

[Min side](#) [Legeforeningen.no](#) [Legejobber.no](#) [Blogg](#) [Tidsskriftet.no](#)

Søk i Tidsskriftet

Søk

## Tidsskrift for Den norske legeforening

- [Siste utgave](#)
- [Nyheter](#)
  - [Nyhetsarkiv for nettnyheter](#)
  - [Les mer fra siste nummer](#)
  - [Innhold siste nummer](#)
  - [Nyhetsbrev](#)
- [Tidligere utgaver](#)
  - [Tidligere utgaver](#)
  - [Søk](#)
  - [Årsregister](#)
  - [Anmeldelser](#)
- [Multimedia](#)
  - [Podkaster](#)
  - [Kunnskapsprøver](#)
  - [Rss-feeder](#)
  - [Interaktive artikler og video](#)
  - [Web-TV](#)
- [Tema](#)
  - [Temaserier](#)
  - [Skriftserien](#)
  - [Leger i Norge](#)
  - [Doktoravhandlinger](#)
  - [Norsk forskning](#)
  - [Svineinfluensa A\(H1N1\)](#)
- [Spesialister](#)
- [Stillinger](#)
- [Stipendier](#)
- [Avansert søk](#)

[Nr. 4 – 20. februar 2000](#)

Tidsskr Nor Lægeforen 2000; 120:479-88

- [Vis forfattere](#)
- [Skjul sammendrag](#)
- [English summary](#)
- [Del artikkelen](#)

TEMA Moderne patologidiagnostikk

## Digital bildebehandling i patologifaget – eksemplifisert ved cancer prostatae

H E Danielsen W Kildal J Sudbø

Patologi er en medisinsk disiplin hvor digital bildebehandling har fått økende betydning. I denne artikkelen presenteres noen digitale bildebehandlingsmetoder benyttet innenfor patologi i dag.

For å illustrere etablerte og fremtidige bruksområder, presenterer vi egne forskningsresultater og tilgjengelig litteratur for cancer prostatae.

Ved DNA-ploidiundersøkelser måler man mengde DNA i cellekjerner. Gjennomgang av litteratur viser at DNA-ploidi er en meget god prognostisk markør for lokalisert cancer prostatae. Likevel rekvireres slike undersøkelser i liten grad, i motsetning til ved gynekologiske kreftformer. I tillegg til å anslå mengde DNA i kjernen, har man mulighet for kvantitativt å beskrive kromatinorganiseringen. Slik nukleotyping har vist seg å ha diagnostisk og prognostisk betydning både i lokalisert og avansert cancer prostatae. DNA-ploidi og nukleotyping er metoder som analyserer egenskaper ved enkeltceller. Man kan i dag også utføre objektive og reproduerbare analyser av vevsarkitektur.

Resultater fra lokalisert cancer prostatae viser at slike analyser gjør det mulig å skille mellom prøver fra pasienter med god og dårlig prognose.

Ved siden av bedret diagnostikk, kan bruk av digital teknologi i kombinasjon med nye metoder fra molekylærbiologi bety en stor arbeidsbesparelse, blant annet ved at man enkelt kan studere mange markører parallelt og i store pasientmaterialer.

Kombinasjonen av tradisjonell, molekylær og digital patologi har allerede gitt metoder til forbedret diagnostikk og prognostisering. Det ligger imidlertid en utfordring i å ta metodene i bruk.

DNA-ploidi som prognostisk markør ved cancer prostatae er bare ett av mange eksempler på at det innen klinisk virksomhet allerede foreligger gode og objektive metoder som ikke blir optimalt utnyttet.

Det er vanskelig å finne områder hvor digitale prosesser og datamaskiner ikke benyttes, og medisin er ikke noe unntak. Dataassistert bildebehandling inngår allerede i mer enn 40 000 publiserte studier innen biomedisin, og dette er et felt i kraftig vekst. Ikke minst gjelder dette innen patologi, hvor datamaskiner eller digitale prosessorer inngår i nær sagt alle arbeidsprosesser. Dette betyr ikke at patologen er i ferd med å bli erstattet av en datamaskin, men etter hvert vil det bli vanskelig å fungere som patolog uten å utnytte de nye muligheter som digital bildeprosessering gir fagområdet.

Den viktigste delen av patologens arbeid er å vurdere bilder, vanligvis gjennom et mikroskop. Basert på pasientens sykehistorie og vevs- eller celleprøver gjennomfører patologen en morfologisk tolking, og kvaliteten på tolkingen måles opp mot hvor godt denne diagnosen kan forutsi sykdommens videre forløp. Digitale bilder kan analyseres for egenskaper av diagnostisk og prognostisk verdi, de kan bearbeides for å fremheve visuell informasjon, de kan lagres og benyttes til forskning, kvalitetssikring og opplæring, og de kan overføres og benyttes i kommunikasjon patologer imellom. I tillegg byr teknikken på muligheter for effektivisering og ressursbesparelser.

#### Behov for nye metoder innen patologi

Det endelige kvalitetsmål for en diagnose er i hvilken grad den forutsier pasientens videre kliniske forløp. Dessverre er det ikke sjelden at patologien mislykkes med dette. Dels skyldes dette at vi har begrenset kunnskap om den aktuelle sykdommen og ofte også om den aktuelle behandling, dels skyldes det at samme behandlingen av samme diagnose hos to pasienter får forskjellig utgang fordi andre faktorer (som ikke vurderes av patologen) spiller avgjørende rolle. Imidlertid er det også slik at patologens morfologiske tolking er subjektiv, og derfor gjenstand for variasjon. I tillegg viser en rekke studier, spesielt ved gradering av maligne svulster, at det for mange lesjoner

kan være lite samsvar mellom diagnoser gitt av forskjellige patologer (høy interobservatorvarians). Dette kan være et uttrykk for varierende kvalitet på patologer, men det kan også være et uttrykk for at man har ufullstendige eller gale kriterier for den aktuelle sykdommen. Uansett er det et behov for å få etablert nye og objektive metoder for diagnostikk. Patologien har også et behov for å kvalitetssikre og dokumentere sine diagnoser ved hjelp av effektive informasjonssystemer som også må inkludere representative bilder av det som diagnostiseres (fig 1). Videre har man behov for mer effektive løsninger for konsultasjoner patologer imellom, samt å kunne tilby peroperativ fjerndiagnostikk til det flertall av sykehus som ikke har egne patologer. Endelig har man også et behov for å effektivisere utdanning og videreutdanning av patologer. Digital patologi er én vei å gå i forsøket på å imøtekomme disse behovene.



**Figur 1** Et sammensatt (kompositt) bilde av prostatakjertel bestående av 81 (9 · 9) synsfelt, med 1024 · 1024 piksler. Oppløsningen er 24 bit, 8 bit for tre farger; rødt, grønt og blått. Oppløsningen i dette bildet er den samme som for hvert enkelt synsfelt, og er følgelig høyere enn ved fotografering av hele området som ett synsfelt

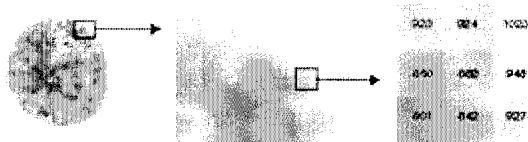
#### Anvendelsesområder for digital patologi

Digitale teknikker har en rekke applikasjonsområder innen patologifaget, hvorav de mest utbredte er: – Bildearkivering/databaser – Telepatologi – 3D-rekonstruksjon og -analyse – Morfometri (inkludert mitoser, AgNor etc.) – DNA-ploidi – Kvantitativ immunohistokjemi – Nukleotyping (kromatinstruktur/tekstur) – Vevstopologi – Automatisk karyotyping – Kvantitative FISH-metoder (komparativ genomhybridisering (CGH) «vevsmikroarray», «rainbow cross species fluorescens in situ hybridisering» (RxFISH)) – Screening-systemer

En del av applikasjonene (bildearkivering, 3D-rekonstruksjon, morfometri, karyotyping) er velkjente og benyttes innenfor en rekke medisinske områder. Denne artikkelen vil ta for seg noen av de anvendelsesområder som synes å få stor betydning innenfor diagnostikk eller forskning i patologifaget, hvor digitale teknikker utgjør basis for, eller muliggjør applikasjonen.

#### DNA-ploidi

Feulgen-teknikken er en av de mest benyttede cytohistokjemiske fargereaksjoner innen biologi og medisin (1). Teknikken gjør det mulig å spesifikt farge DNA in situ, og er basert på Schiffs eller Schiff-liknende reagensers binding til frigjorte aldehydgrupper fra deoksisiribose-molekyler etter HCl-hydrolyse. Fargeintensiteten er proporsjonal med DNA-konsentrasjonen, og mengde DNA i cellekjernen uttrykkes som mengde lys absorbert av Feulgen-fargen over hele cellekjernen (fig 2). Maligne celler karakteriseres ofte av unormalt DNA-innhold, og Feulgen-reaksjonen benyttes i dag til DNA-kvantifisering i cellekjerner for å bestemme DNA-ploidifordelingen i tumorceller.

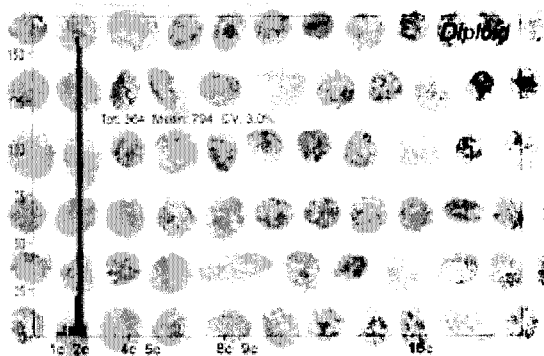


**Figur 2** Digital bildebehandling av en Feulgen-farget kjerne fra prostatakjertel. Til venstre sees et gråtonebilde med 1 600 · forstørrelse, 1 024 · 1 024 piksler med 10 bits oppløsning per piksel. Bilde blir fanget som en 1 024 · 1 024 matrise og hver piksel blir lagret med tilhørende gråtoneverdi. Det midtre bildet viser et utsnitt av kjernen, med de enkelte piksler synlige. Til høyre sees detalj av utsnittet, hvor hver piksel har fått en av 1 024 gråtoneverdier, fra 0 (helt svart, maksimal absorpsjon) til 1 023 (helt hvitt, ingen absorpsjon). Ved Feulgen-farging kan man tallfeste optisk tetthet (OD), som et mål på hvor mye DNA som har vært i lysveien. Den integrerte optiske tettheten (IOD) er summen av gråtoner for alle pikslene over hele kjernen. DNA-ploidi blir bestemt ved beregning av IOD

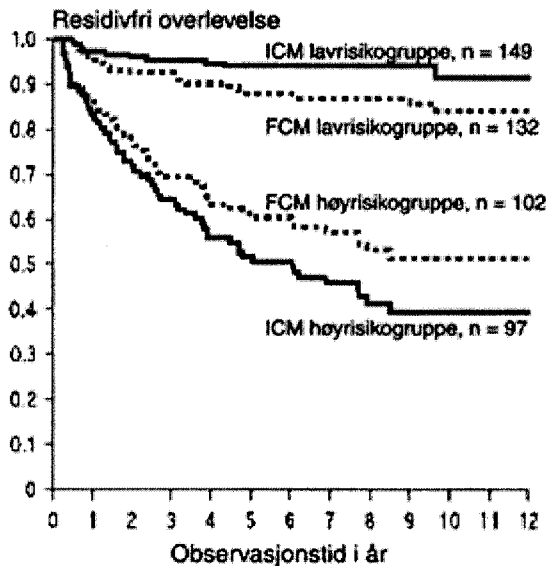
#### Væskestrømscytometri versus bildecytometri

Kliniske DNA-ploidiundersøkelser ved mikrospektrofotometri på Feulgen-fargede kjerner ble først introdusert i Sverige i begynnelsen av 1960-årene. Væskestrømscytometri (flowcytometry, FCM), som ble introdusert på slutten av 1970-årene, var en enklere og raskere teknikk, og førte til en betydelig økning i bruken av DNA-ploidi i diagnostikk og prognostisering av kreftsykdommer. Teknikken tillot målinger av langt flere celler, og med teknisk gode resultater (vurdert i forhold til variasjonskoeffisient). Fra 1980 og frem til i dag er det publisert om lag 4 000 arbeider hvor DNA-ploidi i humane neoplasier er bedømt ved væskestrømscytometri.

Som et resultat av utviklingen innen digital bildebehandling og datateknologi, har vi i samme periode sett en betydelig utvikling av bildecytometri (image cytometry, ICM), både kvalitativt og kvantitativt. Denne teknikken er i ferd med å overta for væskestrømscytometri for bestemmelse av DNA-ploidi.



**Figur 3** Figuren viser 66 av totalt 364 cellekjerner med tilhørende histogram, for en pasient med prostatakreft. Cellekjernene lagres som digitale bilder og kan senere hentes frem for videre analyse, f.eks. kromatinteksturanalyse. Histogrammet er typisk for en diploid svulst (lav risiko)



**Figur 4** Sykdomsfri overlevelse relatert til DNA-ploidi for pasienter med epiteliale ovarialkarsinomer, stadium 1. DNA-ploidi er målt ved væskestrømscytometri (flow cytometry, FCM) og bildecytometri (image cytometry, ICM). Lavrisikogruppene inneholder pasienter med diploid eller tetraploid svulst for bildecytometri og diploide svulster for væskestrømscytometri. Høyriskogruppene inneholder pasienter med tetraploid, polyploid eller aneuploid svulst for væskestrømscytometri og med polyploid eller aneuploid svulst for bildecytometri. Det er signifikant forskjell mellom lav- og høyriskogruppe for både væskestrømscytometri og bildecytometri, men bildecytometri skiller risikogruppene bedre enn væskestrømscytometri (n = antall pasienter i hver av gruppene)

Bertino og medarbeidere publiserte i 1994 et stort arbeid hvor de sammenliknet resultater fra væskestrømscytometri og bildecytometri på i alt 1 864 prøver (3). Av disse ble 440 FCM-analyser ikke-konklusive, mens det tilsvarende tallet for bildecytometri var 127 prøver. I alt 1 397 prøver gav konklusivt resultat med begge metoder, og av disse hadde 1 297 (92,8 %) samme DNA-ploidiklassifisering. Av de 100 prøvene med forskjellig klassifisering var 63 prøver diploide med bildecytometri og aneuploide med væskestrømscytometri. Av de 63 prøvene ble 59 klassifisert som normale eller benigne, og kun fire prøver var maligne. De øvrige 37 prøvene var aneuploide med bildecytometri og diploide med væskestrømscytometri. Av disse ble samtlige klassifisert som maligne. I denne store undersøkelsen er sensitivitet, spesifisitet og andelen av konklusive analyser vesentlig høyere for bildecytometri.

Et annet arbeid som klart viser de nevnte forskjeller på væskestrømscytometri og bildecytometri ble publisert av Alanen og medarbeidere (13). I en serie på 286 tilfeller av brystkreft opprinnelig analysert med væskestrømscytometri var 100 diploide. Av disse hadde 14 pasienter dårlig prognose (død mellom 11 – 84 måneder etter diagnose). Disse ble sammen med 19 pasienter med diploide svulster og med god prognose analysert blindt på nytt med bildecytometri. Man fant da at svulstene hos 11 av 33 pasienter var aneuploide. Av disse 11 var ni blant de 14 med dårlig prognose og kun to blant de 19 med god prognose.

I en rekke studier sammenliknes DNA-ploidieresultater etter FCM- og ICM-undersøkelser av neoplasier. I 29 studier hvor dette sammenliknes direkte, fant vi en gjennomsnittlig overensstemmelse for de to teknikkene i DNA-ploidiklassifisering på 81,6 %. Nær samtlige studier konkluderer med at bildecytometri er en mer spesifikk og sensitiv metode. Bildecytometri har typisk 10 – 20 % flere aneuploide funn enn væskestrømscytometri, samtidig som flere studier indikerer at væskestrømscytometri også kan ha falskt aneuploide funn. Karakteriseringen av falskt positive og falskt negative funn baseres dels på funn i normale og benigne prøver (2 – 4), dels i forhold til andre markører (5 – 11), og endelig i forhold til kjent sykdomsforløp (12 – 17). Forskjellen i analyseresultater kan ha flere årsaker. En meget viktig faktor er at man med

bildecytometri har en visuell morfologisk kontroll med hvilke celler som analyseres, noe som sikrer analysens spesifisitet (fig 3). Ved FCM-undersøkelser skiller man vanligvis ikke mellom f.eks. en svulsts epiteliale celler og celler fra omliggende bindevev eller blod. Dette kan gjøres ved såkalt topameteranalyse med samtidig måling av DNA og f.eks. antistoffer mot cytokeratin, men dette gjøres sjelden i kliniske undersøkelser. En konsekvens av dette er at væskestrømscytometri kan gi et falskt negativt svar (diploid eller euploid) i prøver hvor andelen av aneuploide celler er relativt liten. Et ekstremt eksempel er undersøkelser av lymfeknuter, hvor væskestrømscytometri ofte gir falskt negative (diploide) funn fordi prøven domineres av normale lymfocytter. FCM-an

alyser kan også ha problemer med cellefragmenter og/eller -klumper, noe som gir måleresultater med en større bakgrunnsstøy enn bildecytometri. Igjen kan dette føre til at små aneuploide populasjoner ikke påvises. Det er som nevnt også rapportert om falskt positive (aneuploide) funn med væskestrømscytometri. Dette er spesielt aktuelt ved undersøkelser av materiale fra innstøpte blokker hvor det kan være problematisk å tilsette eksterne kontrollceller (celler med kjent DNA-ploid). Ved tilsvarende ICM-undersøkelser benytter man seg av interne kontrollceller (lymfocytter, plasmaceller), noe som gir en sikker angivelse av posisjonen for diploide celler i DNA-histogrammet. Dette forutsetter at cellene som analyseres ved bildecytometri klassifiseres eller kontrolleres manuelt av patologer, cytoscreenere eller annet trent personell. Dette medfører at ICM-undersøkelser er noe mer tidkrevende enn enparameter-FCM, men resultatene er i en del studier så vidt mye bedre at tidsbruken kan forsvares, spesielt når analysene skal benyttes i forbindelse med diagnostikk og/eller prognostisering. I en nylig avsluttet retrospektiv studie av epiteliale ovarialkarsinomer, stadium 1, har vi vist at korrelasjonen mellom FCM- og ICM-målinger utført på kjernesuspensjoner fra samme prøveblokk ikke var bedre enn 68 %. Når disse resultatene blir vurdert opp mot pasientenes overlevelse, fremgår det at bildecytometri gir vesentlig bedre prognostisk informasjon enn væskestrømscytometri (fig 4), med relativ risiko for pasienter med aneuploide prøver klassifisert med væskestrømscytometri på 4,0, sammenliknet med 11,5 for pasienter med aneuploide prøver klassifisert med bildecytome

tri (G.B. Kristensen og medarbeidere, personlig meddelelse).

#### DNA-ploidi ved cancer prostatae

Det er publisert om lag 400 arbeider som tar for seg DNA-ploidi som diagnostisk og prognostisk markør ved cancer prostatae. Vi skal hovedsakelig ta for oss de studiene som har benyttet bildecytometri som analysemetode.

I 1994 publiserte Adolfsson et arbeid hvor 44 av i alt 115 gjennomgåtte artikler om cancer prostatae omhandler DNA-ploidianalyser ved denne sykdommen (31). Han konkluderte med at DNA-ploidi har prognostisk utslagskraft i univariate analyser, men er mindre viktig når man samtidig vurderer histologisk grad og klinisk stadium. Disse resultatene er imidlertid hovedsakelig fra pasienter med avansert sykdom.

Etter dette er det publisert en rekke arbeider basert på bildecytometriske DNA-ploidianalyser av lokalisert cancer prostatae hos pasienter hvor radikal prostatektomi er primær behandling. Av de arbeidene vi har gjennomgått (32 – 39) inngår i alt 543 pasienter, og alle åtte studier viser at DNA-ploidi bedømt ved bildecytometri er en klar prognostisk markør for denne pasientgruppen, vurdert opp mot sykdomsfri eller total overlevelse. To arbeider basert på bildecytometri er publisert i 1999. Ross og medarbeidere (40) analyserte DNA-ploidi i nålebiopsier fra 111 menn behandlet med radikal prostatektomi og fant at i multivariatanalyse var DNA-ploidundersøkelser det eneste som kunne forutsi senere tilbakefall av sykdommen. I en studie (41) av 108 pasienter med lokal eller avansert sykdom, hvor «salvage» radikal prostatektomi var utført etter mislykket forsøk på kurativ behandling, fant man at DNA-ploidi var den beste prognostiske faktor, både for kreftspesifikk og sykdomsfri overlevelse.

I kun e...n nyere studie (42), hvor prostatabiopsier fra 244 pasienter behandlet med radikal prostatektomi ble undersøkt, vises det at DNA-ploidi ikke er en selvstendig prognostisk markør. Studien konkluderte med at kun Gleason-sum og patologisk T-stadium var statistisk signifikante markører.

Tavares og medarbeidere fant allerede i 1966 (18) at DNA-ploidi kunne korreleres til prognose for pasienter med kreft i prostata. Studier i 1970- og tidlig i 1980-årene bekreftet disse funnene (19 – 22), og i slutten av 1980-årene var dokumentasjonen så overbevisende at en rekke institusjoner, særlig i USA, inkluderte DNA-ploidi i klinisk rutine ved cancer prostatae. Lieber & Cheng (23) konkluderte i en oversiktsartikkel fra 1991 med at målinger av DNA-innhold i tumorkjerner gav mest informasjon om en tumors biologiske potensial, og at avgjørelser vedrørende adjuvant behandling i stor grad styres av DNA-ploidiklassifikasjon. De avsluttet med en generell anbefaling om at DNA-ploidianalyser bør benyttes rutinemessig for cancer prostatae. Rainwater & Zincke (24) og Gee (25) kom til tilsvarende konklusjoner året etter. I en studie av 100 pasienter med adenokarsinom i prostata uten tegn til spredning, fant Ross og medarbeidere (26) at det senere kunne påvises regionale metastaser (D1) eller fjernmetastaser (D2) i 36 av pasientene. Ved bildecytometrisk DNA-ploidiuundersøkelse av de 100 adenokarsinome fant man 36 aneuploide tilfeller. Av disse fikk 32 pasienter senere påvist metastaser. I 1993 kom ytterligere tre oversiktsarbeider som inkluderer studier med begge metoder (væskestrømscytometri og bildecytometri). Visakorpi og medarbeidere (27) har gått gjennom studier med DNA-ploidi, 35 arbeider med væskestrømscytometri og 12 arbeider med bildecytometri. De har undersøkt hvorvidt det er korrelasjon mellom aneuploide funn og klinisk-patologisk og/eller prognostiske data fra pasienter med kreft i prostata. 14 av arbeidene basert på væskestrømscytometri omhandler aneuploidi relatert til klinisk stadium, og i ti av arbe

idene observerte man en positiv korrelasjon. I 24 av arbeidene basert på væskestrømscytometri foreligger det data om histopatologisk gradering, og 19 av disse viser en positiv korrelasjon mellom aneuploidi og histologisk gradering. Det er sett på sykdomsfri eller total overlevelse i 21 av FCM-arbeidene og i kun ett av disse har man ikke funnet en signifikant korrelasjon mellom aneuploidi og overlevelse. Ytterligere tre studier fant ingen signifikant korrelasjon mellom aneuploidi og total overlevelse, men derimot mellom aneuploidi og sykdomsfri overlevelse. I de 12 studiene med bildecytometri var det fire studier med informasjon om klinisk stadium, og alle viste en signifikant korrelasjon til aneuploidi. Videre viste seks studier signifikant korrelasjon med histologisk gradering. I åtte studier av korrelasjon mellom overlevelse og DNA-ploidi, viste kun ett arbeid en ikke-signifikant korrelasjon mellom aneuploidi og overlevelse. Det er verdt å merke seg at denne studien (28) omhandlet avanserte stadier av cancer prostatae. I en konsensusrapport om klinisk bruk av DNA-ploidi i cancer prostatae (29) konkluderes det med at DNA-ploidundersøkelser er av avgjørende betydning for pasienter med sykdom lokalisert til prostata, for å kunne identifisere de pasienter som vil kunne dra nytte av adjuvant behandling. Det hevdes også i samme rapport at væskestrømscytometri er den beste metoden for å bestemme DNA-indeks i ikke-diploide populasjoner, mens bildecytometri påviser aneuploide populasjoner som oversees i væskestrømscytometri. Anbefalingen er derfor at begge metoder bør benyttes i kliniske undersøkelser. En WHO-konsensuskonferanse om klinisk bruk av DNA-ploidimålinger i cancer prostatae i Stockholm samme år (30) konkluderer med at DNA-ploidi bør

utredes for lokalisert cancer prostatae, spesielt dersom det kan være aktuelt å avvente adjuvant behandling. Det er enighet om at aneuploide svulster må forvente å gi dårlig respons på både stråling og endokrin terapi, og det anbefales videre at DNA-ploidiuundersøkelser må inngå i alle kliniske forsøk på nye behandlingsformer for cancer prostatae.

#### DNA-ploidi og histologisk gradering

I mange av studiene referert ovenfor vises det at histologisk gradering etter Gleasons system (43) har selvstendig prognostisk verdi. Som anført ovenfor er DNA-ploidi og histologisk grad ofte signifikant korrelert (27, 31). En del studier (26, 34, 38, 39) oppgir at både Gleason-gradering og

DNA-ploidi er uavhengige prognostiske faktorer i multivariatanalyser. Ingen av disse arbeidene hadde benyttet relativ risiko eller andre beregninger som eventuelt kunne ha differensiert mellom histologisk grad og DNA-ploidi. Et arbeid (37) som omfattet 112 pasienter med cancer prostatae, viste at Gleason-gradering hadde størst prognostisk betydning når man vurderte hele materialet under ett. Så man imidlertid på de lavgradige karsinomene (Gleason-sum 6 og lavere) gav DNA-ploidi mest prognostisk informasjon.

Ross og medarbeidere har publisert tre artikler som vurderte DNA-ploidi som prognostisk faktor. I ett arbeid (35) har de undersøkt DNA-ploidi bedømt bildecytometrisk og Gleason-skåre i nålebiopsier, og fant at kun DNA-ploidi gav uavhengig prognostisk informasjon vurdert opp mot sykdomsfri overlevelse. I et annet arbeid (33) har de vurdert finnålsbiopsier og operasjonspreparat etter radikal prostatektomi fra 89 pasienter. De fant full korrelasjon mellom DNA-ploidianalyser ved begge prøvetyper, og DNA-ploidi er også her en klar prognostisk faktor vurdert i forhold til sykdomsfri overlevelse. De fant ikke signifikant korrelasjon mellom de to prøvetypene med hensyn til Gleason-gradering. I 1999 gjentok de delvis dette forsøket, denne gang med 111 pasienter og med DNA-ploidi kun for nålebiopsier (40). I dette arbeidet fremgår at de har benyttet den opprinnelige graderingen utført av 12 forskjellige patologer ved avdelingen, og har altså ikke, slik som i de fleste andre studier av denne type, latt én eller et fåtall patologer revurdere alle tilfellene under ett. De grupperte de opprinnelige Gleason-skåre i lavgradig (2 – 6) eller høygradig (7 – 10) for begge prøvetyper, og fant at denne graderingen ble endret i 34 % av de 111 tilfellene fra nålebiopsi til operasjonspreparat. De fant videre at tilbakefall av sykdom hos pasientene kan forutsies av DNA-ploidi og gradering av operasjonspreparatene, men ikke av gradering fra nålebiopsier. I multivariatanalysen er det kun DNA-ploidistatus bedømt ved bildecytometri, som gir uavhengig prognostisk informasjon i forhold til sykdomsfri overlevelse.

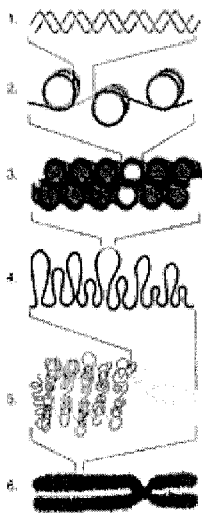
#### DNA-ploidi som prognostisk markør

På tross av overbevisende dokumentasjon for DNA-ploidi som selvstendig prognostisk markør, er det fortsatt slik at kun serum-PSA, klinisk stadium og histologisk grad er de eneste diagnostiske og prognostiske markører som er universelt akseptert for cancer prostatae. Serum-PSA er en meget viktig diagnostisk markør, mens den i prognostisk sammenheng kan være svært usikker. Klinisk stadium er likeledes en meget viktig prognostisk markør, men pasienter med samme kliniske stadium kan som kjent ha høyst forskjellige sykdomsforløp. Histologisk gradering er på sitt beste av udiskutabel verdi, men er subjektiv, og derfor beheftet med så vel inter- som intraobservatorvarians. Dette er sannsynligvis et større problem enn mange er klar over (44, 45). Når det gjelder Gleason-gradering, er det dokumentert intraobservatorvarians på over 90 %, med kappaverdier fra 0,16 til 0,29 (1 er full enighet, 0 er full uenighet) (46)! Gleason-gradering angis til 2 – 10, og det er først når man slår sammen flere verdier i færre grupper at man kan forvente en rimelig overensstemmelse mellom patologer. Lessels og medarbeidere viste i en studie (47) som involverte 12 patologer og 100 biopsier at de oppnådde en kappaverdi på 0,54 dersom Gleason-skåre ble delt inn i to grupper (2 – 6 og 7 – 10) og en kappaverdi på 0,41 ved inndeling i tre grupper (2 – 4, 5 – 6, 7 – 10). Så selv om man i retrospektive studier viser at f.eks. gradering i henhold til Gleason er en viktig prognostisk markør må man anta at kvaliteten og verdien av gradering i rutinediagnostikk kan være variabel.

Behovet for å innføre nye prognostiske markører ved cancer prostatae er derfor åpenbart til stede, og DNA-ploidi synes å være et opplagt valg ved lokalisert sykdom. ICM-analyser av DNA-ploidi er en lett tilgjengelig metode. Prepareringsmetoden er enkel og kan lett etableres ved ethvert patologilaboratorium. Utstyr for måling og analyse er kommersielt tilgjengelig fra en rekke leverandører, og krever minimalt med ressurser. Ønsker man ikke å utføre analysen selv, kan DNA-ploidiundersøkelse bestilles fra så vel offentlige som kommersielle laboratorier. I Norge er DNA-ploidianalyser inkludert i det ordinære takst- og refusjonssystemet.



## Nukleotyping



**Figur 5** Skjematisk fremstilling av de ulike nivåer i DNA-organiseringen. DNA-dobbeltheliks (1.) med lengde på 160 basepar er tvunnet to ganger rundt histoner og danner nukleosomer (2.). Nukleosomene danner fibrer som danner løkker med seks histoner som blir et solenoid (3.). Solenoidene danner DNA-løkker (4.) som er festet til kjernematriks. Ved høyere ordens folding dannes interfasekromatin (5.), som i metafase fremstår som kromosomer (6.)

Celledeling, vekst, utvikling og differensiering reguleres av spesifikke komplekser av protein og DNA i cellekjernen. DNA er organisert rundt histonkomplekser, og ikke-histonproteiner er sentrale aktører i DNA-transkripsjon, -replikasjon, -rekombinasjon og -reparasjon. Den grunnleggende strukturelle organiseringen av disse kompleksene i nukleosomer og kromatinfibrer er kjent (fig 5), men vi vet lite om den høyere organiseringen i kromatin og kromosomer (48). Imidlertid er en rekke forskjeller i kromatinstruktur i ulike celler og vev synlig i mikroskopet, og de fenotypiske forskjeller som fremkommer på grunn av forskjeller i kromatinstruktur er åpenbare. Kjerneatypi er tradisjonelt en av de viktigste parametere for diagnostikk og prognostisering, og nukleotyping er en metode som kartlegger og beskriver kromatinstrukturen ved hjelp av digital bildeanalyse. Metoden er i hovedsak basert på teksturanalyser, og identifiserer både visuelle og subvisuelle egenskaper i kromatinstrukturen. For diagnostikk og prognostisering kartlegger man en gruppe egenskaper for hver enkelt celletype, vevstype eller kreftform, og disse egenskapene utgjør da den enkelte grupperings nukleotype. I praksis gjøres dette ved at man benytter et såkalt treningssett med celler fra vev eller svulster med kjent funksjon eller kjent klinisk forløp. Dette kan være celler fra svulster fra to grupper pasienter med henholdsvis god og dårlig prognose. Man identifiserer de egenskaper i kromatinstrukturen som beskriver reproducerbare forskjeller mellom de to gruppene, og benytter disse som en prognostisk nukleotype. Man kan identifisere et nærmest ubegrenset antall egenskaper fra kromatinstrukturen i en kerne, avhengig av oppløsning og metodevalg. Utfordringen består i å velge et lite antall riktige egensk

aper som med størst mulig nøyaktighet beskriver den enkelte gruppe og samtidig er klart forskjellig i de gruppene som skal undersøkes. Egenskapene velges dels ved hjelp av statistiske metoder (49), og dels på grunnlag av en cellebiologisk forståelse av hva egenskapene beskriver.

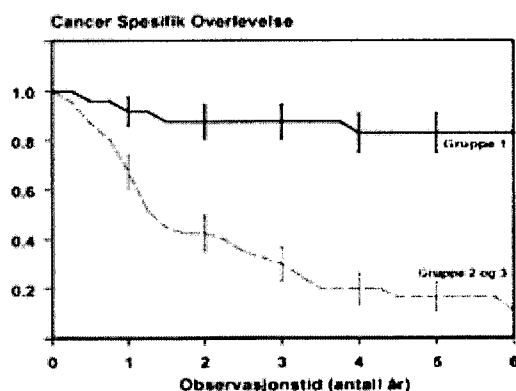
#### Kromatinstruktur og nukleotyping i cancer prostatae

Kromatinstruktur er hyppig undersøkt i en rekke vevstyper og kreftformer, og er vist å ha så vel diagnostisk (50 – 54) som prognostisk (55 – 58) betydning, også i cancer prostatae (59 – 77). En grov egenskap som kjernens form er gjentatte ganger dokumentert å være en meget god prognostisk markør (78 – 81). Narayan og medarbeidere viste i 1989 at i tillegg til formfaktor

hadde også kjernens areal og omkrets signifikant prognostisk verdi. En kombinasjon av disse morfologiske egenskapene viste høyere prediktiv verdi enn blant annet DNA-ploidi og Gleason-gradering (59). Det er derfor ikke overraskende at mer sofistikerte analyser av kjerne-kromatinet gir prognostisk informasjon i cancer prostatae (65 – 67, 69, 72, 75). Imidlertid må man være oppmerksom på at ukritisk bruk av eksempelvis teksturanalyser lett kan gi falskt positive resultater. Dersom man anvender et tilstrekkelig stort antall egenskaper på materiale fra et lite antall pasienter vil man stort sett alltid få «signifikante» forskjeller mellom to definerte grupper (49). Positive resultater må derfor alltid verifiseres på et nytt uavhengig datasett. Dette er dessverre ikke dokumentert i et flertall av de studiene som er referert ovenfor (65, 67, 69, 72).

Christen og medarbeidere har vist at kromatinteksturanalyser kan brukes til klassifisering av prostatahyperplasi versus karsinom. Dessuten kan kromatinteksturanalyser av karsinomer brukes til prognostisk klassifisering som samsvarer med histologisk gradering i henhold til Mostofi (66). I et treningssett bestående av fem hyperplasier og 15 karsinomer (fem av hver Mostofi grad I-III) analyserte de 20 ulike teksturegenskaper. De ti egenskapene som gav best klassifisering av de fire gruppene ble så anvendt på et testmateriale av 20 nye prøver. I testmaterialet oppnådde de en gjennomsnittlig korrekt klassifikasjonsrate på 93 % (66).

Vi har utviklet en gruppe nye teksturestimatører basert på en såkalt entropimatrise (grey level entropy matrix), egenskaper som gir et kvantitativt uttrykk for kromatinorganiseringen (73). Disse nye egenskapene er blant annet blitt testet ut på et materiale fra 77 pasienter med avansert cancer prostatae med spredning til skjelettet (74). Materialet ble inndelt i to klare prognosegrupper med henholdsvis god (30 pasienter med påvist remisjon og ingen tegn til progrediering innen tre år etter behandling) og dårlig prognose (36 pasienter med progrediering og død av cancer prostatae innen to år). I tillegg hadde vi 11 pasienter i en mellomgruppe med mindre avklart prognose (stabil sykdom eller remisjon i første år etter behandling, deretter progrediering i annet og tredje år med påfølgende død). Vi har tidligere vist at verken histologisk gradering (med både WHO- og Gleason-klassifikasjonssystemer) eller DNA-ploidi kan skille mellom de to prognosegruppene (82). I et treningssett bestående av ti pasienter fra hver av prognosegruppene fant vi at fire ulike entropiegenskaper kunne klassifisere disse to gruppene med 95 % nøyaktighet. De samme egenskapene ble så testet blindt ved å klassifisere 57 pasienter, og vi oppnådde da en korrekt klassifikasjonsrate på 87 %. Som det også fremgår av overlevelsedataene (fig 6), er teksturanalyse av kromatinstruktur en meget god prognostisk markør for pasienter med avansert kreft i prostata. Ved multivariatanalyse har vi vist at dette er den klart beste prognostiske markør for denne pasientgruppen (83).



**Figur 6** Kreftspesifikk overlevelse for 77 pasienter med avansert prostatakreft. Gruppe 1: Påvist remisjon og ingen tegn til progrediering tre år etter behandling (n = 30). Gruppe 2: Progrediering og død av prostatakreft innen to år (n = 36). Gruppe 3: Pasienter med stabil sykdom eller remisjon i første år etter behandling, deretter progrediering med påfølgende død, etter to år (n = 11). Ved hjelp av nukleotyping oppnås signifikant forskjell i kreftspesifikk overlevelse mellom gruppe 1 og