SVEUČILIŠTE U RIJECI

FAKULTET ZDRAVSTVENIH STUDIJA

DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKE DIJAGNOSTIKE

KATJA PULJČAN

**IMUNOHISTOKEMIJSKE REAKCIJE NA PARAFINSKIM REZOVIMA TKIVNIH MIKRO AREJA PRETHODNO SMRZNUTOG TKIVA U ODNOSU NA NESMRZNUTO TKIVO GLIOBLASTOMA**

Diplomski rad

Rijeka, 2016.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

FAKULTET ZDRAVSTVENIH STUDIJA

DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKE DIJAGNOSTIKE

KATJA PULJČAN

**IMUNOHISTOKEMIJSKE REAKCIJE NA PARAFINSKIM REZOVIMA TKIVNIH MIKRO AREJA PRETHODNO SMRZNUTOG TKIVA U ODNOSU NA NESMRZNUTO TKIVO GLIOBLASTOMA**

Diplomski rad

Rijeka, 2016.

*Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Nives Jonjić i sumentorici prof. dr. sc. Kameliji Žarković na nesebičnoj pomoći i zalaganju, savjetima i konstruktivnim kritikama koje sam primila tijekom izrade ovog rada.*

*Zahvaljujem se svojim kolegama i kolegicama sa Zavoda za Patologiju i patološku anatomiju Medicinskog fakulteta u Rijeci koji su svojom strpljivošću, razumijevanjem i korisnim savjetima pridonijeli izradi ovoga rada.*

*Zahvaljujem se svom suprugu Mariju i dječici Marku, Ani i Mariji na bezrezervnoj podršci u svakom smislu i razumijevanju na tome „da mama mora nešto pisati“. Ovo je za vas!!!*

SADRŽAJ

[1. Uvod 1](#_Toc462739239)

[1.1. Glioblastomi 1](#_Toc462739240)

[1.2. Imunohistokemijske tehnike 4](#_Toc462739241)

[1.3. Tkivni mikro areji 12](#_Toc462739242)

[2. Ciljevi istraživanja i hipoteza 13](#_Toc462739243)

[3. Materijali i metode 15](#_Toc462739244)

[3.1. Materijali 15](#_Toc462739245)

[3.2. Metode 15](#_Toc462739246)

[3.2.1. Smrzavanje uzoraka i fiksacija tkiva 15](#_Toc462739247)

[3.2.2. Procesiranje tkiva 17](#_Toc462739248)

[3.2.3. Uklapanje tkiva 19](#_Toc462739249)

[3.2.4. Izrada parafinskih rezova 19](#_Toc462739250)

[3.2.5. Histokemijsko bojenje 20](#_Toc462739251)

[3.2.6. Izrada TMA 21](#_Toc462739252)

[3.3. Imunohistokemijsko bojenje tkiva 27](#_Toc462739253)

[3.3.1. Predtretman tkiva 27](#_Toc462739254)

[3.3.2. Razotkrivanje antigena - manualne metode 27](#_Toc462739255)

[3.3.3. Automatizirana metoda predtretmana tkiva 29](#_Toc462739256)

[3.4. Primarna protutijela i njihove pozitivne kontrole 30](#_Toc462739257)

[3.4.1. GFAP 30](#_Toc462739258)

[3.4.2. S100 30](#_Toc462739259)

[3.4.3. Ki-67 31](#_Toc462739260)

[3.4.4. IDH1 31](#_Toc462739261)

[3.5. Automatizirana metoda imunohistokemijskog bojenja tkiva 31](#_Toc462739262)

[3.6. Analiza imunohistokemijskih preparata 34](#_Toc462739263)

[3.6.1. Automatizirana analiza imunohistokemijske metode bojenja 34](#_Toc462739264)

[3.6.2. Kvantifikacija uz pomoć svjetlosnog mikroskopa 34](#_Toc462739265)

[3.6.3. Statistička obrada rezultata 35](#_Toc462739266)

[4. Rezultati 35](#_Toc462739267)

[4.1. Rezultati pojavnosti Ki-67 u obje vrste uzoraka 35](#_Toc462739268)

[4.2. Rezultati pojavnosti GFAP u obje vrste uzoraka 43](#_Toc462739269)

[4.3. Rezultati pojavnosti IDH1 u obje vrste uzoraka 51](#_Toc462739270)

[4.4. Rezultati pojavnosti S100 u obje vrste uzoraka 58](#_Toc462739271)

[4.5. Sumarna statistička obrada inteziteta IHC reakcije za GFAP, S100 i IDH1 66](#_Toc462739272)

[5. Rasprava 67](#_Toc462739273)

[6. Zaključci 70](#_Toc462739274)

[7. Sažetak 71](#_Toc462739275)

[8. Summary 72](#_Toc462739276)

[9. Literatura 73](#_Toc462739277)

[10. Prilozi 80](#_Toc462739278)

[11. Životopis 81](#_Toc462739279)

[12. Biography 82](#_Toc462739280)

# 1. Uvod

## 1.1. Glioblastomi

Glioblastom (GBM) je prema SZO određen kao maligni astroglijalni tumor gradusa IV. Sadržan je u 15 % svih intrakranijalnih neoplazmi, te čini 50 % svih astrocitnih tumora. Incidenciju u populaciji čine 4 nova slučaja na 100 000 osoba pretežito u Europskoj populaciji (1). Glioblastomi se manifestiraju u svim dobnim skupinama, ali najčešće se pojavljuju između četrdesete i sedamdesete godine života. Povećan rizik za nastanak GBM postoji kod osoba koje su imale u anamnezi tretmane ionizirajućeg zračenja glave i vrata, a smanjen rizik kod osoba povezanih sa kliničkom slikom alergija i atopijskih bolesti (2).

Prema kliničko-genetičkim karakteristikama podijeljeni su na primarne i sekundarne GBM . Pojavnost primarnih (*de novo*) GBM je učestalija, te čini 90 % slučajeva, a očituje se kao potpuno novi tumor nakon kratke kliničke povijesti, bez prethodnog dokaza o postojanju prijašnje maligne lezije (3). Karakteristična pojavnost je u starijim dobnim skupinama kao i muškoj populaciji. Sekundarni GBM nastaju iz bolje diferenciranih astroglijalnih tumora, te je njihova učestalost 10 % i karakteristični su za mlađu dobnu populaciju i ženski spol. Najčešće se pojavljaju u moždanim hemisferama. Glioblastomi moždanog debla nisu česti osim kod djece, dok su mali mozak i kralježnička moždina rijetka mjesta nastanka (4). Izrazito loša klinička prognoza je rezultat brzog širenja te čini kompletnu resekciju zahvaćenog područja nemogućom. Nove mase tumora mogu se tada pojaviti na drugoj strani, tvoreći neuroradiološku sliku multižarišnog glioblastoma. Multižarišnost neurološke slike predstavlja širenje originalne lezije na daljnja mjesta. Unatoč visokom infiltrativnom potencijalu, nemaju obrazac širenja kroz subarahnoidalne prostore i rijetko diseminiraju kroz cerebrospinalnu tekućinu. Širenje prema perivaskularnim prostorima čini jedan način infiltracije, dok invazija kroz vaskularni zid rezultira hematogenim širenjem prema ekstraneuralnim tkivima, što je vrlo rijetko kod pacijenata koji nisu bili podloženi prethodnoj kirurškoj intervenciji (5). Iznimka su prodiranje u duru, venske sinuse (6) i koštanu srž.

Simptomi se pojavljuju naglo i progresivno, osim ako se neoplazma nije razvila iz niskogradusnog astrocitoma. Pacijenti najčešće imaju nespecifične neurološke simptome, pulsirajuće glavobolje, promjene ličnosti i epilepsiju te hemiparezu i afaziju (7). Makroskopski izgled pokazuje heterogenost sa perifernom sivom tumorskom masom, žutom nekrozom te manjim hemoragičnim područjima koja su raspršena kroz neoplazmu. Centralna nekroza zauzima i do 90 % cijele tumorske mase. Prisutne ciste sadrže mutnu tekućinu, te predstavljaju tekuće nekrotično tumorsko tkivo. Dokazana je frekvencija manifestacije sekundarnog glioblastoma na frontalni režanj, osobito na regiju koja okružuje rostralne lateralne moždane komore (8). Infiltrativno širenje definira sve difuzne GBM , dok je kod GBM osobita općepoznata rapidna invazija na susjedne moždane strukture (9). Neovaskularizacija glijalnih tumora mozga korelira sa njihovom biološkom agresivnošću, stupnjem zloćudnosti i prognozom (10).

Patohistološka slika GBM je veoma varijabilna. Tumorske stanice su poredane oko centralne nekroze. Regionalna heterogenost GBM je prisutna te čini problem u dijagnostici isječaka načinjenih stereotaksijskom iglenom biopsijom (11). Prisutnost anaplastičnih glijalnih stanica, mitotička aktivnost te mikrovaskularna proliferacija sa/ili nekrozom dijagnostički su najvažanija obilježja glioblastoma. Medijan preživljenja je 12 mjeseci i ne ovisi o primijenjenom liječenju.

Primarni i sekundarni GBM razlikuju se po pojavnosti u dobnim skupinama, kliničkom tijeku nastajanja te imaju različitu molekularno-genetičku osnovu nastanka, dok su histološki vrlo slični. Prema istraživanjima (12) projekta Cancer Genome Atlas (TCGA) identificirana su četiri subtipa glioblastoma koji su klasificirani prema svojim dominatnim genskim ekspresijama te su podijeljeni na proneuralni, neuralni, mezenhimalni i klasični subtip. Svaki subtip udružen je sa specifičnim genetičkim i epigenetičkim obilježjima. Iz toga proizlazi da je pojavnost sekundarnih GBM vezana uz proneuralni subtip, dok pojavnost primarnih glioblastoma može biti vezana uz bilo koji subtip. Molekularno-genetički signalni putovi koji su involvirani u nastanku GBM pod utjecajem genskih mutacija, delecija, amplifikacija ili drugih molekularnih promotora podijeljeni su u tri patološka genetičko-molekularna puta:

* p53 (TP53, MDM2/MDM4, ARF)
* retinoblastomom (Rb1, cdk4, CDKN2A/p16)
* receptorima tirozin kinaze (EGFR, PDGFR, MET, PI3-kinaza, PTEN, Neurofibrimatoza 1).

Primarni GBM su obilježeni amplifikacijom EGFR gena (engl. *epidermal grow factor receptor*) uključenih u kontrolu stanične diobe. Delecijom EGFR varijante (13) EGFRvIII javlja se rezinstencija na apoptozu, nekontrolirani rast i razvoj stanica te je prisutna mutacija u korelaciji sa smanjenim preživljenjem. Direktna mutacija supresor gena staničnog ciklusa TP53 na kromosomu 17 koji kodira p53 protein predstavlja početno obilježje patogeneze sekundarnih GBM (14).

PTEN (engl. *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*) kao tumor supresor gen nalazi se na kromosomu 10 te je negativni regulator PI3K/Akt signalnog puta. Gubitak funkcije PTEN-a ima bitnu ulogu u kancerogenezi zbog hiperaktivacije Akt-a (protein kinaza B) i direktno utječe na izbjegavanje stanične apoptoze i utječe na preživljenje (15). PTEN utječe na regulaciju rasta stanice i apoptozu, staničnu migraciju kao i angiogenezu (16).

Nadalje, Akt aktivira stanični rast putem mTORC (engl*. mechanistic target of rapamycin complex*). Mutacijom supresor gena na kromosomu 10 dolazi do gubitka heterozigotnosti (LOH), te je ta mutacija udružena sa pojavnošću glioblastoma.

Osnovna funkcija tumor supresor gena TP53 koji se nalazi na kromosomu 17 je kodiranje proteina p53 koji ima ulogu u reparaciji DNA pri zastoju staničnog ciklusa ili navođenje stanice u apoptozu (17). Posljedično tome dolazi do nemogućnosti kontrole proliferacije. Najčešći mehanizmi inaktivacije su točkaste mutacije, gubitak dijela kratkog kraka kromosoma 17 i amplifikacija MDM2 (*engl. murine double minute 2)* što dovodi do redukcije njegove unutarstanične koncentracije, ali i do nakupljanja aberantnog p53 proteina (18), a posljedično dolazi do zaustavljanja staničnog ciklusa u G1 fazi i popravljanja oštećene DNA ili do pokretanja apoptoze ako su ta oštećenja ireverzibilna.

Gen MGMT (engl*. O-6-methylguanine-DNA metiltransferase*) kodira za DNA protein čije je djelovanje usmjereno na uklanjanje alkilne skupine iz O6 pozicije na gvaninu, te MGMT postaje ireverzibilno inaktiviran vezanjem alkilne skupine (19). Utvrđivanje metilacijskog statusa služi kao marker prognostičkog značaja.

Novija istraživanja pokazuju učestalu alteraciju (20) gena uključenih u kromatin remodelirajući put kao α-thalassemia/mental-retardation-sindrome-X-linked gene (ATRX). ATRX je potencijalni prediktivni marker izocitrat dehidrogenaze (IDH) kod glioma. Gubitak nuklearne ATRX ekspresije je pridružen obitelji astrocističnih tumora i mlađoj dobnoj populaciji te upućuje na IDH1/IDH2 mutaciju kao i mutaciju H3F3A u 89 % ispitanika dok 11 % ispitanika pripada skupini bez IDH mutacije, tzv. divljem tipu (wild tipe status) (21). Bolje preživljenje je povezano sa postojanjem IDH1/2 mutacije, a lošije u njezinoj odsutnosti (22). Stoga, ATRX mutacija je pridružena pojavnošću sekundarnih glioblastoma.

## 1.2. Imunohistokemijske tehnike

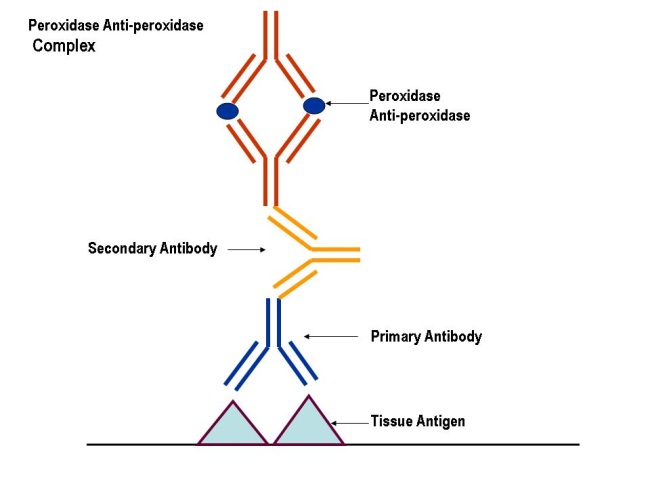
Imunohistokemijska analiza je široko primijenjena biološka tehnika koja povezuje imunologiju i histologiju. Temelji se na reakciji antigen-antitijelo koje zajedno drže vodikove veze, elektrostatska interakcija (23) i van der Waalsove sile te se može smatrati metodom koja vizualizira distribuciju i lokalizaciju specifičnog antigena ili stanične komponente u isječku tkiva, te identificira stanična događanja (apoptozu i sl.). Vrši se na tkivnim isječcima koji su prethodno fiksirani, procesuirani u tkivnom procesoru te uklopljeni u parafin. Imunohistokemija je primijenjena metoda diferencijalnog karaktera, pojašnjava i potvrđuje dijagnostiku patološke anatomije. U usporedbi s ostalim biološkim tehnikama imunohistokemija omogućuje in situ informaciju. Antigen se može nalaziti u citolazmi, jezgri, staničnoj membrani te na lipidima i proteinima. Imunohistokemijska tehnika mora biti dovoljno osjetljiva da može detektirati dovoljan broj antigena te vizualizirati reakciju. Obilježivači mogu biti enzimi koji su široko primijenjeni u imunohistokemiji koji inkubirani sa kromogenom produciraju stabilne obojene reakcije primjenjive za svjetlosnu mikroskopiju. Imunoenzimske metode bojenja koriste enzim-substrat reakciju da bi se bezbojni kromogen preinačio u obojenu reakciju. Stoga, detekcijski kompleks čini kromogen, enzim i supstrat.

Peroksidaza iz hrena (HRP, engl. *horseradish peroxidase*) je najrašireniji enzim obilježivač u primjeni zbog svoje stabilnosti te nije podložan kontaminaciji. Drugi značajan enzim je teleća intestinalna alkalna fosfataza (AP, engl. *calf intestine alkaline phosphatase*) koja se razvila primjenom imunohistokemijske APAAP metode. Najčešće korišteni kromogen u imunohistokemijskim reakcijama je DAB (3, 3'-diaminobenzidin) koji je stabilan i prikazuje imunoreakcije tamno smeđe boje, dok su manje zastupljeni kromogeni 3-amino-9-etilkabazol koje daje crvenu boju rekciji, zatim 4-klor-11-naftol koje stvara plavu boju reakciji; Hanker-Yates reagens stvara tamno plavu boju, dok α-naftol pironin stvara crveno ljubičastu boju reakcijama.

Povijest metoda bojenja imunoloških reakcija počinje Marrackovim produciranjem reagensa usmjerenog na mikroorganizme tifusa i kolere koristeći crvenu boju konjugiranu na benzidin tetraedar. Coons 1941. god. otkriva da slaba reakcija pod svjetlosnim mikroskopom može biti bolje predočena i vizualizirana ako se na tkivnim isječcima primijeni antitijelo koje je vezano sa fluoresceinom pod ultraljubičastim svjetlom.

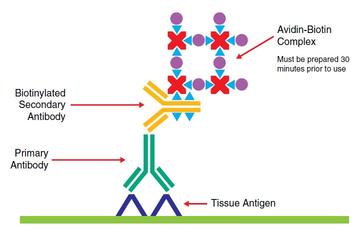
Naknadno, uvođenjem enzima peroksidaze kao obilježivače na antitijelima koje je razvio 1967. god. Nakane i Pierce, najavljuje se važna era za imunohistokemiju otkako je postojala mogućnost vizualizacije reakcija optičkim mikroskopom. Masonovom APAAP (engl*. alkaline phosphatase-antialkaline phosphatase method*) metodom 1984. god. značajno se razvija primijenjena imunohistokemijska tehnika predstavljanjem alkalne fosfataze. Stemberger 1980. god. otkrivanjem indirektne PAP (engl. *unlabeled antibody peroxidase-antiperoksidase method*) metode uvodi peroksidazu-antiperoksidazu.

PAP metoda je rezultat razvoja indirektne metode imunohistokemijskog bojenja. Kod PAP metode uvedeno je treće protutijelo koje je vezano na sekundarno sa kompleksom peroksidaza-antiperoksidaza, te je taj kompleks vezan na primarno protutijelo koje prepoznaje antigen (24). Indirektna metoda imunohistokemijskog bojenja je temeljena na tome da se na tkivni antigen veže neobilježeno antitijelo, dok spajanjem sekundarnog antitijela koje je obilježeno te usmjereno na Fc fragment primarnog protutijela nastane reakcija koja je osjetljivija nego direktna metoda. PAP kompleks se ponaša kao antigen reagirajući sa sekundarnim protutijelom te predstavlja treći sloj reakcije. Ovdje nema gubitka enzimatske djelotvornosti zbog toga što ne postoji samo kemijska vezanost peroksidaze na sekundarno protutijelo, nego je stvoren imunološki kompleks (25). Osjetljivost ove metode je pojačana uz reduciran utrošak količine primarnog protutijela.



*Slika 1*. Shematski prikaz PAP metode. Preuzeto sa <https://www.google.hr/search?q=pap+metoda+imunohistokemija&espv=2&biw=1366&bih=667&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiBpJOtyL_OAhXJbhQK>, 1.8.2016.god.

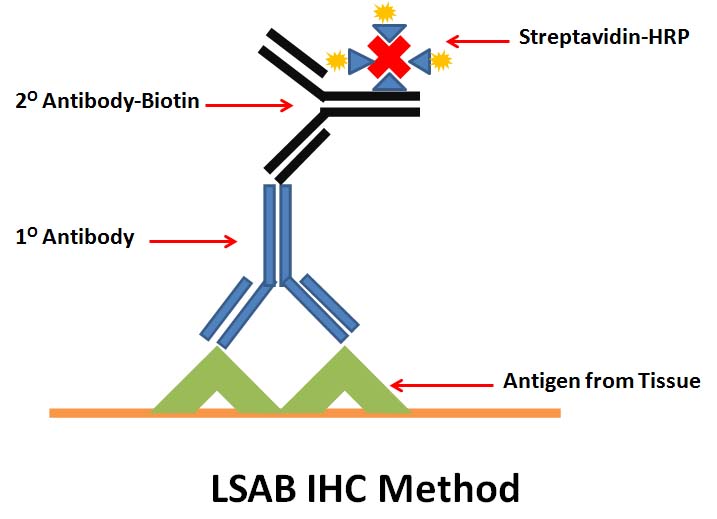
Princip APAAP metode je isti kao i kod PAP metode, osim što je ovdje PAP kompleks zamijenjen APAAP kompleksom. Bojenje tkiva je praćeno velikom količinom endogene peroksidaze. Obojeni specifični stanični tipovi produciraju crvenu boju. Huangovim otkrićem metoda za otkrivanje antigena gdje se izlažu epitopi antigena za ostavarivanje antigen-antitijelo reakcije koja slijedi kao idući korak u tehnikama (26), razvija se sustav detekcije sekundarnog antitijela kao što je ABC (engl. *avidin-biotin-peroxidase method*) i Hsuova LSAB (engl. *labeled streptavidin-biotin complex*) metoda. Avidin biotin metode oslanjaju se na snažnom afinitetu avidina ili streptavidina na vitamin biotin. Streptavidin i avidin posjeduju četiri vezna mjesta za biotin. ABC metoda je tehnika koja uključuje stvaranje tri sloja. Prvi sloj stvoren je dodatkom primarnog neoznačenog antitijela. Drugi sloj nastaje dodatkom biotinom vezanog sekundarnog antitijela. Treći sloj nastaje dodatkom kompleksa avidin-biotin-enzim (peroksidaza). Peroksidaza reagira dodavanjem DAB-a ili drugog substrata te se razvija obojeni krajnji produkt.



*Slika 2*. Shematski prikaz ABC metode. Preuzeto sa <http://www.slideshare.net/shiningpearl18/abc-method-of-ihc-32395131>, 01.08.2016.god.

LSAB metoda je primjenom streptavidina zamijenila avidin. Streptavidin kao derivat Streptococcusa avidini za razliku od avidina ima izoelektričnu točku 0 (pl=0) što znači da se onemogućuje elektrostratsko vezanje sa tkivom (27). Također, streptavidin ne stvara pozadinsko bojenje zbog svoje strukture ugljikohidratne skupine koja se ne veže na tkivne lektine. Kod ABC metode prije aplikacije primarnog antitijela nužno je blokirati djelovanje biotina da se izbjegne nastajanje nespecifičnog bojenja uzrokovano vezanjem avidina s endogenim biotinom. Izvedbeno, ABC metoda i LSAB metoda su slične. Prvi sloj nastaje dodatkom neobilježenog primarnog protutijela. Drugi sloj dobiva se dodatkom biotinom obilježeno sekundarno protutijelo. Treći sloj čini enzim-streptavidin konjugat (HRP- streptavidin ili AP-streptavidin) koji mijenja kompleks avidin-biotin-peroksidazu kod ABC metode. Enzimska aktivnost se vizualizira apliciranjem kromogen substrata koji oboji krajnji produkt. LSAB metoda je pet do deset puta osjetljivija metoda od ABC metode (28).

 Ova otkrića dopustila su imunohistokemiji da bude nezamjenjiva u patohistološkom laboratoriju. Unatoč tome, tek nakon što je tkivni antigen mogao biti prikazan imunoperoksidaznom tehnikom u fiksiranom tkivu sa formalinom i prožetim parafinom, primijenjena imunohistokemija je tek tada mogla postati dijelom rutinske dijagnostike patohistološkog laboratorija.



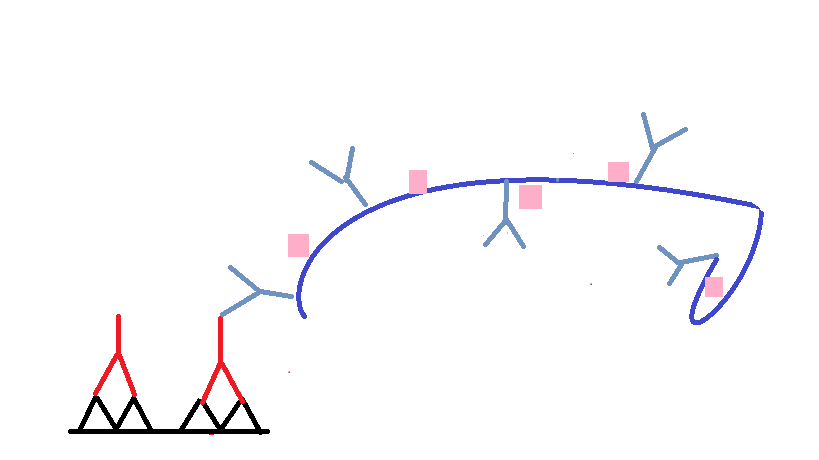
*Slika 3*. Shematski prikaz LSAB metode. Preuzeto sa <http://image.slidesharecdn.com/immunocytochemicalstaining-140706095517-phpapp01/95/immunocytochemical-staining-36-638.jpg?cb=1404640609>, 1.8.2016.god.

Direktna metoda imunohistokemijskog bojenja bazirana je na tome da je primarno antitijelo konjugirano direktno na obilježivač. Konjugat može biti fluorokrom ili enzim. Obilježeno antitijelo reagira direktno s antigenom na histološkom preparatu. Metoda je brza i jednostavne izvedbe, omogućuje mali amplifikacijski signal dok mu je nedostatak smanjena osjetljivost. Novija direktna tehnika razvijena prema Pulzeku 1993. god. komercijalnog naziva EPOS (engl. *Enhanced Polymer One-Step Staining*) bazirana je na velikom broju primarnih antitijela i enzima peroksidaze koje su privijene na polimer dextran (engl. *dextran backbone*) te su stoga amplificirani signal i veća osjetljivost prednosti ove metode.

Indirektna metoda u dva koraka (engl. *two-step indirect technique*) čini obilježeno sekundarno antitijelo direktno usmjereno na imunoglobulin životinjske vrste u kojoj je primarno antitijelo nastalo te vizualizira neobilježeno primarno antitijelo. Kao obilježivač koristi se peroksidaza iz hrena (HRP) zajedno sa prikladnim kromogen supstratom. Ova tehnika je visoko osjetljiva zbog korištenja multiplih sekundarnih antitijela koje mogu reagirati sa različitim mjestima na primarnom protutijelu povećavajući amplificirani signal.

Indirektna metoda u dva koraka na polimernom lancu (engl. *polymer chain two-step indirect technique)* koristi tehnologiju (EnVision™) nekonjugiranog primarnog antitijela u interakciji sa sekundarnim antitijelom konjugiranim na enzim peroksidaze, a sve je vezano na polimerni lanac dekstran (29). Konjugacijom anti mišjih (engl. *anti-mouse*) i anti zečjih (engl. *anti-rabbit*) sekundarnih protutijela omogućuje se reagensu da se koristi za monoklonalna protutijela (zec i miš) i poliklonalna (zečja) primarna antitijela (30). Dekstran na sebi ima vezano desetak sekundarnih protutijela i sedamdesetak molekula enzima peroksidaze ili alkalne fosfataze. Nevedeni polimer se veže na jedno primarno protutijelo. Prednosti ove metode su povećana osjetljivost naspram LSAB metode, pozadinsko bojenje je minimalno te je izvođenje metode jednostavnije od ranijih tehnika koje su bile u upotrebi. Nadalje, razvojem EnVision+ sustava uveo se pojačivač (engl. *linker*) koji se u standardni EnVision sustav pridodao u obliku dodatnog reagensa te sadrži mišja odnosno zečja protutijela i time stvara dodatnu amplifikaciju signala (31).

DAKO EnVision TM



Polimerni lanac lanaclanac

Tkivni antigen

Imunoperoksidaza (HRP)

Primarno protutijelo

Sekundarno protutijelo

*Slika 4*. Indirektna EnVision™ metoda bojenja u dva koraka. Preuzeto i prilagođeno sa [http://www.slideshare.net/DRKALPAJYOTI/immunohistochemistry-methods 25.06.2016](http://www.slideshare.net/DRKALPAJYOTI/immunohistochemistry-methods%2025.06.2016). god.

Impress sistem je drugačiji tip polimerne metode koja se koristi u imunohistokemiji. Za razliku od EnVision sustava, ovaj sustav ne zahtijeva dekstran lanac. Primarno antitijelo se veže na antigen od interesa. Na primarno protutijelo veže se polimerni lanac sastavljen od mnogobrojnih enzimskih monomera koji su pričvršćeni na sekundarno protutijelo. Prednosti i nedostaci ove metode su slični kao i kod EnVision sustava. Nepostojanjem dekstrana, koji ima veliku molekularnu masu, olakšava se učinkovitiji prodor sustava u tkivo te se to smatra prednošću ove metode nad EnVision metodom (32).

CSA (engl. *catalised amplification methods*) najosjetljivija je imunohistokemijska metoda i visoko osjetljiva metoda poznata kao i TSA (engl. *Tyramide Signal Amplification*) koja se koristi za detekciju malih količina proteina. Ova metoda koristi biotinil tiramid (BT) koji se taloži na mjestu antigena. BT se aktivira enzimom HRP. Aktivirani BT se pretvara u vrlo reaktivnu molekulu koja pričvrsti uz sebe proteine. Ovo vezanje događa se vrlo brzo (unutar 10 minuta), dok se amplifikacija signala ostvaruje detekcijom tiramida u tkivu.

CSA II metoda je vrlo slična normalnoj CSA metodi, razlika je u tome što se kod CSA II umjesto biotinil tiramida koristi fluorescil tiramid (FT). FT precipitira sa proteinom nakon kojeg slijedi sekundarna reakcija dodatkom anti-fluoresceina. Reakcija završava sa hidrogen peroksidom/kromogenom te je vidljiva pod svjetlosnim mikroskopom. Ovaj sustav kao i TSA dopušta detekciju malih količina antigena te korištenje slabo specifičnih antitijela. Korištenjem FT-a potpuno je izbjegnuto nespecifično pozadinsko bojenje koje uzrokuje endogeni biotin, osobito kod tkiva jetre ili bubrega (33).

Imunohistokemijske reakcije mogu biti korištene u različitim namjenama tokom istraživanja u patološkoj anatomiji, a najviše su pridonijele u histogenetskoj dijagnostici neoplazmi, određivanju subtipova neoplazmi, pri istraživanju prognostičkih faktora i terapeutskih indikacija nekih bolesti, staničnoj proliferaciji te pri identifikaciji struktura i produkata staničnih elemenata (34).

Utjecaj na izvedbu imunohistokemijskih bojenja tkiva čine odabir vrste fiksativa, vrijeme fiksacije, vremensko trajanje procesiranja tkiva, odabir neprikladnog sustava za razotkrivanje antigena i njegovu detekciju, osjetljivost odabranog panela antitijela te odabir vrste i tipa klona pojedinog antitijela, kao i dilucija samog protutijela. Stoga, dosezi u imunohistokemiji mogu biti ograničeni neadekvatnom pripremom uzoraka kao i izvedbom imunohistokemijske analize. Također, prisustvo pozadinskog nespecifičnog bojenja tkiva koje nastaje vezanjem protutijela na nespecifične proteine umjesto na specifične antigene stvara neželjeni produkt imunohistokemijskog bojenja tkiva (35). Procesom blokiranja reducira se količina pozadinskog bojenja tijekom različitih imunohistokemijskih metoda bojenja tkiva. Uzroci pozadinskog bojenja su neadekvatna ili prebrza fiksacija tkiva kao i korištenje kontaminiranih protutijela drugim protutijelima koji uzrokuju lažno pozitivne reakcije. Enzim peroksidaza je sastavni element staničnog tkiva koje može u kontaktu sa vodikovim peroksidom i kromogenom DAB stvoriti lažno pozitivnu reakciju te kao rezultat toga nastati nespecifično obojenje tkiva (36).

Stoga, u primjeni imunohistokemijskog bojenja tkiva koriste se tehnike koje blokiraju aktivnost endogene peroksidaze. Pojavnost pozadinskog bojenja je specifična kod ABC metode, osobito kod tkiva koje sadrži mnogo prirodnog biotina. Da bi se spriječilo vezanje prirodnog biotina sa avidinom u ABC metodi, tkivo se predtretitra nekonjugiranim avidinom te dodatkom biotina do zasićenja (37). Aktivnost endogene peroksidaze je pronađena u mnogim tkivima koja se detektira DAB substratom. Korištenje predtretmana hidrogen peroksidom prije dodavanja primarnog protutijela rješava taj problem. Također, mnoga tkiva imaju aktivnu endogenu alkanu fosfatazu (AP) koja se blokira predtretmanom tkiva uz korištenje levamisola, ako je AP korištena kao obilježivač.

Imunohistokemijske metode bojenja su tehnike koje su validirane i standardizirane prema smjernicama vanjske kontrole kvalitete. Vanjska kontrola kvalitete je zadužena za promoviranje kvalitete imunohistokemije, proširuje je u kliničkoj primjeni kroz dogovorene obrasce za imunohistokemijska testiranja. Omogućuje primjere sa preporučenim protokolima, dobavlja kontrolne preparate za pojedine imunohistokemijske reakcije, te podastire sve relevantne informacije uključujući i opise epitopa (38). Svako korišteno protutijelo mora biti specificirano podacima o klonu, na koji način i kada se primjenjuje sa preporučenim razrjeđenjima (39). Sva korištena protutijela u imunohistokemijskim laboratorijima podložna su unutarnjoj kontroli, kao i vanjskoj kontoli kvalitete. Vanjsku kontolu kvalitete čine međunarodne ovlaštene profesionalne i znanstvene organizacije (npr. NordicQC, Nordic Quality Control) koje omogućuju standardizaciju imunohistokemijskih metoda, te detektiraju različitosti u imunohistokemijskoj kvaliteti između laboratorija te omogućuju načine poboljšanja te ostvarivanja optimalnih rezultata koji su međusobno usporedivi.

Korištena protutijela su monoklonalnog odnosnog poliklonalnog podrijetla, koja se razlikuju u načinu nastanaka i specifičnošću za pojedini epitop antigena. Monoklonska protutijela otkrićem Kohlera i Milsteina 1975. god. primjenjuju se kao produkt imunizacije miša, te nakon nastanka imunosnog odgovora B limfociti se prikupljaju iz slezene. Budući da izolirani B limfociti imaju ograničen životni vijek trajanja, primjenjuje se fuzija sa mijelomskim mišjim stanicama iz koje nastaje besmrtna hibridna stanica koja stvara imunoglobuline specifične za pojedini epitop na antigenu. Monoklonalna protutijela su visoko specifična i osjetljiva. Poliklonalna protutijela su producirana iz raznih životinjskih vrsta (zec, konj) te su većeg afiniteta i veće reaktivnosti, ali niske specifičnosti u usporedbi sa monoklonskim protutijelima. Stvorena su imunizacijom životinje sa pročišćenim imunogenima koja sadrže antigen od interesa. Životinja postiže humoralni odgovor na imunogen te tako stvorena protutijela produciraju se u krvi životinje koja je bogata imunoglobulinima. Tim načinom proizvode se brojni klonovi plazma stanica, te takva poliklonalna protutijela imaju prednost pred monoklonalnim zbog mogućnosti identifikacije multiplih izoformi (epitopa) na ciljanom proteinu. Selekcija primarnih protutijela za imunohistokemijske metode bojenja učinjena je na temelju njihove specifičnosti za pojedinu vrstu tumora, uz pretpostavku da će nastati pozitivna reakcija (40). Antitijelo ima svoju specifičnost, što bi bila odlika da se selektivno veže na jedan epitop antigena. Poliklonalna protutijela su manje specifična ali rasprostranjenija u primjeni. U ovom istraživanju korištena su monoklonalna protutijela IDH1, GFAP, Ki-67 te poliklonalni S100, koji su imunohistokemijski primijenjeni na fiksiranim, parafinom uklopljenim tkivima kao i na prethodno zamrznutim tkivima glioblastoma.

Pozitivna kontola koristi se za verifikaciju procedure i za dokaz specifičnosti protutijela (41). Stoga se kao pozitivna kontrola koristi tkivo unaprijed poznate pozitivnosti na ispitivano protutijelo. Negativna kontrola pokazuje izostanak imunoreakcije na korišteno protutijelo, te kao negativna kontrola koristi se normalni serum umjesto primarnog antitijela. Normalni serum mora biti iz iste vrste kao i primarno protutijelo. Drugu vrstu negativne kontole čini inhibicija bojenja tkiva adsorpcijom primarnog antigena sa prethodno pročišćenim antigenom (42).

## 1.3. Tkivni mikro areji

Tkivni mikro areji (TMA) sadrže više manjih reprezentativnih tkivnih primjeraka na jednom histološkom preparatu. Produkti su parafinskih blokova iz kojih se ekstrahirao cilindar reprezentativnog tkiva (engl. *donor block tissue*) koji se prenosi na pojedinačno područje novog parafinskog bloka (engl. *recipient block*) uz pomoć zadanih koordinata na ploči instrumenta. Korištenje jednog protutijela na veliku količinu uzoraka čini ovu tehniku ekonomičnom. Upotrebom tehnike dozvoljava se simultana analiza molekularnih meta na DNA, mRNA i na proteinskoj razini pod identičnim standardiziranim uvjetima na jednom histološkom preparatu što omogućuje maksimalno očuvanje i korištenje količinski ograničnog i nezamjenjivog arhivskog tkiva (43). TMA tehnika omogućuje izvedbu imunohistokemije, fluorescentne in situ hibridizacije ili RNA in situ hibridizacije (ISH) na brži i jeftiniji način usporedivo sa konvencionalnim pristupom. Tkivni mikro areji sadrže malu količinu jedne vrste tkivnog uzorka. Korištenjem 1 mm promjera igle dobivena je 0,785 mm2 površine areje (prema formuli P = r2 ᴨ). Primjenu tkivnih mikro areja Battifora je 1986. god. prvi puta opisao u svojim istraživanjima smanjivši potrošnju korištenih markera u odnosu na broj obrađenih uzoraka tkiva, dok su format mikrotkivnih area upotpunili Wan i sur. 1987. god. (44). Ovom metodom omogućeno je simultano ispitivanje multiplih tkivnih isječaka pod jednakim uvjetima. Kononen i sur. 1998. god. razrađuju tehniku kakvu danas koriste patohistološki laboratoriji. Tehnika je razvijana prema rastu mogućeg broja korištenih mikrotkivnih uzoraka, tako da je danas poznato da jedan primatelj blok može sadržavati i do 1000 mikro uzoraka (45). Budući da u ovoj tehnici je korištena ograničena količina tkiva, problem pri izradi TMA predstavlja heterogeničnost tkiva. Tada se koristi do tri mikrotkivna cilindra donorskog tkiva (engl. *core number*) od jednog tumora. Prije određivanja mjesta od interesa koja predstavljaju mikrotkivni uzorak na novom parafinskom bloku (engl. *cor recipient*), nužno je prirediti noviji primjerak histološkog preparata cijele površine tkiva obojenog hemalaun eozinom. Dosadašnja istraživanja pokazala su uspješnu primjenu TMA tehnike na smrznutom tkivu (46). Komparacijom imunohistokemijske analize cijelih tkivnih isječaka tkiva naspram TMA uzoraka na primjeru statusa estrogenskih receptora kod tumora dojke u istraživanju Parkera i sur. (47) dokazano je da su rezultati potpuno jednaki u 96 % slučajeva.

Vrsta korištenog tkiva je bitna pri razumijevanju poteškoća koje mogu nastati ili stvoriti nepredvidive neželjene učinke. Određeno tkivo kao koža, kost, mast, mozak i tkivo dojke predstavlja poteškoću pri prikupljanju parafinskih TMA rezova na vodenoj kupelji ili probadanju tkiva mikrotkivnom iglom. Zbog toga je nužno grupirati tkiva slične konzistencije u jedan TMA primatelj parafinski blok.

# 2. Ciljevi istraživanja i hipoteza

Ciljevi istraživanja: Usporediti valjanost imunohistokemijske reakcije na prethodno smrznutom tkivu glioblastoma u odnosu na nesmrznuto tkivo uklopljeno u parafin, kako bi se smrznuto tkivo uklopljeno u parafin moglo koristiti za imunohistokemijske metode bojenja ukoliko je količina naknadno dobivenog tkiva glioblastoma nedostatna ili je naknadno pristiglo tkivo nekrotično.

Specifični ciljevi:

1. Monoklonalno protutijelo IDH1 Uloga IDH1/2 (izocitrat dehirogenaza 1/2) u Krebsovom ciklusu je stvaranje α-ketoglutarata, koji je patološkim putem stvaranja zamijenjen nenormalnim metaboličkim produktom 2-hidroksiglutaratom koji je mogući onkometabolit, te nemogućnošću stvaranja NADPH. Nakupljanje nenormalnog metaboličkog produkta u stanici povezuje se sa toksičnim učinkom na samu stanicu uz apoptozu. IDH1 je kodiran od citoplazmatskih proteina, dok je IDH2 kodiran od mitohondrijskih proteina (48). IDH mutacija pridružena je sa povećanom DNA metilacijom poznatijom kao G-CIMP (engl. *glioma CpG island methylation phenotype*) (49). Mutirani IDH1/2 služi kao prognostički marker, te je ta mutacija pridružena sekundarnim glioblastomima. IDH1 mutacije pogađaju kodon 132, uzrokujući zamjenu arginina (R) histidinom (H), dok kod IDH2 mutacija pogađa kodon 172 (50).

2. Monoklonalno protutijelo GFAP GFAP gen kodira protein GFAP, te je 50 kDa protein intermedijalnih filamenata koji čine znatan dio citoskeleta u astrocitima i specifičan je stanični marker za dokazivanje stanica astrocističnog podrijetla, kao i stanica ependimalnog podrijetla. Uključen je u međustaničnu komunikaciju i funkciju krvno moždane barijere (51). GFAP ima ulogu u mitozi stanice. U imunohistokemijskoj reakciji protutijelo veže protein GFAP, koji je osjetljiv marker glijalne diferencijacije.

3. Poliklonalno protutijelo S100 S100 je protein je dimer koji veže kalcij, sastavljen od α i β podjedinica te su poznate tri njegove izoforme: alfa-alfa poznata kao S-100A0, alfa-beta poznato kao S-100A i beta-beta poznata kao S-100B, te svaka podjedinica ima različitu tkivnu distribuciju. Polikolnalno protutijelo prepoznaje sva tri izotipa. Imunoreaktivnost je prisutna kroz jezgrinu, citoplazmatsku i membransku distribuciju. S obzirom da su članovi S100 familije implicirani u Ca2+ vezajuću regulaciju intracelularnih aktivnosti, važni su markeri stanične proliferacije, fosforilacije proteina, diferencijacije i neoplastične transformacije (52). S100 (beta protein) je prisutan u glijalnim stanicama. Ekspresija S100 proteina prisutna je kod astrocitoma, glioblastoma, oligodendroglioma, ependimoma i drugih glijalnih tumora.

4. Monoklonalno protutijelo Ki-67 Ki-67 protein je stanični marker za određivanje postotka proliferacije (engl. *labelling indeks*), odnosno to je postotak stanica koji se oboji Ki-67 pozitivno. Prisutan je isključivo tokom aktivne faze staničnog ciklusa (G1, S, G2 i mitoza) dok mu se prisutnost u G0 staničnoj fazi ne može detektirati. Antigen je rapidno degradiran kako stanica ulazi u neproliferativnu fazu te se čini da ne postoji ekspresija Ki-67 tijekom DNA reparirajućeg procesa (53).

Hipoteza ovog istraživanja: Imunohistokemijsko bojenje prethodno smrznutog tkiva glioblastoma imat će istovjetnu ili neznatno slabiju imunohistokemijsku reakciju u usporedbi sa prethodno nesmrzutim tkivom uklopljenim u parafin istih tumora.

# 3. Materijali i metode

## 3.1. Materijali

U istraživanju su korišteni tkivni uzorci 32 pacijenta sa dijagnozom glioblastoma multiforme. Ukupan broj obrađenih uzoraka je 64, od kojih su 32 uzorci koji su prethodno smrznuti i 32 uzorka koji nisu prethodno smrznuti. Svaki pacijent ima po jedan uzorak prethodno smrznutog tkiva i jedan uzorak nesmrznutog tkiva. Svi pacijenti su operativno obrađeni u Klinici za neurokirurgiju KBC Zagreb u razdoblju od 2011. god. do 2013. god.

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Smrzavanje uzoraka i fiksacija tkiva

Po zaprimanju uzoraka u laboratorij, dodjeljuje im se laboratorijski identifikacijski bioptički broj. Intraoperativni bioptički materijal se položi na metalni podložak koji služi kao nosač pri narezivanju materijala koji je prožet sa O.C.T ™ (TissueTek, Sakura) gelom. O.C.T ™ gel veže tkivo na nosač i prekriva ga. Pri temperaturi od -20 °C tkivo na nosaču se smrzava. Nakon tri minute postaje adekvatan za manualno rezanje na tanke rezove debljine 3-4 µm u uređaju za rezanje smrznutog tkiva KRIOSTAT CM1850 (Leica). Prednost korištenja O.C.T™ gela jest brzo otapanje tkiva na sobnoj temperaturi te to što ne diskolorira preparate. Nakon dobivenih rezova, preparati se ručno sukcesivno uranjaju u:

1. Metanol (Methanol pro analysis, EMSURE®) 1 min,

2. 70 % alkohol 1 min,

3. Hematoxylin Thermo scientific® (instant hematoxylin pripravlja se miješanjem sadržaja 1 bočice instant praha sa 1 litrom destilirane vode) 1 minuta,

4. Ispiranje 30 sekundi u vodovodnoj vodi,

5. Eosin Thermo scientific® (instant eosin pripravlja se miješanjem sadržaja 1 bočice instant praha sa 1 litrom destilirane vode) 30 sekundi,

6. Ispiranje u vodovodnoj vodi 30 sekundi,

7. Uranjanje u 96 % alkohol dva puta po 20 sekundi,

8. Uranjanje u apsolutni alkohol (99,99 %) 20 sekundi te

9. U Xylen (Xylene pro analysis, Mr 106,17; proizvođač Claro-promet d.o.o) dva uranjanja po 30 sekundi.

10. Montiranje pokrovnice sa dvije kapi Entellan® New Microskopy (Merck).

Svrha smrzavanja tkiva je omogućiti preliminarnu dijagnostiku na najkraći mogući način tijekom operacije pacijenta. Nakon otapanja smrznutog uzorka na sobnoj temperaturi od 25 °C kroz 10 minuta, zapakira se u plastične kazete koje su označene identifikacijskim bioptičkim laboratorijskim brojem, te odlaže u fiksativ puferirani 10 % neutralni formalin kroz 12 sati na sobnoj temperaturi te se potom prenosi u tkivni procesor. Uzorci kojima nije prethodilo navedeno smrzavanje pristiglo je naknadno, potom se pakira u plastične kazete označene bioptičkim brojem te polaže u puferirani 10 % neutralni formalin kroz 12 sati na sobnoj temperaturi te zatim premještaju u tkivni procesor. Tkivo koje se pakira u kazete ne smije biti preveliko zbog toga što se smanjuje mogućnost kvalitetnog prodiranja fiksativa te kvalitetne daljnje obrade u tkivnom procesoru. Veličina tkiva treba zauzimati najviše 2/3 veličine plastične kazete. Ispis podataka na kazeti izrađen je na automatskom pisaču kazeta (Tissue Tek® Auto Write™). Kazete se poslože u pretinac predviđen za plastične kazete, te se unosom zapisa bioptičkog laboratorijskog broja u kompjutor istovremeno ispisuje podatak na plastičnoj kazeti koji se potom prenosi izvan aparata.

Fiksativ se koristi radi očuvanja tkivne arhitekture i stanične morfologije, a svrha mu je očuvati antigeničnost tkiva kao i prevenirati autolizu i nekrozu postojećeg tkiva te povećati rezistenciju staničnih elemenata na tkivno procesiranje. Fiksacija nastaje mijenjanjem konformacije proteina na način da nastaju metilenski mostovi između karbonilne skupine formaldehida i amino skupina bočnih lanaca proteina (54), što posljedično tomu dolazi do maskiranja antigeničnih mjesta (epitopa) te je učinjen nepovoljan utjecaj na vezanje s antigenom. Dobar fiksativ služi očuvanju morfoloških detalja nakon stavljanja u potporni medij kao parafin. Neodgovarajuća fiksacija smanjuje mogućnost uspješne izvedbe imunohistokemijskih reakcija. Djelovanje aldehida (formaldehida, CH2O) na tkivo je takvo da stvara križne veze između aminokiselinskih ostataka proteina (55) formirajući gel koji je idealan za čuvanje in vivo veza u tkivu. Topljivi proteini su pričvršćeni na strukturalne proteine i prema tome podložni netopljivosti te time cijela struktura dobiva mehaničku snagu koja dozvoljava daljnje manevriranje u prostoru. Najčešće korišteni fiskativi su aldehidnog podrijetla zbog svoga svojstva blagog utjecaja na antigeničnost tkiva što je vrlo bitno svojstvo za kvalitetnu izvedbu imunohistokemije. U ovom istraživanju korišten je fiksativ aldehidnog podrijetla formaldehid iz kojeg se radi radna otopina 10 % neutralni puferirani formalin. Vrijednost pH je podešena da bude u rasponu fizioloških granica, odnosno između 6 i 8 što omogućuje očuvanje ultrastruktura tkiva. Volumen fiksativa koji je dostatan za fiksiranje bioptičkog materijala treba biti dvadeset puta veći od volumena samog materijala. Fiksiraju se na jednak način prethodno smrznuti materijal kao i nesmrznuti materijal.

Izrada 10 % neutralnog puferiranog formalina (količina od 6 L):

1. 49,5 g Na2HPO4 x 2H2O (natrijev hidrogensulfat dihidrat, proizvođač Kemika)

2. 22,6 g NaH2PO4 X 2H2O (natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, proizvođač Kemika)

3. 4,5 L destilirane vode

4. 1,5 L formaldehida (u komercijalne svrhe dostupan je kao koncentrirana 36 % otopina, proizvođač Kemika)

### 3.2.2. Procesiranje tkiva

Nakon fiksacije obje vrste uzoraka, kazete s uzorcima se premještaju u automatski tkivni procesor (Tissue Tek ®-Vip ®, Sakura) koji služi da prema unaprijed odabranom protokolu procesuiranja i temperature tkivo može biti podloženo sukcesivnom djelovanju različitih otopina. Cilj procesiranja tkiva je ulaganje tkiva u solidni medij dovoljno čvrst da podupire tkivo i da mu omogući dovoljnu krutost pri rezanju, a opet da tkivo učini dovoljno mekanim bez tragova oštećenja do kojeg može doći pri rezanju materijala. Automatski tkivni procesor je uređaj koji je potpuno zatvoren sustav, te sadrži mjesto za ulaganje kazeta (kaveza) i spremnike s otopinama zapremnine 4 litre svaki. Kapacitet broja kazeta koji se može procesuirati u jednoj vrsti protokola (engl*. run*) je 300. Kazete se slažu u metalne kaveze te poslože okomito na kavez i odlože u za to predviđeno mjesto u tkivnom procesoru. Odabirom vrste protokola započinje proces dehidracije tkiva i prožimanja sa parafinom. Raspored kontejnera je identičan slijedu izmjenjivanja otopina na kaveze.

Redoslijed otpuštanja otopina u tkivnom procesoru (dehidracija tkiva) na uzorke u kavezu:

1. Otopina 10 % puferiranog neutralnog formalina otpušta se na tkivne kaveze na razdoblje od 1 sata pri temperaturi od 35 °C te se nakon otpuštanja vakuumski vraća u spremnik.
2. Otopina 70 % alkohola (1 L priprema se razrjeđenjem apsolutnog alkohola i destilirane vode tako da se 7 dL apsolutnog alkohola pomiješa sa 3 dL destilirane vode) otpušta na tkivne kaveze na razdoblje od 1 sata pri temperaturi od 35 °C te se nakon otpuštanja vakuumski vraća u spremnik.
3. Otopina 96 % alkohola otpušta se na tkivne kaveze na razdoblje od 1 sata pri temperaturi od 35 °C (proizvođač Etil promet). Nakon otpuštanja vakuumski se vraća u spremnik.
4. Otopina 96 % alkohola otpušta se na tkivne kaveze na razdoblje od 1 sata pri temperaturi od 35 °C (proizvođač Etil promet). Nakon otpuštanja vakuumski se vraća u spremnik.
5. Otopina 100 % alkohola otpušta se na tkivne kaveze na razdoblje od 1 sata pri temperaturi od 35 °C. Nakon otpuštanja vakuumski se vraća u spremnik.
6. Otopina 100 % alkohola otpušta se na tkivne kaveze na razdoblje od 1 sata pri temperaturi od 35 °C. Nakon otpuštanja vakuumski se vraća u spremnik.
7. Otopina 100 % alkohola otpušta se na tkivne kaveze na razdoblje od 1 sata i 30 minuta pri temperaturi od 35 °C. Nakon otpuštanja vakuumski se vraća u spremnik.
8. Otopina Xylene otpušta se u tkivne kaveze na razdoblje od 1 sata pri temperaturi od 35 °C. Nakon otpuštanja vakuumski se vraća u spremnik.
9. Otopina Xylene otpušta se na tkivne kaveze na razdoblje od 1 sata i 30 minuta pri temperaturi od 35 °C. Nakon otpuštanja vakuumski se vraća u spremnik.
10. Otopina Xylene otpušta se na tkivne kaveze na razdoblje od 1 sata i 30 minuta pri temperaturi od 35 °C. Nakon otpuštanja vakuumski se vraća u spremnik.
11. Otopljeni parafin (Sakura-Tissue Tek III Embedding wax) otpušta se na tkivne kaveze na razdoblje od 1 sata i 30 minuta pri temperaturi od 60 °C. Nakon otpuštanja vakuumski se vraća u spremnik.
12. Otopljeni parafin otpušta se na tkivne kaveze na razdoblje od 1 sata i 30 minuta pri temperaturi od 60 °C. Nakon otpuštanja vakuumski se vraća u spremnik.
13. Otopljeni parafin otpušta se na tkivne kaveze na razdoblje od 1 sata i 30 minuta pri temperaturi od 60 °C. Nakon otpuštanja vakuumski se vraća u spremnik.

Cilj dehidracije tkiva je postepeno izuzimanje vode iz tkiva, te uz bistrenje u Xylenu omogućiti prožimanje tkiva parafinom. Dnevni program traje 16 sati.

### 3.2.3. Uklapanje tkiva

Uklapanje tkiva je tehnika kojom postojeće procesuirano tkivo bude uloženo u metalni kalup napunjen s otopljenim parafinom, te sa položenim donjim dijelom kazete na kojoj se nalazi identifikacijski bioptički broj prenese se na hladnu podlogu gdje parafinski blok dobiva svoj izgled kocke i čvrstu konzistenciju spremnu za rezanje na mikrotomu. Uklapanje se vrši na aparatu za manualno uklapanje uzoraka proizvođača Tissue-Tek®TEC™. Sastoji se od toplog spremnika u koji se ulažu procesirane kazete da bi se osiguralo tekuće agregatno stanje parafina i lakše pronalaženje materijala koji se pincetom prenosi u tople metalne kalupe odabrane prema obliku i veličini materijala. Otopljeni parafin odlijeva se u kalupe koji se potom prenose na hladnu ploču sa radnom temperaturom od -10 °C, a svrha toga je da se uzorak uklopi u solidni parafinski blok. Spremnik u kojem se otapa parafin ima temperaturu između 52 °C i 62 °C.

### 3.2.4. Izrada parafinskih rezova

Narezivanje tkiva vrši se pomoću mikrotoma (proizvođač Leica, model SM2000R). Svrha ovog koraka je izrada histoloških preparata namijenjenih za histološko bojenje hemalaun eozinom te potom mikroskopskim pregledom odrediti interesne zone za izradu recipient TMA bloka.

Mikrotomom se služi na način da se ohlađeni parafinski blok postavi u utor na mikrotomu te pričvsti da se izbjegne oštećenje pri rezanju. Klizni dio na mikrotomu čine držač oštrice i rukohvat sa dva vijka. Vijci služe da bi se odredio nagib bloka i njegova visina u odnosu na oštricu. Na lijevoj strani mikrotoma nalazi se vijak pomoću kojeg se određuje debljina reza. Blokovi su rezani na debljini od 3 μm, te se listići tkiva kistom prenose na vodenu kupelj (proizvođač Kunz Instruments). Temperatura vodene kupelji iznosi 55 °C. Temperatura je stalna i omogućuje prianjanje rezova na mikroskopsko staklo. Dobiveni rezovi prenose se u termostat (proizvođač Memmert) koji otapa ostatke parafina te mu temeperatura iznosi 70,5 °C. Istekom 30 minuta, preparati se prenose u aparat za histološko bojenje tkiva.

### 3.2.5. Histokemijsko bojenje

Automatizirani aparat za histokemijsko bojenje (proizvođač Tissue Tek®) provodi automatiziranu rehidraciju tkiva te vrši osnovno histokemijsko bojenje preparata hemalaun eozinom te montiranje pokrovnice na obojeni preparat. S obzirom da je aparat za bojenje tkiva vezanim sustavom priključen na aparat za montiranje pokrovnica, potpuna automatizacija omogućuje brz i jednostavan proces. Sve otopine nalaze se u zasebnim posudama unutar aparata za bojenje tkiva te pomični nosač uranja preparate u posude na točno određeno vremensko razdoblje i prema unaprijed zadanom protokolu bojenja tkiva.

Bojenje preparata hemalaun eozinom vrši se na način da se nosač optereti svim preparatima i pomiče na startnu poziciju iz koje započinju uranjanja preparata u posude navedenim redoslijedom:

1. Xylene otopina (Xylene pro analysis, Mr 106,17; proizvođač Claro-promet d.o.o) pet minuta

2. Xylene otopina (Xylene pro analysis, Mr 106,17; proizvođač Claro-promet d.o.o) pet minuta

3. Xylene otopina (Xylene pro analysis, Mr 106,17; proizvođač Claro-promet d.o.o) pet minuta

4. 99 % alkohol (proizvođač Kemig d.o.o) pet minuta

5. 99 % alkohol (proizvođač Kemig d.o.o) tri minute

6. 96 % alkohol rafinirani (proizvođač Kemig d.o.o) tri minute

7. 70 % alkohol (priprava iz 99 % alkohola i destilirane vode u omjeru 7:3) jedna minuta

8. Wash station odnosno ispiranje preparata vodovodnom vodom dvije minute

9. Hemalaun (priprava iz Instant hematoxylin komercijalne bočice koja se razvija u doticaju sa jednom litom destilirane vode: proizvođač Thermo scientific) sedam minuta

10. Wash station odnosno ispiranje preparata vodovodnom vodom dvije minute

11. Kiseli alkohol (priprema se iz 95 mL 70 % alkohola i 5 mL zakiseljavanja kloridnom kiselinom HCl, proizvođača Kemig d.o.o) deset sekundi

12. Wash station odnosno ispiranje preparata vodovodnom vodom dvije minute

13. Scottova otopina jedna minuta uranjanja preparata; priprema 1 L Scottove otopine iz 20 g MgSO4x7H2O (magnezijsulfat heptahidrat) i 2,5 g NaHCO3 (natrij-hidrogen karbonat) rastopi se sa 1 L destilirane vode (sve proizvođač: Kemika d.o.o)

14. Wash station odnosno ispiranje preparata vodovodnom vodom jedna minuta

15. Eosin (priprava iz Instant eozin komercijalne bočice koja se razvija u doticaju sa jednom litom destilirane vode: proizvođač Thermo scientific) jedna minuta

16. Wash station odnosno ispiranje preparata vodovodnom vodom jedna minuta

17. 96 % alkohol rafinirani (proizvođač Kemig d.o.o) jedna minuta

18. 99 % alkohol (proizvođač Kemig d.o.o) dvije minute

19. 99 % alkohol (proizvođač Kemig d.o.o) dvije minute

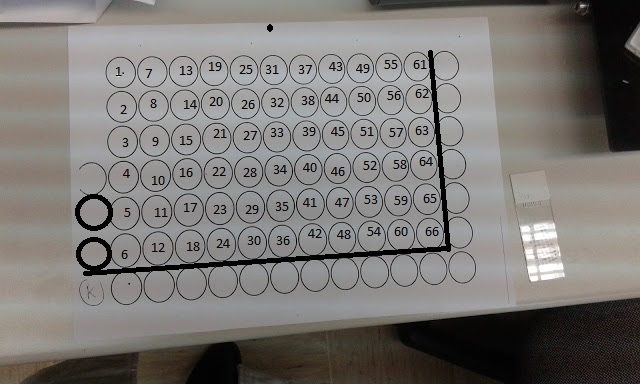
20. Xylene otopina (Xylene pro analysis, Mr 106,17; proizvođač Claro-promet d.o.o) tri minute 21. Xylene otopina (Xylene pro analysis, Mr 106,17; proizvođač Claro-promet d.o.o) tri minute 22. Xylene otopina (Xylene pro analysis, Mr 106,17; proizvođač Claro-promet d.o.o) dvije minute

Nakon završenog bojenja nosač prenosi preparate u automatizirani aparat za montiranje pokrovnice gdje se s Entellan® New Microskopy (Merck) otopinom vrši polaganje pokrovnice. Na pregledanim preparatima pod svjetlosnim mikroskopom (proizvođač: Leica DM/LS) označavaju se interesna područja koja predstavljaju novi TMA uzorak na recipient parafinskom bloku.

### 3.2.6. Izrada TMA

U okomite stupce položeni su tkivni mikro areji od pojedinačnog pacijenta na način da prva gornja tri uzorka u stupcu predstavljaju po tri reprezentativna mjesta od interesa koja pripadaju donor parafinskom bloku nesmrznutog tkiva. Druga tri uzorka u stupcu predstavljaju reprezentativna mjesta sa donor parafinskog bloka prethodno smrznutoga tkiva. Pozicijski markeri su postavljani radi orijentacije i razumijevanja interpretacije rezultata. U ovom istraživanju tkivo jetre je korišteno u svrhu pozicijskog markera. Svaki primatelj parafinski blok ima po dva pozicijska markera koji se postavljaju uz peti i šesti uzorak prvog pacijenta sa njegove lijeve strane. Promjer svakog uzorka iznosi 1 mm. Prije izrade TMA izrađuje se nacrt, odnosno priprema izgled budućeg primatelj parafinskog bloka. Od 64 uzoraka pripremljena su tri primatelj parafinska bloka (GLIOBLASTOMI 1, GLIOBLASTOMI 2 i GLIOBLASTOMI 3).

Na primatelj parafinskom bloku br. 1 postavljeni su svih 20 uzoraka pacijenata zaprimljenih u 2011. god. Primatelj parafinski blok br. 2 sačinjen je od sva 24 uzoraka prikupljenih tokom 2013. god., dok primatelj parafinski blok br. 3 načinjen je od svih 18 uzoraka iz 2012.god. i 2 uzorka iz 2013. god.

S*lika 5*. Shematski prikaz primatelj TMA parafinskog bloka

SVAKI STUPAC PREDSTAVLJA JEDNOG PACIJENTA

POZICIJSKI MARKERI

DRUGA TRI REDA PREDSTAVLJAJU PRETHODNO SMRZNUTE UZORKE (IOB)

PRVA TRI REDA PREDSTAVLJAJU NESMRZNUTE UZORKE

Pozicijska mjesta i pozicijski markeri raspoređeni su na isti način kod svakog primatelj parafinskog bloka, osim postojanja razlike u broju uzoraka koji nisu jednaki na sva tri TMA parafinska bloka.

*Tablica 1*. Pozicijska mjesta i pripadajući uzorci s identifikacijskim bioptičkim brojem na primatelj parafinskom bloku GLIOBLASTOMI 1.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| POZICIJSKO MJESTO | UZORAK | POZICIJSKO MJESTO | UZORAK |
| 1 | 6097/11 | 37 | 18087/11 |
| 2 | 6097/11 | 38 | 18087/11 |
| 3 | 6097/11 | 39 | 18087/11 |
| 4 | 6097/11 IOB | 40 | 18087/11 IOB |
| 5 | 6097/11 IOB | 41 | 18087/11 IOB |
| 6 | 6097/11 IOB | 42 | 18087/11 IOB |
| 7 | 6934/11 | 43 | 18090/11 |
| 8 | 6934/11 | 44 | 18090/11 |
| 9 | 6934/11 | 45 | 18090/11 |
| 10 | 6934/11 IOB | 46 | 18090/11 IOB |
| 11 | 6934/11 IOB | 47 | 18090/11 IOB |
| 12 | 6934/11 IOB | 48 | 18090/11 IOB |
| 13 | 10357/11 | 49 | 18177/11 |
| 14 | 10357/11 | 50 | 18177/11 |
| 15 | 10357/11 | 51 | 18177/11 |
| 16 | 10357/11 IOB | 52 | 18177/11 IOB |
| 17 | 10357/11 IOB | 53 | 18177/11 IOB |
| 18 | 10357/11 IOB | 54 | 18177/11 IOB |
| 19 | 12229/11 | 55 | 18967/11 |
| 20 | 12229/11 | 56 | 18967/11 |
| 21 | 12229/11 | 57 | 18967/11 |
| 22 | 12229/11 IOB | 58 | 18967/11 IOB |
| 23 | 12229/11 IOB | 59 | 18967/11 IOB |
| 24 | 12229/11 IOB | 60 | 18967/11 IOB |
| 25 | 15232/11 |  |  |
| 26 | 15232/11 |  |  |
| 27 | 15232/11 |  |  |
| 28 | 15232/11 IOB |  |  |
| 29 | 15232/11 IOB |  |  |
| 30 | 15232/11 IOB |  |  |
| 31 | 17248/11 |  |  |
| 32 | 17248/11 |  |  |
| 33 | 17248/11 |  |  |
| 34 | 17248/11 IOB |  |  |
| 35 | 17248/11 IOB |  |  |
| 36 | 17248/11 IOB |  |  |

*Tablica 2*. Pozicijska mjesta i pripadajući uzorci s identifikacijskim bioptičkim brojem na primatelj parafinskom bloku GLIOBLASTOMI 2.



*Tablica 3*. Pozicijska mjesta i pripadajući uzorci s identifikacijskim bioptičkim brojem na primatelj parafinskom bloku GLIOBLASTOMI 3.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Pozicijsko mjesto | Uzorak | Pozicijsko mjesto | Uzorak | Pozicijsko mjesto | Uzorak |
| 1 | 20824/13 | 25 | 14470/12 | 49 | 3686/12 |
| 2 | 20824/13 | 26 | 14470/12 | 50 | 3686/12 |
| 3 | 20824/13 | 27 | 14470/12 | 51 | 3686/12 |
| 4 | 20824/13 IOB | 28 | 14470/12 IOB | 52 | 3686/12 IOB |
| 5 | 20824/13 IOB | 29 | 14470/12 IOB | 53 | 3686/12 IOB |
| 6 | 20824/13 IOB | 30 | 14470/12 IOB | 54 | 3686/12 IOB |
| 7 | 24420/12 | 31 | 13050/12 | 55 | 19536/12 |
| 8 | 24420/12 | 32 | 13050/12 | 56 | 19536/12 |
| 9 | 24420/12 | 33 | 13050/12 | 57 | 19536/12 |
| 10 | 24420/12 IOB | 34 | 13050/12 IOB | 58 | 19536/12 II IOB |
| 11 | 24420/12 IOB | 35 | 13050/12 IOB | 59 | 19536/12 II IOB |
| 12 | 24420/12 IOB | 36 | 13050/12 IOB | 60 | 19536/12 II IOB |
| 13 | 19722/12 | 37 | 12914/12 |  |  |
| 14 | 19722/12 | 38 | 12914/12 |  |  |
| 15 | 19722/12 | 39 | 12914/12 |  |  |
| 16 | 19722/12 IOB | 40 | 12914/12 IOB |  |  |
| 17 | 19722/12 IOB | 41 | 12914/12 IOB |  |  |
| 18 | 19722/12 IOB | 42 | 12914/12 IOB |  |  |
| 19 | 16882/12 | 43 | 12845/12 |  |  |
| 20 | 16882/12 | 44 | 12845/12 |  |  |
| 21 | 16882/12 | 45 | 12845/12 |  |  |
| 22 | 16882/12 IOB | 46 | 12845/12 IOB |  |  |
| 23 | 16882/12 IOB | 47 | 12845/12 IOB |  |  |
| 24 | 16882/12 IOB | 48 | 12845/12 IOB |  |  |

Primatelj TMA parafinski blokovi sačinjeni su na automatiziranim instrumentu za izradu TMA proizvođača ALPHELYS MTA BOOSTER 01®. Automatizirani instrument za izradu TMA sastoji se od tornja (engl. *turret*) na kojem se sa svake strane u podnožju nalazi po jedna igla. Sa lijeve strane podnožja nalazi se (engl. *recipient punch)* igla koja služi za izradu cilindričnog utora, te sa desne strane podnožja tornja nalazi se igla (engl*. donor punch)* koja služi za vađenje označenog polja od interesa sa donor parafinskog bloka i premješta ga u primateljev parafinski blok. Postolje (engl.*bridge*) na kojem se nalazi donor parafinski blok je povezano s utorom u koji se odlaže primatelj parafinski blok, te uz sinkroniziranu radnju čini rukovanje vrlo jednostavnim. Sustav određivanja novog TMA mjesta za uzorak odvija se preko unaprijed zadanih koordinata na ploči instrumenta.

Na tri podloška organiziraju se svi donor parafinski blokovi prema trima nacrtima primatelj parafinskih blokova. Uz pomoć križnog odvijača umeću se igle promjera 1 mm, te određuje dubina kojom igla može prodrijeti u blokove, a koja se pozicionira na 4,5 mm dubine radi mogućeg probijanja i odlamanja parafinskog bloka. Prvo se postavljaju pozicijski markeri na način da se sa lijevom iglom podnožja tornja ubode cilinar parafina na primatelj parafinskom bloku koji se odlaže u otpad, a zatim sa desnom iglom ubode na parafinski blok sa tkivom jetre i premješta u utor primatelj parafinskog bloka. Uz pomoć sustava koji na temelju koordinata pozicionira TMA utor, određena je razdaljina između centara dvaju TMA utora od 2 mm. Pritiskom na gumb za izradu novog TMA utora instrument sam pomiče primatelj parafinski blok za jedno mjesto ulijevo i za unaprijed određenu razdaljinu između utora. Digitalni mikrometar određuje svako novo ubodno mjesto. Umetanjem i pričvršćivanjem primatelj parafinskog bloka, sinkronizirano se vrši radnja vađenja parafinskog cilindra i umetanje TMA tkiva sa donor parafinskog bloka. To se vrši ručnim pomicanjem tornja u lijevo ili u desno, ovisno o tome koja igla je trenutno korištena. Pritiskanjem gumba za pomak, stvara se novo područje koje čini novi utor. Tada se uzima novi donor parafinski blok te vrši radnja ubadanja i stavljanja TMA uzorka na primatelj parafinski blok. Jedan donor parafinski blok ima tri interesna područja koja se premještaju u tri nova utora na primatelj parafinskom bloku. Da bi se osigurala dodatna preciznost probadanja donor parafinskog bloka, poželjno je preparat obojen hemalaun eozinom identičnog donor parafinskog bloka imati postavljenog uz TMA instrument tokom rada.

Nakon izrade sva tri TMA primatelj parafinska bloka, nužno je osigurati izravnavanje površine TMA parafinskog bloka koje se postiže pomoću odlaganja blokova u metalne kalupe i stavljanja u termostat pri temperaturi od 40 °C preko noći. Navedena temperatura neće otopiti izrađene blokove, nego će omogućiti bolje prožimanje tkiva i parafina. Idući dan parafinski blokovi stavljaju se u hladnjak na +4 °C koje im omogućuje hlađenje i daje stabilnost pri narezivanju na mikrotomu.

Narezivanje izrađenih TMA blokova se vrši na jednak način kao narezivanje parafinskih blokova cijelih isječaka tkiva. Ohlađeni TMA blok se postavi na utor na mikrotomu i pričvsti da se izbjegne ispadanje bloka ili njegovo oštećenje pri rezanju. Klizni dio na mikrotomu uz pomoć postavljenje oštrice reže TMA blok, dok vijci sa lijeve strane mikrotoma služe pri određivanju debljine rezova. Parafinski blokovi su rezani na debljini od 4 μm, te su potom listići tkiva kistom preneseni na vodenu kupelj (proizvođač Kunz Instruments). Temperatura vodene kupelji iznosi 55 °C. Temperatura je stalna i omogućuje prianjanje rezova na mikroskopsko staklo SuperFrost™ proizvođača Thermo scientific. Dobiveni rezovi na staklu prenose se u termostat (proizvođač Memmert) čija temeperatura iznosi 70,5 °C te odstoje tijekom noći.

## 3.3. Imunohistokemijsko bojenje tkiva

### 3.3.1. Predtretman tkiva

Predtretman tkiva uključuje deparafiniranje histoloških TMA preparata, rehidraciju TMA preparata i razotkrivanje antigena (engl. *antigen retrieval*) na TMA preparatu.

### 3.3.2. Razotkrivanje antigena - manualne metode

Deparafiniranjem i rehidracijom preparata započinje se sa tretiranjem tkiva adekvatnog za postupak manualnog razotkrivanja antigena. Ovo je polazište svakog preparata koje sudjeluje u imunohistokemijskom bojenju neovisno o izboru korišenog protutijela. Deparafiniranje se vrši uranjanjem preparata posloženih na nosač u tri posude Xylene Substitute® proizvođača Tissue Tek™ na sobnoj temperaturi. Svako uranjanje traje po sedam minuta. Nakon deparafiniranja tkiva slijedi rehidriranje tkiva i to na način:

1. Uranjanje nosača sa preparatima u 99 % alkohol (proizvođač Claro-promet, d.o.o) četiri minute

2. Uranjanje nosača sa preparatima u 96 % alkohol (proizvođač Claro-promet, d.o.o) četiri minute

3. Uranjanje nosača sa preparatima u 70 % alkohol (dobiva se miješanjem 7 dL 99 %-tnog alkohola i 3 dL destilirane vode) četiri minute

4. Uranjanje nosača sa preparatima u destiliranu vodu kroz pet minuta

Antigen razotkrivajuće metode su potrebne zbog učinka formalinske fiksacije na tkivo na način da zamaskira epitope antigena, te ta procedura povećava dostupnost antitijela antigenu. Točan mehanizam na koji metode antigen razotkrivanja djeluju na formalinom fiksiranom tkivu nisu poznate, ali hidroliza Schiffovih baza, kelacija kalcija, uklanjane parafina te rehidracija tkiva također pospješuju prodor antitijela prema antigenu (56). Manualne metode koje uključuju razotkrivanje antigena su:

1. Proteolitička enzimska digestija (skr. PIER, engl. *protease-induced epitope retrieval*), koju su opisali Huang i sur. (1976.god.), Curran i Gregory (1977.god.) te Mepham (1979.god.). Najzastupljeniji enzimi su tripsin, proteaza K, pepsin i kimotripsin. Princip metode je taj da ova vrsta digestije uništava formalinske križne veze i potom oslobađa antigenična mjesta za vezanje antitijela. Nedovoljna digestija rezultira nedovoljnim bojenjem tkiva zbog premalo oslobođenih antigena koji su dostupni antitijelima. Predigestirano tkivo rezultira lažno pozitivnim bojenjem tkiva te oštećenjem tkiva.

2. HIER grupa metoda razotkrivanja antigena (engl. *heat-induced epitope retrieval*) je pridonijela velikom poboljšanju u kvaliteti i reproducibilnosti imunohistokemije. Tijekom formalinske fiksacije intermolekularni metilenski mostovi i slabe Schiffove baze tvore intramolekularne križne veze, koje mogu prevenirati specifično vezanje protutijela na antigen. HIER grupa antigen razotkrivajućih metoda uklanja slabe Schiffove baze ali ne utječe na metilenske mostove, te je stoga rezultirajuća proteinska konformacija u sredini između fiksiranog i nefiksiranog. Morgan i sur. 1997. god. postavljaju postulat da kalcijev usklađeni kompleks stvoren tijekom formalinske fiksacije prevenira antitijelo da se veže s epitopima na tkivnim antigenima. Visoka temperatura oslabljuje ili lomi neke od kalcij usklađenih veza koje su revezibilne naravi tokom hlađenja. Veza između temperature i vremena izlaganja je obrnuto proporcionalna - što je veća temperatura, to je potrebno manje vremensko razdoblje da bi se ostvarili dobri rezultati. Puferi koji se upotrebljavaju u ovim metodama razotkrivanja antigena najčešće su citratni (pH 6.0), Tris-HCL pufer (pH 10) i EDTA (engl. *ethylene-diaminetetraacetic acid*) sa pH 8.5. Važnost pH je pridodana ponašanju antigena u sredini visokog odnosno niskog pH. Komercijalni antigen razotkrivajući puferi su dostupni sa različitom pH vrijednosti. Postoje puferi sa višom pH vrijednosti kao i oni sa nižom pH vrijednosti. Odabiru se i koriste prema specifikacijama korištenog antitijela. Niski pH pufera (acetatni, pH 1.0-2.0) smatra se korisnim za antigene u jezgri stanice.

U HIER grupu metoda razotkrivanja antigena pripadaju:

* Razotkrivanje antigena uz pomoć mikrovalne pećnice, koju je opisao Shi i sur. 1991.god. te uveo kao alternativni način proteolitičkoj enzimskoj digestiji. Stvarno vrijeme grijanja ovisi o jakosti pećnice, izboru pufera za razotkrivanje antigena, volumenu korištenog pufera, debljini parafinskih rezova i o vrsti antigena koji se želi detektirati. Ova metoda se koristila pri razotkrivanju antigena za protutijelo GFAP i S100. Preparati TMA uranjaju se u citratni pufer pH 6.0 te se ta posuda stavlja u mikrovalnu pećnicu (proizvođač Gorenje) kroz devet minuta na 800 W, a potom kroz petnaest minuta na 450 W. Zatim se preparati hlade dvadeset minuta te potom ispiru destiliranom vodom i potom stavljaju u aparat za imunohistokemijsko bojenje. Izrada citartnog pufera: 2,94 g natrij citratdihidrat (proizvođač Merck) rastopi se u 1 L destilirane vode.
* Razotkrivanje antigena uz pomoć vodene kupelji kao metoda razvijena je 1994. god. (Kawai i sur.) kada je opisano da je temperatura vodene kupelji od 90 °C adekvatna za razotkrivanje antigena te smanjuje vrijeme inkubacije. Prednosti ove metode su očuvanje preparata jer je temperatura ispod vrelišta vode i time neće doći do evaporacije antigen razotkrivajućeg pufera. Na ovaj način mogu iznova koristiti već korišteni komercijalni puferi za razotkrivanje antigena. Ova metoda razotkrivanja antigena korištena je za protutijelo Ki-67. Preparati TMA uranjaju se u Tris-EDTA pufer te se potom sve zajedno polaže u vodenu kupelj (proizvođač Kunz) kroz petnaest minuta. Zatim slijedi hlađenje od dvadeset minuta i odlaganje preparata u aparat za imunohistokemijsko bojenje. Izrada Tris-EDTA pufera: 0,37 g EDTA (proizvođač Fluka) i 1,21 g Tris (proizvođač Merck) otope se u 1 L destilirane vode.

Prednosti korištenja manualnog grijanja kao predtretmana su to što ne zahtijeva različito vremensko trajanje kod većine antigena bez obzira na duljinu fiksacije tkiva i što su se otkrićem ovih metoda razotkrili antigeni za koje se smatralo da ih nije moguće razotkriti. Nedostatak ove metode je vezana uz moguće narušavanje antigeničnosti, nuklearni detalji mogu se izgubiti ako se grije nedovoljno fiksirano tkivo, te tkivo koje sadrži masti može kliznuti sa mikroskopskog stakla.

### 3.3.3. Automatizirana metoda predtretmana tkiva

PT Link® proizvođača Dako je potpuno automatizirani sustav koji vrši deparafiniranje tkiva, rehidraciju i HIER razotkrivanje antigena. Ovim predtretmanom obuhvaćena su protutijela IDH1. Nakon što preparati TMA odstoje u termostatu, odlažu se u automatizirani aparat za predtretman tkiva.

Potupak upravljanja navedenim aparatom vrši se:

1. Pripremom radne otopine EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution (proizvođač Dako) koncentracije 1:50 pomiješanog sa destiliranom ili deioniziranom vodom. S obzirom da postoje dva kontejnera u jedan se stavlja EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution High pH sastava Tris/EDTA pufer pH 9, dok u drugi kontejner se stavlja EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution Low pH sastava citratnog pufera pH 6.1. Sve je komercijalni pripravak proizvođača Dako.

2. Punjenjem kontejnera PT Linka™ suficijentnom količinom (1.5 L) obje radne otopine da se prekriju preparati.

3. Podešavanjem PT Linka™ na temperaturu od 65 °C.

4. Uranjanjem preparata TMA u zagrijanu radnu otopinu na 97 °C kroz vrijeme od 20 minuta.

5. Hlađenjem preparata u PT Linku™ na temperaturi od 65 °C.

6. Odlaganjem preparata TMA na sobnoj temperaturi u EnVision™ FLEX Wash Buffer (proizvođač Dako) kroz vrijeme od 5 minuta. Prije odlaganja preparata TMA u aparat za automatsko imunohistokemijsko bojenje nužno je pripaziti na mogućnost presušivanja preparata na sobnoj temperaturi.

## 3.4. Primarna protutijela i njihove pozitivne kontrole

Korištena su monoklonalna protutijela sa simultanom izvedbom predtretmana i imunohistokemijskog bojenja njihovih pozitivnih kontrola. Pozitivne kontrole služe kao regulator uspješnosti imunohistokemijske reakcije. Kao pozitivna kontola za protutijelo S100 korišen je preparat crvuljka, za Ki-67 preparat normalne tonzile, za GFAP preparat mozgovnog tkiva, dok je za IDH1 korištena komercijalna pozitivna imunohistokemijska kontrola (proizvođača Dianova; DIA-W09) mišji anti humani IDH1 divlji tip. Sva protutijela su komercijalno dostupna u obliku koncentrata, te su podložna manualnoj diluciji.

### 3.4.1. GFAP

Korišteno je monoklonalno mišje anti-humano GFAP protutijelo proizvođača Dako (LOT 000624111, EXP. 9/2016), klon 6F2 klase imunoglobulina IgG, koje je koncentrirano, te se koristi razrijeđen sa Dako Antibody Diluent™ reagensom u omjeru 1:300. Razrjeđenje protutijela vrši se neposredno prije upotrebe na sobnoj temperaturi.

### 3.4.2. S100

Anti-S100 je poliklonalno zečje protutijelo proizvođača Dako (LOT 20016080, EXP. 9/2020) koje je kao komercijalni proizvod koncentrirano te se neposredno prije upotrebe razrjeđuje Dako Antibody Diluent™ reagensom na sobnoj temperaturi u omjeru 1:2000. Protutijela su komercijalno u čvrstom agregatnom stanju adsorbirana na proteine humane plazme i proteine kravlje plazme. U glijalnim stanicama podliježe pozitivitet reakcije kroz citoplazmatsku distribuciju.

### 3.4.3. Ki-67

Monoklonalno mišje anti-humano Ki-67 antigen koristi se u razrjeđenju 1:100 sa Dako Antibody Diluent™ reagensom na sobnoj temperaturi neposredno prije upotrebe. Klon MIB-1 prepoznaje nativni Ki-67 antigen i rekombinantne fragmente Ki-67 molekule (57). Ki-67 i MIB-1 (monoklonsko protutijelo korišteno u ovom istraživanju da bi se utvrdilo Ki-67 *labbeling index*) su direktno usmjereni na različite epitope jednoga proliferacijski vezanog antigena.

### 3.4.4. IDH1

Korišteno je anti-humano IDH1 R132H protutijelo, klon W09 (proizvođač Dianova). Protutijelo je monoklonalnog karaktera, klase IgG, usmjereno na najčešću heterozigotnu humanu točkastu mutaciju kodona 132. Koristi se razrijeđen destiliranom vodom u omjeru 1:20 odstajanjem na sobnoj temperaturi kroz 30 minuta. IDH1 R132H mutacija je detekcijski vrlo osjetljiva i specifična za tumorsku klasifikaciju te se detektira u pojedinačnoj infiltrirajućoj tumorskoj stanici.

## 3.5. Automatizirana metoda imunohistokemijskog bojenja tkiva

Dako Autostainer Link 48™ je sustav koji automatiziranim načinom rada imitira manualan način bojenja tkiva koja se rutinski koriste u imunohistokemiji. Programska podrška podržava ustaljeni protokol bojenja tkiva putem radnih stanica koje su umrežene ili samostalne konfiguracije. Imunohistokemijska bojenja vrše se u instrumentu pri sobnoj temperaturi.

Potrebni reagensi i radne otopine za rad instrumenta su (sve proizvođač Dako):

* EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) koji se sastoji od TRIS pufera u zasoljenom pripravku koji sadrži Tween 20, pH 7.6 (+/- 0.1). Radna otpina priređuje se dilucijom 1:20 što bi odgovaralo za 1 L: 950 mL destilirane ili deionizirane vode sa 50 mL Wash Buffer (20x)
* EnVision™FLEX Peroksidase-Blocking Reagent (RTU) koji se sastoji od fosfatnog pufera u kojemu je hidrogen peroksidaza, 15 mmol/l NaN3 i detergent
* EnVision™ FLEX/HRP (RTU) koji čini dekstran nakupljen sa molekulama peroksidaze (HRP) i molekulama kozjih sekundarnih protutijela usmjerene na zečja i mišja primarna protutijela (imunoglobuline). Prema kemijskoj strukturi dozvoljava se da na jednu okosnicu dekstrana bude vezano 100 molekula HRP i 20 molekula primarnih protutijela.
* EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen koncentrat
* EnVision™ FLEX Substrate Buffer koja je puferska otopina koja sadrži hidrogen peroksidazu i konzervanse

EnVision™ FLEX Substrate Working Solution priređuje se:

1 mL EnVision™ FLEX Substrate Buffer + 1 kap EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen

* primarna protutijela već unaprijed razrijeđena u traženim koncentracijama sa EnVision™ FLEX Antibody Diluent.

Upravljanje instrumentom vrši se na sljedeći način:

1. Uključivanjem kompjutora, upisivanjem korisničke lozinke te unosom bioptičkog identifikacijskog broja

2. Odabirom protokola rada (GFAP, IDH1, S100, Ki-67)

3. Printanjem etiketa

4. Lijepljenjem etiketa na mat stranu preparata

5. Polaganjem stakalca na držače u instrumentu i to na bilo koju poziciju

6. Stavljanjem reagensa i radnih otopina u predviđena mjesta u instrumentu

7. Instrument započinje s radom tako da skenira stakalca i reagense, te se nakon izvršenih bojenja preparati vade iz instrumenta.

Instrument Autostainer Link 48™ automatiziranim načinom provodi protokol EnVision™ FLEX sustavom bojenja tkiva prema sljedećem protokolu:

1. Ispiranje preparata sa EnVision™ FLEX Wash Buffer

2. Dodavanje EnVision™ FLEX Peroksidase-Blocking Reagent (RTU) 100 μL kroz 5 minuta

3. Ispiranje preparata sa EnVision™ FLEX Wash Buffer

4. Dodavanje primarnih protutijela već unaprijed razrijeđenih sa EnVision™ FLEX Antibody Diluent™ 100 μL kroz 20 minuta

5. Ispiranje preparata sa EnVision™ FLEX Wash Buffer

6. Dodavanje EnVision™ FLEX/HRP (RTU) 100 μL kroz 20 minuta

7. Ispiranje preparata sa EnVision™ FLEX Wash Buffer

8. Ispiranje preparata sa EnVision™ FLEX Wash Buffer kroz 5 minuta

9. Dodavanje EnVision™ Substrat Working Solution 200 μL kroz 10 minuta

10. Ispiranje preparata sa EnVision™ FLEX Wash Buffer

.



*Slika 6*. Protokol EnVision™ u automatiziranom aparatu za imunohistokemijsko bojenje tkiva temeljen na polimer bazirajućoj metodi. Preuzeto sa [www.kanidis.gr/.../EnVision%20FLEX%20Systems%20-%20Manual%20protocol.pdf](http://www.kanidis.gr/.../EnVision%20FLEX%20Systems%20-%20Manual%20protocol.pdf) 25.07.2016.god.

Izvađeni preparati odlažu se u destiliranu vodu gdje se ispiru dva puta po dvije minute, a zatim se preparati uranjaju u Hematoksilin 1 minute Mayer's Lillie's Modification (proizvođač Dako) Histological Staining Reagent® (LOT 10104956) na jednu minutu, a potom uranjaju u mlaku vodovodnu vodu kroz deset minuta. Montiranje pokrovnice vrši se manualno sa Tissue Tek® Glas Mount Containing (LOT 1517400012) proizvođača Sakura.

## 3.6. Analiza imunohistokemijskih preparata

### *3.6.1. Automatizirana analiza imunohistokemijske metode bojenja*

Automatiziranom kvantifikacijom imunohistokemijskog bojenja tkiva detektirani su i računalno obrađeni histološki preparati TMA obojani sa Ki-67 protutijelom na aparatu Olympus® sa programskom kompjutorskom podrškom Hue Saturation Intensity. Aparat se sastoji od digitalne kamere koja skenira preparat i računala koje preparat analizira. Rezultat je dobiven dijeljenjem broja pozitivnih jezgara sa negativnim brojem jezgara te izražen u postotku.

Preparat se uz pomoć digitalne kamere vezanim sustavom priključenim na kompjutor skenira, te na zaslonu računala prikaže izgled TMA cora koja je podložna daljnjoj analizi. TMA cor se podijeli na 9 regija te se svaka regija zasebno analizira odnosno kvantificira. Ova metoda razvijena je na principu postojanja razlike u intezitetu boje koje je različit od podloge. S obzirom da Ki-67 prikazuje distribuciju kroz nuklearni pozitivitet brojčano su određene pozitivne i negativne jezge kroz četiri faze:

1. Detekcijom koja je temeljena na tonu, zasićenosti i intezitetu (58) boje.

2. Filtracijom pozitivnih piksela primjenom metode pragova (59).

3. Automatiziranom selekcijom objekata koji zadovoljavaju postavljene kriterije.

4. Izračunavanjem rezultata na temelju obrađenih zadanih parametara računalnim matematičkim algoritmima.

### *3.6.2. Kvantifikacija uz pomoć svjetlosnog mikroskopa*

Preparati obojeni sa GFAP, IDH1 i S100 su pregledani pod svjetlosnim mikroskopom proizvođača Olympus® sa digitalnom kamerom Sony® za pohranu digitalno uslikanih uzoraka u programu ISSA(Vamstek, Zagreb) pri povećanju od 200X. U svim uzorcima koji su bili GFAP i S100 pozitivni zabilježeno je više od 75 % imunopozitivnih stanica, ali različitog inteziteta obojenja. Različiti inteziteti bojenja obilježeni su brojevima 1, 2 i 3 tako da 1 predstavlja reakciju slabog inteziteta (žuto obojene imunoreakcije), 2 predstavlja reakciju umjerenog inteziteta (srednje smeđe obojene imunoreakcije) i 3 koji predstavlja reakciju jakog inteziteta (tamno smeđe obojene imunoreakcije). U svim uzorcima koji su bili IDH1 pozitivni zabilježeno je manje od 25 % imunopozitivnih stanica, ali različitog inteziteta obojenja. Različiti inteziteti obojenja obilježeni su brojevima 1, 2 i 3 tako da 1 predstavlja reakciju slabog inteziteta (žuto obojene imunoreakcije), 2 predstavlja reakciju umjerenog inteziteta (srednje smeđe obojene imunoreakcije) i 3 koji predstavlja reakciju jakog inteziteta (tamno smeđe obojene imunoreakcije).

### 3.6.3. Statistička obrada rezultata

Podaci su statistički obrađeni parametrijskom statističkom obradom T-testom. Pri analizi korištena je programska podrška IBM SPSS, verzija 21. Sve p vrijednosti koje su veće od 0,05 smatrane su statistički neznačajnom.

# 4. Rezultati

## 4.1. Rezultati pojavnosti Ki-67 u obje vrste uzoraka

Imunopozitivnost za Ki-67 prikazana je brojčano u Tablici 4., 5. i 6. Svaki Grid predstavlja po jedan uzorak. U Tablici 4. Grid #13, #14, #15, #32 i #57 su bez iskazanog rezultata (engl. *missing value)* zbog tehničke neispravnosti uzorka. U Tablici 5. Grid#11 i #52 također nisu uvršteni u statističku obradu podataka zbog tehničke neispravnosti uzorka. U Tablici 6. ne postoje iskazani rezultati mjerenja za Grid #35, #58 i #59. U Tablici 7. prikazane su vrijednosti imunohistokemijske pozitivnosti za Ki-67. Nevažeći rezultati nisu imali utjecaj na konačnu statističku obradu upravo zbog korištenja većeg broja uzoraka prethodno smrznutog tkiva i nesmrznutog tkiva glioblastoma po jednom pacijentu.

*Tablica 4*. Imunopozitivnost za Ki-67 za svaki pojedinačni tkivni uzorak tumora na TMA parafinskom bloku GLIOBLASTOMI 1.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| GLIOBLASTOMI 1 | % Ki-67 pozitivnosti imunoreakcije | Broj pozitivnih jezgara | Broj negativnih jezgara |
| Grid #1 | 23.9% | 819 | 2509 |
| Grid #2 | 10.7% | 410 | 3104 |
| Grid #3 | 15.0% | 855 | 4144 |
| Grid #4 | 6.8% | 112 | 1499 |
| Grid #5 | 9.9% | 118 | 935 |
| Grid #6 | 7.7% | 60 | 675 |
| Grid #7 | 4.4% | 85 | 1764 |
| Grid #8 | 3.4% | 34 | 969 |
| Grid #9 | 4.3% | 45 | 980 |
| Grid #10 | 7.6% | 43 | 510 |
| Grid #11 | 3.9% | 52 | 1219 |
| Grid #12 | 6.4% | 71 | 1099 |
| Grid #16 | 22.4% | 179 | 641 |
| Grid #17 | 37.5% | 747 | 1129 |
| Grid #18 | 13.9% | 202 | 1260 |
| Grid #19 | 8.8% | 324 | 2703 |
| Grid #20 | 7.0% | 184 | 2618 |
| Grid #21 | 18.5% | 10 | 44 |
| Grid #22 | 3.2% | 61 | 2165 |
| Grid #23 | 3.3% | 56 | 1796 |
| Grid #24 | 3.2% | 50 | 1474 |
| Grid #25 | 11.6% | 664 | 4157 |
| Grid #26 | 6.4% | 131 | 1826 |
| Grid #27 | 17.9% | 744 | 3698 |
| Grid #28 | 1.9% | 50 | 2639 |
| Grid #29 | 2.7% | 64 | 2416 |
| Grid #30 | 3.3% | 56 | 2326 |
| Grid #31 | 16.0% | 379 | 2270 |
| Grid #33 | 8.6% | 155 | 1688 |
| Grid #34 | 8.6% | 342 | 3541 |
| Grid #35 | 6.4% | 120 | 1573 |
| Grid #36 | 9.0% | 337 | 3212 |
| Grid #37 | 7.2% | 188 | 2315 |
| Grid #38 | 16.4% | 230 | 991 |
| Grid #39 | 9.0% | 196 | 2049 |
| Grid #40 | 5.6% | 110 | 2041 |
| Grid #41 | 6.2% | 117 | 1672 |
| Grid #42 | 4.5% | 87 | 1753 |
| Grid #43 | 7.7% | 512 | 6769 |
| Grid #44 | 6.5% | 90 | 1338 |
| Grid #45 | 6.1% | 189 | 2944 |
| Grid #46 | 4.2% | 246 | 5443 |
| Grid #47 | 5.1% | 232 | 3950 |
| Grid #48 | 3.3% | 157 | 4459 |
| Grid #49 | 20.1% | 592 | 2453 |
| Grid #50 | 8.9% | 384 | 3899 |
| Grid #51 | 5.9% | 197 | 2851 |
| Grid #52 | 1.8% | 53 | 3201 |
| Grid #53 | 2.4% | 33 | 3628 |
| Grid #55 | 6.8% | 310 | 4180 |
| Grid #56 | 3.1% | 142 | 4487 |
| Grid #58 | 5.7% | 130 | 4001 |
| Grid #59 | 4.8% | 144 | 3495 |
| Grid #60 | 5.1% | 194 | 3913 |

*Tablica 5*. Imunopozitivnost za Ki-67 za svaki pojedinačni tkivni uzorak tumora na TMA parafinskom bloku GLIOBLASTOMI 2.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| GLIOBLASTOMI 2 | % Ki-67 pozitivnosti imunoreakcije | Broj pozitivnih jezgara | Broj negativnih jezgara |
| Grid #1 | 20.3% | 1107 | 3940 |
| Grid #2 | 21.7% | 147 | 818 |
| Grid #3 | 8.9% | 157 | 2126 |
| Grid #4 | 13.1% | 186 | 1423 |
| Grid #5 | 38.8% | 68 | 148 |
| Grid #6 | 21.4% | 233 | 1323 |
| Grid #7 | 38.5% | 566 | 721 |
| Grid #8 | 44.1% | 1720 | 2141 |
| Grid #9 | 11.1% | 95 | 726 |
| Grid #10 | 29.6% | 368 | 815 |
| Grid #12 | 6.5% | 3 | 43 |
| Grid #13 | 10.7% | 290 | 2448 |
| Grid #14 | 12.4% | 512 | 3534 |
| Grid #15 | 19.4% | 793 | 3146 |
| Grid #16 | 12.7% | 141 | 1119 |
| Grid #17 | 12,5% | 70 | 734 |
| Grid #18 | 21.3% | 165 | 1001 |
| Grid #19 | 20.9% | 26 | 181 |
| Grid #20 | 14.3% | 114 | 817 |
| Grid #21 | 6.4% | 68 | 1103 |
| Grid #22 | 18.3% | 83 | 733 |
| Grid #23 | 23.2% | 101 | 701 |
| Grid #24 | 18.9% | 86 | 390 |
| Grid #25 | 31.5% | 1164 | 2654 |
| Grid #26 | 22.1% | 977 | 3229 |
| Grid #27 | 9.7% | 372 | 3279 |
| Grid #28 | 14.2% | 92 | 556 |
| Grid #29 | 13.9% | 220 | 1573 |
| Grid #30 | 11.8% | 413 | 2912 |
| Grid #31 | 28.7% | 626 | 1939 |
| Grid #32 | 17.1% | 797 | 4148 |
| Grid #33 | 15.9% | 668 | 3168 |
| Grid #34 | 43.8% | 242 | 309 |
| Grid #35 | 25.9% | 628 | 1717 |
| Grid #36 | 26.0% | 182 | 556 |
| Grid #37 | 11.9% | 162 | 1150 |
| Grid #38 | 19.3% | 293 | 1346 |
| Grid #39 | 23.4% | 332 | 1131 |
| Grid #40 | 32.3% | 227 | 538 |
| Grid #41 | 36.8% | 563 | 908 |
| Grid #42 | 9.3% | 5 | 49 |
| Grid #43 | 25.4% | 107 | 437 |
| Grid #44 | 20.8% | 621 | 2452 |
| Grid #45 | 25.8% | 229 | 610 |
| Grid #46 | 16.8% | 204 | 1003 |
| Grid #47 | 38.7% | 471 | 831 |
| Grid #48 | 53.0% | 208 | 191 |
| Grid #49 | 22.0% | 895 | 3227 |
| Grid #50 | 18.8% | 541 | 2363 |
| Grid #51 | 15.5% | 444 | 2581 |
| Grid #53 | 66.02% | 583 | 295 |
| Grid #54 | 58.13% | 229 | 135 |
| Grid #55 | 8.3% | 174 | 1562 |
| Grid #56 | 8.0% | 270 | 3446 |
| Grid #57 | 18.6% | 910 | 3633 |
| Grid #58 | 28.9% | 653 | 1529 |
| Grid #59 | 30.4% | 75 | 169 |
| Grid #60 | 3.1% | 5 | 212 |
| Grid #61 | 21.8% | 299 | 1256 |
| Grid #62 | 14.1% | 120 | 954 |
| Grid #63 | 2.9% | 43 | 1553 |
| Grid #64 | 5.8% | 67 | 1113 |
| Grid #65 | 3.5% | 2 | 55 |
| Grid #66 | 4.8% | 70 | 1599 |
| Grid #67 | 6.7% | 98 | 1451 |
| Grid #68 | 11.5% | 99 | 850 |
| Grid #69 | 6.7% | 25 | 441 |
| Grid #70 | 7.7% | 17 | 318 |

*Tablica 6*. Imunopozitivnost za Ki-67 za svaki pojedinačni tkivni uzorak tumora na na TMA parafinskom bloku GLIOBLASTOMI 3.

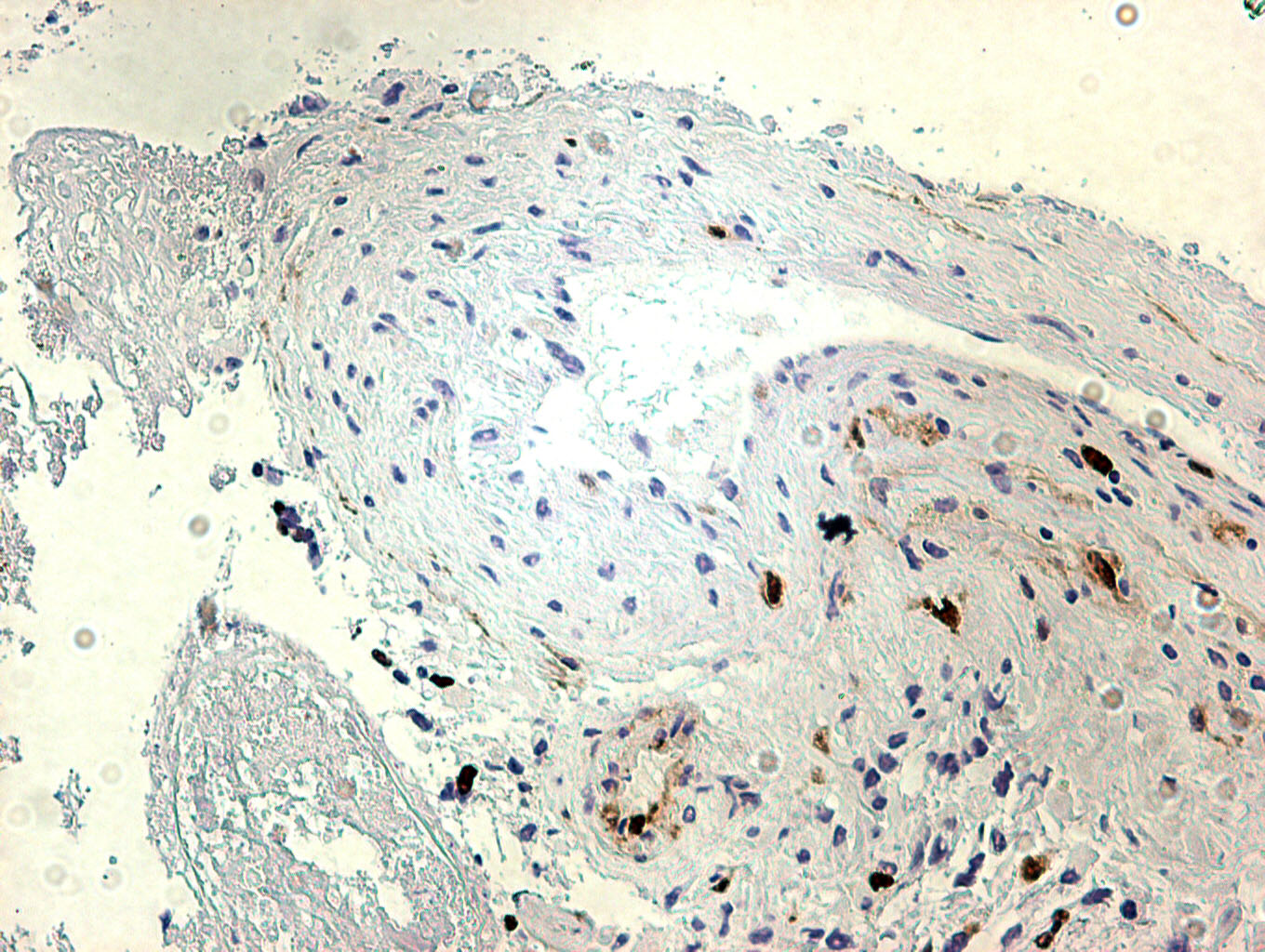
|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| GLIOBLASTOMI 3 | % Ki-67 pozitivnosti imunoreakcije | Broj pozitivnih jezgara | Broj negativnih jezgara |
| Grid #1 | 22.2% | 10 | 35 |
| Grid #2 | 11.5% | 319 | 2568 |
| Grid #3 | 12.4% | 816 | 5663 |
| Grid #4 | 0.0% | 0 | 38 |
| Grid #5 | 8.1% | 131 | 1473 |
| Grid #6 | 6.5% | 36 | 581 |
| Grid #7 | 14.0% | 28 | 172 |
| Grid #8 | 19.0% | 548 | 2551 |
| Grid #9 | 16.3% | 578 | 2976 |
| Grid #10 | 13.4% | 710 | 4477 |
| Grid #11 | 11.4% | 259 | 2365 |
| Grid #12 | 13.1% | 751 | 4918 |
| Grid #13 | 12.3% | 747 | 5141 |
| Grid #14 | 1.1% | 3 | 391 |
| Grid #15 | 8.6% | 428 | 4393 |
| Grid #16 | 13.2% | 673 | 4420 |
| Grid #17 | 8.1% | 159 | 1782 |
| Grid #18 | 15.7% | 90 | 371 |
| Grid #19 | 5.6% | 175 | 2985 |
| Grid #20 | 5.2% | 125 | 1890 |
| Grid #21 | 8.2% | 211 | 2756 |
| Grid #22 | 4.4% | 41 | 1138 |
| Grid #23 | 3.2% | 112 | 2643 |
| Grid #24 | 1.0% | 18 | 1693 |
| Grid #25 | 5.2% | 276 | 5025 |
| Grid #26 | 12.0% | 636 | 4673 |
| Grid #27 | 4.6% | 179 | 4129 |
| Grid #28 | 15.2% | 823 | 4514 |
| Grid #29 | 11.0% | 257 | 1905 |
| Grid #30 | 13.8% | 591 | 3865 |
| Grid #31 | 24.7% | 747 | 2470 |
| Grid #32 | 25.5% | 361 | 1363 |
| Grid #33 | 18.5% | 798 | 3608 |
| Grid #34 | 32.2% | 944 | 2549 |
| Grid #36 | 41.4% | 688 | 1537 |
| Grid #37 | 11.4% | 383 | 3219 |
| Grid #38 | 7.7% | 290 | 3397 |
| Grid #39 | 14.9% | 374 | 2099 |
| Grid #40 | 7.8% | 277 | 2643 |
| Grid #41 | 35.5% | 1634 | 2675 |
| Grid #42 | 52.9% | 2002 | 1786 |
| Grid #43 | 26.9% | 1310 | 3818 |
| Grid #44 | 27.8% | 1241 | 3272 |
| Grid #45 | 54.0% | 1839 | 1918 |
| Grid #46 | 72.8% | 2169 | 816 |
| Grid #47 | 69.3% | 2585 | 1184 |
| Grid #48 | 56.7% | 2067 | 1560 |
| Grid #49 | 16.6% | 425 | 2274 |
| Grid #50 | 24.5% | 604 | 1987 |
| Grid #51 | 18.0% | 398 | 1633 |
| Grid #52 | 44.7% | 1044 | 1260 |
| Grid #54 | 47.8% | 1053 | 1058 |
| Grid #55 | 6.8% | 71 | 1182 |
| Grid #56 | 10.9% | 166 | 1353 |
| Grid #57 | 8.9% | 114 | 1176 |
| Grid #60 | 45.0% | 1119 | 1384 |

*Tablica 7*. Sumarni rezultati mjerenja za imunopozitivnost Ki-67. Primjer: pacijent pod rednim brojem 1. ima pridružen sumarni rezultat 16,53 koji se odnosi na prva tri uzorka te predstavlja nesmrznuti uzorak, dok se sumarni rezultat 8,13 odnosi na druga tri uzorka te predstavlja prethodno smrznuti uzorak.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Redni broj uzorka | Nesmrznuti uzorak | Prethodno smrznuti uzorak |
| 1 | 16,53 | 8,13 |
| 2 | 4,03 | 5,97 |
| 3 | - | 24,6 |
| 4 | 11,43 | 3,23 |
| 5 | 11,97 | 2,63 |
| 6 | 12,3 | 8 |
| 7 | 10,87 | 5,43 |
| 8 | 6,77 | 4,2 |
| 9 | 11,63 | 2,1 |
| 10 | 4,95 | 5,2 |
| 11 | 16,97 | 24,43 |
| 12 | 31,23 | 18,05 |
| 13 | 14,17 | 15,5 |
| 14 | 13,87 | 20,13 |
| 15 | 21,1 | 13,3 |
| 16 | 20,57 | 31,9 |
| 17 | 18,2 | 26,13 |
| 18 | 24 | 36,17 |
| 19 | 18,77 | 62,08 |
| 20 | 11,63 | 20,8 |
| 21 | 12,93 | 4,7 |
| 22 | 8,3 | 7,7 |
| 23 | 15,37 | 4,87 |
| 24 | 16,43 | 12,63 |
| 25 | 7,33 | 12,33 |
| 26 | 6,33 | 2,87 |
| 27 | 7,27 | 13,33 |
| 28 | 22,9 | 36,8 |
| 29 | 11,33 | 32,07 |
| 30 | 36,23 | 66,27 |
| 31 | 19,7 | 46,25 |
| 32 | 8,87 | 45 |

*Slika 7*. Prikaz vrijednosti imunohistokemijske pozitivnosti za Ki-67 tkivu glioblastoma.

Statistička obrada podataka za imunopozitivnost Ki-67 pokazuje da standardna devijacija za nesmrznute uzorke iznosi 7,37 (Std.), a za prethodno smrznute uzorke iznosi 17,60 (Std.) što znači da je raspršenje uzorka u odnosu na artimetičku sredinu za nesmrznute uzorke manje nego kod prethodno smrznutih uzoraka. Broj pacijenata koji je uključen u statističku obradu je 31. Također, podaci iz obje vrste uzoraka značajno visoko koreliraju što odgovara korelacijskom koeficijentu od 0,616. Prema tome, p ˃ 0,05 dokazuje ovom statističkom obradom da nema razlike u obojenosti imunohistokemijskih preparata za Ki-67 između nesmrznutih i prethodno smrznutih uzoraka.

*Slika 8*. Imunopozitivnost Ki-67 na preparatu glioblastoma multiforme (200X).

## 4.2. Rezultati pojavnosti GFAP u obje vrste uzoraka

Pojavnost GFAP na sva tri TMA parafinska bloka prikazana je u Tablicama 8., 9., i 10. te je predstavljena kroz intenzitet obojenja reakcije. U Tablici 8. pod rednim brojem 6.,13., 14., 15., 17., 21., 23., 24., 42. i 45. nema iskazanih vrijednosti mjerenja zbog tehničke neispravnosti. Također, u Tablici 9. nevažeći rezultati zbog tehničke neispravnosti pod rednim brojem 11., 12., 34., 36., 42., 52., 53., 59. i 60. nisu pridodani statističkoj obradi. U Tablici 10. pod rednim brojem 7., 13., 35., 40., 52. i 53. rezultati su nevažeći zbog tehničke neispravnosti te nisu pridodani statističkoj obradi podataka. Nevažeći rezultati utjecali su na konačnu statističku obradu upravo zbog korištenja većeg broja uzoraka prethodno smrznutog tkiva i nesmrznutog tkiva glioblastoma po jednom pacijentu.

*Tablica 8*. Intezitet imunohistokemijskog bojenja na GFAP za svaki pojedinačni tkivni uzorak tumora na TMA parafinskom bloku GLIOBLASTOMI 1.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Pozicijsko mjesto | Intezitet imunohistokemijskog bojenja na GFAP | GLIOBLASTOMI 1 |
| 1 | 2 | 6097/11 |
| 2 | 2 | 6097/11 |
| 3 | 2 | 6097/11 |
| 4 | 2 | 6097/11 IOB |
| 5 | 2 | 6097/11 IOB |
| 6 | / | 6097/11 IOB |
| 7 | 2 | 6934/11 |
| 8 | 2 | 6934/11 |
| 9 | 2 | 6934/11 |
| 10 | 2 | 6934/11 IOB |
| 11 | 2 | 6934/11 IOB |
| 12 | 2 | 6934/11 IOB |
| 13 | / | 10357/11 |
| 14 | / | 10357/11 |
| 15 | / | 10357/11 |
| 16 | 2 | 10357/11 IOB |
| 17 | / | 10357/11 IOB |
| 18 | 2 | 10357/11 IOB |
| 19 | 1 | 12229/11 |
| 20 | 1 | 12229/11 |
| 21 | / | 12229/11 |
| 22 | 1 | 12229/11 IOB |
| 23 | / | 12229/11 IOB |
| 24 | / | 12229/11 IOB |
| 25 | 2 | 15232/11 |
| 26 | 2 | 15232/11 |
| 27 | 2 | 15232/11 |
| 28 | 1 | 15232/11 IOB |
| 29 | 1 | 15232/11 IOB |
| 30 | 1 | 15232/11 IOB |
| 31 | 1 | 17248/11 |
| 32 | 1 | 17248/11 |
| 33 | 1 | 17248/11 |
| 34 | 1 | 17248/11 IOB |
| 35 | 1 | 17248/11 IOB |
| 36 | 1 | 17248/11 IOB |
| 37 | 1 | 18087/11 |
| 38 | 1 | 18087/11 |
| 39 | 1 | 18087/11 |
| 40 | 2 | 18087/11 IOB |
| 41 | 2 | 18087/11 IOB |
| 42 | / | 18087/11 IOB |
| 43 | 1 | 18090/11 |
| 44 | 1 | 18090/11 |
| 45 | 1 | 18090/11 |
| 46 | 1 | 18090/11 IOB |
| 47 | 1 | 18090/11 IOB |
| 48 | 1 | 18090/11 IOB |
| 49 | 1 | 18177/11 |
| 50 | 1 | 18177/11 |
| 51 | 1 | 18177/11 |
| 52 | 3 | 18177/11 IOB |
| 53 | 3 | 18177/11 IOB |
| 54 | / | 18177/11 IOB |
| 55 | 1 | 18967/11 |
| 56 | 1 | 18967/11 |
| 57 | 1 | 18967/11 |
| 58 | 2 | 18967/11 IOB |
| 59 | 2 | 18967/11 IOB |
| 60 | 2 | 18967/11 IOB |

*Tablica 9*. Intezitet imunohistokemijskog bojenja na GFAP za svaki pojedinačni tkivni uzorak tumora na na TMA parafinskom bloku GLIOBLASTOMI 2.

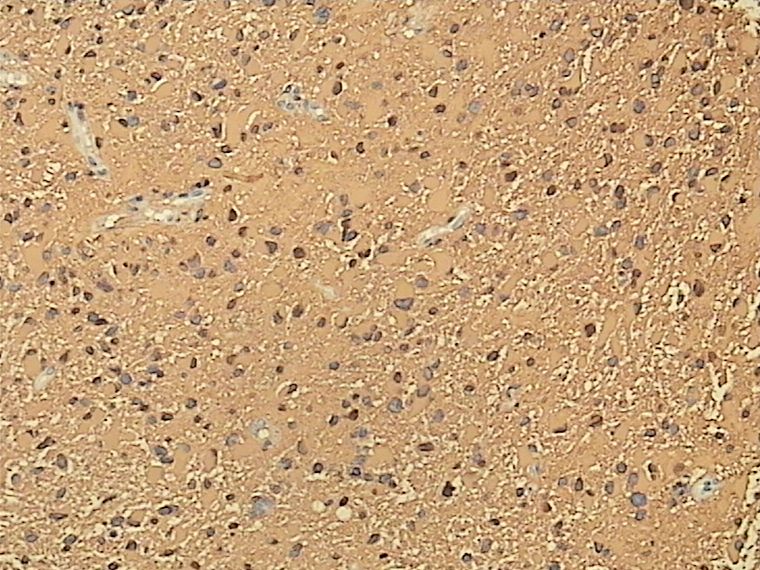
|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Pozicijsko mjesto | Intezitet imunohistokemijskog bojenja na GFAP | GLIOBLASTOMI 2 |
| 1 | 2 | 10/13 |
| 2 | 2 | 10/13 |
| 3 | 2 | 10/13 |
| 4 | 1 | 10/13 IOB |
| 5 | 1 | 10/13 IOB |
| 6 | 1 | 10/13 IOB |
| 7 | 1 | 1731/13 |
| 8 | 1 | 1731/13 |
| 9 | 2 | 1731/13 |
| 10 | 1 | 1731/13 IOB |
| 11 | / | 1731/13 IOB |
| 12 | / | 1731/13 IOB |
| 13 | 2 | 2686/13 |
| 14 | 2 | 2686/13 |
| 15 | 2 | 2686/13 |
| 16 | 2 | 2686/13 IOB |
| 17 | 2 | 2686/13 IOB |
| 18 | 2 | 2686/13 IOB |
| 19 | 3 | 4829/13 |
| 20 | 3 | 4829/13 |
| 21 | 3 | 4829/13 |
| 22 | 3 | 4829/13 IOB |
| 23 | 3 | 4829/13 IOB |
| 24 | 3 | 4829/13 IOB |
| 25 | 3 | 5675/13 |
| 26 | 3 | 5675/13 |
| 27 | 3 | 5675/13 |
| 28 | 2 | 5675/13 IOB |
| 29 | 2 | 5675/13 IOB |
| 30 | 2 | 5675/13 IOB |
| 31 | 2 | 10969/13 |
| 32 | 2 | 10969/13 |
| 33 | 2 | 10969/13 |
| 34 | / | 10969/13 IOB |
| 35 | 2 | 10969/13 IOB |
| 36 | / | 10969/13 IOB |
| 37 | 2 | 12312/13 |
| 38 | 2 | 12312/13 |
| 39 | 2 | 12312/13 |
| 40 | 2 | 12312/13 IOB |
| 41 | 2 | 12312/13 IOB |
| 42 | / | 12312/13 IOB |
| 43 | 2 | 13285/13 |
| 44 | 2 | 13285/13 |
| 45 | 2 | 13285/13 |
| 46 | 2 | 13285/13 IOB |
| 47 | 2 | 13285/13 IOB |
| 48 | 2 | 13285/13 IOB |
| 49 | 3 | 14496/13 |
| 50 | 3 | 14496/13 |
| 51 | 3 | 14496/13 |
| 52 | / | 14496/13 IOB |
| 53 | / | 14496/13 IOB |
| 54 | 3 | 14496/13 IOB |
| 55 | 2 | 14679/13 |
| 56 | 2 | 14679/13 |
| 57 | 2 | 14679/13 |
| 58 | 2 | 14679/13 IOB |
| 59 | / | 14679/13 IOB |
| 60 | / | 14679/13 IOB |
| 61 | 2 | 16083/13 |
| 62 | 2 | 16083/13 |
| 63 | 2 | 16083/13 |
| 64 | 1 | 16083/13 IOB |
| 65 | 1 | 16083/13 IOB |
| 66 | 2 | 16083/13 IOB |
| 67 | 2 | 17059/13 |
| 68 | 2 | 17059/13 |
| 69 | 2 | 17059/13 |
| 70 | 2 | 17059/13 IOB |
| 71 | 2 | 17059/13 IOB |
| 72 | 2 | 17059/13 IOB |

*Tablica 10*. Intezitet imunohistokemijskog bojenja na GFAP za za svaki pojedinačni tkivni uzorak tumora na TMA parafinskom bloku GLIOBLASTOMI 3.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Pozicijsko mjesto | Intezitet imunohistokemijskog bojenja na GFAP | GLIOBLASTOMI 3 |
| 1 | 2 | 20824/13 |
| 2 | 2 | 20824/13 |
| 3 | 2 | 20824/13 |
| 4 | 2 | 20824/13 IOB |
| 5 | 2 | 20824/13 IOB |
| 6 | 2 | 20824/13 IOB |
| 7 | / | 24420/12 |
| 8 | 3 | 24420/12 |
| 9 | 3 | 24420/12 |
| 10 | 2 | 24420/12 IOB |
| 11 | 2 | 24420/12 IOB |
| 12 | 2 | 24420/12 IOB |
| 13 | / | 19722/12 |
| 14 | 3 | 19722/12 |
| 15 | 3 | 19722/12 |
| 16 | 2 | 19722/12 IOB |
| 17 | 2 | 19722/12 IOB |
| 18 | 2 | 19722/12 IOB |
| 19 | 3 | 16882/12 |
| 20 | 3 | 16882/12 |
| 21 | 3 | 16882/12 |
| 22 | 3 | 16882/12 IOB |
| 23 | 3 | 16882/12 IOB |
| 24 | 3 | 16882/12 IOB |
| 25 | 1 | 14470/12 |
| 26 | 1 | 14470/12 |
| 27 | 1 | 14470/12 |
| 28 | 2 | 14470/12 IOB |
| 29 | 2 | 14470/12 IOB |
| 30 | 2 | 14470/12 IOB |
| 31 | 1 | 13050/12 |
| 32 | 1 | 13050/12 |
| 33 | 2 | 13050/12 |
| 34 | 2 | 13050/12 IOB |
| 35 | / | 13050/12 IOB |
| 36 | 2 | 13050/12 IOB |
| 37 | 1 | 12914/12 |
| 38 | 2 | 12914/12 |
| 39 | 2 | 12914/12 |
| 40 | 2 | 12914/12 IOB |
| 41 | / | 12914/12 IOB |
| 42 | 1 | 12914/12 IOB |
| 43 | 1 | 12845/12 |
| 44 | 1 | 12845/12 |
| 45 | 2 | 12845/12 |
| 46 | 1 | 12845/12 IOB |
| 47 | 2 | 12845/12 IOB |
| 48 | 2 | 12845/12 IOB |
| 49 | 1 | 3686/12 |
| 50 | 1 | 3686/12 |
| 51 | 1 | 3686/12 |
| 52 | 1 | 3686/12 IOB |
| 53 | / | 3686/12 IOB |
| 54 | / | 3686/12 IOB |
| 55 | 3 | 19536/12 |
| 56 | 3 | 19536/12 |
| 57 | 3 | 19536/12 |
| 58 | 3 | 19536/12 II IOB |
| 59 | / | 19536/12 II IOB |
| 60 | 2 | 19536/12 II IOB |

Statistička obrada za GFAP pokazuje da standardna devijacija za nesmrznute uzorke iznosi 1,12 (Std.), a za prethodno smrznute uzorke iznosi 1,00 (Std.) što znači da je raspršenje uzorka u odnosu na artimetičku sredinu za nesmrznute uzorke veće nego kod prethodno smrznutih uzoraka. Broj pacijenata koji je uključen u statističku obradu je 32. Također, podaci iz obje vrste uzoraka značajno visoko koreliraju što odgovara korelacijskom koeficijentu od 0,916. Prema tome, p ˃ 0,05 dokazuje ne postoji statistički značajna razlika za GFAP u intezitetu imunohistokemijskih reakcija za obje vrste uzoraka.

*Tablica 11*. Odnos inteziteta obojanosti imunohistokemijskih reakcija za GFAP za nesmrznute uzorke i prethodno smrznute uzorke izražen kroz srednje vrijednosti

*Slika 9*. Nazočnost inteziteta imunohistokemijski pozitivne reakcije na GFAP sa vrijednosti inteziteta 3 (200X).

*Slika 10*. Nazočnost inteziteta imunohistokemijski pozitivne reakcije na GFAP sa vrijednosti inteziteta 1 (200X).

## 4.3. Rezultati pojavnosti IDH1 u obje vrste uzoraka

Pojavnost IDH1 na sva tri TMA parafinska bloka sa pripadajućim vrijednostima inteziteta imunohistokemijske reakcije prikazana su u Tablicama 12., 13., i 14. U Tablici 12. pod rednim brojem 21. i 54. nalaze se nevažeća mjerenja koja nisu iskazana zbog tehničkih nepravilnosti. U Tablici 13. nevažeći rezultati pod rednim brojem 11., 12., 35. i 60. nisu pridodani statističkoj obradi. Također, u Tablici 14. pod rednim brojem 7., 13., 35., 40., 52. i 53. rezultati su nevažeći te nisu pridodani statističkoj obradi podataka. Nevažeći rezultati nisu utjecali na konačnu statističku obradu upravo zbog korištenja većeg broja uzoraka prethodno smrznutog tkiva i nesmrznutog tkiva glioblastoma po jednom pacijentu.

*Tablica 12*. Intezitet imunohistokemijskog bojenja na IDH1 za svaki pojedinačni tkivni uzorak tumora na TMA parafinskom bloku GLIOBLASTOMI 1.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Pozicijsko mjesto | Intezitet imunohistokemijskog bojenja na IDH1 | GLIOBLASTOMI 1 |
| 1 | 0 | 6097/11 |
| 2 | 0 | 6097/11 |
| 3 | 0 | 6097/11 |
| 4 | 0 | 6097/11 IOB |
| 5 | 0 | 6097/11 IOB |
| 6 | 0 | 6097/11 IOB |
| 7 | 2 | 6934/11 |
| 8 | 2 | 6934/11 |
| 9 | 1 | 6934/11 |
| 10 | 1 | 6934/11 IOB |
| 11 | 1 | 6934/11 IOB |
| 12 | 1 | 6934/11 IOB |
| 13 | 0 | 10357/11 |
| 14 | 0 | 10357/11 |
| 15 | 0 | 10357/11 |
| 16 | 0 | 10357/11 IOB |
| 17 | 0 | 10357/11 IOB |
| 18 | 0 | 10357/11 IOB |
| 19 | 0 | 12229/11 |
| 20 | 0 | 12229/11 |
| 21 | / | 12229/11 |
| 22 | 0 | 12229/11 IOB |
| 23 | 0 | 12229/11 IOB |
| 24 | 0 | 12229/11 IOB |
| 25 | 0 | 15232/11 |
| 26 | 0 | 15232/11 |
| 27 | 0 | 15232/11 |
| 28 | 0 | 15232/11 IOB |
| 29 | 0 | 15232/11 IOB |
| 30 | 0 | 15232/11 IOB |
| 31 | 0 | 17248/11 |
| 32 | 0 | 17248/11 |
| 33 | 0 | 17248/11 |
| 34 | 0 | 17248/11 IOB |
| 35 | 0 | 17248/11 IOB |
| 36 | 0 | 17248/11 IOB |
| 37 | 0 | 18087/11 |
| 38 | 0 | 18087/11 |
| 39 | 0 | 18087/11 |
| 40 | 0 | 18087/11 IOB |
| 41 | 0 | 18087/11 IOB |
| 42 | 0 | 18087/11 IOB |
| 43 | 0 | 18090/11 |
| 44 | 0 | 18090/11 |
| 45 | 0 | 18090/11 |
| 46 | 0 | 18090/11 IOB |
| 47 | 0 | 18090/11 IOB |
| 48 | 0 | 18090/11 IOB |
| 49 | 0 | 18177/11 |
| 50 | 0 | 18177/11 |
| 51 | 0 | 18177/11 |
| 52 | 0 | 18177/11 IOB |
| 53 | 0 | 18177/11 IOB |
| 54 | / | 18177/11 IOB |
| 55 | 0 | 18967/11 |
| 56 | 0 | 18967/11 |
| 57 | 0 | 18967/11 |
| 58 | 0 | 18967/11 IOB |
| 59 | 0 | 18967/11 IOB |
| 60 | 0 | 18967/11 IOB |

*Tablica 13*. Intezitet imunohistokemijskog bojenja na IDH1 za svaki pojedinačni tkivni uzorak tumora na na TMA parafinskom bloku GLIOBLASTOMI 2.

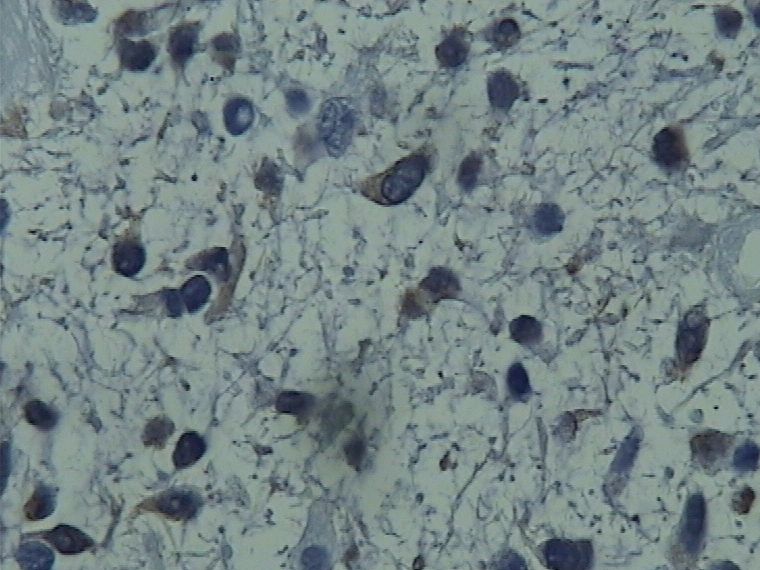
|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Pozicijsko mjesto | Intezitet imunohistokemijskog bojenja na IDH1 | GLIOBLASTOMI 2 |
| 1 | 0 | 10/13. |
| 2 | 0 | 10/13. |
| 3 | 0 | 10/13. |
| 4 | 0 | 10/13 IOB |
| 5 | 0 | 10/13 IOB |
| 6 | 0 | 10/13 IOB |
| 7 | 0 | 1731/13 |
| 8 | 0 | 1731/13 |
| 9 | 0 | 1731/13 |
| 10 | 0 | 1731/13 IOB |
| 11 | / | 1731/13 IOB |
| 12 | / | 1731/13 IOB |
| 13 | 0 | 2686/13 |
| 14 | 0 | 2686/13 |
| 15 | 0 | 2686/13 |
| 16 | 0 | 2686/13 IOB |
| 17 | 0 | 2686/13 IOB |
| 18 | 0 | 2686/13 IOB |
| 19 | 0 | 4829/13 |
| 20 | 0 | 4829/13 |
| 21 | 0 | 4829/13 |
| 22 | 0 | 4829/13 IOB |
| 23 | 0 | 4829/13 IOB |
| 24 | 0 | 4829/13 IOB |
| 25 | 0 | 5675/13 |
| 26 | 0 | 5675/13 |
| 27 | 0 | 5675/13 |
| 28 | 0 | 5675/13 IOB |
| 29 | 0 | 5675/13 IOB |
| 30 | 0 | 5675/13 IOB |
| 31 | 0 | 10969/13 |
| 32 | 0 | 10969/13 |
| 33 | 0 | 10969/13 |
| 34 | 0 | 10969/13 IOB |
| 35 | / | 10969/13 IOB |
| 36 | 0 | 10969/13 IOB |
| 37 | 0 | 12312/13 |
| 38 | 0 | 12312/13 |
| 39 | 0 | 12312/13 |
| 40 | 0 | 12312/13 IOB |
| 41 | 0 | 12312/13 IOB |
| 42 | 0 | 12312/13 IOB |
| 43 | 0 | 13285/13 |
| 44 | 0 | 13285/13 |
| 45 | 0 | 13285/13 |
| 46 | 0 | 13285/13 IOB |
| 47 | 0 | 13285/13 IOB |
| 48 | 0 | 13285/13 IOB |
| 49 | 0 | 14496/13 |
| 50 | 0 | 14496/13 |
| 51 | 0 | 14496/13 |
| 52 | 0 | 14496/13 IOB |
| 53 | 0 | 14496/13 IOB |
| 54 | 0 | 14496/13 IOB |
| 55 | 0 | 14679/13 |
| 56 | 0 | 14679/13 |
| 57 | 0 | 14679/13 |
| 58 | 0 | 14679/13 IOB |
| 59 | 0 | 14679/13 IOB |
| 60 | / | 14679/13 IOB |
| 61 | 0 | 16083/13 |
| 62 | 0 | 16083/13 |
| 63 | 0 | 16083/13 |
| 64 | 0 | 16083/13 IOB |
| 65 | 0 | 16083/13 IOB |
| 66 | 0 | 16083/13 IOB |
| 67 | 0 | 17059/13 |
| 68 | 0 | 17059/13 |
| 69 | 0 | 17059/13 |
| 70 | 0 | 17059/13 IOB |
| 71 | 0 | 17059/13 IOB |
| 72 | 0 | 17059/13 IOB |

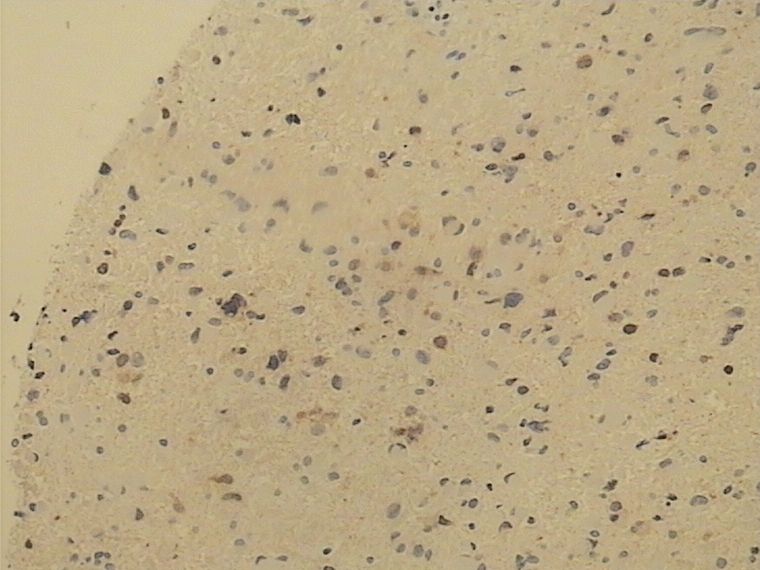
*Tablica 14*. Intezitet imunohistokemijskog bojenja na IDH1 za svaki za svaki pojedinačni tkivni uzorak tumora na TMA parafinskom bloku GLIOBLASTOMI 3.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Pozicijsko mjesto | Intezitet imunohistokemijskog bojenja na IDH1 | GLIOBLASTOMI 3 |
| 1 | 0 | 20824/13 |
| 2 | 0 | 20824/13 |
| 3 | 0 | 20824/13 |
| 4 | 0 | 20824/13 IOB |
| 5 | 0 | 20824/13 IOB |
| 6 | 0 | 20824/13 IOB |
| 7 | / | 24420/12 |
| 8 | 0 | 24420/12 |
| 9 | 0 | 24420/12 |
| 10 | 0 | 24420/12 IOB |
| 11 | 0 | 24420/12 IOB |
| 12 | 0 | 24420/12 IOB |
| 13 | / | 19722/12 |
| 14 | 0 | 19722/12 |
| 15 | 0 | 19722/12 |
| 16 | 0 | 19722/12 IOB |
| 17 | 0 | 19722/12 IOB |
| 18 | 0 | 19722/12 IOB |
| 19 | 0 | 16882/12 |
| 20 | 0 | 16882/12 |
| 21 | 0 | 16882/12 |
| 22 | 0 | 16882/12 IOB |
| 23 | 0 | 16882/12 IOB |
| 24 | 0 | 16882/12 IOB |
| 25 | 0 | 14470/12 |
| 26 | 0 | 14470/12 |
| 27 | 0 | 14470/12 |
| 28 | 0 | 14470/12 IOB |
| 29 | 0 | 14470/12 IOB |
| 30 | 0 | 14470/12 IOB |
| 31 | 0 | 13050/12 |
| 32 | 0 | 13050/12 |
| 33 | 0 | 13050/12 |
| 34 | 0 | 13050/12 IOB |
| 35 | / | 13050/12 IOB |
| 36 | 0 | 13050/12 IOB |
| 37 | 0 | 12914/12 |
| 38 | 0 | 12914/12 |
| 39 | 0 | 12914/12 |
| 40 | / | 12914/12 IOB |
| 41 | 0 | 12914/12 IOB |
| 42 | 0 | 12914/12 IOB |
| 43 | 0 | 12845/12 |
| 44 | 0 | 12845/12 |
| 45 | 0 | 12845/12 |
| 46 | 0 | 12845/12 IOB |
| 47 | 0 | 12845/12 IOB |
| 48 | 0 | 12845/12 IOB |
| 49 | 0 | 3686/12 |
| 50 | 0 | 3686/12 |
| 51 | 0 | 3686/12 |
| 52 | / | 3686/12 IOB |
| 53 | / | 3686/12 IOB |
| 54 | 0 | 3686/12 IOB |
| 55 | 1 | 19536/12 |
| 56 | 1 | 19536/12 |
| 57 | 1 | 19536/12 |
| 58 | 1 | 19536/12 II IOB |
| 59 | 1 | 19536/12 II IOB |
| 60 | 1 | 19536/12 II IOB |

Statistička obrada za IDH1 pokazuje da standardna devijacija za nesmrznute uzorke iznosi 0,33 (Std.), a za prethodno smrznute uzorke iznosi 0,24 (Std.) što znači da je raspršenje uzorka u odnosu na aritmetičku sredinu za nesmrznute uzorke veće nego kod prethodno smrznutih uzoraka. Broj pacijenata koji je uključen u statističku obradu je 32. Također, podaci iz obje vrste uzoraka značajno visoko koreliraju što odgovara korelacijskom koeficijentu od 0,968. Prema tome, p ˃ 0,05 dokazuje da ne postoji statistički značajna razlika za IDH1 u intezitetu imunohistokemijskih reakcija za obje vrste uzoraka.

*Tablica 15*. Odnos inteziteta obojanosti imunohistokemijskih reakcija za IDH1 između nesmrznutih uzoraka i prethodno smrznutih uzoraka izražen kroz srednje vrijednosti.

*Slika 11*. Nazočnost imunopozitivnosti IDH1 na TMA preparatu glioblastoma multiforme (1000X) vrijednosti inteziteta 2.

*Slika 12*. Negativna imunohistokemijska reakcija na IDH1 na TMA preparatu glioblastoma multiforme (200X).

## 4.4. Rezultati pojavnosti S100 u obje vrste uzoraka

Pojavnost S100 na sva tri TMA parafinska bloka sa pripadajućim vrijednostima inteziteta imunohistokemijske reakcije prikazana su u Tablicama 16., 17., i 18. U Tablici 16. pod rednim brojem 6.,13., 14., 15., 17., 21., 23., 24., 42. i 54. nalaze se nevažeći rezultati koji nisu pridodani statističkoj obradi zbog tehničke neispravnosti uzorka. U Tablici 17. nevažeći rezultati nalaze se pod rednim brojem 11., 12., 52., 53.,54. i 60. te nisu pridodani statističkoj obradi. Također, u Tablici 18. pod rednim brojem 13., 35., 53., 57. i 59. nalaze se nevažeći rezultati koji nisu uvršteni u statističku obradu podataka. Nevažeći rezultati nisu utjecali na konačnu statističku obradu upravo zbog korištenja većeg broja uzoraka prethodno smrznutog tkiva i nesmrznutog tkiva glioblastoma po jednom pacijentu.

*Tablica 16*. Intenzitet imunohistokemijskog bojenja na S100 za svaki pojedinačni tkivni uzorak tumora na TMA preparatu GLIOBLASTOMI 1.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Pozicijsko mjesto | Intezitet imunohistokemijskog bojenja na S100 | GLIOBLASTOMI 1 |
| 1 | 2 | 6097/11 |
| 2 | 2 | 6097/11 |
| 3 | 2 | 6097/11 |
| 4 | 2 | 6097/11 IOB |
| 5 | 2 | 6097/11 IOB |
| 6 | / | 6097/11 IOB |
| 7 | 2 | 6934/11 |
| 8 | 2 | 6934/11 |
| 9 | 2 | 6934/11 |
| 10 | 2 | 6934/11 IOB |
| 11 | 2 | 6934/11 IOB |
| 12 | 2 | 6934/11 IOB |
| 13 | / | 10357/11 |
| 14 | / | 10357/11 |
| 15 | / | 10357/11 |
| 16 | 2 | 10357/11 IOB |
| 17 | / | 10357/11 IOB |
| 18 | 2 | 10357/11 IOB |
| 19 | 1 | 12229/11 |
| 20 | 1 | 12229/11 |
| 21 | / | 12229/11 |
| 22 | 1 | 12229/11 IOB |
| 23 | / | 12229/11 IOB |
| 24 | / | 12229/11 IOB |
| 25 | 2 | 15232/11 |
| 26 | 2 | 15232/11 |
| 27 | 2 | 15232/11 |
| 28 | 1 | 15232/11 IOB |
| 29 | 1 | 15232/11 IOB |
| 30 | 1 | 15232/11 IOB |
| 31 | 1 | 17248/11 |
| 32 | 1 | 17248/11 |
| 33 | 1 | 17248/11 |
| 34 | 1 | 17248/11 IOB |
| 35 | 1 | 17248/11 IOB |
| 36 | 1 | 17248/11 IOB |
| 37 | 1 | 18087/11 |
| 38 | 1 | 18087/11 |
| 39 | 1 | 18087/11 |
| 40 | 2 | 18087/11 IOB |
| 41 | 2 | 18087/11 IOB |
| 42 | / | 18087/11 IOB |
| 43 | 1 | 18090/11 |
| 44 | 1 | 18090/11 |
| 45 | 1 | 18090/11 |
| 46 | 1 | 18090/11 IOB |
| 47 | 1 | 18090/11 IOB |
| 48 | 1 | 18090/11 IOB |
| 49 | 1 | 18177/11 |
| 50 | 1 | 18177/11 |
| 51 | 1 | 18177/11 |
| 52 | 3 | 18177/11 IOB |
| 53 | 3 | 18177/11 IOB |
| 54 | / | 18177/11 IOB |
| 55 | 1 | 18967/11 |
| 56 | 1 | 18967/11 |
| 57 | 1 | 18967/11 |
| 58 | 2 | 18967/11 IOB |
| 59 | 2 | 18967/11 IOB |
| 60 | 2 | 18967/11 IOB |

*Tablica 17*. prikazuje rezultate pozitivnosti za S100 za svaki pojedinačni tkivni uzorak tumora na TMA preparatu GLIOBLASTOMI 2.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Pozicijsko mjesto | Intezitet imunohistokemijskog bojenja na S100 | GLIOBLASTOMI 2 |
| 1 | 3 | 10/13. |
| 2 | 3 | 10/13. |
| 3 | 3 | 10/13. |
| 4 | 3 | 10/13 IOB |
| 5 | 3 | 10/13 IOB |
| 6 | 3 | 10/13 IOB |
| 7 | 3 | 1731/13 |
| 8 | 3 | 1731/13 |
| 9 | 3 | 1731/13 |
| 10 | 3 | 1731/13 IOB |
| 11 | / | 1731/13 IOB |
| 12 | / | 1731/13 IOB |
| 13 | 3 | 2686/13 |
| 14 | 3 | 2686/13 |
| 15 | 3 | 2686/13 |
| 16 | 3 | 2686/13 IOB |
| 17 | 3 | 2686/13 IOB |
| 18 | 3 | 2686/13 IOB |
| 19 | 3 | 4829/13 |
| 20 | 3 | 4829/13 |
| 21 | 3 | 4829/13 |
| 22 | 3 | 4829/13 IOB |
| 23 | 3 | 4829/13 IOB |
| 24 | 3 | 4829/13 IOB |
| 25 | 3 | 5675/13 |
| 26 | 3 | 5675/13 |
| 27 | 3 | 5675/13 |
| 28 | 3 | 5675/13 IOB |
| 29 | 3 | 5675/13 IOB |
| 30 | 3 | 5675/13 IOB |
| 31 | 3 | 10969/13 |
| 32 | 3 | 10969/13 |
| 33 | 3 | 10969/13 |
| 34 | 3 | 10969/13 IOB |
| 35 | 3 | 10969/13 IOB |
| 36 | 3 | 10969/13 IOB |
| 37 | 3 | 12312/13 |
| 38 | 3 | 12312/13 |
| 39 | 3 | 12312/13 |
| 40 | 3 | 12312/13 IOB |
| 41 | 3 | 12312/13 IOB |
| 42 | 3 | 12312/13 IOB |
| 43 | 3 | 13285/13 |
| 44 | 3 | 13285/13 |
| 45 | 3 | 13285/13 |
| 46 | 3 | 13285/13 IOB |
| 47 | 3 | 13285/13 IOB |
| 48 | 3 | 13285/13 IOB |
| 49 | 3 | 14496/13 |
| 50 | 3 | 14496/13 |
| 51 | 3 | 14496/13 |
| 52 | / | 14496/13 IOB |
| 53 | / | 14496/13 IOB |
| 54 | / | 14496/13 IOB |
| 55 | 3 | 14679/13 |
| 56 | 3 | 14679/13 |
| 57 | 3 | 14679/13 |
| 58 | 2 | 14679/13 IOB |
| 59 | 2 | 14679/13 IOB |
| 60 | / | 14679/13 IOB |
| 61 | 3 | 16083/13 |
| 62 | 3 | 16083/13 |
| 63 | 3 | 16083/13 |
| 64 | 3 | 16083/13 IOB |
| 65 | 3 | 16083/13 IOB |
| 66 | 3 | 16083/13 IOB |
| 67 | 2 | 17059/13 |
| 68 | 2 | 17059/13 |
| 69 | 2 | 17059/13 |
| 70 | 3 | 17059/13 IOB |
| 71 | 3 | 17059/13 IOB |
| 72 | 3 | 17059/13 IOB |

*Tablica 18*. Intezitet imunohistokemijskog bojenja na S100 za svaki uzorak tkiva tumora na TMA parafinskom bloku GLIOBLASTOMI 3.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Pozicijsko mjesto | Intezitet imunohistokemijskog bojenja na S100 | GLIOBLASTOMI 3 |
| 1 | 3 | 20824/13 |
| 2 | 3 | 20824/13 |
| 3 | 3 | 20824/13 |
| 4 | 3 | 20824/13 IOB |
| 5 | 3 | 20824/13 IOB |
| 6 | 3 | 20824/13 IOB |
| 7 | 3 | 24420/12 |
| 8 | 3 | 24420/12 |
| 9 | 3 | 24420/12 |
| 10 | 3 | 24420/12 IOB |
| 11 | 3 | 24420/12 IOB |
| 12 | 3 | 24420/12 IOB |
| 13 | / | 19722/12 |
| 14 | 3 | 19722/12 |
| 15 | 3 | 19722/12 |
| 16 | 3 | 19722/12 IOB |
| 17 | 3 | 19722/12 IOB |
| 18 | 3 | 19722/12 IOB |
| 19 | 3 | 16882/12 |
| 20 | 3 | 16882/12 |
| 21 | 2 | 16882/12 |
| 22 | 3 | 16882/12 IOB |
| 23 | 2 | 16882/12 IOB |
| 24 | 3 | 16882/12 IOB |
| 25 | 2 | 14470/12 |
| 26 | 2 | 14470/12 |
| 27 | 2 | 14470/12 |
| 28 | 2 | 14470/12 IOB |
| 29 | 3 | 14470/12 IOB |
| 30 | 3 | 14470/12 IOB |
| 31 | 3 | 13050/12 |
| 32 | 3 | 13050/12 |
| 33 | 3 | 13050/12 |
| 34 | 3 | 13050/12 IOB |
| 35 | / | 13050/12 IOB |
| 36 | 3 | 13050/12 IOB |
| 37 | 3 | 12914/12 |
| 38 | 3 | 12914/12 |
| 39 | 2 | 12914/12 |
| 40 | 3 | 12914/12 IOB |
| 41 | 2 | 12914/12 IOB |
| 42 | 2 | 12914/12 IOB |
| 43 | 3 | 12845/12 |
| 44 | 3 | 12845/12 |
| 45 | 3 | 12845/12 |
| 46 | 3 | 12845/12 IOB |
| 47 | 3 | 12845/12 IOB |
| 48 | 3 | 12845/12 IOB |
| 49 | 2 | 3686/12 |
| 50 | 2 | 3686/12 |
| 51 | 2 | 3686/12 |
| 52 | 2 | 3686/12 IOB |
| 53 | / | 3686/12 IOB |
| 54 | 2 | 3686/12 IOB |
| 55 | 1 | 19536/12 |
| 56 | 1 | 19536/12 |
| 57 | / | 19536/12 |
| 58 | 1 | 19536/12 II IOB |
| 59 | / | 19536/12 II IOB |
| 60 | 1 | 19536/12 II IOB |

Statistička obrada za S100 pokazuje da standardna devijacija za nesmrznute uzorke iznosi 0,82 (Std.), a za prethodno smrznute uzorke iznosi 0,75 (Std.) što znači da je raspršenje uzorka u odnosu na aritmetičku sredinu za nesmrznute uzorke veće nego kod prethodno smrznutih uzoraka. Broj pacijenata koji je uključen u statističku obradu je 31. Također, podaci iz obje vrste uzoraka značajno visoko koreliraju što odgovara korelacijskom koeficijentu od 0,757. Prema tome, p ˃ 0,05 dokazuje ne postoji statistički značajna razlika za S100 u intezitetu imunohistokemijskih reakcija za obje vrste uzoraka.

*Tablica 19*. Odnos inteziteta obojenosti imunohistokemijskih reakcija za S100 između nesmrznutih uzoraka i prethodno smrznutih uzoraka izražen kroz srednje vrijednosti.



*Slika 13*. Nazočnost imunopozitivnosti S100 na TMA preparatu glioblastoma multiforme (200X) vrijednosti inteziteta 3.

*Slika 14*. Nazočnost imunopozitivnosti S100 na TMA preparatu glioblastoma multiforme (200X) vrijednosti inteziteta 2.

## 4.5. Sumarna statistička obrada inteziteta IHC reakcije za GFAP, S100 i IDH1

*Tablica 20*. Usporedba sumarnih mjerenja inteziteta IHC reakcija za GFAP, IDH1 i S100 na nesmrznutim i prethodno smrznutim uzorcima.

Uspoređivanjem sumarnih mjerenja inteziteta IHC reakcija za GFAP, IDH-1 i S100 dobiveni su rezultati:

1. Standardna devijacija sumarnog inteziteta IHC reakcija za GFAP, IDH1 i S100 u nesmrznutim uzorcima iznosi 1,24.
2. Standardna devijacija sumarnog inteziteta IHC reakcija za GFAP, IDH1 i S100 u prethodno smrznutim uzorcima iznosi 1,22.
3. Dokaz sukladnog koreliranja obje vrste uzoraka za GFAP, IDH1 i S100 pokazuje koeficijent korelacije 0,941.
4. p ˃ 0,05 (0,686) dokazuje da ne postoji statistički značajna razlika u sumarnom mjerenju inteziteta imunohistokemijskih reakcija za GFAP, IDH1 i S100 u obje vrste uzoraka.

# 5. Rasprava

U svim nesmrznutim uzorcima tumorskog tkiva glioblastoma kao i u svim uzorcima prethodno smrznutog tkiva uklopljenog u parafin zamijećen je imunohistokemijski pozitivitet na Ki-67. S obzirom da Ki-67 pokazuje nuklearnu pozitivnost, uz pomoć automatiziranog sustava procjene imunopozitivnosti pokazalo se da nema značajne razlike u vrijednostima obojenih preparata tkiva glioblastoma na uzorcima koji su prethodno smrznuti i uklopljeni u parafin naspram uzoraka koji nisu prethodno smrznuti. Automatizirani sustav je prepoznao nuklearnu distribuciju Ki-67 kroz izbrojen broj pozitivnih jezgara i jezgara koje su se pokazale negativnima brojeći ih na 1000 stanica. Određivanje proliferacijskog indeksa Ki-67 kod nesmrznutog tkiva glioblatoma tehnikom TMA naspram cijelih isječaka tkiva (60) u dosadašnjem istraživanju pokazalo je neznačajnu statističku razliku. Nadalje, u istraživanju primjenom monoklonalnog Ki-67 protutijela na cijelim isječcima smrznutog tkiva glioblastoma uz predtretman HIER i nesmrznutog tkiva opisalo je neznačajnu imunopozitivnu različitost u obojenosti IHC reakcije na obje vrste uzoraka (61). U ovom radu primjenom TMA tehnike, ostvaren je istovjetan intezitet IHC reakcija na prethodno smrznutom tkivu i nesmrznutom tkivu glioblastoma uklopljeno u parafin. Nadalje, u određivanju inteziteta imunohistokemijskih reakcija sa GFAP i S100 pokazalo se da nema značajne razlike u intezitetu obojenja reakcije između uzoraka prethodno smrznutih i nesmrznutih uzoraka uklopljenih u parafin, što se postiglo semikvantitativnim određivanjem intetziteta imunoreakcije na više od 75 % pozitivnih stanica. Budući da su GFAP i S100 gotovo uvijek imunopozitivni kod glioblastoma, u ovom istraživanju se to potvrdilo na obje vrste uzoraka. Intezitet IHC reakcije nije značajno smanjen na prethodno smrznutom tkivu u odnosu na nesmrznuto tkivo glioblastoma uklopljeno u parafin. Također, nije zabilježena značajna razlika u intezitetu obojenosti imunohistokemijske reakcije na IDH1 između obje vrste uzoraka, što se dokazalo semikvantitativnim određivanjem inteziteta imunohistokemijske reakcije na manje od 25 % pozitivnih stanica u uzorku. Iako se IDH1 imunopozitivnost pokazala u samo dva pacijenta, po pojavnosti u populaciji IDH divlji tip je učestaliji nego IDH1 mutacija (62). Uvidom u godine rođenja oba pacijenta s IDH1 mutacijom potvrđena je njihova mlađa dob, što bi odgovaralo obilježju sekunadarnih glioblastoma. Intezitet IHC reakcije na IDH1 je gotovo istovjetan na prethodno smrznutom tkivu u odnosu na nesmrznuto tkivo uklopljeno u parafin. Ovim istraživanjem dokazalo se uspješno izvođenje imunohistokemijskog bojenja na prethodno smrznutom tkivu uklopljeno u parafin koje će prezentirati istovjetne imunoreakcije kao i na tkivu koje nije prethodno smrzavano. Intraoperativni uzorci koji su podvrgnuti smrzavanju i uklapanju u parafin nisu dio uobičajene imunohistokemijske obrade u patohistološkim laboratorijima iz razloga što je poznato da se imunohistokemijskom bojenju tkiva podvrgavaju uzorci koji nisu prethodno smrzavani zbog nepovoljnog utjecaja smrzavanja tkiva na morfologiju tkiva. Ovim istraživanjem poduprijeta je primjena imunohistokemijskog bojenja tkiva na prethodno smrznutim uzorcima uklopljenima u parafin. Naime, korištena su komercijalno dostupna protutijela koja su validirana za humanu imunohistokemijsku dijagnostiku na prethodno smrznutom tkivu i nesmrznutom tkivu uklopljeno u parafin. Metoda imunohistokemijskog bojenja tkiva kao i odabrani predtretmani tkiva su validirani i standardizirani postupci koji određeni smjernicama vanjske kontole kvalitete, te iz tog razloga nema prepreke da se prethodno smrznuta tkiva uklopljena u parafin koriste u imunohistokemijskim metodama bojenja tkiva. Korištena odabrana metoda imunohistokemijskog bojenja tkiva je polimer bazirajuća metoda u dva koraka koja se pokazala pouzdanim odabirom i kod koje postoji mogućnost dodatne amplifikacije signala putem EnVision FLEX+ sustava, ali u ovom istraživanju nije bilo potrebno koristiti dodatni sustav amplificiranja što znači da je detektirani signal imunoreakcije na prethodno smrznutom tkivu uklopljeno u parafin dostatan da osigura dovoljno jak intezitet imunohistokemijske reakcije. Nadalje, razvidno je da smrzavanje tkiva ne uništava epitope antigena. Pokazatelji toga su rezultati ovog istraživanja koji idu u prilog tome da nema značajne razlike u imunohistokemijskom bojenju tkiva prethodno smrznutog tkiva i nesmrznutog tkiva koje je uklopljeno u parafin. Iz toga proizlazi da uzorci pristigli naknadno intraoperativnim uzorcima budu oskudni ili nekrotični, moguće je primijeniti imunohistokemiju na intraoperativnim uzorcima, što je ovim istraživanjem i uspješno dokazano. Korištenjem jednakog odabira predtretmana tkiva za obje vrste uzoraka dokazuje da se demaskiranje antigena provodi na jednak način kod obje vrste uzoraka. Iz toga proizlazi da su korišteni HIER predtretmani valjani u primjeni na prethodno smrznutom tkivu i nesmrznutom tkivu uklopljenom u parafin. Budući da je kod semikvantitativnog određivanja inteziteta imunohistokemijskih reakcija nužno osigurati umanjenje subjetivne greške, TMA metoda je to omogućila smanjivši tehničku varijabilnost napose jer je veći broj uzoraka prezentiran na jednom mikroskopskom staklu kroz iste uvjete izrade (debljina reza, uvjeti predtretmana) preparata. Korištenjem triju reprezentativnih mjesta prethodno smrznutog uzorka i nesmrznutog uzorka uklopljeno u parafin, dodatno se povećala vrijednost rezultata ovog istraživanja jer su mjereni inteziteti imunohistokemijskih reakcija pokazali visoku međusobnu korelaciju s obzirom da je tkivo glioblastoma vrlo heterogeno. Stoga, time je dokazano da je TMA tehnika opravdana za korištenje ovakve vrste istraživanja jer se pažljivim odabirom interesnih područja na preparatima cijelih isječaka tkiva osigurava jednako valjana imunohistokemijska reakcija na TMA preparatu. Ograničenja koja su prikazana u vidu nevažećih rezulata tehničkog su karaktera te ovisna o preciznosti korištenja automatiziranog instrumenta za izradu TMA parafinskih blokova. S obzirom da je u ovom istraživanju korišten veći broj reprezentativnih uzoraka na TMA parafinskom bloku, nevažeći rezultati nisu imali utjecaj na tijek statističke obrade. Također, prednost ove tehnike je predočena kroz smanjen utrošak protutijela i pripadajućih reagenasa čineći ovu metodu ekonomičnom.

Budući da ovo istraživanje omogućuje primjenu protutijela monoklonalnog i poliklonalnog podrijetla na prethodno smrznutim uzorcima i nesmrznutim tkivima glioblastoma sa prisutnim intezitetom koji je gotovo istovjetan na obje vrste uzoraka, može se ustvrditi da je ostvaren cilj istraživanja jer su se imunohistokemijske reakcije pokazale uspješnima na obje vrste uzoraka. Ovo istaživanje se razlikuje od dosadašnjih publikacija o komparaciji uspješnosti IHC reakcije na smrznutom i nesmrznutom tkivu iz razloga što se u dostupnim publikacijama koristi smrznuto tkivo koje se kao takvo imunohistokemijski analizira i potom se ne uklapa u parafin, nego prezervira na -80 °C u zamrzivaču. Stoga, nije postojala mogućnost usporedbe ovog istraživanja sa dostupnim istraživanjima.

# 6. Zaključci

1. Nema statistički značajne razlike u intezitetu imunohistokemijskih reakcija između prethodno smrznutih uzoraka tkiva i nesmrznutih uzoraka tkiva tumora glioblastoma uklopljenih u parafin za sva ispitivana protutijela (Ki-67,GFAP, IDH1 i S100).
2. Imunohistokemijska bojenja na Ki-67,GFAP, IDH1 i S100 mogu se nesmetano koristiti na smrzavanim uzorcima tkiva glioblastoma, ukoliko je naknadno dobiveno tkivo istog tumora oskudno ili nekrotično, s obzirom da su korištena protutijela validirana za humanu dijagnostiku polučila iste rezultate bojenja kao i parafinski uzorci koji nisu prije smrzavani.
3. Vjerodostojnosti rezultata u ovom radu doprinose: primjena TMA metode, korištenje validirane metode imunohistokemijskog bojenja tkiva i validiranih protutijela, kojima je tehnička varijabilnost svedena na minimum.

# 7. Sažetak

Glioblastomi su prema SZO maligni astroglijalni tumori gradusa IV. Odlikuju se rapidnim rastom, staničnim polimofizmom, stvaranjem nekroza i neovaskularizacijom te infiltracijom susjednih moždanih struktura. Prema genetičkim alteracijama dijele se na primarne (IDH divlji tip) i sekundarne (s IDH mutacijom) glioblastome koji se histološki ne razlikuju, osim imunohistokemijskom ekspresijom kao i molekularnom dijagnostikom. S obzirom na difuzni infiltrativni rast u moždanim strukurama, potpuna resekcija zahvaćenog dijela mozga nije moguća što predstavlja problem i kod bioptičkog uzorkovanja. Patohistološka dijagnoza često je uvjetovana uzorkom glioblastoma koji je oskudan i/ili nekrotičan te stvara problem u postavljanju dijagnoze. U ovom istraživanju koristili su se tkivni uzorci 32 bolesnika operirana poradi glioblastoma. Imunohistokemijska analiza na tkivima glioblastoma vršena je na 32 prethodno smrznuta uzorka i 32 nesmrznuta uzorka uklopljena u parafin te izrađena tehnikom TMA. Korištena su protutijela na GFAP, S100, IDH1 i Ki-67. Cilj istraživanja je bio usmjeren na usporedbu valjanosti imunohistokemijske reakcije na prethodno smrznutom tkivu glioblastoma u odnosu na nesmrznuto tkivo uklopljeno u parafin, kako bi se smrznuto tkivo uklopljeno u parafin moglo koristiti za imunohistokemijske metode bojenja ukoliko je količina naknadno dobivenog tkiva glioblastoma nedostatna ili je naknadno pristiglo tkivo nekrotično. Rezultati imunohistokemijske analize pokazuju da ne postoji značajna razlika u kvaliteti imunohistokemijskih reakcija između obje vrste uzorka komparirajući svako protutijelo zasebno kao i kompariranjem zbirno svih protutijela. Vjerodostojnosti rezultata u ovom radu doprinose: primjena TMA metode, korištenje validirane metode imunohistokemijskog bojenja tkiva i validiranih protutijela, kojima je tehnička varijabilnost svedena na minimum.

# 8. Summary

According to the WHO, glioblastoma are malignant astroglial tumors of grade IV. They are characterized by rapid growth, cellular polymorphism, creation of necrosis, neovascularization and the infiltration of neighbouring brain structures. By genetic alterations glioblastoma can be divided into primary (IDH wild type) and secondary (with IDH mutation) glioblastoma that are histologically indistinguishable, except by immunohistochemical expression and molecular diagnostics. Considering the diffuse infiltrative growth in brain structures, complete resection of the affected part of the brain is not possible which is a problem for bioptic sampling. Histopathological diagnosis is often conditioned by glioblastoma sample which is deficient and/or necrotic and that creates a problem in setting up diagnosis. In this research we have used tissue samples from 32 patients operated on because of glioblastoma. Immunohistochemical analysis of glioblastoma tissues was made on 32 previously frozen samples and 32 unfrozen samples embedded in paraffin and made by TMA method. Antibodies were used on GFAP, S100, IDH1 and Ki-67. The research compared the quality of immunohistochemical reactions on both types of samples. The aim of the research was focused on comparison of the validity of immunohistochemical reaction on previously frozen glioblastoma tissues in comparison to unfrozen tissue embedded in paraffin, so that frozen tissue embedded in paraffin could be used for immunohistochemical staining in case that amount of subsequently obtained glioblastoma tissues is insufficient or if the subsequently obtained tissue was necrotic. The results of immunohistochemical analysis show that there is no significant difference in the quality of immunohistochemical reactions between both types of sample by comparing each antibody individually as with collective comparison of all antibodies. The credibility of the results in this study is contributed to: application of TMA method , the use of validated method of immunohistochemical staining of tissue and validated antibodies, which reduces technical variability to minimum.

# 9. Literatura

(1) Olivier M, Hussain SP, Caron de Fromentel C, Hainaut P, Harris CC. TP53 mutation spectra and load: a tool for generating hypotheses on the etiology of cancer. IARC Sci Publ. 2004;157:247-70.

(2) Ostrom QT, Bauchet L, Davis Fg, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, et al. The epidemiology of glioma in adults: a „state of the science“ review. Neuro Oncol. 2014;16(7):896-913.

(3) Ohgaki H, Kleihues P. Population based studies on incidence, survival rates, and genetic alternations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. J Neuropathol Exp Neurol. 2005;64(6):479-89.

(4) Gheyi V, Hui Fk, Doppenberg EM, Todd W, Broaddus WC. Glioblastoma multiforme causing calvarial destruction: an unusual manifestation revisited. AJNR Am J Neuroradiol. 2004;25(9):1533-7.

(5) Pompili A, Calvosa F, Caroli F, Mastrostefano R, Occhipinti E, Raus L, et al. The transdural extension of gliomas. J Neurooncol. 1993;15(1):67-74.

(6) Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adult. N Engl J Med. 2008;359(5):492-507.

(7) DeAngelis LM. Brain Tumors. N Engl J Med.. 2001;344(2):114-23.

(8) Lai A, Kharbanda S, Pope WB, Tran A, Solis Oe, Peale F, et al. Evidence for sequenced molecular evolution of IDH mutant glioblastoma from a distinct cell of origin. J Clin Oncol. 2011;29(34):4482-90.

(9) Dohmann GJ, Farwell JR, Flannery JT. Glioblastoma multiforme in children. J Neurosurg. 1986;44(4):442-8.

(10) Lai A, Kharbanda S, Pope WB, Tran A, Solis OE, Peale F, et al. Evidence for sequenced molecular evolution of IDH1 mutant glioblastoma from a distinct cell of origin. J Clin Oncol. 2011;29(34):4482-90.

(11) Burger PC, Kleihues P. Cytologic composition of the untreated glioblastoma with implication for evaluation of needle biopsies. Cancer. 1989;63(10):2014-23.

(12) Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. Cancer Genome Atlas Research Network. Cancer Cell. 2011;17(1):98-110.

(13) Von Deimling A, Korshunov A, Hartmann C. The next generation of glioma biomarkers: MGMT methylation, BRAF fusion and IDH1 mutations. Brain Pathol. 2011;21:74-87.

(14) Benjamin R, Capparella J, Brown A. Classification of glioblastoma multiforme in adults by molecular genetics. Cancer J. 2003;9:82-90.

(15) Ohgaki H, Kleihues P (2007). Genetic pathways to primary and cesondary glioblastoma multiforme. Am J Pathol. 2007;170:1445-1453.

(16) Smith JS, Tachibana I, Passe SM, Huntley BK, Borell TJ, Iturria N, Schaefer PL, Scheitgauer BW, James CD, Buckner JC, Jenkins RB. PTEN Mutation, EGFR Amplification And Outcoming Patients With Anaplastic Astrocytoma and Glioblastoma Multiforme. Journal of the National cancer Institute 2001;93:1246-1256.

(17) Soussi T. The p53 Tumor Supresor Gene: From Molecular Biology to Clinical Investigation. Annals of The New York Academy of Science 2006;910:121-139.

(18) Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. Brain Pathol. 1996;6(3):217-23.

(19) Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA- Rapair Gene MGMT and the Clinical Responce of Gliomas to Alkylating Agents. The New England Journal of Medicine 2000;344:686-693.

(20) Liu XY, Gerges N, Korshunov A, Sabha N, Khuong-Quang DA, Fontebasso AM, Fleming A, Hadjadj D, Schwartzentruber J, Majewski J, et al. Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations. Acta Neuropathol. 2012;124:615–625.

(21) Jiao Y, Killela PJ, Reitman ZJ, Rasheed AB, Heaphy CM, de Wilde RF, Rodriguez FJ, Rosemberg S, Oba-Shinjo SM, Nagahashi Marie SK, et al. Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. Oncotarget. 2012;3:709–722.

(22) Schittenhelm J, Mittelbronn M, Meyermann R, et al. Confirmation of R132H mutation of isocitrate dehydrogenase 1 as an independent prognostic factor in anaplastic astrocytoma. Acta Neuropathol.2011;122:651–2.

(23) Sternberger La, Hardy PH Jr., Cuculis JJ, Meyer Hg. the unlabeled antibody-enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorse-radish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. J Histochem Cytochem 1970;18:315.

(24) Montero C. The antigen-antibody reaction i immunohistochemistry. J Histochem Cytochem 2003;51(1):1-4.

(25) Montero C. The antigen-antibody reaction i immunohistochemistry. J Histochem Cytochem 2003;51(1):1-4.

(26) Heras A, Roach CM, Key ME. Enhanced polymer detection system for immunohistochemistry. Lab Invest 1995;72:165.

(27) Hsu SM, Raine L, and Fanger H. Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J Histochem Cytochem 1981;29:577-80.

(28) Hatanaka, Yutaka PhD; Imaoka, Yuki BS; Torisu, Kae BS; Kamihara, Yuki BS; Hashizume, Kaoru BS; Ichimura, Koichi MD, PhD; Yoshino, Tadashi MD, PhD; Tani, Yoichi BS, A Simplified, Sensitive Immunohistochemical Detection System Employing Signal Amplification Based on Fluorescyl-Tyramide/Antifluorescein Antibody Reaction: Its Application to Pathologic Testing and Research. Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology: January 2008;16(1):87-93.

(29) Kammere, U., Kapp, M., Gassel, A. M., Richter, T., Tank, C., Dietl, J., & Ruck, P. A New Rapid Immunohistochemical Staining Technique Using the EnVision Antibody Complex. Journal of Histochemistry and Cytochemistry.2001;49:623-630.

(30) Kammere, U., Kapp, M., Gassel, A. M., Richter, T., Tank, C., Dietl, J., & Ruck, P. A New Rapid Immunohistochemical Staining Technique Using the EnVision Antibody Complex. Journal of Histochemistry and Cytochemistry.2001;49:623-630.

(31) Sabattini, E., Bisgaard, K., Ascani, S., Poggi, S., Piccioli, M., Ceccarelli, C., Pieri, F., Fraternali-Orcioni, G., & Pileri, S. A. The EnVision++ system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMate, CSA, LABC, and SABC techniques. Jounral of clinc. Pathology, 1998;51(7):506-511.

(32) Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KA, Stein H, Mason DY. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). J Histochem Cytochem.1984;32(2):219–229.

(33) Hatanaka, Yutaka PhD; Imaoka, Yuki BS; Torisu, Kae BS; Kamihara, Yuki BS; Hashizume, Kaoru BS; Ichimura, Koichi MD, PhD; Yoshino, Tadashi MD, PhD; Tani, Yoichi BS, A Simplified, Sensitive Immunohistochemical Detection System Employing Signal Amplification Based on Fluorescyl-Tyramide/Antifluorescein Antibody Reaction: Its Application to Pathologic Testing and Research. Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology: January 2008;16(1):87-93.

(34) Stross WP, Jones M, Mason DY. Automation of APAAP immunocytochemical technique. J Clin Pathol. 1989;42(1):106–112.

(35) Jean-Marc Fritschy, "Is my antibody-staining specific? How to deal with pitfalls of immunohistochemistry", *The European Journal of Neuroscience*, Volume 28, Issue 12, pp.2365-2370., preuzeto 1.8.2016.god. sa <http://www3.interscience.wiley.com/journal/121557079/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0>

(36) Montero C. The antigen-antibody reaction i immunohistochemistry. J Histochem Cytochem 2003;51(1):1-4.

(37) Kammere, U., Kapp, M., Gassel, A. M., Richter, T., Tank, C., Dietl, J., & Ruck, P. A New Rapid Immunohistochemical Staining Technique Using the EnVision Antibody Complex. Journal of Histochemistry and Cytochemistry.2001;49:623-630.

(38) Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KA, Stein H, Mason DY. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). J Histochem Cytochem.1984;32(2):219–229.

(39) Montero C. The antigen-antibody reaction i immunohistochemistry. J Histochem Cytochem 2003;51(1):1-4.

(40) Tark E, Faltinat D, Von der Fecht R. An automated device for immunocytochemistry. J Immunol Methods. 1988; 24;107(1):89–92.

(41) Indl JM, Warnke RA. Advantages of detecting monoclonal antibody binding to tissue sections with biotin and avidin reagents in Coplin jars. Am J Clin Pathol. 1986;85(4):490–493.

(42) Karsay M, Neil JA, Guan J, Mark MA, Colman H, Jensen RL. A practical review of prognostic correlations of molecular biomarkers in glioblastoma. Neurosurgical Focus. 2015;38:1-8.

(43) Shibahara I, Sonoda Y, Kanamori M, Saito R. IDH1/2 gene status defines the prognosis and molecular profiles in patients with grade III gliomas. Internation Journal of Clinical Oncology. 2012;17:551-561.

(44) Jacque CM, Vinner C, Kujas M, Raoul M, Racadot J, Baumann NA. "Determination of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in human brain tumors". *Journal of the Neurological Sciences*. 1978;35(1):147–55.

(45) Donato R. "Intracellular and extracellular roles of S100 proteins". *Microscopy Research and Technique*. 2003;60(6):540–51.

(46) Scholzen T, Gerdes J . "The Ki-67 protein: from the known and the unknown". *J. Cell. Physiol*. 2000;182(3):311–22.

(47) Burry RW. 2010. Immunocytochemistry: a practical guide for biomedical research. New York: Springer

(48) Richani K, Romero R, Kim YM, Cushenberry E, Soto E, Han YM, Espinoza J, Kim CJ. Tissue microarray: an effective high-throughput method to study the placenta for clinical and research purposes. J Matern Fetal Neonatal Med. 2006;19(8):509–15.

(49) Wan WH, Fortuna MB, Furmanski P. A rapid and efficient method for testing immunohistochemical reactivity of monoclonal antibodies against multiple tissue samples simultaneously. J Immunol Methods.1987;103:121–129.

(50) Bentzen SM, et al. Multiple biomarker tissue microarrays: bioinformatics and practical approaches. Cancer Metastasis Rev 2008;27:481-94.

(51) Shergill IS, Shergill NK, Arya M, Patel HR. Tissue microarrays: a current medical research tool. Curr Med Res Opin. 2004;20(5):707–12.

(52) Robin L. Parker MD, David G. Huntsman MD, David W. Lesack MD, James B. Cupples MD, Dennis R. Grant MD, Majid Akbari MD, C. Blake Gilks MD Assessment of Interlaboratory Variation in the Immunohistochemical Determination of Estrogen Receptor Status Using a Breast Cancer Tissue Microarray. Am J Clin Pathol. 2002;117(5):723–728.

(53) Bady P, Sciuscio D, Diserens AC, Bloch J, van der Bent Mj, Marosi C, et al. MGMT methylation analysis of glioblastoma on the Infinium methylation BeadChip identifies two distinct CpG regions associated with gene silencig and outcome, yielding a prediction model for comparisons across datasets, tumor grades and CIMP status. Acta Neuropathol. 2012; 124(4):457-460

(54) <http://genom.mefst.hr/postdipl_BN/predmeti/ImunoHistokemija/Uvod_u_h-kemiju.pdf>, preuzeto 1.8.2016.god.

(55) <http://genom.mefst.hr/postdipl_BN/predmeti/ImunoHistokemija/Uvod_u_h-kemiju.pdf>, preuzeto 1.8.2016.god.

(56) Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. ["Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation"](http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/abstract/112713361/). *Int. J. Cancer*. 1983;31(1):13–20.

(57) Montero C. The antigen-antibody reaction i immunohistochemistry. J Histochem Cytochem 2003;51(1):1-4.

(58) Yamashita S. Heat-induced antigen retrieval: mechanisms and application to histochemistry.Prog Histochem Cytochem. 2007;41:141-200.

(59) Ostertag CB, Volk B, Shibata T, Burger P, Kleihues P. The monoclonal antibody Ki-67 as a marker for proliferative cells in stereotactic biopsies of brain tumors. Acta Neurochir. 1987;89:117–121.

(60) <http://www.3dhistech.com/sites/default/files/pictures/brochures/digital_tma.pdf>, preuzeto 1.8.2016.god.

(61) <http://www.3dhistech.com/sites/default/files/pictures/brochures/digital_tma.pdf>, preuzeto 1.8.2016.god.

(62) Comparison of Proliferation Indices in Glioblastoma Multiforme by Whole Tissue Section vs Tissue Microarray Andres G. Chiesa-Vottero, MD,1 Lisa A. Rybicki, MS,2 and Richard A. Prayson, MD1 Am J Clin Pathol 2003;120:902-908.

(63) Torp SH, Johannensen E, Lindboe CF. Comparation of different Ki67 antibodies in human gliomas. J Clin Pathol: Mol Pathol. 1995;48:M191-M193.

(64) Ohgaki H, Kleihues P. Population based studies on incidence, survival rates, and genetic alternations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. J Neuropathol Exp Neurol. 2005;64(6)479-89.

# 10. Prilozi

**ODOBRENJE ETIČKOG POVJERENSTVA KBC ZAGREB ZA KORIŠTENJE ARHIVSKIH PARAFINSKIH BLOKOVA**

# 11. Životopis

Rođena sam 5.1.1982. god. u Zagrebu, gdje sam pohađala osnovnu školu i opću (12.) gimnaziju. Zdravstveno veleučilište u Zagrebu upisala sam 2000. god., smjer medicinsko-laboratorijska dijagnostika te završetkom istog 2004. god. stekla naziv prvostupnika medicinsko laboratorijske dijagnostike. Jednogodišnji pripravnički staž obavila sam na Kliničkom bolničkom centru Zagreb tijekom 2007. god., gdje sam nakon njega ostala u radnom odnosu do danas. Dvije godine provela sam u Kliničkom zavodu za tipizaciju tkiva pri Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a gdje sam bila involvirana u rad Zaklade Ana Rukavina vršeći serološku dijagnostiku HLA sustava primatelja i davatelja koštane srži. Također, radila sam molekularne tehnike pri određivanju HLA statusa (izolacija DNA, PCR tehnika, elekroforeza, izrada nalaza). Od 2009. god. djelatnica sam Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju na Odjelu za kožnu patologiju i patologiju mekih tkiva te hematološku patologiju.

2014. god. upisujem diplomski sveučilišni studij medicinsko-laboratorijske dijagnostike na Fakultetu zdravstvenih studija u Rijeci, koji uspješno privodim završetku ovim diplomskim radom.

# 12. Biography

I was born 05.01.1982. in Zagreb, where I attended primary school and XII Zagreb gymnasium. In 2000. I enrolled at the University of Applied Health Sciences in Zagreb, Study of Medical Laboratory Diagnostics, and with its completion I became the bachelor of laboratory medical diagnostics in 2004. I finished my one-year internship at the Clinical Hospital Centre Zagreb during 2007. where I have been employed until now. I spent two years at the Tissue Typing Department in Department of Laboratory Diagnostics of CHC where I was involved in work of the Ana Rukavina Foundation through serological diagnosis of HLA system of bone marrow transplant recipients and donors. Also, I worked in DNA HLA Laboratory where I did izolation of DNA, PCR method, electrophoresis and test results. Since 2009. I have been working at Department of Pathology and Citology on Department of Hematological Pathology, Skin Pathology and Soft Tissue Pathology.

In 2014. I enrolled at the Graduate University Study of Medical Laboratory Diagnostics at the Faculty of Health Studies in Rijeka, that I am succesfully bringing to completion with this thesis.