S dajejo boljše rezultate v primeru uporabe pufra Tris-EDTA.

4.2.4. Statistična obdelava podatkov testiranja predobdelave preparatov v citratnem pufru



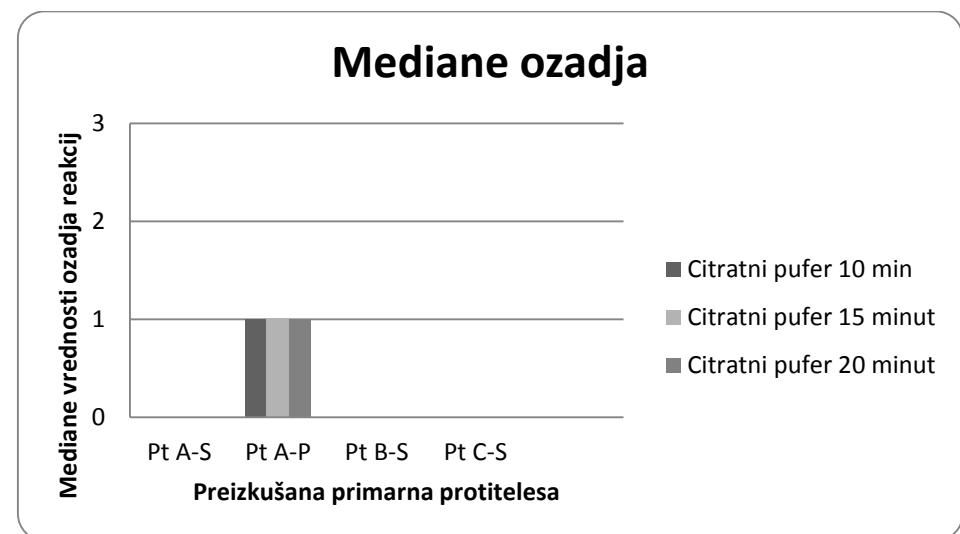
Graf 4: Prikaz median intenzitet reakcij za posamezna protitelesa pri testiranjih 10-, 15- in 20-minutne predobdelave preparatov v citratnem pufru.

Iz Grafa 4 je razvidno, da so pri testiranju 10-, 15- in 20-minutne predobdelave preparatov v citratnem pufru protitelesa Pt C-S dosegla vrednost mediane intenzitete reakcij 2, Pt A-P 1, Pt B-S pa ponovno 0. Pri uporabi protiteles Pt A-S smo po 10-minutni predobdelavi preparatov določili mediano vrednost 1, pri 15- in 20-minutni predobdelavi pa mediano vrednost 2.



Graf 5: Prikaz median odstotkov reakcij oz. % obarvanega tkiva v preparatih za posamezna protitelesa pri testiranju 10-, 15- in 20-minutne predobdelave preparatov v citratnem pufru.

Graf 5 prikazuje rezultate vplivov vseh treh časovno različnih predobdelav preparatov v citratnem pufru na % obarvanosti tkiva. Za protitelesa Pt C-S smo pri vseh treh časih trajanja predobdelave določili mediano vrednost 3. Za protitelo Pt A-S smo po 10- in 15-minutni predobdelavi določili mediano 3, po 20-minutni pa 2. S protitelesom Pt A-P smo po 10- in 15- minutnem trajanju predobdelave določili mediano 2, po 20-minutnem trajanju predobdelave pa 1. Protitelo Pt B-S ponovno ni dalo nobene reakcije zato je bila v tem primeru vrednost mediane enaka 0.



Graf 6: Prikaz median ozadij reakcij za posamezna protitelesa pri testiranju 10-, 15- in 20-minutne predobdelave preparatov v citratnem pufru.

Pri testiranju (Graf 6) vseh treh časov trajanja predobdelave preparatov v citratnem pufru smo s protitelesi Pt A-S, Pt B-S in Pt C-S dobili mediano vrednost ozadja 0. Pri protitelesu Pt A-P pa se je pri vseh treh različno dolgih predobdelavah preparatov pojavilo šibko ozadje z mediano vrednostjo 1.

4.3. REZULTATI TESTIRANJA PREDOBDELAVE TKIVNIH PREPARATOV V FOSFATNEM PUFRU S PROTEAZO

4.3.1. Dvajset minutna predobdelava preparatov v fosfatnem pufru s proteazo

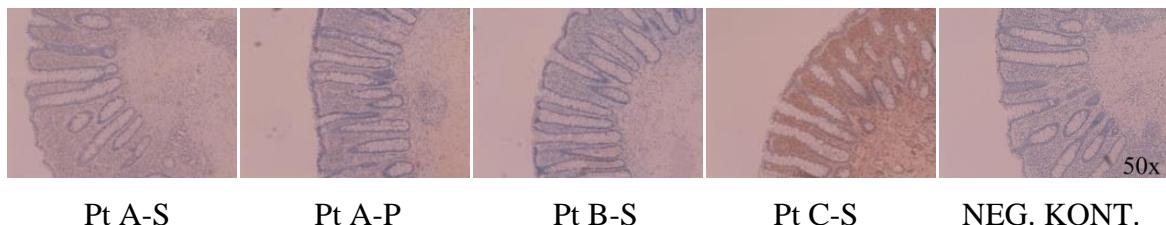
Testiranje predobdelave preparatov v fosfatnem pufru s proteazo smo izvedli samo v času 20 minut.

Preglednica XVII: Prikaz rezultatov testiranja 20-minutne predobdelave preparatov v fosfatnem pufru s proteazo.

VRSTA KONTROLE	OCENJEVALNI PARAMETER	VRSTA PROTITELESA				
		Pt A-S	Pt A-P	Pt B-S	Pt C-S	SEKUNDARNO Pt
<i>Pozitivna kontrola 1 (rezina št. 1)</i>	Intenziteta	-	-	-	+++	/
	% reakcije	-	-	-	+++	/
	Ozadje	+	+	-	-	/
<i>Pozitivna kontrola 2 (rezina št. 2)</i>	Intenziteta	-	-	-	+++	/
	% reakcije	-	-	-	+++	/
	Ozadje	+	+	-	-	/
<i>Pozitivna kontrola 3 (rezina št. 3)</i>	Intenziteta	+	-	-	+++	/
	% reakcije	+	-	-	+++	/
	Ozadje	+	+	-	-	/
<i>Negativna kontrola</i>	Intenziteta	/	/	/	/	-
	% reakcije	/	/	/	/	-
	Ozadje	/	/	/	/	-

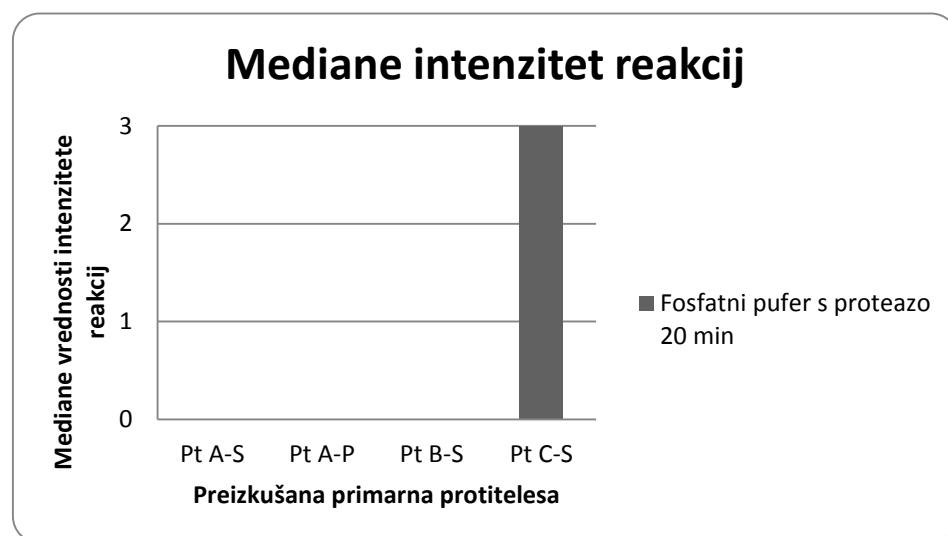
Pri testiranju pogojev navedenih v Preglednici XVII in ob uporabi protiteles Pt A-S nismo opazili obarvanosti specifičnih celic, prisotno pa je bilo šibko ozadje. Majhno število obarvanih celic smo zaznali le v kontroli št. 3, pri čemer je bilo prisotno šibko ozadje. Protitelesa Pt A-P so bila zelo podobno ocenjena kot Pt A-S. Protitelo Pt B-S ponovno ni

povzročilo nobene reakcije. Pri uporabi protiteles Pt C-S je prišlo do močne obarvanosti v vseh celicah, ozadja pa ni bilo. Negativna kontrola pa je bila pričakovana negativna.



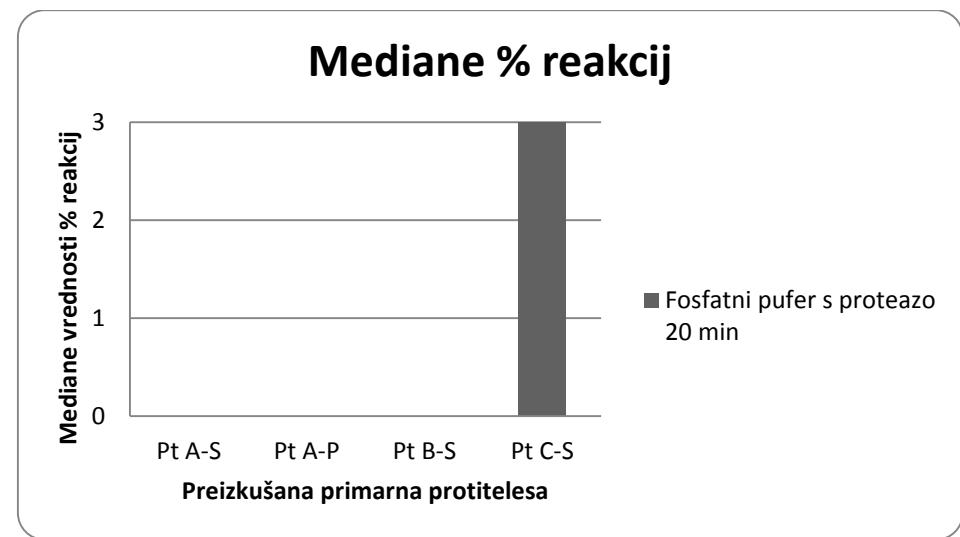
Slika 17: Primerjava mikrofotografij preparatov po 20-minutnem testiranju predobdelave v fosfatnem pufru s proteazo (IHK, 50 x povečava).

4.3.2. Statistična obdelava podatkov testiranja predobdelave preparatov v fosfatnem pufru s proteazo



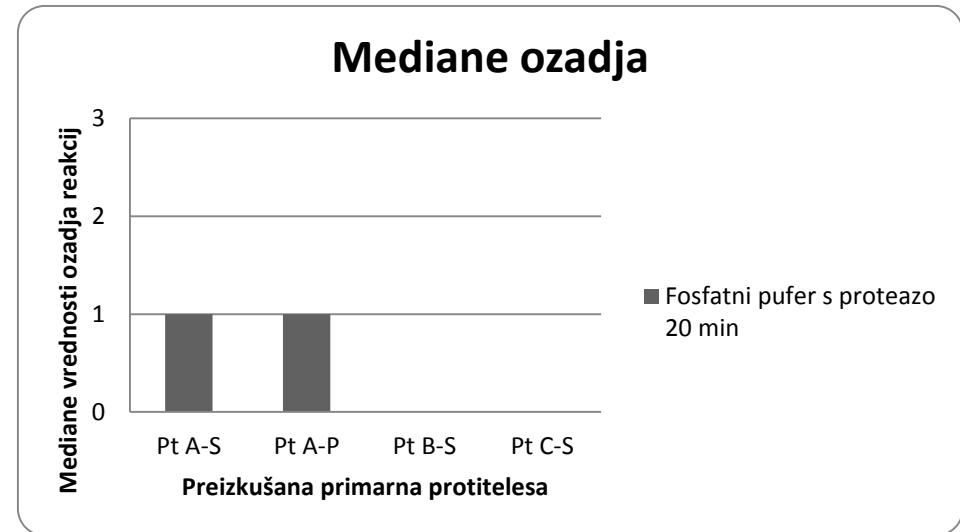
Graf 7: Prikaz median intenzitet reakcij za posamezna protitelesa pri testiranju 20-minutne predobdelave v fosfatnem pufru s proteazo.

Rezultati predstavljeni v obliki Grafa 7 kažejo, da smo pri testiranju 20-minutne predobdelave preparatov v fosfatnem pufru s proteazo pri protitelesih Pt A-S, Pt A-P in Pt B-S določili enako vrednost median intenzitet reakcij, in sicer 0. Močna obarvanost preparatov pa se je pojavila le pri uporabi protitelesa Pt C-S. V tem primeru smo določili mediano vrednost 3.



Graf 8: Prikaz median odstotkov reakcij oz. % obarvanega tkiva v preparatih za posamezna protitelesa pri testiranju 20-minutne predobdelave preparatov v fosfatnem pufru s proteazo.

Po 20-minutni predobdelavi preparatov v fosfatnem pufru s proteazo je bila pri protitelesih Pt A-S, Pt A-P in Pt B-S vrednost median % reakcij 0, pri protitelesu Pt C-S pa 3 (Graf 8).



Graf 9: Prikaz median ozadij reakcij za posamezna protitelesa pri testiranju 20-minutne predobdelave preparatov v fosfatnem pufru s proteazo.

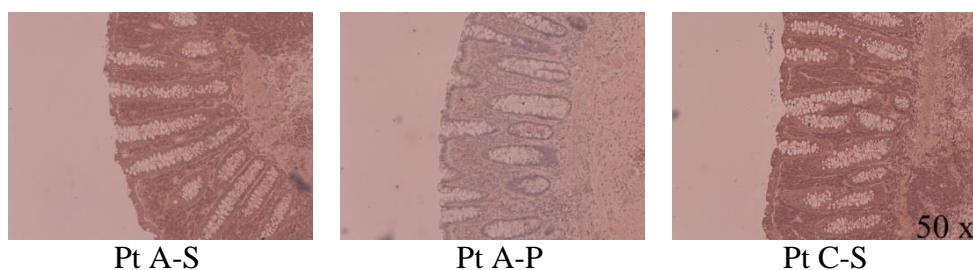
Pri testiranju 20-minutne predobdelave preparatov v fosfatnem pufru s proteazo smo za protitelesa Pt A-S in Pt A-P določili vrednost median ozadja 1. V primeru uporabe protiteles Pt B-S in Pt C-S pa je bila ta vrednost enaka 0 (Graf 9).

4.4. PRIMERJAVA REZULTATOV GLEDE NA VRSTO IN TRAJANJE PREDOBDELAVE PREPARATOV

Po primerjavi preparatov izpostavljenim različnim vrstam predobdelave se je patologinja odločila, da je najustreznejša 15-minutna predobdelava v pufru Tris-EDTA.

4.5. PRIMERJAVA PREPARATOV V IZBRANI VRSTI PREDOBDELAVE

Med seboj smo primerjali najlepše mikrofotografije preparatov po uporabi protiteles Pt A-S, Pt A-P in Pt C-S posnete v okviru najboljše ocenjene predobdelave, in sicer 15 minut v pufru Tris-EDTA. Protiteles Pt B-S nismo vključili v analizo ker z njimi nismo dobili pozitivnih rezultatov.



Slika 18: Primerjava mikrofotografij preparatov po uporabi različnih vrst protiteles v okviru najbolje ocenjene predobdelave, to je 15 minut v pufru Tris-EDTA (IHK, 50 x povečava).

Za najustreznejše protitelo za določanje BTL smo izbrali Pt C-S.

4.6. REZULTATI TESTIRANJA TKIV BOLNIKOV Z RAKOM DČD STADIJA I

Preglednica XVIII: Prikaz rezultatov testiranja na tkivnih vzorcih raka DČD stadija I.

	ŠTEVILKA BOLNIKA	OCENJEVALNI PARAMETER	TKIVO RAKAVEGA VZORCA 1	ZDRAVO TKIVO 1	TKIVO RAKAVEGA VZORCA 2	ZDRAVO TKIVO 2	TKIVO RAKAVEGA VZORCA 3	ZDRAVO TKIVO 3	POZITIVNA KONTROLA	NEGATIVNA KONTROLA	IZOTIPSKA KONTROLA
<i>Bolnik 1</i>	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
	Ozadje	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
<i>Bolnik 2</i>	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	Ozadje	-	-	-	-	-	-	-			
<i>Bolnik 3</i>	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	Ozadje	-	-	-	-	-	-	-			
<i>Bolnik 4</i>	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	Ozadje	-	-	-	-	-	-	-			
<i>Bolnik 5</i>	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	Ozadje	-	-	-	-	-	-	-			
<i>Bolnik 6</i>	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	Ozadje	-	-	-	-	-	-	-			
<i>Bolnik 7</i>	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	Ozadje	-	-	-	-	-	-	-			
<i>Bolnik 8</i>	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	Ozadje	-	-	-	-	-	-	-			
<i>Bolnik 9</i>	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	Ozadje	-	-	-	-	-	-	-			

Rezultati, zbrani v Preglednici XVIII kažejo, da smo pri bolniku 1 intenzitetu vseh treh vzorcev rakavega tkiva ocenili kot zelo močno, saj sta se obarvali več kot 2/3 rakavega tkiva. Pri tem se je šibko obarvalo tudi malo nespecifičnega tkiva. V vseh treh vzorcih zdravega tkiva smo intenzitetu reakcije ocenili kot močno, pri čemer so se pobavale več kot 2/3 tkiva, pri čemer ni bilo ozadja. Pri bolnikih 2-9 smo intenzitetu obarvanja vseh treh vzorcev rakavega tkiva ocenili kot zelo močno zato, ker sta se obarvali več kot 2/3 tkiva, ozadja pa ni bilo. V vseh treh vzorcih zdravega tkiva je bila intenziteta obarvanja prav tako močna. Tudi v tem primeru sta se obarvali več kot 2/3 tkiva, ozadja pa ni bilo. Pri pozitivni

kontroli smo intenziteto obarvanja ocenili kot močno. Obarvali sta se več kot 2/3 tkiva, ozadja pa nismo zaznali. Pri negativni in izotipski kontroli se kontrolno tkivo ni obarvalo, je pa bilo prisotno šibko ozadje.

4.7. REZULTATI TESTIRANJA TKIV BOLNIKOV Z RAKOM DČD STADIJA II

Preglednica XIX: Prikaz rezultatov testiranja na tkivnih vzorcih raka DČD stadija II.

ŠTEVILKA BOLNIKA	OCENJEVALNI PARAMETER	TKIVO RAKAVEGA VZORCA 1	ZDRAVO TKIVO 1	TKIVO RAKAVEGA VZORCA 2	ZDRAVO TKIVO 2	TKIVO RAKAVEGA VZORCA 3	ZDRAVO TKIVO 3	POZITIVNA KONTROLA	NEGATIVNA KONTROLA	IZOTIPSKA KONTROLA
Bolnik 10	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
	Ozadje	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bolnik 11	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
	Ozadje	-	-	-	-	-	-	-		
Bolnik 12	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
	Ozadje	-	-	-	-	-	-	-		
Bolnik 13	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
	Ozadje	-	-	-	-	-	-	-		
Bolnik 14	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
	Ozadje	-	-	-	-	-	-	-		
Bolnik 15	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
	Ozadje	-	-	-	-	-	-	-		
Bolnik 16	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
	Ozadje	-	-	-	-	-	-	-		
Bolnik 17	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
	Ozadje	-	-	-	-	-	-	-		
Bolnik 18	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
	Ozadje	-	-	-	-	-	-	-		
Bolnik 19	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
	Ozadje	-	-	-	-	-	-	-		

Vidimo (Preglednica XIX), da so bile pri bolnikih 10-19 intenzitete obarvanja vseh treh vzorcev rakavega tkiva zelo močne, saj sta se obarvali $> 2/3$ tkiva, pri čemer ni bilo ozadja. Tudi v vseh treh vzorcih zdravega tkiva je bila intenziteta močna, z obarvanjem $> 2/3$

tkiva, brez ozadja. Tudi pozitivna kontrola se je močno obarvala ($> 2/3$ tkiva), ozadja pa ponovno ni bilo. V negativni in izotipski kontroli se tkivo ni obarvalo, prav tako pa nismo zaznali ozadja.

4.8. REZULTATI TESTIRANJA TKIV BOLNIKOV Z RAKOM DČD STADIJA III

Preglednica XX: Prikaz rezultatov testiranja na tkivnih vzorcih raka DČD stadija III.

ŠTEVILKA BOLNIKA	OCENJEVALNI PARAMETER	TKIVO RAKAVEGA VZORCA 1	ZDRAVO TKIVO 1	TKIVO RAKAVEGA VZORCA 2	ZDRAVO TKIVO 2	TKIVO RAKAVEGA VZORCA 3	ZDRAVO TKIVO 3	POZITIVNA KONTROLA	NEGATIVNA KONTROLA	IZOTIPSKA KONTROLA
<i>Bolnik 20</i>	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
	Ozadje	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Bolnik 21</i>	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	Ozadje	-	-	-	-	-	-			
<i>Bolnik 22</i>	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	Ozadje	-	-	-	-	-	-			
<i>Bolnik 23</i>	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	Ozadje	-	-	-	-	-	-			
<i>Bolnik 24</i>	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	Ozadje	-	-	-	-	-	-			
<i>Bolnik 25</i>	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	Ozadje	-	-	-	-	-	-			
<i>Bolnik 26</i>	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	Ozadje	-	-	-	-	-	-			
<i>Bolnik 27</i>	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	Ozadje	-	-	-	-	-	-			
<i>Bolnik 28</i>	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	Ozadje	-	-	-	-	-	-			
<i>Bolnik 29</i>	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	Ozadje	-	-	-	-	-	-			

Iz Preglednice XX je razvidno, da so bile pri bolnikih 20-29 intenzitete obarvanja vseh treh vzorcev rakavega tkiva zelo močne, saj sta se obarvali $> 2/3$ tkiva, ozadja pa ni bilo. V vseh treh vzorcih zdravega tkiva smo intenzitetu obarvanja prav tako ocenili kot močno.

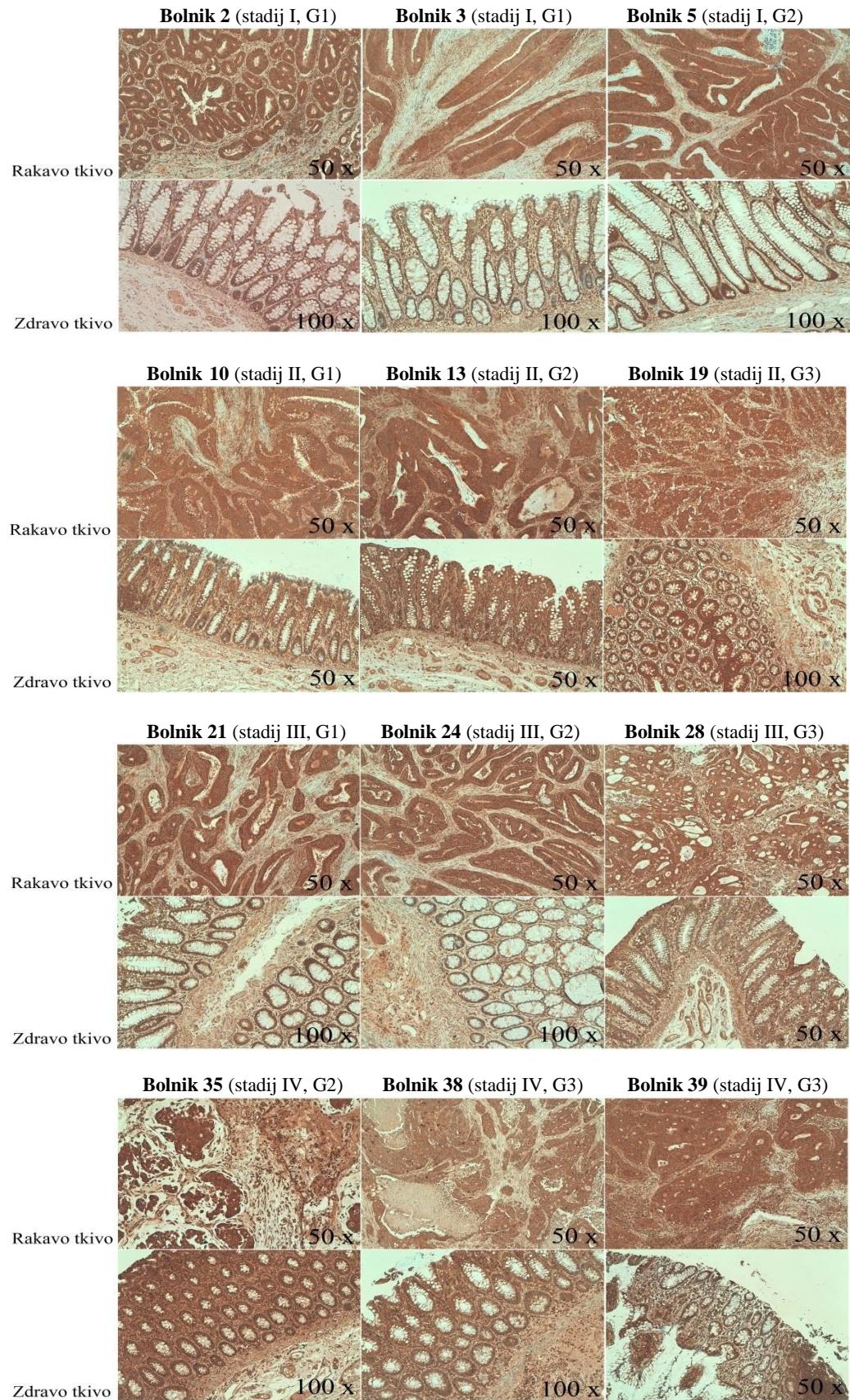
Tudi v tem primeru sta se obarvali $> 2/3$ zdravega tkiva, brez ozadja. Tudi v pozitivni kontroli je bila intenziteta reakcije močna, saj sta se obarvali $>$ kot $2/3$ tkiva, brez ozadja. V negativni kontroli se tkivo ni obarvalo, prisotno pa je bilo šibko ozadje. Tkivo izotipske kontrole se ni obarvalo, prav tako pa ni bilo prisotnega ozadja.

4.9. REZULTATI TESTIRANJA TKIV BOLNIKOV Z RAKOM DČD STADIJA IV

Preglednica XXI: Prikaz rezultatov testiranja na tkivnih vzorcih raka DČD stadija IV.

ŠTEVILKA BOLNIKA	OCENJEVALNI PARAMETER	TKIVO RAKAVEGA VZORCA 1	ZDRAVO TKIVO 1	TKIVO RAKAVEGA VZORCA 2	ZDRAVO TKIVO 2	TKIVO RAKAVEGA VZORCA 3	ZDRAVO TKIVO 3	POZITIVNA KONTROLA	NEGATIVNA KONTROLA	IZOTIPSKA KONTROLA
<i>Bolnik</i> <i>30</i>	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
	Ozadje	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bolnik</i> <i>31</i>	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	Ozadje	-	-	-	-	-	-			
<i>Bolnik</i> <i>32</i>	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	Ozadje	-	-	-	-	-	-			
<i>Bolnik</i> <i>33</i>	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	Ozadje	-	-	-	-	-	-			
<i>Bolnik</i> <i>34</i>	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	Ozadje	-	-	-	-	-	-			
<i>Bolnik</i> <i>35</i>	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	Ozadje	-	-	-	-	-	-			
<i>Bolnik</i> <i>36</i>	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	Ozadje	-	-	-	-	-	-			
<i>Bolnik</i> <i>37</i>	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	Ozadje	-	-	-	-	-	-			
<i>Bolnik</i> <i>38</i>	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	Ozadje	-	-	-	-	-	-			
<i>Bolnik</i> <i>39</i>	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	Ozadje	-	-	-	-	-	-			
<i>Bolnik</i> <i>40</i>	Intenziteta	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	% reakcije	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	Ozadje	-	-	-	-	-	-			

Rezultati, navedeni v Preglednici XXI kažejo, da so bile pri bolnikih 30-40 intenzitete obarvanja v vseh treh vzorcih rakavega tkiva zelo močne, saj sta se obarvali $> 2/3$ tkiva. Ozadja nismo zaznali. V vseh treh vzorcih zdravega tkiva je bilo obarvanje prav tako močno, saj je obsegalo $> 2/3$ zdravega tkiva, brez opaznega ozadja. V pozitivni kontroli je bila intenziteta reakcije prav tako močna. Obarvali sta se $> 2/3$ tkiva, ozadja pa ni bilo. V negativni in izotipski kontroli se kontrolno tkivo ni obarvalo, pa tudi ozadja nismo opazili.



Slika 19: Prikaz IHK reakcij na prisotnost BTL na preparatih rakavih tkiv stadijev I, II, III in IV ter na tkivnih preparatih zdravega črevesja.

5. RAZPRAVA

Imunohistokemijske metode so zelo pomembne pri patomorfološki diagnostiki bolezni. Z osnovnim barvanjem s HE ne dobimo vedno zadostnih podatkov o tkivu, zato postavitev diagnoze bolezni ni zanesljiva. V takih primerih se patologi poslužujejo IHK metod, da pridobijo dodatne informacije o prisotnosti (izražanju), lokaciji in količini specifičnih antigenov oziroma bioloških označevalcev fenotipa ali bolezni ter o interakcijah med njimi, s čimer pripomorejo k dokončni postavitvi diagnoze. V okviru magistrske naloge smo testirali postopek IHK barvanja membranskega proteina bilitranslokaze (BTL), ki se izraža na različnih celicah in za katerega menijo, da bi lahko bil biološki označevalec nekaterih bolezni. Postopek njegovega IHK barvanja smo preverili s štirimi vrstami protiteles, in pri tem ugotavliali najustreznejše testne pogoje. Ugotovili smo, da nekatera od preučevanih protiteles dajejo zelo lepe reakcije (Slika 18), medtem, ko so se druga izkazala kot neprimerna (Slika 8) za IHK barvanja BTL na tkivnih rezinah debelega črevesa.

Če si najprej pogledamo ocene delovanja protiteles pri testiranju predobdelave preparatov v pufru Tris-EDTA vidimo, da sta bili protitelo Pt A-S in Pt C-S enakovredni. Kljub temu, da so bile njihove ocene po vseh treh časih predobdelave enake, pa smo pri primerjavi slik preparatov opazili majhna odstopanja v intenziteti reakcij (Slika 11). S podaljševanjem časa trajanja predobdelave se namreč intenziteta reakcij stopnjuje (Slika 11). Takšen odziv smo pričakovali, saj dlje časa kot traja razkrivanje antiga več navzkrižno povezanih molekul se reducira, zato je vezava primarnih protiteles nanj lažja in obsežnejša, reakcija pa močnejša. Presenetljivo je, da je bilo protitelo Pt A-P ocenjeno slabše kot Pt A-S (Preglednice XI, XII in XIII). Edina razlika med njima je bila v tem, da se je protitelo Pt A-S nahajalo v supernatantu celičnih kultur, Pt A-P pa je bilo prečiščeno in skoncentrirano. Zato smo pričakovali, da bo intenziteta reakcij po uporabi Pt A-P močnejša od tiste s Pt A-S. Predvidevamo, da je razlog za neuresničitev naših pričakovanj v tem, da nismo poznali natančne koncentracije neprečiščenih protiteles Pt A-S. Možno je, da je bila koncentracija prečiščenih protiteles nižja od koncentracije protiteles Pt A-S in smo zato s Pt A-P dobili šibkejše reakcije. Drugi možni vzrok bi lahko bil, da protiteesa v supernatantu bolje delujejo zaradi prisotnosti 13% seruma. Napaka med postopkom izvajanja IHK metode pa je manj verjetna, saj je skorajda nemogoče, da bi z enakim protitelesom vsakič naredili

napako, ki bi povzročila slabše reakcije, pri čem te napake ne bi naredili pri nobenem drugem protitelesu. Pri uporabi protiteles Pt A-P smo opazili, da se je intenziteta reakcij pri testiranju predobdelave preparatov v pufru Tris-EDTA s podaljševanjem časa predobdelave povečevala (Preglednice XI, XII in XIII). Kljub temu, da smo intenzitete reakcij pri 15- in 20-minutni predobdelavi ocenili enako, pri primerjavi slik preparatov lahko opazimo zelo majhno odstopanje v intenziteti obarvanja (Slike 8, 9 in 10). Zavedati se moramo, da je ocenjevanje preparatov pri vsakem posamezniku zelo subjektivno ter odvisno od vida in interpretacije. Pri protitelesu Pt A-P smo zaznali tudi prisotnost šibkega ozadja (Preglednice XI, XII in XIII). Razlogi za njegov pojav so hidrofobne in ionske reakcije ter aktivnost endogenih encimov. Hidrofobne in ionske reakcije so lahko posledica navzkrižnega povezovanja aminokislinskih ostankov proteinских molekul zaradi vpliva fiksativa. S predobdelavo preparatov naj bi njihov vpliv zmanjšali, da pa bi jih potrdili kot vzrok za pojav ozadja, bi morali izvesti dodatna testiranja. Možen vzrok za pojav ozadja je tudi afiniteta primarnega protitelesa do močno nabitih skupin vezivnega tkiva. Tudi za potrditev tega vzroka bi morali narediti še dodatna testiranja. Naslednji vzrok za pojav ozadja je lahko prisotnost endogenih peroksidaz, ki zmanjšujejo specifičnost IHK reakcij. Ker smo vse naše preparate obdelali z reagentom za inhibicijo peroksidaz, lahko trdimo, da to najverjetneje ni vzrok za pojav ozadja. V kolikor bi ta korak med postopkom testiranja nepravilno izvedli ali po pomoti izpustili, bi se ozadje pojavilo tudi na preparatih, kjer smo uporabili druga protitelesa. Glede na to, da je bilo protitelo Pt A-P koncentrirano, bi lahko ozadje nastalo tudi zaradi prevelike koncentracije primarnega protitelesa na tkivni rezini. Verjetnost za to pa je zelo majhna, saj bi v tem primeru morale biti intenzitete reakcij močnejše kot smo jih zaznali, ozadje pa bi se moralo pojavljati na vseh kontrolah. V našem primeru smo ozadje opazili na vseh kontrolnih preparatih, razen na tistem s katerim smo testirali 20-minutno predobdelavo v pufru Tris-EDTA (Preglednice XI, XII in XIII). Odstopanje je najverjetneje posledica napake (npr. raztopina primarnega Pt je odtekla s preparata) pri izvedbi IHK postopka. Zaradi ene kontrole brez ozadja, prevelike koncentracije primarnega protitelesa Pt A-P sicer ne moremo povsem izključiti kot vzroka za pojav ozadja pri ostalih kontrolah. Za dodatna testiranja se nismo odločili ker smo protitelesa Pt A-P precej slabše ocenili v primerjavi s Pt A-S in Pt C-S. Kot popolnoma neprimerna protitelesa, za uporabo v IHK postopkih dokazovanja izražanja BTL so se izkazala protitelesa Pt B-S. Z njimi nismo dobili nobenih pozitivnih reakcij pri testiranju predobdelave preparatov v pufru Tris-EDTA (Preglednice XI, XII in XIII). Vzrokov za to

ne poznamo. Morda so zato kriva premajhna specifičnost teh protiteles, napaka pri njihovem pridobivanju ali nanosu itd. Dejstvo je, da so bila vsa tri testna protitelesa izdelana na osnovi modela istega proteina, s pomočjo znanih sintetičnih peptidov. Protitelesa Pt A in Pt B so usmerjena proti zunajcelični domeni, Pt C pa proti znotrajcelični domeni predvidenega proteinskega modela BTL. S predobdelavo preparatov in s tem z razkritjem epitopov, ki ustrezajo aminokislinskemu zaporedju paratopov protiteles Pt A in Pt C, dovolj učinkovito in kakovostno razkrijemo antigen, medtem, ko epitop, ki naj bi ga prepoznala protitelesa Pt B ostane kljub temu zakrit. Verjetnost za metodološko napako pri izvedbi IHK postopka je majhna, saj je skorajda nemogoče, da bi jo z enakimi protitelesi naredili vsakič in to tako, da ne bi dobili reakcij, pri tem pa je ne bi ponovili z nobenim drugim protitelesom. Po pregledu ocenjevalnih parametrov testiranja kontrolnih preparatov v pufru Tris-EDTA smo ugotovili, da sta se 15- in 20-minutna predobdelava obnesli enako dobro medtem, ko je 10-minutna predobdelava dala malce slabše rezultate. Najboljša protitelesa za določanje BTL na tkivnih preparatih v pufru Tris-EDTA so bila Pt A-S in Pt C-S.

Rezultati testiranj v citratnem pufru so bili povsem drugačni od tistih v pufru Tris-EDTA. V primeru protiteles Pt A-S se je intenziteta reakcije, v primerjavi s testiranjem predobdelave v pufru Tris-EDTA, zmanjšala. To lahko pripišemo bolj kislemu pH-ju tega pufra, v primerjavi s pufrom Tris-EDTA. Opazili smo, da je ob uporabi Pt A-S pri testiranju 10-minutne predobdelave v citratnem pufru prišlo do odstopanja v intenziteti obarvanja preparatov. Najverjetnejši vzrok bi lahko bila napaka pri izvedbi IHK postopka (npr. primarna Pt niso prekrila celotne tkivne rezine). Intenziteta reakcij se je s podaljševanjem trajanja predobdelave z 10 na 15 minut izboljšala (Preglednici XIV in XV), a je bila še vedno slabša kot v primeru uporabe pufra Tris-EDTA. Razlik med 15- in 20- minutno predobdelavo pa nismo opazili (Slike 13 in 14). Rezultati so delno pričakovani, saj so bile ocene preparatov po 15-minutni predobdelavi boljše kot tiste po 10-minutni. Manj pričakovano pa je dejstvo, da se intenziteta obarvanja preparatov ni izboljšala po podaljšanju časa predobdelave s 15 na 20 minut (Preglednici XV in XVI). Dobljene rezultate lahko pripišemo nizkim vrednostim pH citratnega pufra. Protitelesa Pt A-P so bila pri predobdelavi v citratnem pufru, enako kot v pufru Tris-EDTA, ocenjena slabše kot Pt A-S (Preglednice XIV, XV in XVI), saj je bila intenziteta reakcij nižja. Razlago za take rezultate smo podali že prej. Glede na to, da se razlike v intenzitetah

reakcij pri uporabi protiteles Pt A-S in Pt A-P ponavljajo, to dodatno potrjuje, da lahko napako pri izvajanju IHK postopka izključimo. Pri testiranju protiteles Pt A-P se je pri 20-minutni predobdelavi v citratnem pufru pojavila razlika, v primerjavi z 10- in 15- minutno predobdelavo, saj se je namesto večine obarvalo le malo tkiva (Preglednice XIV, XV in XVI). Najverjetnejši vzrok za to bi lahko bila napaka v izvedbi postopka IHK barvanja. Poleg tega je pri izvedbi IHK postopka možno tudi, da bi lahko podaljšanje predobdelave v citratnem pufru na 20 minut vplivalo na ocene reakcij najverjetneje le v smislu njihove intenzitete, ne pa glede števila obarvanih celic v tkivu. V vseh preparatih, kjer smo uporabili protitelesa Pt A-P, je bilo prisotno ozadje. Možne vzroke za ta pojav smo že opisali. Pri uporabi protiteles Pt C-S smo v vseh testiranih predobdelavah, ne glede na njihovo trajanje, zabeležili šibke reakcije v vseh preparatih, brez prisotnosti ozadja (Preglednice XIV, XV in XVI). Pričakovali smo, da bodo s podaljševanjem trajanja predobdelave reakcije postajale vse močnejše (Slika 15). Opazili smo tudi odstopanja v intenziteti barvanja pri testiranju 10- in 20-minutne predobdelave preparatov v citratnem pufru. Najverjetnejši vzrok za to bi lahko bila sicer le malo verjetna napaka v izvedbi IHK postopka. Če primerjamo ocene protiteles Pt A-S in Pt C-S, so bile te za Pt C-S, pri testiranju predobdelave preparatov v citratnem pufru, v povprečju boljše kot za Pt A-S (Preglednice XIV, XV in XVI). Ocene reakcij s protitelesi Pt C-S so bile boljše tako pri testiranju predobdelave v pufru Tris-EDTA kot tudi v citratnem pufru (Slika 16). Protitelesa Pt B-S tudi pri predobdelavi preparatov v citratnem pufru niso dala nobene reakcije. Po pregledu ocenjevanih parametrov testiranj kontrolnih preparatov v citratnem pufru smo ugotovili, da so se za posamezna protitelesa različni časi trajanja predobdelav obnesli različno dobro. Za protitelesa Pt A-S je bila najuspešnejša 15- minutna predobdelava, za Pt C-S 15- in 20-minutni, za Pt A-P pa 10- in 15-minutni predobdelavi. Najbolje ocnjena protitelesa za določanje BTL v citratnem pufru so bila Pt C-S, pri čemer pa so bile ocene slabše kot pri uporabi pufra Tris-EDTA.

Rezultati testiranj predobdelave preparatov v fosfatnem pufru s proteazo so bili najslabši (Preglednica XVII). Pri uporabi protiteles Pt A-S smo v dveh kontrolah ugotovili, da ni prišlo do reakcije, prisotno pa je bilo šibko ozadje. V kontroli številka 3 pa smo zaznali le šibko obarvanost majhnega števila celic, ob prav tako prisotnem šibkem ozadju (Preglednica XVII). Vzrok za odstopanje v intenzitetah in odstotkih reakcij bi lahko bila izvedba IHK barvanja. Pri kontrolah številka 1 in 2 bi se lahko teoretično zgodilo, da tkivni

rezini nista bili v celoti prekriti z raztopino primarnih protiteles ipd. Druge možne napake kot so slabo razkrivanje antigena, uporaba starih reagentov, izpuščen korak v postopku IHK barvanja so še manj verjetne, saj drugače ne bi zaznali reakcij niti v kontroli številka 3. Protitelesa Pt A-P so bila zelo podobno ocenjena kot Pt A-S, s to razliko, da z njimi v nobeni kontroli nismo zaznali pozitivne reakcije, povsod pa je bilo prisotno šibko ozadje. Za obe primerjani protitelesi lahko trdimo, da je bila predobdelava v fosfatnem pufru s proteazo zanju manj primerna, kot tisti v citratnem pufru ali v pufru Tris-EDTA (Slike 10, 14 in 17). Protitelesa Pt B-S tudi v teh pogojih ponovno niso generirala nobene reakcije. S protitelesi Pt C-S smo dobili močno obarvanost v vseh celicah, pri čemer nismo zaznali ozadja (Preglednica XVII). Po pregledu ocenjevanih parametrov testiranja kontrolnih preparatov v fosfatnem pufru s proteazo smo ugotovili, da so se ti pogoji dobro obnesli le za protitelesa Pt C-S. Na podlagi rezultatov vidimo, da je za vsa testirana protitelesa, razen za Pt C-S, proteolitično razkrivanje antigena zanje neprimerno.

Glede na rezultate, določene z različno dolgimi predobdelavami preparatov v različnih pufrih lahko zaključimo, da so bili ti najboljši pri uporabi pufra Tris-EDTA (Preglednice XI-XIII), temu so sledili rezultati predobdelave v citratnem pufru (Preglednice XIV-XVI), najslabši pa so bili tisti, ki smo jih ovrednotili po uporabi fosfatnega pufra s proteazo (Preglednica XVII). To potrjujejo tudi izračunane vrednosti median posameznih parametrov (Grafi 1-9). Po uporabi pufra Tris-EDTA je mediana intenzitet reakcij najvišjo vrednost 3 dosegla pri dveh protitelesih (Pt A-S in Pt C-S), pri tretjem (Pt A-P) je bila ta vrednost 2 oz. 1 in pri četrtem (Pt B-S) 0 (Graf 1). Tovrstne mediane vrednosti so bile v primeru uporabe citratnega pufra pri istih dveh protitelesih (Pt A-S in Pt C-S) 2 oz. 1, pri tretjem protitelesu (Pt A-P) 1 in pri četrtem (Pt B-S) ponovno 0 (Graf 4). Po uporabi fosfatnega pufra s proteazo pa smo najvišjo mediano vrednost 3 določili le pri enem protitelesu (Pt C-S), medtem ko je bila pri ostalih treh (Pt A-S, Pt A-P in Pt B-S) enaka 0 (Graf 7). Uporaba pufra Tris-EDTA se je izkazala kot najustreznejša tudi pri ocenjevanju medianih vrednosti % reakcij, saj smo za tri preskušana protitelesa (Pt A-S, Pt A-P in Pt C-S) določili najvišjo vrednost 3, za četrto protitelo (Pt B-S) pa 0 (Graf 2). Po uporabi citratnega pufra smo najvišjo tovrstno mediano vrednost 3 oz. 2 izračunali pri dveh protitelesih (Pt A-S in Pt C-S), pri tretjem (Pt A-P) je bila ta 2 oz. 1 in pri četrtem (Pt B-S) 0 (Graf 5). V primeru uporabe fosfatnega pufra s proteazo smo najvišjo mediano vrednost 3 pri vrednotenju % reakcij določili le pri enem protitelesu (Pt C-S), pri ostalih treh pa je

bila enaka 0 (Graf 8). Pri ocenjevanju pojavnosti ozadja sta bila pufer Tris-EDTA in citratni pufer izenačena, saj smo po njuni uporabi zaznali ozadje z mediano vrednostjo 1 samo pri uporabi enega protitelesa (Pt A-P) (Grafa 3 in 6). Po uporabi fosfatnega pufra s proteazo pa smo določili mediano vrednost 1 v primeru dveh protiteles (Pt A-S in Pt A-P) (Graf 9). Po pregledu in ocenitvi vseh preparatov se je patologinja odločila, da je za IHK določanje BTL najprimernejša 15-minutna predobdelava v pufru Tris-EDTA. Pri primerjavi protiteles so se kot najboljša izkazala Pt C-S in Pt A-S (Slika 11). Manj primerna so bila protitelesa Pt A-P, povsem neustrezna pa protitelesa Pt B-S (Slika 8). Patologinja je za nadaljnja testiranja, kot najboljša, izbrala protitelesa Pt C-S.

Za vsa testiranja smo uporabili pozitivno in nespecifično negativno kontrolo. Rezultati pozitivnih kontrol po testiranju protiteles proti BTL niso bili že vnaprej znani. S testiranjem smo iskali ustrezne rezultate in želeli ugotoviti katera od protiteles bi bila najprimernejša za rutinsko uporabo pri IHK barvanjih BTL. Z uporabo nespecifične negativne kontrole smo potrdili, da reakcije na pozitivnih kontrolah niso rezultat neželenega obarvanja ozadja. Vse nespecifične negativne kontrole, ki smo jih uporabili so bile pričakovano negativne. Specifične negativne kontrole nismo uporabili, ker niti antigen BTL, niti protitelesa proti BTL še niso dovolj raziskana in vpeljana na področje patohistologije. Zato tudi še ne vemo zanesljivo katero tkivo bi bilo najprimernejše za specifično negativno kontrolo. Posledično se moramo pri interpretaciji vseh dobljenih rezultatov zavedati, da nismo izključili možnih vplivov neželenih navzkrižnih reaktivnosti s poznanimi vrstami celic oz. celičnih komponent. Pri nekaterih pozitivnih kontrolah so se ocene reakcij malenkost razlikovale, kar bi lahko pripisali morebitnim manjšim nepravilnostim pri izvedbi IHK postopka. Vendar pa te, tudi če so bile prisotne niso ključno vplivale na osnovni namen pozitivne kontrole; to je na prikaz pozitivne reakcije, ki potrjuje prisotnost proteina BTL na tkivu. Da bi se izognili manjšim odstopanjem v intenzitetah in odstotkih reakcije ter ozadju, bi testiranja lahko izvedli na avtomatskem barvalniku. Tako bi izključili morebitne napake pri izvedbi postopka IHK in dosegli popolnoma standardizirano barvanje.

Pri ponovitvah oz. pri nadgradnji naših testiranj bi se morali zavedati, da bi lahko dobili drugačne rezultate zaradi uporabe drugih pozitivnih kontrol. Kontrole pri IHK metodah namreč niso standardizirane, saj v nasprotju z npr. serumskimi vzorci, tkivnih vzorcev različnih izvorov ne moremo združiti v enega, poleg tega pa tudi oskrba z njimi ni

neskončna. Morfološko podobni tumorji in tkiva si niso nujno podobni tudi v antigenosti. Prav tako bi lahko bil postopek, optimiziran v drugem patohistološkem laboratoriju nekoliko drugačen, saj se za fiksacijo in procesiranje tkiva uporabljam reagenti različnih proizvajalcev kar seveda lahko vpliva na IHK postopek barvanja preparatov.

Po pregledu in primerjavi preparatov normalnega oz. zdravega tkiva in tkiv različnih stadijev raka DČD, je patologinja ugotovila, da med njimi ne obstaja bistvena razlika v intenziteti izražanja BTL (Slika 19). Intenzitete reakcij na zdravem in rakavem tkivu so bile enako močne, in sicer ne glede na stadij bolezni. Močna intenziteta reakcij v zdravem tkivu je bila pričakovana in smo jo potrdili pri testiranju protiteles Pt C-S v kontrolnih preparatih normalnega tkiva debelega črevesa. Pri rakavih vzorcih pa so bila naša pričakovanja drugačna, saj smo predvidevali, da se bo intenziteta reakcij spremnjala v odvisnosti od stadija raka. Tako smo za stadij I pričakovali najmočnejšo intenziteto reakcij, pri stadiju IV pa najšibkejšo. Predpostavljal smo namreč, da je v rakastem tkivu stadija I BTL še normalno prisotna, medtem ko se v višjih stadijih izraža vedno manj. Tega žal nismo uspeli potrditi, zato smo sprejeli sklep, da protitelesa Pt C-S niso primerna za uporabo v diagnostiki raka DČD. Pri tem pa se moramo zavedati, da je bilo v raziskavo vključeno razmeroma majhno število bolnikov z rakom DČD. Kljub temu menimo, da je bila reprezentativnost izbranih bolnikov dobra, saj smo zajeli take z vsemi različnimi stadiji raka, znotraj posameznih skupin teh stadijev pa so bili zajeti bolniki z raki različnih gradusov.

6. SKLEP

V okviru magistrske naloge smo testirali izbrana monoklonska protitelesa, ki prepoznavajo bilitranslokazo (BTL) in ugotavljali, katero od njih bi bilo najprimernejše za imunohistokemijsko (IHK) barvanje in potencialno uporabo v diagnostične namene. Ugotoviti smo želeli tudi, kateri pogoji so najprimernejši za IHK določanje izražanja bilitranslokaze (BTL) in ali obstajajo razlike v njenem izražanju na normalnem, zdravem tkivu in na črevesnih tkivih bolnikov z rakom debelega črevesa in danke (DČD).

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

- kot najprimernejša za IHK dokazovanje izražanja bilitranslokaze (BTL) na tkivnih rezinah črevesa so se izkazala protitelesa Pt C-S;
- najučinkovitejša med preizkušanimi metodami za IHK razkrivanje antiga BTL je bila 15-minutna predobdelava preparatov v pufru Tris-EDTA;
- ker nismo našli bistvenih razlik v izražanju BTL na normalnem, zdravem črevesnem tkivu in na tkivih različnih stadijev raka debelega črevesa in danke (DČD), menimo, da IHK določanje prisotnosti BTL ni metoda, ki bi bila uporabna za diagnostiko te bolezni.

LITERATURA

1. http://www.cartercenter.org/resources/pdfs/health/ephti/library/lecture_notes/health_extension_trainees/GeneralPathology.pdf, dostopno: november 2015
2. <http://www.zdravstvena.info/vsznj/uvod-v-patologijo-in-celicna-patologija/>, dostopano: november 2015
3. David J. Dabbs: Diagnostic Immunohistochemistry Theranostic and genomic application, 4th edition. Saunders Elsevier© 2014, 1-38
4. Suvarna SK, Layton C, Bancroft JD. Bancroft's theory and practice of histological techniques, 7th edition. Churchill Livingstone Elsevier© 2013, 381-409
5. Humera Kausar, Antigen and Antibody Interaction basis of serological testing, 31. oktober 2014, slide 24
6. <http://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/dokumenti/1-2000-novakovic.pdf>, dostopano: januar 2016
7. Taylor CR, Rudbeck L: Immunohistochemical Staining Methods, 6th Edition; Urednika Clive R. Taylor in Lars Rudbeck; Dako Denmark© 2013, 11-18
8. http://neuron.mefst.hr/docs/graduate%20school/novotvorine/popis_predmeta/IHK_metod_e/Imunohistokemija.pdf, dostopano: februar 2016
9. <http://bitesizebio.com/13392/troubleshooting-immunohistochemistry/>, dostopano: januar 2016
10. http://genom.mefst.hr/postdipl_BN/predmeti/ImunoHistokemija/Uvod_u_h-kemiju.pdf, dostopano: februar 2016
11. Perdih A, Choudhury AR, Župerl Š, Sikorska E, Zhukov I, Solmajer T, Novič M. Structural Analysis of a Peptide Fragment of Transmembrane Transporter Protein Bilitranslocase. PLoS ONE 2012; 7:1-13
12. Montanič S, Bonin S, Čurin Šerbec V, De Leo L, Passamonti S, Rajčević U, Terdoslavich M. Development and characterization of a novel mAb against bilitranslocase - a new biomarker of renal carcinoma. Radiology and oncology (Ljubljana) 2013; 47(2):128-137
13. Čvorović J, Tramer F, Passamonti S. Bilitranslocase and anthocyanins role in the gastrointestinal tract. Urednik Sabina Passamonti, EUT (Edizioni Università di Trieste) 2014, 151-152

14. Battiston L, Passamonti S, Macagno A, Sottocasa GL. The Bilirubin-Binding Motif of Bilitranslocase and Its Relation to Conserved Motifs in Ancient Biliproteins. Biochemical and Biophysical Research Communications 1998; 247(3):687–692
15. Lukan T. Opredelitev in uporaba monoklonskih IgM monoklonskih protiteles proti zaporedju EFTYQLTSSPTC, izbranem na osnovi modela bilitranslokaze. Diplomsko delo; Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijsko tehnologijo, 2013
16. <https://globalmedicaldiscovery.com/key-scientific-articles/structural-analysis-of-a-peptide-fragment-of-transmembrane-transporter-protein-bilitranslocase/>, dostopano: marec 2016
17. <http://www.whatisthebiotechnology.com/blog/hybridoma-technology/>, dostopano: december 2015
18. <http://www.slideshare.net/aalamaram/ihc-technology>, dostopano: december 2015
19. <http://bitesizebio.com/7619/immunohistochemistry-getting-the-stain-you-want/>, dostopano: januar 2016
20. http://www.onkologija.com/sl/domov/o_raku/rak_prebavil/rak_debelega_crevesa_in_danke/postavitev_diagnoze_in_stadija_bolezni/, dostopano: januar 2016
21. Štabuc B. Odkrivanje in preprečevanje zgodnjih oblik raka debelega črevesa in danke; Radiology and Oncology (Ljubljana) 2006; 40:107-114