

Razlike u procjeni diobe stanica raka dojke imunohistokemijskim bojenjem jezgrina Ki67 antigena.

Breški, Anita

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:117119>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-16**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske
dijagnostike**

Anita Breški

**RAZLIKE U PROCJENI DIOBE
STANICA RAKA DOJKE
IMUNOHISTOKEMIJSKIM BOJENJEM
JEZGRINA KI67 ANTIGENA**

Diplomski rad

Osijek, 2019. godine

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske
dijagnostike**

Anita Breški

**RAZLIKE U PROCJENI DIOBE
STANICA RAKA DOJKE
IMUNOHISTOKEMIJSKIM BOJENJEM
JEZGRINA KI67 ANTIGENA**

Diplomski rad

Osijek, 2019. godine

Rad je ostvaren u Kliničkom zavodu za patologiju i sudsku medicinu Kliničkog bolničkog centra u Osijeku.

Mentor rada: prof. dr. sc. Branko Dmitrović, dr. med.

Rad ima 25 listova, 5 tablica i 1 sliku.

ZAHVALA

Zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Branku Dmitroviću na iznimnoj pomoći, pristupačnosti i uloženom trudu i vremenu oko izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Svenu Kurbelu koji mi je pomogao u statističkoj obradi podataka.

Velika hvala mojoj obitelji, prijateljima i svim kolegama koji su vjerovali u mene i pružali mi potporu tijekom studiranja i pisanja diplomskog rada.

Hvala suprugu Igoru, djeci Hani, Jakovu i Lani bez kojih bi ovaj rad bio napisan godinu dana ranije...

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Prognostički čimbenici rizika raka dojke	1
1.2. Ki67 proliferacijski indeks	1
1.3. Značenje Ki67 u karcinomu dojke	2
1.4. Klasifikacija po St. Gallenu 2013. godine.....	2
1.5. Određivanje kliničkog stadija raka.....	3
1.6. Načini određivanja Ki67	4
2. HIPOTEZA.....	5
3. CILJEVI.....	6
4. MATERIJAL I METODE	7
4.1. Ustroj studije	7
4.2. Materijal	7
4.3. Metode.....	7
4.3.1. Histološka analiza	7
4.3.2. Imunohistokemija	8
4.4. Statističke metode	9
5. REZULTATI	10
6. RASPRAVA	15
7. ZAKLJUČCI	18
8. SAŽETAK	19
9. SUMMARY.....	20
10. LITERATURA	21
11. ŽIVOTOPIS.....	24
12. PRILOZI	25

POPIS KRATICA

ER	estrogeni receptori
FDA	naziv ustanove; Američka Agencija za hranu i lijekove
HER2 - neu	eng. <i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
Ki67	nuklearni antigen, proliferacijski indeks
NordiQC	eng. <i>Nordic immunohistochemical Quality Control</i> - organizacija koja se bavi standardizacijom protokola
PR	progesteronski receptori
TNBC	eng. <i>triple negative breast carcinoma</i> - trostruko negativni karcinom dojke
TNM clasification	eng. <i>tumor, node, metastasis</i> – klasifikacija tumor, limfni čvor, metastaza

1. UVOD

Karcinom dojke najčešća je zloćudna bolest u žena. U oko 80 % novih slučajeva bolest se često otkrije u ranoj fazi, a u oko 20 % slučajeva, u trenutku postavljanja dijagnoze, bolest već bude u uznapredovaloj fazi. Prema podacima Registra za rak, Zavoda za javno zdravstvo Republike Hrvatske godišnje, od raka dojke oboli preko 2500 žena. Prema posljednjim dostupnim epidemiološkim podacima rak dojke je treći uzrok smrti u ženskoj populaciji u 2012. godini. Stopa smrtnosti od raka dojke u Hrvatskoj je među najvišima u Europi. Tijekom 2012. godine preko 1000 žena umrlo je od raka dojke (1).

1.1. Prognostički čimbenici rizika raka dojke

Najvažniji prognostički parametri uključuju veličinu tumora, histološki tip, histološki gradus, broj pozitivnih limfnih čvorova, status receptora estrogena (ER), progesterona (PR) i HER-2 neu (2). Mnoge studije istražuju posebnu korist Ki67 kao prognostički marker za karcinom dojke; korist adjuvantne terapije kod visokorizičnih pacijentica luminal B tipa i pacijentica s negativnim limfnim čvorovima (3, 4). Neka istraživanja pokazuju vaskularnu (5) i limfnu invaziju povezanu s višim vrijednostima Ki67 (6, 7).

1.2. Ki67 proliferacijski indeks

Ki67 je nehistonski nuklearni protein koji su ranih 80-ih otkrili Gerdes i suradnici, koristeći mišje monoklonalno antitijelo s nuklearnim antigenom iz stanične linije Hodgkinova limfoma. Nazvan je po sveučilištu Kiel i 67 kao broj klona antitijela kojim je otkriven (8).

Antitijelo Ki67 otkriva antigen jezgre koji je prisutan u G1, S, G2 i M fazi diobe stanice, a nema ga u G0 fazi odnosno fazi mirovanja stanice. Ekspresija Ki67 varira kroz stanični ciklus, niska je u G1 i S fazi, doseže pik tijekom mitoze (9). Tijekom interfaze, antigen se može otkriti isključivo unutar jezgre, dok se u mitozu većina proteina premješta na površinu kromosoma. Antigen se brzo razgrađuje kako stanica ulazi u neproliferativno stanje (10) i nema ekspresije Ki67 tijekom postupka popravka DNA.

1.3. Značenje Ki67 u karcinomu dojke

Kako je proliferacija znak malignih neoplazmi, mnogi su znanstvenici istražili kliničku primjenu Ki67 kao prognostički i/ili prediktivni biomarker u karcinomu dojke. Prognostička uloga Ki67 posebno je proučavana u ranim karcinomima dojke, a njegova je korist dokazana (11). Pacijentice čiji tumori imaju Ki67 u više od 50 % tumorskih stanica su u velikom riziku da razviju relaps bolesti (12, 13).

Ki67 se koristi i kao biomarker za razvrstavanje karcinoma dojke u određene podskupine. Konsenzus u St. Gallenu 2009. godine predložio je 3 kategorije karcinoma dojke: niski ($\leq 15\%$), srednji ($16 - 30\%$) i visoki gradus ($> 30\%$) (14). Znanstvenici su 2011. godine zagovarali dvije kategorije, graničnu vrijednost (*cutt off*) od 14 % temeljenu na studiji Cheanga i suradnika (15), za diferencijaciju luminal A od luminal B.

Promijenili su 2013. godine preporuku na vrijednost $\leq 20\%$ za visoki Ki67 status, drugi su bili zabrinuti zbog velike međulaboratorijske varijacije u mjerenjima Ki67 i preporučili da svaki laboratorij samostalno postavlja svoju graničnu vrijednost (16).

Hormon receptor pozitivni tumori s vrijednošću Ki67 manje ili jednako 20 % svrstavaju se u luminal A podskupinu koja se liječi samo endokrinom terapijom i ima najbolju prognozu. Ako je Ki67 veći od 20 %, karcinom se svrstava u podskupinu luminal B koja uz endokrinu mora primiti i citotoksičnu terapiju. Određivanje statusa Ki67 nije standardizirano pa je teško provoditi usporedne studije (4, 17 - 19).

Ipak, 2015. godine predložili su da se Ki67 treba računati na temelju lokalnih laboratorijskih vrijednosti (20).

1.4. Klasifikacija po St. Gallenu 2013. godine

Klasifikacija po St. Gallenu temelji se na molekularnoj dijagnostici. Kako je ta klasifikacija preskupa, koristi se modificirana klasifikacija molekularnih subtipova karcinoma dojke temeljena na imunohistokemijskom određivanju ER, PR, HER2 i Ki67 (Tablica 1).

Tablica 1. Surogatni molekularni tipovi karcinoma dojke (21, 22).

Molekularni podtip	Imunohistokemijske karakteristike		
	ER i/ili PR	HER2	Ki67 ekspresija
Luminal A	ER i PR pozitivni	negativan	$\leq 20 \%$
Luminal B HER2 negativni	ER pozitivan i najmanje jedno od : - PR negativan ili nizak ($< 20 \%$ + stanica) - Ki67 visok ($> 20 \%$)	negativan	
Luminal B HER2 pozitivni	ER pozitivan PR bilo koji	pozitivan	bilo kakva
HER2 pozitivni	ER negativan PR negativan	pozitivan	
Trostruko negativni	ER negativan PR negativan	-	

1.5. Određivanje kliničkog stadija raka

TNM klasifikacija je klasifikacija proširenosti raka dojke koja je prihvaćena za određivanje stadija bolesti. Koristi se nakon patohistološke analize, a prije terapijskog postupka. Interpretira tri kategorije: „T“ veličinu tumora, „N“ broj metastaza zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova i „M“ nepostojanju metastaza u drugim dijelovima organizma (23).

Bolju prognozu bolesti imaju pacijentice s tumorima manjim od 1 cm i negativnim regionalnim limfnim čvorovima.

1.6. Načini određivanja Ki67

Prema nekim preporukama, Ki67 određuje se u „vrućim točkama“ (engl. „hot spots“), odnosno u dijelovima tumora gdje je imunoreaktivnost na Ki67 najviša (17).

Prema drugima, Ki67 broji se i u „vrućim točkama“ i u drugim dijelovima tumora, ali bez posebnih preporuka iz kojih točno područja i na koji način se vrši probir tih područja (18).

Preporuka je, također, i da se Ki67 broji u rubnim dijelovima tumora gdje su tumorske stanice najvitalnije kao i u drugim dijelovima tumora (17, 18).

2. HIPOTEZA

Razlike u procjeni diobe stanica raka dojke imunohistokemijskim bojenjem jezgrina Ki67 antigena onemogućuju točno razvrstavanje karcinoma dojke u podskupine na kojima se temelji određivanje terapije bolesnika.

3. CILJEVI

Cilj rada je utvrditi utječe li varijabilnost u očitavanju Ki67 antigena raka dojke na točnost svrstavanja raka dojke u podskupine koje ovise o očitanoj Ki67.

Specifični ciljevi ovog istraživanja su:

- 1) utvrditi udio Ki67 pozitivnih stanica u uzorcima raka dojke u rubnom i središnjem dijelu tumora
- 2) utvrditi udio Ki67 pozitivnih stanica u uzorcima raka dojke u području „vrućih točaka“ i izvan njih
- 3) utvrditi udio Ki67 pozitivnih stanica u uzorcima raka dojke u tri slučajno odabrana dijela tumora
- 4) utvrditi razlike u dobivenim rezultatima s obzirom na primijenjene metode očitavanja (uzorkovanja).

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Ustroj studije

Studija je ustrojena kao presječna studija s povijesnim podacima.

4.2. Materijal

Materijal su parafinski blokovi 50 uzastopno dijagnosticiranih invazivnih karcinoma dojke bez posebnih osobitosti stadija T1 žena operiranih u Kliničkom bolničkom centru Osijek u 2017. godini.

Parafinski blokovi su izvađeni iz arhiva Kliničkog zavoda za patologiju i sudsku medicinu KBC-a Osijek. Izabran je stadij proširenosti raka dojke T1 u kojem je karcinom veličine do 2 cm kako bi se moglo točno procijeniti područje tumora u kojem se očitava Ki67 (rubovi, središnji dio tumora...), budući da su ovi tumori dovoljno mali da histološki rez cijelog ili većeg dijela tumora stane na jedno predmetno stakalce.

Podatci o dobi ispitanica, veličini tumora, patološkoj dijagnozi, stupnju diferencijacije tumorskog tkiva, ekspresiji estrogenih i progesteronskih receptora, amplifikaciji HER2 i mitotskoj aktivnosti prema izražaju Ki67 također su prikupljeni iz patohistoloških nalaza Kliničkog zavoda za patologiju i sudsku medicinu.

4.3. Metode

4.3.1. Histološka analiza

Patohistološka analiza rađena je na uzorcima tkiva koji su fiksirani u 10 % puferiranom formaldehidu (24). Nakon procesuiranja kroz noć u aparatu za procesuiranje, uklopljeni su u parafinske blokove. Zatim se režu na mikrotomu na debljinu reza od 3 do 5 μm . Rezovi se prebace na vruću kupelj i lijepe na predmetno staklo, zatim se suše u termostatu i bojaju standardnim bojenjem hemalaun-eozin (HE) u automatskom bojaču (Sakura Tissue-Tek Prisma). Mikroskopiranjem se određuje moguća dijagnoza (histološki tip) te traži dodatna imunohistokemijska analiza.

4.3.2. Imunohistokemija

Parafinski blokovi reprezentativnih uzoraka tumorskog tkiva obojeni su imunohistokemijski na Ki67. Korišteno je monoklonalno zečje protutijelo anti-Ki67, klon 30 - 9, kataloški broj 790 - 4286, Ventana (CONFIRM anti-Ki67 (30 - 9) Rabbit Monoclonal Primary Antibody, Roche Diagnostics) (25). Postupak imunohistokemijskog bojenja vođen je automatizirano na Ventana BenchMark Ultra platformi.

Uređaj je automatiziran; u njemu se vrši kompletan postupak od deparafinizacije, pretretmana do inkubacije protutijela na grijačim pločama koje su postavljene horizontalno. Protutijelo Ki67 prethodno je razrijeđeno od proizvođača (RTU, *ready to use*) i bojenje je provedeno prema protokolima proizvođača. Vrijeme inkubacije antigena je 32 minute, pretretmanom CC1, pH 9, 64 minute. Vezanje antitijela iz seruma s antigenom u tkivu napravljeno je uz pomoć Ventana ultraView™ Universal DAB veznim kitom (26) pri čemu nastaje kompleks Ag - At koji se vizualizira pomoću kromogena. Nakon inkubacije u kromogenu, tkivo se boja hemalaunom što dovodi do kontrasta i bolje vidljivosti strukture stanica te lakšem interpretiranju rezultata.

Na predmetnom stakalcu se, uz tkivni rez, postavlja pozitivna kontrola. Prema Nordiqu, preporuča se crvuljak koji služi kao pozitivna i negativna kontrola. Gotovo sve B stanice u tamnim zonama germinativnih centara moraju pokazati umjerenu do jaku nuklearnu boju, dok se u većini B-stanica u svjetlosnim zonama mora vidjeti barem slaba do umjerena reakcija bojenja. U velikoj većini B stanica zona plašta ne smije se vidjeti reakcija bojenja (27).

Da bi se što bolje objektiviziralo brojenje Ki67 pozitivnih (smeđe obojenih jezgara u bilo kojem intenzitetu) stanica karcinoma dojke, napravljene su mikrofotografije tumorskog tkiva obojenog na Ki67 svih definiranih mjesta očitavanja na povećanju $\times 400$, mikroskopa Olympus BX41. Pozitivnost imunohistokemijskog nalaza Ki67 očitana je u postotku pozitivnih stanica.

Ventana je trenutno jedina tvrtka koja nudi antitijelo za analizu slike koji je odobrila Američka agencija za hranu i lijekove, FDA. Poznato je da je Ki67 (30 - 9) izvrstan marker za staničnu proliferaciju i može pomoći patolozima u postizanju objektivne i konzistentne interpretacije određivanja razine ekspresije Ki67 u bolesnika s rakom dojke. Pruža kvantitativne rezultate. Također je odobreno, od FDA, digitalno interpretiranje Ki67 na obojenim

preparatima na kompjutorskom monitoru pomoću Ventana iScan Coreo Au scanner i Virtuoso softwarea, međutim to u ovom radu ipak nije primijenjeno (28).

4.4. Statističke metode

U odabiru statističkih metoda polazište je bio tip prikupljenih podataka. Rezultati istraživanja su formirani u bazi podataka kao Excell tablica koja sadrži 7 varijabli s po 50 slučajeva. Provedeno je računanje Friedmanove ANOVE i Kendallove suglasnosti.

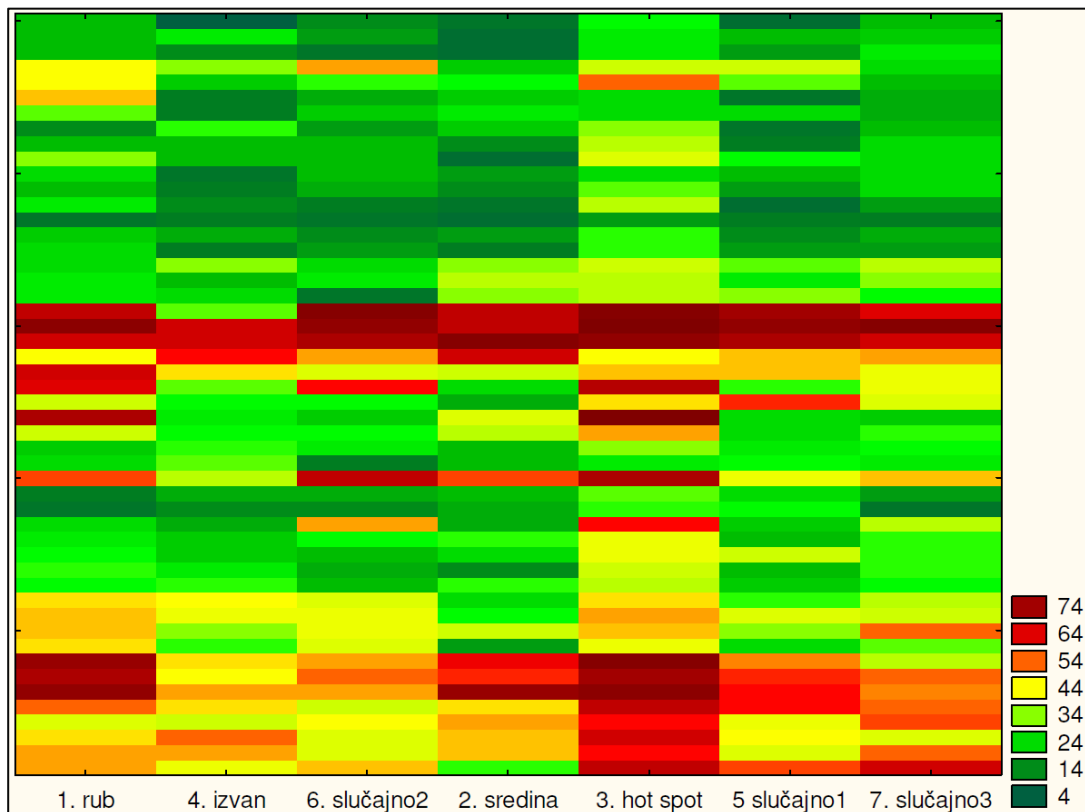
Nakon toga, provedena je dvostupanjska analiza skupina (klastera) u prikazanim podacima. Prvi stupanj analize klastera bilo je određivanje grupiranja klastera u dva smjera (*two-way joining clusters*). Na temelju rezultata prvog stupnja analize odabrani su načini svrstavanja koji pokazuju sličnost u rezultatima. Nakon toga su za te dvije skupine koje su međusobno slične provedene analize o postojanju podskupina u 50 promatranih bolesnika, čime se dobivaju razdiobe po klasterima koje su pohranjene i uspoređene u cilju procjene međusobne kompatibilnosti rezultata Ki67 u testiranih 7 načina uzorkovanja u donošenju jednakovrijednih zaključaka.

Sve P vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti postavljena je na $p < 0,05$. Za statističku analizu korišten je statistički program SPSS (inačica 16.0, SPSS Inc., Chicago, IL, SAD).

5. REZULTATI

Udio Ki67 pozitivnih stanica u uzorcima raka dojke u rubnom i središnjem dijelu tumora, u području „vrućih točaka“ i izvan njih te u tri slučajno odabrana dijela tumora svih bolesnica prikazan je u tablici Priloga 1.

Slika 1. nam prikazuje rezultate učinjene dvosmjernom analizom klastera. Uobičajena je za ovu metodu analize – stupci predstavljaju 7 metoda procjene vrijednosti Ki67 koje se razlikuju po načinu uzorkovanja, a redovi predstavljaju 50 promatranih bolesnica. Kodiran je u bojama koje odgovaraju očitanoj vrijednosti Ki67. Kao što se vidi, promatrani načini uzorkovanja su grupirani po međusobnoj sličnosti pa prvu grupu čine „rub“, „izvan hot spota“, „slučajno 2“ i „sredina“, a drugu skupinu čine „hot spot“, „slučajno 1“ i „slučajno 3“. Točnost razdiobe načina uzorkovanja Ki67 u navedene dvije grupe vidljiva je u sličnosti uzoraka boja između pojedinih metoda uzorkovanja te u nizu kojim su metode uzorkovanja poredane po apscisi Slike 1.



Slika 1. Rezultati dvosmjerne analize klastera.

Iz uzorka boja vidljivo je da su najrazličitiji međusobno oni načini uzorkovanja koji su najudaljeniji na apscisi, dakle „slučajno 3“, „izvan“ i „rub“. Također se vidi da se metode počinju razlikovati jedna od druge u sredini grafikona, dakle između stupca „sredine“ i stupca „hot spot“ očito je da postoji razlika u procjeni Ki67 vrijednosti u zadnjih desetak bolesnica. Iz grafikona je namjerno izbačeno kodiranje redoslijeda pacijenata kako su grupirani jer za potrebe ovog istraživanja to nije bilo bitno.

Slika 1. poslužila je da se definiraju skupine uzorkovanja koje su međusobno slične i koje će biti testirane klaster analizom (analizom skupina). Prvu skupinu podataka čine prva četiri stupca „rub“, „izvan“, „slučajno 2“ i „sredina“, a drugu podaci „hot spot“, „slučajno 1“ i „slučajno 3“.

Tablica 2. Testiranje Kendallove suglasnosti prve skupine (klastera 1) načina uzorkovanja vrijednosti Ki67 u promatranih bolesnica s rakom dojke.

Varijabla	Prosječni stupanj rangiranja	Zbroj vrijednosti rangiranja	Aritmetička sredina Ki67	Standardna devijacija Ki67
1. rub	3,18	159	37,97	19,48
2. izvan	2,18	109	29,08	14,88
3. slučajno 2	2,36	118	31,71	18,79
4. sredina	2,28	114	30,33	19,46

Friedmanova ANOVA i Kendallov koeficijent suglasnosti skupine 1; ANOVA N = 50, stupanj slobode = 3, $\chi^2 = 18,98$, $p < 0,001$, koeficijent suglasnosti = 0,12.

U Tablici 2. i Tablici 3. primjenom Kendallovog koeficijenta suglasnosti testirano je kolika suglasnost (podudarnost) postoji između prije opisane dvije skupine načina uzorkovanja pa je tako u tablici 1. razvidno da su prva četiri načina uzorkovanja, dakle „rub“, „izvan“, „slučajno 2“ i „sredina“ pokazali koeficijent suglasnosti od 0,12 što znači da je postojala samo

umjerena suglasnost između ta 4 načina uzorkovanja, dok je u drugoj skupini načina uzorkovanja (Tablica 3.) gdje je testirana suglasnost „hot spot“, „slučajno 1“ i „slučajno 3“ utvrđen koeficijent suglasnosti 0,56 što pokazuje znatno veću suglasnost u toj drugoj skupini metoda uzorkovanja.

Tablica 3. Testiranje Kendalllove suglasnosti druge skupine (klastera 2) načina uzorkovanja vrijednosti Ki67 u promatranih bolesnica s rakom dojke.

Varijabla	Prosječni stupanj rangiranja	Zbroj vrijednosti rangiranja	Aritmetička sredina Ki67	Standardna devijacija Ki67
1. hot spot	2,86	143	46,05	19,10
2. slučajno 1	1,48	74	31,84	17,98
3. slučajno 3	1,66	83	33,34	16,21

Friedmanova ANOVA i Kendallov koeficijent suglasnosti skupine 2; ANOVA N = 50, stupanj slobode = 2, $\chi^2 = 56,28$, $p < 0,001$, koeficijent suglasnosti = 0,56.

U drugom dijelu analize podataka, navedene dvije skupine načina uzorkovanja testirane su na postojanje podgrupa unutar skupine od 50 bolesnica uz uporabu metode automatske detekcije.

Pri tomu su u podacima prve 4 promatrane metode uzorkovanja detektirana samo dva klastera, jednako kao i u podacima preostale 3 metode uzorkovanja. Navedeno znači da se u obje skupine metoda otkrilo postojanje jedne skupine bolesnica s razmjerno niskim vrijednostima Ki67 (podskupina I) i druge skupine s višim vrijednostima Ki67 (podskupina II).

Konačna statistički uporabljena metoda bila je izračun tablice kontigencije razdiobe naših bolesnica u dvije podskupine: po prve 4 metode uzorkovanja u odnosu na razdiobu dvije podskupine po preostale 3 metode uzorkovanja pri čemu je izračunat χ^2 test.

U Tablicama 4. i 5. date su dvije tablice χ^2 . Jedna je tablica opaženih frekvencija, a druga je tablica očekivanih frekvencija i vidljivo je da je χ^2 vrijednost 31,53 uz stupanj slobode 1, dala nemjerljivo nisku vrijednost p, što znači da je postojalo veliko suglasje između metoda pa je malo bolesnica bilo različito razvrstano prvim i drugim izračunom. Zaključno, čak 27 bolesnica su po oba izračuna stavljene u podskupinu I (tumori s nižim Ki67), a 18 u podskupinu II (tumori s višim Ki67), ostavljajući samo 5 bolesnica kao nedefinirane jer su jednim izračunom u podskupini I, a drugim u podskupini II.

Tablica 4. Tablica opaženih frekvencija razdiobe bolesnica prethodno definiranih skupina (klastera) u dvije podskupine (I – s nižim vrijednostima Ki67 i II – s višim vrijednostima Ki67).

Skupine bolesnica	Podskupina 1	Podskupina 2	Ukupno
Skupina 1	27	2	29
Skupina 2	3	18	21
Ukupno	30	20	50

$$\chi^2 = 31,53, \text{ stupanj slobode} = 1, p < 0,001$$

Tablica 5. Tablica očekivanih frekvencija razdiobe bolesnica prethodno definiranih skupina (klastera) u dvije podskupine (I – s nižim vrijednostima Ki67 i II – s višim vrijednostima Ki67).

Skupine bolesnica	Podskupina 1	Podskupina 2	Ukupno
Skupina 1	17	12	29
Skupina 2	13	8	21
Ukupno	30	20	50

$$\chi^2 = 31,53, \text{ stupanj slobode} = 1, p < 0,001$$

Ovaj rezultat jasno upućuje da procjena vrijednosti Ki67 bilo kojim od odabranih načina brojenja pozitivnih tumorskih stanica, odnosno bilo kojim od 7 odabranih načina uzorkovanja statistički, daje vrlo slične rezultate. Da se analizirane dvije skupine uzorkovanja bitno razlikuju, bio bi puno veći broj lažno pozitivnih i lažno negativnih slučajeva, kojih je ovdje samo 5, dok je 45 od 50 bolesnica jednako klasificirano. Usporedna točnost analizirane dvije metode je 90 %.

6. RASPRAVA

Ki67 je antigen stanica u diobi (29). Koristi se često u patologiji radi mjerenja udjela diobeno aktivnih stanica u tkivu neoplazmi, budući da taj broj korelira s biološkim ponašanjem tumora: u pravilu, što je udio Ki67 pozitivnih stanica viši, to je tumor zloćudniji (brže raste, brže infiltrira okolno tkivo i brže metastazira) (30). U nekih je tumora vrlo bitno točno odrediti udio Ki67 pozitivnih stanica jer o tome ovisi svrstavanje tumora u različite prognostičke i terapijske skupine (primjerice kod karcinoma dojke). Ki67 je korišten kao zamjenski marker za praćenje odgovora na liječenje (31, 32).

Imunohistokemija je jeftinija i praktičnija metoda od molekularne dijagnostike. Može se izvesti u gotovo svim laboratorijima i može pružiti korisne informacije o morfološkim i topografskim osobinama tumora. To je prikladna metoda za određivanje prognoze i izbor odgovarajuće terapije. Drugim riječima, korelacija između prognostičkog faktora Ki67 i drugih prognostičkih i prediktivnih čimbenika osigurava liječnicima bolji način liječenja u pacijentica s tumorima dojke (33).

Ki67 određuje se imunohistokemijski i način očitavanja je u biti vrlo jednostavan: treba prebrojati smeđe (pozitivne) jezgre na 500 ili 1000 tumorskih stanica. Problem je u heterogenosti tumora (34), odnosno pozitivnosti tumorskih stanica unutar tumora - u nekim je područjima više Ki67 pozitivnih stanica, a u drugim manje. Problem je dalje i u mjestu brojenja pozitivnih stanica: treba li računati nekakav prosjek pozitivnosti unutar cijelog tumora (što je teško ostvarivo budući da su tumori ponekad veliki i takav bi pregled oduzeo previše vremena) ili treba ciljati određena područja – ona s višim postotkom Ki67 pozitivnih stanica (kolokvijalno poznata kao žarišta, „vruće točke“ ili engl. *hot spots*) – ili neka druga?

Ukoliko je bojenje homogeno, preporuka je brojati udio pozitivnih stanica na najmanje tri slučajno odabrana područja velikog mikroskopskog povećanja (objektivom $\times 40$) (35). U slučaju heterogenih tumora, uočavaju se dva tipa heterogenosti: gradijent sve intenzivnijeg udjela pozitivnih stanica prema rubovima tumora i „vruće točke“. Što se tiče rubova tumora, preporuka je odabrati tri rubna područja za brojenje. Invazivni se rubovi općenito smatraju biološki najaktivnijim dijelovima tumora i vrlo vjerojatno određuju i sam ishod bolesti.

Što se „vrućih točaka“ tiče, o njima postoji najmanje slaganja među istraživačima: neki su osobito posvećeni brojenju pozitivnosti u „vrućim točkama“, drugi određuju Ki67 pozitivnost i u vrućim točkama i izvan njih, a treći pak potpuno isključuju „vruće točke“ iz analize pozitivnosti Ki67 unutar tumorskog tkiva (35).

I studije koje su se bavile određivanjem podudarnosti određivanja Ki67 pozitivnih stanica u različitim laboratorijama, preporučile su različite metode. Tako su se u studiji Leung SCY i suradnika koristile tri „scoring“ metode: globalna procjena Ki67 u cijelom tumoru; procjena Ki67 u zonama visoke, srednje i niske pozitivnosti i procjena Ki67 pozitivnosti u „vrućim točkama“ (18).

Podatci iz literature i svakodnevna praksa u patohistološkim laboratorijima ukazuju na problem u točnom određivanju udjela Ki67 pozitivnih stanica u tumorskom tkivu. Zbog toga je cilj ovog istraživanja bio utvrditi kolika je varijabilnost između podataka prikupljenih različitim načinima brojanja Ki67 u pojedinom tumoru. Izabrani su karcinomi dojke stadija T1 (veličine do 2 cm) kako bi cijeli ili veći dio tumora stao na jedan histološki rez i stakalce, što omogućuje pregled gotovo cijelog ili cijelog tumora i lak probir različitih područja Ki67 pozitivnosti, dobar pregled rubova tumora i središnjeg dijela kao i lako prepoznavanje „vrućih točaka“. Problem je bio obrada prikupljenih podataka.

U odabiru statističkih metoda polazište je bio tip prikupljenih podataka. Rezultati istraživanja formirani su kao baza podataka u tablici Excel koja sadrži 7 varijabli s po 50 slučajeva što znači da je postojalo 7 vezanih uzoraka različitih načina uzorkovanja Ki67 u 50 promatranih bolesnika. Upravo ovakav tip podataka predstavlja izazov za statističku obradu jer ako bi se koristio uobičajeni neparametrijski test za uspoređivanje dva vezana uzorka, morao bi se napraviti veliki broj usporedbi. Dakle, $6 + 5 + 4 + 3 + 2 + 1$ test i rezultati tih testova utvrdili bi na koji se način međusobno razlikuje 7 načina uzorkovanja koji su testirani, međutim bez jasnih spoznaja kako opažene razlike interpretirati.

Drugi pristup također neparametrijske statistike računanje je Kendallove suglasnosti (*concordans*), odnosno statistički test koji se uobičajeno koristi za procjenu varijabilnosti sudaca u procjenjivanju istih predmeta ocjenjivanja. Takav test bi po svojoj namjeni bio primjereniji ovom istraživanju, međutim problem Kendallove suglasnosti leži u tome što jednako tretira sve testirane skupove rezultata ocjenjivanja te ni na koji način ne daje informaciju o tome koji se od načina više razlikuju u odnosu na one koji su međusobno dali slične rezultate. Dakle, to čini navedenu metodu samo uvjetno primjenjivom u ovom slučaju.

Postavljaju se dva osnovna pitanja: 1. s obzirom na 7 odabranih načina uzorkovanja za ocjenu Ki67, koje su metode davale sličnije, a koje različite rezultate i 2. da li su zaključci koji se mogu izvući iz primijenjenih metoda jednako vrijedni bez obzira na metodu uzorkovanja?

Upravo zbog toga se izabrala dvostupanjska analiza skupina (klastera) u prikazanim podacima. Prvi stupanj analize klastera bilo je određivanje grupiranja klastera u dva smjera (*two-way joining clusters*), metoda koje se inače često koristi u medicinskim i biomedicinskim istraživanjima, u slučajevima kada se istodobno po sličnosti grupiraju uzorci koji se testiraju, a također i metode kojima se testiraju, što ovu metodu čini upravo primjerenom za ovakvo istraživanje.

Na temelju rezultata prvog stupnja analize odabrani su načini svrstavanja koji pokazuju sličnost u rezultatima. Nakon toga su za te dvije skupine metoda, koje su međusobno slične, provedene analize o postojanju podskupina u 50 promatranih bolesnica, čime se dobiju razdiobe po klasterima koje su pohranjene i uspoređene u cilju procjene međusobne kompatibilnosti rezultata Ki67 u testiranih 7 načina uzorkovanja u donošenju jednakovrijednih zaključaka.

U drugoj fazi statističke obrade uspoređeni su načini na koje se grupiraju podgrupe 50 promatranih bolesnica ovisno o prva 4 pokazatelja i ovisno o zadnja tri pokazatelja. Na ta 2 načina su utvrđene po 2 podgrupe i onda je uspoređeno statistički da li ti pokazatelji koji su međusobno slični jednako raspoređuju bolesnice i kao što je vidljivo iz one tablice kontigencije (Tablica 4.), 5 bolesnica je različito raspoređeno što znači da je odstupanje 10 % (pet od 50 bolesnica).

Iz toga se može zaključiti samo sljedeće: način uzorkovanja Ki67 u 50 promatranih bolesnica je u dosta bitnoj mjeri varijabilan po rezultatu. Ukoliko se primijenjuje kruti kriterij koji je definiran od strane ekspertnog tima u St. Gallenu, po kojem je razina Ki67 bitna, bilo bi jako važno standardizirati točno mjesto odnosno način uzorkovanja, jer je margina od 10 % za donošenje bitnih kliničkih odluka preširoka.

7. ZAKLJUČCI

- 1) Očitane vrijednosti Ki67 u rubnim dijelovima tumorskog tkiva su 37,97 %, standardna devijacija $Ki67 \pm 19,48$, a u središnjem dijelu 30,3 %, standardna devijacija $Ki67 \pm 19,46$.
- 2) Očitane vrijednosti Ki67 u „vrućim točkama“ istraživanih tumora iznosi 46,05 % $\pm 19,10$, a izvan njih je 29,08 % $\pm 14,88$.
- 3) U tri slučajno odabrana dijela tumorskog tkiva očitane su vrijednosti Ki67 od 31,84 % $\pm 17,98$, 31,71 % $\pm 18,79$ i 33,34 % $\pm 16,21$.
- 4) Varijabilnost u dobivenim podacima očitavanja Ki67 antigena raka dojke je 10 % i onemogućuje točno svrstavanje raka dojke u podskupine o kojima ovisi određivanje načina liječenja bolesnika.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Utvrditi da li varijabilnost u očitavanju Ki67 antigena onemogućuje točno svrstavanje raka dojke u podskupine koje ovise o očitanoj Ki67.

Ustroj studije: Presječna studija s povijesnim podacima.

Ispitanici i metode: Istraživanje je provedeno na 50 uzoraka tumorskog tkiva pacijentica kod kojih je u Kliničkom bolničkom centru Osijek u 2017. godini dijagnosticiran invazivni karcinom dojke bez posebnih osobitosti stadija T1. Histološki rezovi su imunohistokemijski obojeni Ki67 antitijelom, fotografirani i na fotografijama je očitavana pozitivnost na najmanje 500 tumorskih stanica u različitim dijelovima tumora: u rubnom i središnjem dijelu, unutar „hot spotsa“ i izvan njih, kao i u tri slučajno odabrana dijela tumora. Statistička obrada podataka provedena je analizom klastera i računanjem Friedmanove ANOVE i Kendallove suglasnosti.

Rezultati: Klaster analiza svrstala je 7 načina uzorkovanja Ki67 u dvije skupine: skupinu 1 (rub tumora, izvan vrućih točaka, slučajni uzorak 2 i sredina tumora) $\chi^2 = 18,98$, $p < 0,001$, uz koeficijent suglasnosti 0,12 i skupinu 2. (vruće točke, slučajni uzorci 1 i 3) $\chi^2 = 56,28$, $p < 0,001$, uz koeficijent suglasnosti 0,56. U drugoj fazi statističke obrade, uspoređeni su načini na koje se grupiraju podgrupe 50 promatranih bolesnica ovisno o prva 4 pokazatelja i ovisno o zadnja tri pokazatelja. Na ta 2 načina utvrđene su po 2 podgrupe i onda je uspoređeno statistički da li pokazatelji koji su međusobno slični jednako raspoređuju bolesnice ($\chi^2 = 31,53$, $p < 0,001$). Pet bolesnica je različito raspoređeno što znači da je odstupanje 10 %.

Zaključak: Varijabilnost u dobivenim podacima očitavanja Ki67 antigena raka dojke je 10 % i onemogućuje točno svrstavanje raka dojke u podskupine o kojima ovisi određivanje načina liječenja bolesnika.

Ključne riječi: karcinom dojke; Ki67 ekspresija; predikcija; proliferacijski marker; prognoza; preporuke.

9. SUMMARY

Variation in breast carcinoma cell proliferation assessment according to immunohistochemical nuclear antigen Ki67 staining

Study objective: To determine whether the variability in the Ki67 antigen detection prevents the correct classification of breast cancer into subgroups depending on the detected Ki67.

Study design: Cross-sectional retrospective study.

Subjects and methods: The study was conducted on 50 tumor tissue samples of patients with stage T1 invasive breast cancer of no special type, diagnosed at the Osijek Clinical Hospital Centre in 2017. Histology slides were immunohistochemically dyed with the Ki67 antigen photographed, and a share of Ki67 positive cells was detected on at least 500 tumor cells in different regions of the tumors: in the peripheral and central regions, within the "hot spots" and beyond, as well as in three randomly selected regions. Statistical data analysis was performed using cluster analysis and by measuring the Friedman's ANOVA and the Kendall's Coefficient of Concordance.

Results: The cluster analysis has categorized 7 methods of sampling Ki67 into two groups: group 1 (tumor margins, outside hot spots, random sample 2, and tumor centre) $\chi^2 = 18.98$, $p < 0,001$, with a coefficient of concordance of 0.12, and group 2 (hot spots, random samples 1 and 3) $\chi^2 = 56,28$, $p < 0,001$, with a coefficient of concordance of 0.56. In the second phase of the statistical data analysis, the methods in which subgroups of 50 observed patients were grouped according to the first 4 and last 3 indicators were compared. These 2 methods determined 2 subgroups and then there was a statistical comparison as to whether the similar indicators were distributed equally among the patients ($\chi^2 = 31.53$, $p < 0,001$). In 5 patients the indicators were distributed unequally, meaning that the variation was 10 %.

Conclusion: There was a 10 % variability in the data obtained from the Ki67 breast cancer antigen reading which prevents the exact classification of breast cancers into the subgroups on which the determination of patient treatment depends.

Key words: breast cancer; Ki67 expression; prediction; proliferation marker; prognosis; recommendations.

10. LITERATURA

1. Onkologija.hr.; Dostupno na adresi: <http://www.onkologija.hr/rak-dojke/rak-dojke-statistika/> Datum pristupa: 29. 11. 2018.
2. Leong AS, Raymond WA. Prognostic parameters in breast cancer. *Pathology* 1989;21(3):169-75.
3. Stathopoulos GP, Malamos NA, Markopoulos C, et al. The role of Ki-67 in the proliferation and prognosis of breast cancer molecular classification subtypes. *Anticancer Drugs* 2014;25:950-7.
4. Polley MY, Leung SC, Gao D, et al. An international study to increase concordance in Ki67 scoring. *Mod Pathol* 2015;28(6):778-86.
5. Penault-Llorca F, Andre F, Sagan C, et al. Ki67 expression and docetaxel efficacy in patients with estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2009;27(17):2809-15.
6. Nishimura R, Osako T, Okumura Y, et al. Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer subtype and a predictor of recurrence time in primary breast cancer. *Exp Ther Med* 2010;1:747-54.
7. Nishimura R, Osako T, Nishiyama Y, et al. Prognostic significance of Ki-67 index value at the primary breast tumor in recurrent breast cancer. *Mol Clin Oncol* 2014;2:1062-8.
8. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983;31:13-20.
9. Lee LH, Yang H, Bigras G. Current breast cancer proliferative markers correlate variably based on decoupled duration of cell cycle phases. *Sci Rep* 2014;4:5122.
10. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000;182:311-22.
11. De Azambuja E, Cardoso F, de Castro G Jr., et al. Ki67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer* 2007;96(10):1504-13. Epub 2007/04/25. doi: 10.1038/sj.bjc.6603756.
12. Keshgegian AA, Cnaan A. Proliferation markers in breast carcinoma. Mitotic figure count, S-phase fraction, proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and MIB-1. *Am J Clin Pathol* 1995;104:42-9.

13. Veronese SM, Gambacorta M, Gottardi O, Scanzi F, Ferrari M, Lampertico P.
Proliferation index as a prognostic marker in breast cancer. *Cancer* 1993;15(71):3926-31.
14. Goldhirsch A., Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn H J. Panel members. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol* 2009;20(8):1319-29.
15. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009;101(10):736–50. Epub 2009/05/14. doi: 10.1093/jnci/djp082.
16. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thurlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol* 2013;24(9):2206–23. Epub 2013/08/07. doi: 10.1093/annonc/mdt303.
17. Raap M, Ließem S, Rüschhoff J, et al. Quality assurance trials for Ki67 assessment in pathology. *Virchows Arch* 2017; <https://doi.org/10.1007/s00428-017-2142-y>.
18. Leung SCY, Nielsen TO, Zabaglo L, et al. Analytical validation of a standardized scoring protocol for Ki67: phase 3 of an international multicenter collaboration. *Breast cancer* 2016;2,16014 <https://doi.org/10.1038/npjbcancer.2016.14>; published online 18 May 2016.
19. Shui R, Yu B, Bi R, Yang F, Yang W. An Interobserver Reproducibility Analysis of Ki67 Visual Assessment in Breast Cancer. *Plos One* 2015. Published: May 1, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125131>.
20. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnant M, Piccart-Gebhart M, et al. Tailoring therapies - improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol* 2015;26(8):1533 - 46.
21. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. *Patologija, četvrto izdanje*. Medicinska naklada: Zagreb 2014;655.
22. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, et al. Strategies for subtypes - dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol* 2011;22:1736–47.
23. American Joint Committee Cancer. Breast Cancer Staging. Dostupno na adresi: <https://cancerstaging.org/references-tools/quickreferences/documents/breastmedium.pdf>
Datum pristupa: 15. 01. 2019.

24. Breast pathology grossing guidelines. Dostupno na adresi:
<http://pathology.ucla.edu/workfiles/Education/Residency%20Program/Gross%20Manual/Axillary%20Lymph%20Nodes.pdf>. Datum pristupa: 11. 01. 2019.
25. Ventana Medical Systems, Inc. Tissue-based cancer diagnosti solution. Dostupno na adresi: www.ventana.com/product/114?type=108. Datum pristupa: 13. 01. 2019.
26. Ventana Medical Systems, Inc. Tissue-based cancer diagnosti solution. Dostupno na adresi: www.ventana.com/product/1414?type=1791. Datum pristupa: 13. 01. 2019.
27. NordiQC. Dostupno na adresi: <https://www.nordiqc.org/epitope.php?id=1>. Datum pristupa: 14. 01. 2019.
28. Cision Prnewswire. Dostupno na adresi: <https://www.prnewswire.com/news-releases/ventana-receives-fda-clearance-for-ki-67-30-9-image-analysis-and-digital-read-applications-140545623.html>. Datum pristupa: 09. 01. 2019.
29. Sobecki M, Mrouj K, Camasses A, et al. The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin. *Elife* 2016;5:e13722. Published 2016 Mar 7. doi:10.7554/eLife.13722.
30. Li FY, Wu SG, Zhou J, et al. Prognostic value of Ki-67 in breast cancer patients with positive axillary lymph nodes: a retrospective cohort study. *PLoS One* 2014;9(2):e87264. Published 2014 Feb 3. doi:10.1371/journal.pone.0087264.
31. Yeon P, Seock-Ah IM, EunYC, Joong HA, Sook YW, et al. Validation and Comparison of CS-IHC4 Scores with a Nomogram to Predict Recurrence in Hormone Receptor-Positive Breast Cancers. *Oncology* 2014;86:279-288.
32. Yoshiki M, Takayuki U, Kenichi Y, Hitoshi T, et al. Abstract P5-01-02: Inter-observer concordance of Ki-67 labeling index in breast cancer: Japan Breast Cancer Research Group (JBCRG) Ki-67 Ring Study. *Cancer science*. 2013;72. 10.1111/cas.12245.
33. Kermani T, Kermani I, Faham Z, Dolatkah R. Ki-67 status in patients with primary breast cancer and its relationship with other prognostic factors. *Biomed Res Ther* 2019;6(2):2986-91.
34. Maeda I, Abe K, Koizumi H, Nakajima C, Tajima S, et al. Comparison between Ki67 labeling index determined using image analysis software with virtual slide system and that determined visually in breast cancer. *Breast Cancer* 2015;23(5):745–51.
35. Dowsett M, Torsten ON, A'Hern R, et al. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *JNCI* 2011;103(22):1656-64.

11. ŽIVOTOPIS

ANITA BREŠKI, bacc. med. lab. dijagn.

Klinički zavod za patologiju i citologiju

Klinički bolnički centar Zagreb

Kišpatićeva 12

10000 Zagreb

Datum i mjesto rođenja:

1. kolovoza 1983., Varaždin

Kućna adresa:

Ruđera Boškovića 16 A

42000 Varaždin

OBRAZOVANJE

od 2016.: studentica II. godine Sveučilišnog diplomskog studija medicinsko laboratorijske dijagnostike Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

2008.: tečaj citotehnologa; Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi i Hrvatsko društvo za kliničku citologiju Hrvatskog liječničkog zbora, Zagreb

2006. – 2007.: pripravnički staž na Kliničkom zavodu za citologiju, KBC Rebro

2002. – 2006.: godine Zdravstveno Veleučilište, Zagreb; smjer: baccalaurea medicinsko - laboratorijske dijagnostike

1998. – 2002.: Medicinska škola Varaždin; smjer zdravstveno – laboratorijski tehničar

STRUČNO USAVRŠAVANJE

2018.: edukacija i optimizacija imunohistokemijskih protokola, Roche Diagnostics Ltd IHC Protocol Set Up Training Certificate, Burgess Hill, UK

2018.: edukacija imunohistokemije na Dako Omnis aparatu, Dako Agilent, Zagreb

ČLANSTVO I AKTIVNOSTI U STRUKOVNIM UDRUGAMA

2011.: članstvo u Hrvatskoj komori zdravstvenih radnika

2019.: provoditelj stručnih nadzora strukovnog razreda medicinsko laboratorijske dijagnostike

AKTIVNA SUDIONICA NA STRUČNIM SKUPOVIMA

2018.: Četvrti Kongres strukovnog razreda za medicinsko-laboratorijsku djelatnost, Zagreb, prezentacija „IHC određivanje i važnost ekspresije PDL-1 kod karcinoma pluća“

2019.: One Roche Oncology symposium, Split, prezentacija „Optimizacija protokola“

12. PRILOZI

Prilog 1. Tablični prikaz podataka o Ki67 pozitivnim tumorskim stanicama ovisno o mjestu brojenja za svaku bolesnicu

Prilog 1.

Tablični prikaz podataka o Ki67 pozitivnim tumorskim stanicama ovisno o mjestu brojenja za svaku bolesnicu

MJESTO BROJENJA KI67 POZITIVNIH TUMORSKIH STANICA

<i>REDNI BROJ</i>	<i>BROJ BOLESNICE/2017</i>	RUB	SREDINA	HOT SPOT	IZVAN	SLUČAJNO 1	SLUČAJNO 2	SLUČAJNO 3
1.	52	19,3	8,86	26,03	3,43	7,55	12,1	18,86
2.	294	25,64	8,75	35,95	13,2	7,57	11,42	15,25
3.	556	18,75	13,57	35,42	19,44	11,75	19,92	23,27
4.	1104	43,36	21,35	36,63	32,3	36,31	48,94	22,42
5.	1147	67,5	66,09	81,94	31,64	73,68	81,2	63,75
6.	1361	47,16	20,37	22,8	11,71	9,11	17,29	16,96
7.	1626	22,64	17,39	58,62	17,37	20,78	49,77	35,55
8.	1683	62,85	22,96	68,44	30,12	28,14	59,6	41,07
9.	1801	74,39	60,93	81,48	45,66	51,15	49,48	35,13
10.	1900	24,91	29	41,68	21,28	19,73	27,07	28,18
11.	2326	36,79	16,13	44,7	27,76	57,36	26,34	38,31
12.	2403	21,72	19,44	33,79	28,5	24,8	26	28
13.	2511	22,09	20	24,73	30,55	27,27	10,9	25,4
14.	2707	45,81	23,07	46	42,16	28,93	40	35,12
15.	2974	71,68	38,03	83,03	24,83	23,6	21,55	21,69
16.	3034	22,24	34	37,67	33,5	30,64	22,81	34,38
17.	3101	47,87	26,76	48,98	41,75	39,25	41,49	36,77
18.	3519	79,14	67,24	82,93	65,57	77,65	77,6	80,6

19.	3660	53,13	45,16	66,04	45,5	59,28	37,1	53,11
20.	3712	26,72	23,1	40,8	20,38	36,84	20	28,73
21.	4029	42,15	65,71	43,4	58,5	47,29	48,6	49,52
22.	4820	22,7	14,81	23,82	10	18,16	18,85	22,33
23.	5596	42,61	26,41	53,41	21,9	30,54	29,02	19,71
24.	5779	45,16	15	41,6	28,68	22,85	40	30,38
25.	5894	24,3	34,16	34,75	19,43	24,78	25,66	32,5
26.	5957	28,57	13,33	36,1	25,5	18,35	17,23	28,76
27.	6166	47,63	36,53	46,66	32,23	32,17	40,75	53,84
28.	6248	11,66	19,62	30,9	16,7	22,85	16,75	15,06
29.	6911	13,23	20,55	32,64	29,62	8,82	14,61	18,98
30.	7048	18,76	7,23	24,91	25,75	18,38	15,16	21,51
31.	7330	39,61	49,41	59,2	37,14	41,76	42,92	55
32.	7403	32,79	6,4	38,08	18,29	27,27	18,98	23,42
33.	7465	64,33	81,22	77,44	65	71,71	70,4	64,81
34.	7712	44,8	47,27	64,33	52,8	42,4	40	38,4
35.	7714	49,5	29,82	67,58	41,66	56	47,2	64,61
36.	7782	27,55	30	35	28,78	21,9	18,66	26,6
37.	8191	19,77	13,5	30,76	10,79	15,06	17,56	22,31
38.	8429	48,52	48	58,22	49,25	38,23	40	53,33
39.	8583	8,91	7,5	15,1	11,48	11,11	8,5	11,55
40.	8615	77,16	74,41	80	48,09	59,5	48,57	51,11
41.	8718	25,39	33,33	35,89	23,07	32,56	10	26,13

42.	8985	8,84	17,89	28,47	12,88	26,78	12,28	9,04
43.	9108	71,17	58	73,89	42,56	56,52	52,41	53,33
44.	9236	55,11	54,31	70,25	34,28	41,66	66,78	48
45.	9894	19,2	6,08	25,43	12,44	14,79	8,8	25,5
46.	10059	20,57	14,54	29,49	17,93	12,28	13,28	16,54
47.	10309	65,01	37,73	46,56	45,06	46,15	39,31	42
48.	10466	30,16	25	23,66	11,33	22,10	21,5	17,2
49.	10501	23,03	10,84	28,51	10,4	15,23	14,22	14,64
50.	10851	36,92	35,89	49,05	26,08	23,77	27,33	28,4