

Ki-67 som prognostisk markør for prostatakreft

Betydningen av proliferasjonsraten til prostatakreftceller målt ved bruk av Ki-67

—

Ingeborg Marie Movik

MK-11

MED-3950 Medisin 5.-årsoppgave – Profesjonsstudiet i medisin ved Universitetet i Tromsø

Medisinsk fakultet,

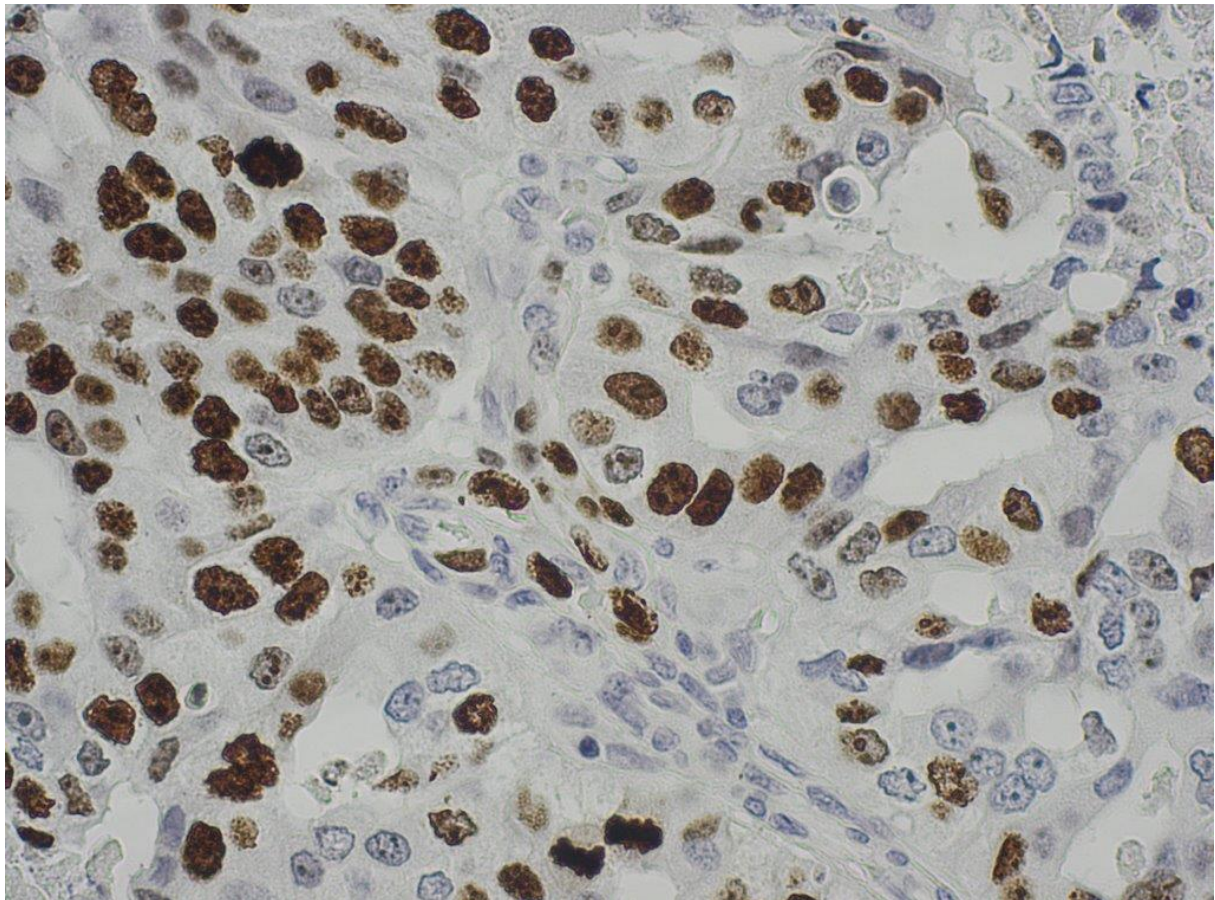
Institutt for Medisinsk Biologi,

Translasjonell Kreftforskningsgruppe

Veileder: Elin Richardsen

Biveileder: Lill-Tove Busund

Tromsø 2016



Innholdsfortegnelse

1	Forkortelser	4
2	Nøkkelord	5
3	Introduksjon	6
3.1	Insidens, prevalens og mortalitet av prostatakraft	6
3.2	Screening for prostatakraft	9
3.3	Behandling av prostatakraft	10
3.4	Normal anatom, fysiologi og histologi	11
3.5	Utvikling av prostatakraft	14
3.5.1	Prostatakraft.....	14
3.5.2	Risikofaktorer for å utvikle prostatakraft	17
3.5.3	Forebygging	18
3.5.4	Risikogrupper.....	19
3.6	Diagnostikk	20
3.6.1	Utredning og diagnose.....	20
3.6.2	Prostataspesifikt antigen (PSA).....	20
3.6.3	TNM-klassifisering	21
3.6.4	Gleason score	22
3.6.5	Immunhistokjemi (IHC).....	25
3.7	Proliferasjonsmarkøren Ki-67	27
3.7.1	Ki-67	27
3.7.2	Ki-67 som prognostisk markør for prostatakraft	30
4	Materiale og metode	31
4.1	Materialet	31
4.1.1	Pasienter.....	31
4.1.2	Scoringssystemet	32
4.2	Metoder	33
4.2.1	H&E-farging av histologiske snitt.....	33
4.2.2	Vevsmatriser (TMA, Tissue Microarray)	34
4.2.3	Ki-67 farging.....	34
4.2.4	Scoring	35
4.2.5	Statistikk	36
5	Resultat.....	37
5.1	Korrelasjonsanalyser.....	37
5.2	Univariat analyser	37

5.3	Multivariate analyser.....	42
6	Diskusjon	43
7	Konklusjon	46
8	Referanser	47
9	Vedlegg.....	53

Formålet med oppgaven

Jeg har lenge vært interessert i onkologi (kreftmedisin), spesielt de molekylære mekanismene bak utviklingen av ulike krefttyper, og hvilke konsekvenser molekylære markører kan ha for diagnostikk og behandling. I den forbindelse tok jeg kontakt med Translasjonell Forskningsgruppe ved Institutt for Medisinsk Biologi som studerer molekylære markører i vev fra kreftsvulster som har betydning for kreftutviklingen. Jeg fikk da tildelt et prosjekt og veiledere fra denne forskningsgruppa. Prosjektet er en translasjonell studie hvor formålet er å undersøke den prognostiske betydningen proliferasjonsmarkøren Ki-67 har for pasienter med prostatakraft. Ki-67 uttrykker hastigheten av kreftcellenes deling. Tilstedeværelsen av denne markøren relateres til kliniske og patologiske opplysninger.

Om oppgaven

Prostatakraft er en av de vanligste kreftformene blant menn og en av de ledende årsakene til mortalitet i utviklede land. Det er en heterogen krefttype som kan ha et uforutsigbart forløp påvist i tidlig stadium. Man mangler gode nok prognostiske verktøy for å vurdere hvilke menn som vil ha nytte av behandling for sin prostatakraft, og hvem som har gode leveutsikter uten. I flere studier har måling av proliferasjonsmarkøren Ki-67 med immunhistokjemi (IHC) vist en signifikant prognostisk verdi for utfallet av prostatakraft. I denne studien ønsker jeg å undersøke den prognostiske verdien av proliferasjonsmarkøren (hastighetsmarkøren) Ki-67 for pasienter med prostatakraft i forhold til ulike endepunkter av sykdommen. Jeg skal også se på hvordan Ki-67 korrelerer til de allerede veletablerte prognostiske variablene for prostatakraft. Innledningsvis vil jeg beskrive prostatakjertelen og

de ulike aspektene ved prostatakreft. Deretter vil jeg beskrive Ki-67 og oppsummere aktuelle funn fra studier. Avslutningsvis skal jeg sammenligne og drøfte mine egne funn med andre relevante studier, og diskutere eventuelle fordeler og ulemper med Ki-67 som prognostisk markør for prostatakreft.

Av faglitteratur har jeg benyttet "Richard L. Drake, A. Wayne Vogl, Adam W. M. Mitchell. Gray's Anatomy for students. Second ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2010", "John. E. Hall PD. Gyton and Hall Textbook of Medical Physiology. Twelfth ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2011", "Barbara Young, James S. Lowe, Alan Stevens, Heath JW. Wheater's Functional Histology, A text and Colour Atlas. Fifth ed: Churchill Livingstone Elsevier; 2011", Vinay Kumar, Abbas Abul K., Jon C Aster. Robbins Basic Pathology. Ninth ed. Philadelphia: Elsevier; 2013", "Michael Schuenke, Erik Schulte, Udo Schumacher. Atlas of Anatomy. Second ed. New York: Thieme Medical Publishers, Inc; 2009." Jeg har funnet aktuelle publikasjoner i stor grad gjennom medisinske søkebaser som PubMed og UpToDate. Jeg har også brukt Google Scholar til å finne aktuelle kilder som jeg så har søkt opp i de overnevnte medisinske databasene.

Resyme

Metode

Det ble laget vevsmatriser (TMA, tissue micro array) fra 535 pasienter med prostatakreft. Fra forhåndsmarkerte områder med epitelialt tumorvev, stromalt tumorvev, normale epitelceller og normale stromale celler ble det stanset ut vev for å lage 13 TMA-blokker.

Immunhistokjemi (IHC) ble benyttet for å visualisere kreftcellekjerner. Positive cellekjerner ble deretter talt opp og scoret etter et eget skjema.

Resultat

I univariate analyser var Ki-67 score i tumorvev signifikant prognostisk for biokjemisk svikt (BF, som var definert med en økning i PSA, prostataspesifikt antigen) ($p < 0,001$), og i tumorvev hvor forstadiet til prostatakraft (PIN, høygradig intraepitelial neoplasi) var ekskludert var Ki-67-score signifikant assosiert med biokjemisk svikt ($p < 0,001$) og klinisk svikt (CF) ($p = 0,018$). I multivariate analyser var høy Ki-67 score i tumorvev ekskludert PIN en selvstendig prognostisk faktor for biokjemisk svikt (Hazard ratio, HR: 1,8, 95% Konfidensintervall, KI: 1,14 – 2,84, $p = 0,011$). Ki-67-score i tumorvev hadde signifikant korrelasjon til Gleason grad ($p < 0,001$), tumorstørrelse ($p = 0,025$) og positiv apikal margin (ufri reseksjonsrand) ($p = 0,001$). I tumorvev hvor PIN var ekskludert var Ki-67 score korrelert til Gleason grad ($p < 0,001$) og positiv apikal margin ($p = 0,005$).

Konklusjon

Høy Ki-67 score i prostatakraftceller er en selvstendig, negativ prognostisk faktor for biokjemisk svikt. Ki-67 gir ytterligere prognostisk informasjon om hvor aggressiv en kreftsvulst i prostata er.

1 Forkortelser

Apikal PSM – Apikal positive surgical margin – positiv apikal reseksjonsrand

BF – Biochemical failure – biokjemisk svikt

CF – Clinical failure – klinisk svikt

EFS – Event free survival in months – hendelsesfri overlevelse i måneder

ER – Elin Richardsen

H – Hyperplasi

H&E – Hematoxylin og Eosin

HR – Hazard ratio

IHC – Immunhistokjemi

KI – Konfidensintervall

Kirurgisk pros – Kirurgisk prosedyre (type prostatektomi)

N – Normalt vev

n – Number – antall

NLSH – Nordlandssykehuset Bodø

NPV – Negativ prediktiv verdi

NS – Normalt stroma

PCD – Prostate cancer death – prostatakraft død

PIN – Prostata intraepitelial neoplasi (endring i prostata som kan bli kreft)

PNI – Perineural infiltrasjon

PPV – Positiv prediktiv verdi

Preop PSA – preoperativ PSA

PSA – Prostataspesifikt antigen

PSM – positive surgical margin – positiv kirurgisk reseksjonsrand

S – Tumorassosiert stroma

Sirkum. PSM – circumferent positive surgical margin – positiv circumferent reseksjonsrand

St. Olav – St. Olavs hospital/Trondheim universitetssykehus

T – Tumorepitel

UNN – Universitetssykehuset Nord-Norge

VI – Vaskulær infiltrasjon

2 Nøkkelord

Kreft

Kreftsykdom

Kreftsvulst

Prostatakreft

Immunhistokjemi

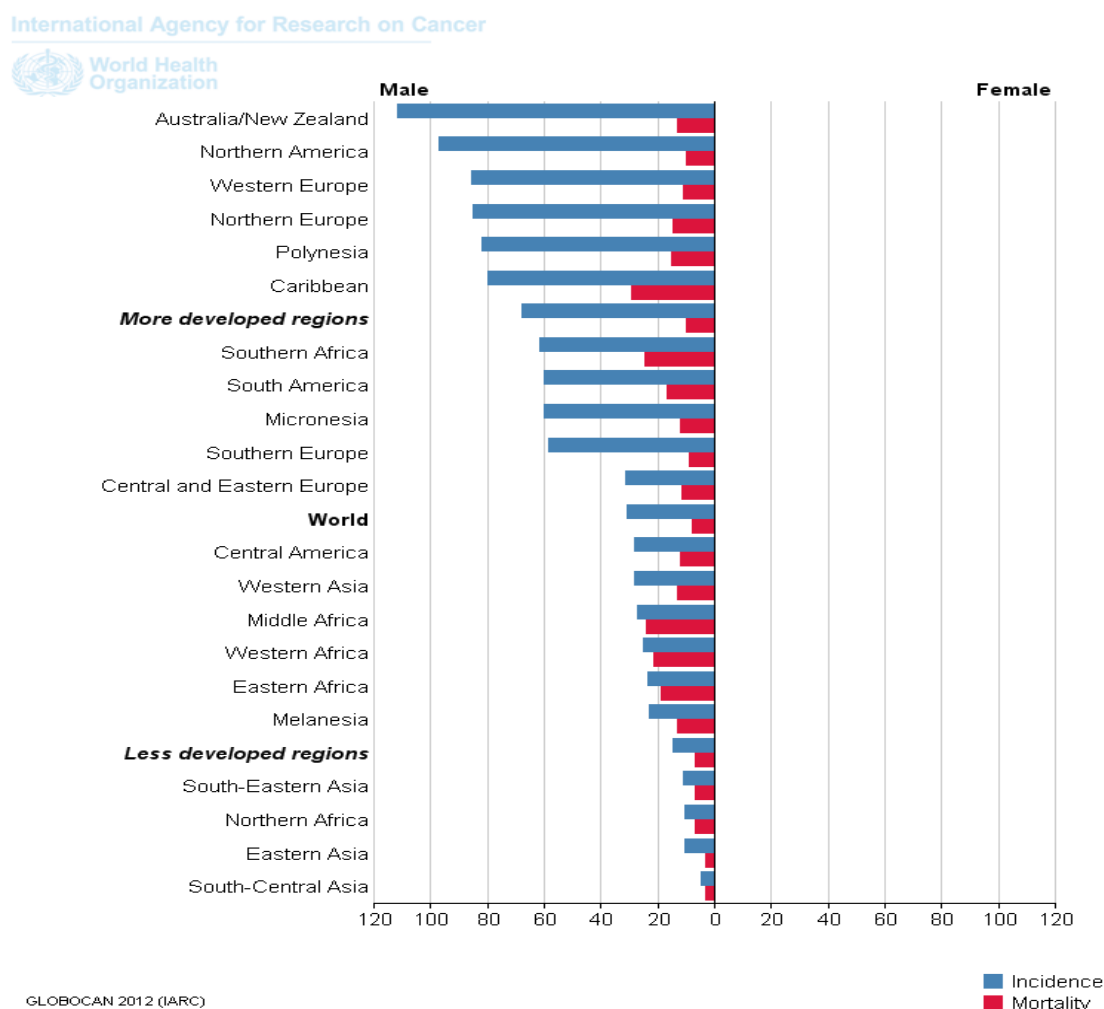
Proliferasjonsmarkør

Ki-67

3 Introduksjon

3.1 Insidens, prevalens og mortalitet av prostatakraft

I 2012 var den rapporterte insidensen av prostatakraft på verdensbasis 1,1 millioner, og ca. 70% av tilfellene var i mer utviklede land (Figur 1) (1). Prostatakraft er den andre mest vanligste kreftformen hos menn på verdensbasis, etter lungekreft (1, 2). I 2012 døde ca. 307.000 menn av prostatakraft, og prostatakraft er den femte største årsaken til kreftrelatert død blant menn (1).

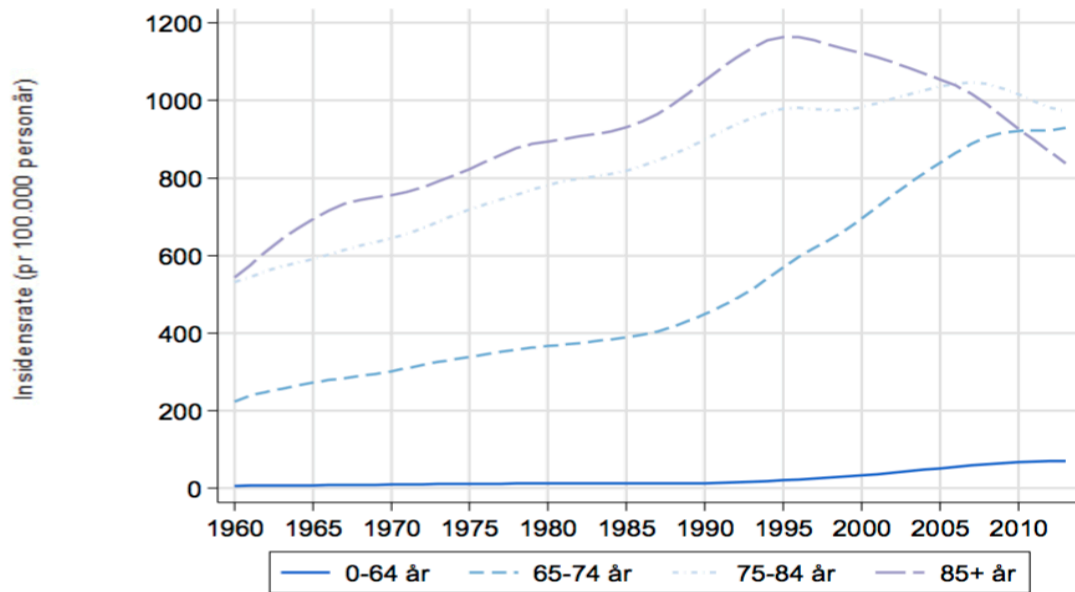


Figur 1: Estimerte aldersstandardiserte rater (verdensbasis) for prostatakraft per 100 000, WHO 2012 (1).

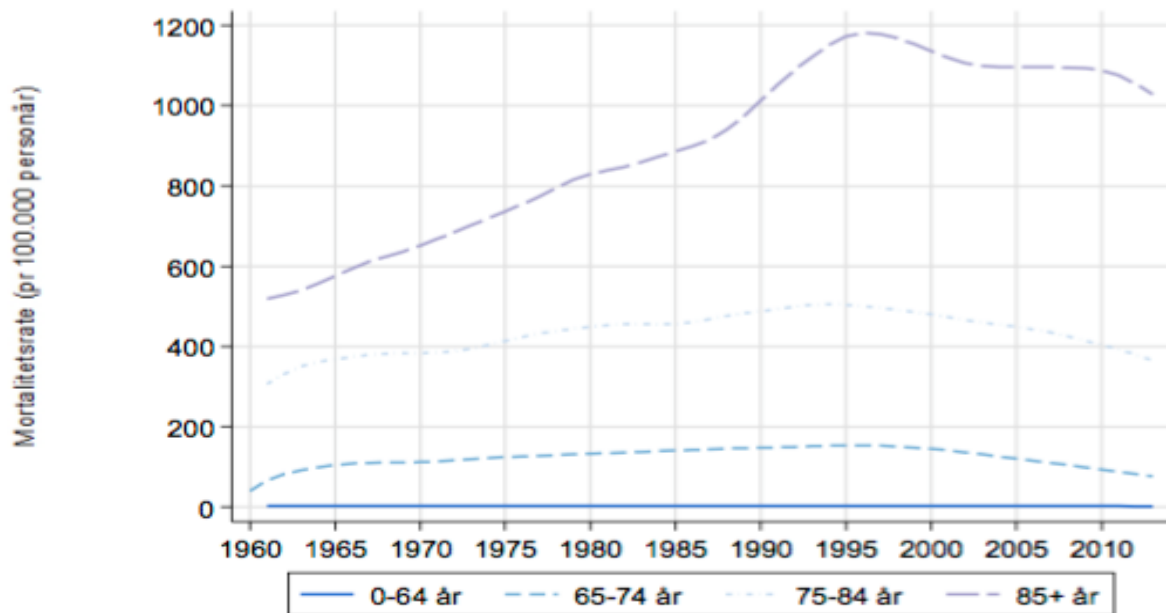
I Norge er prostatakraft den vanligste kreftformen blant menn. 5-års relativ overlevelse var i 1975-1979 54,5%, mens fra 2010-2014 var den 90,8%. Kumulativ risiko for å utvikle prostatakraft fram til 75 års alder var fra 2010-2014 14,3% (3, 4). Siden oppstarten av Prostatakraftregisteret i 2004 har det vært en stor økning i insidens og prevalens av prostatakraft i Norge, mens mortaliteten har gått ned på tross av økt antall nye tilfeller (Figur 2-4). Dette kan skyldes tidligere diagnostidspunkt, mer effektiv behandling, mange lever lenge med sykdommen, i tillegg til at man oppdager svulster som ikke nødvendigvis ville gitt sykdom.

År	Insidens	Mortalitet	Prevalens
2004	3854	1051	20364
2005	3709	1020	21885
2006	3899	1008	23657
2007	4450	1072	25835
2008	4435	1070	27948
2009	4382	1037	30006
2010	4249	1030	31869
2011	4974	1038	34447
2012	4914	996	37024
2013	4836	979	39358
Totalt	43702	10301	

Figur 2: Kreftregisteret 2015: Insidens, mortalitet og prevalens av prostatakraft. Norge 2004 – 2013 (4).



Figur 3: Kreftregisteret 2015: Insidensrater for prostatakraft per. 100 000 personår for aldersgruppene 0-64, 65-74, 75-84 og over 85 år. 1960-2013, Norge (4).



Figur 4: Kreftregisteret 2015: Mortalitetsrater for prostatakraft per. 100 000 personår for aldersgruppen 0-64, 65-74, 75-84 og over 85 år. 1960-2013, Norge (4).

3.2 Screening for prostatakraft

En økende andel symptomfrie menn gjennomgår PSA-testing, og dette bidrar til økningen i insidensen av prostatakraft. Hensikten med PSA-testing er å påvise prostatakraft i et tidlig stadium. Systematisk screening og tidlig påvisning av prostatakraft kan muligens redusere dødeligheten, men det er hittil ikke tilstrekkelig evidens for at totaloverlevelsen forbedres (5-7). Prostatakraft påvist i tidlig stadium kan ha et uforutsigbart forløp, og det kan være usikkert om svulsten vil gi symptomer som får betydning for pasientens helse og leveutsikter. Vi mangler fremdeles gode nok metoder for å vurdere hvilke menn som vil ha nytte av behandling for sin prostatakraft, og de som har like gode leveutsikter uten. Dette er bakgrunnen for eventuell overbehandling (6-8).

Behandlingen for prostatakraft har en betydelig risiko for varige bivirkninger (urinlekkasje, ereksjonssvikt, problemer med å kontrollere avføring) som kan gi redusert livskvalitet. Bivirkningene forekommer relativt hyppig (5, 8). Risiko for overdiagnostisering med unødvendig behandling og fare for bivirkninger gjør PSA-screening omstridt. Derfor anbefales ikke populasjonsbasert screening i Norge. Dette er i overensstemmelse med anbefalingene fra US Preventive Services Task Force og The European Association of Urology (EAU) (6). Det anbefales at beslutningen om å måle PSA tas i samråd med en lege etter en grundig samtale hvor pasienten informeres tilstrekkelig (5, 6, 8). Dersom menn med familiær opphopning av prostatakraft følges opp med målrettede undersøkelser, vil de sannsynligvis ha redusert risiko for å dø av sykdommen (6). Menn med risikofaktorer for prostatakraft bør informeres om PSA-prøve og testens mangelfullhet (Tabell 1) (6, 8).

Tabell 1: Norsk urologisk forenings anbefalinger for allmennleger. PSA-prøve (8).

Hvem bør anbefales PSA-prøve?	Tiltak
Menn med kjent risiko:	Disse mennene bør anbefales PSA-prøve årlig
Menn med 2 nære slektninger som har fått prostatakraft før fylte 60 år.	fra 40-50 års alder (10 år før yngste slektning fikk påvist kreftsykdom).
Menn med 3 nære slektninger som har fått påvist prostatakraft uansett alder.	Henvises til urolog ved PSA-verdi over referanseområde i flere påfølgende prøver, eller ved stigende PSA-verdier.
Menn med kjent forekomst av BRACA2 mutasjon i familien, eller med opphopning av brystkreft og/eller eggstokkreft i familien.	
Menn som etter informasjon om mulig overlevelsesgevinst med samtidig risiko for overdiagnostikk, som ønsker å få tatt PSA-prøve bør få tatt prøve.	Henvises til urolog ved PSA-verdi over referanseområde i flere påfølgende prøver, eller ved stigende PSA-verdier.

3.3 Behandling av prostatakraft

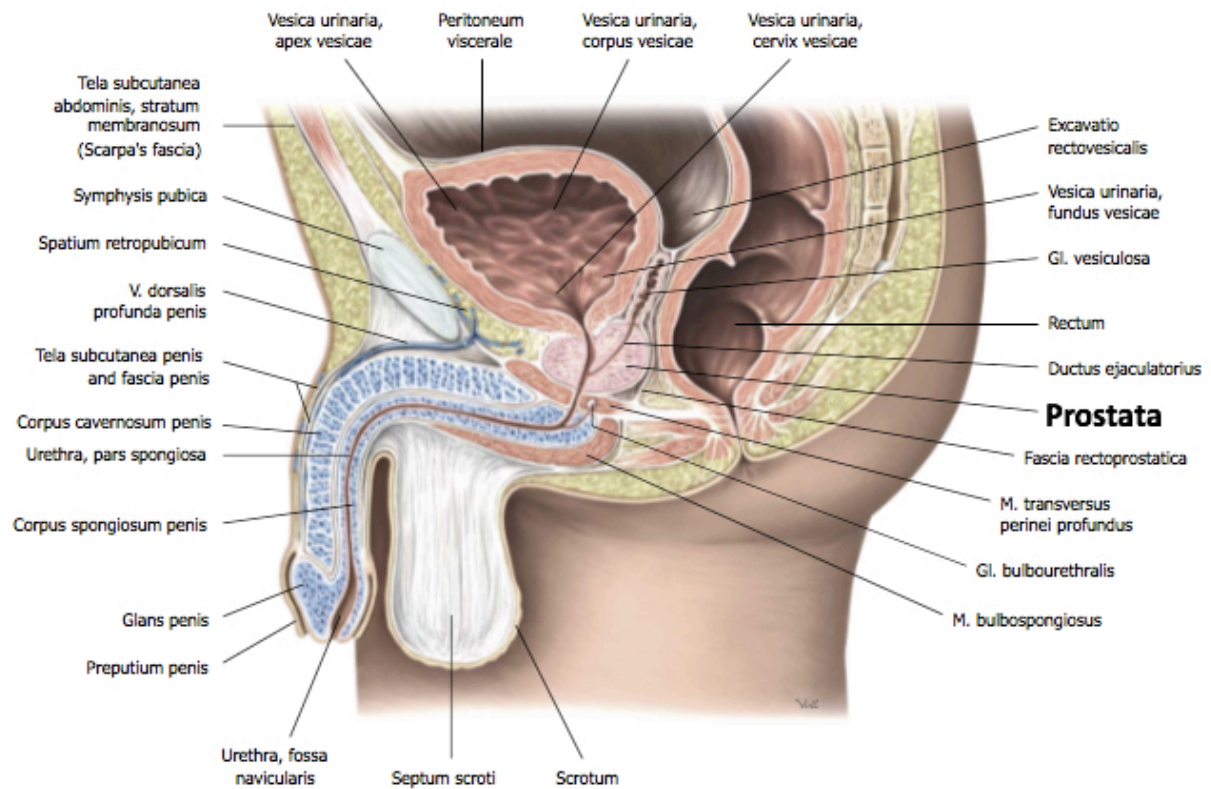
Ved prostatakraft har man per nå i hovedsak tre ulike behandlingsalternativer; 1. aktiv overvåkning, 2. radikal behandling (helbredende behandling) og 3. utprøvende behandling. Aktiv overvåkning er et godt alternativ for pasienter med lavrisiko kreft. Pasienten følger da jevnlig opp ved urologisk avdeling. Sykdommens utvikling monitoreres nøye, og helbredende

behandling iverksettes ved behov. Ved radikal behandling har man flere alternativer: kirurgisk fjerning av prostata (radikal prostatektomi), utvendig (ekstern) strålebehandling, innvendig strålebehandling (brachyterapi) eller en kombinasjon av disse, evt. med hormonbehandling. Utprøvende behandling omfatter ødeleggelse av kreftcellene enten med nedfrysning (kryoterapi) eller høy-intensiv ultralydbehandling gjennom endetarmen (HiFu). Cellegift gir forlenget overlevelse ved lindrende (palliativ) behandling. Valg av behandling baseres på pasientens sykkelighet, allmenntilstand, forventet levetid, pasientens egne forventninger til behandlingen, og vurdering av behandlingsnytte opp mot risiko for bivirkninger. I januar 2015 ble Pakkeforløp (et standard pasientforløp med utredning og behandling, ansvarsplassering og konkrete forløpstider) for prostatakraft innført i Norge (4, 6).

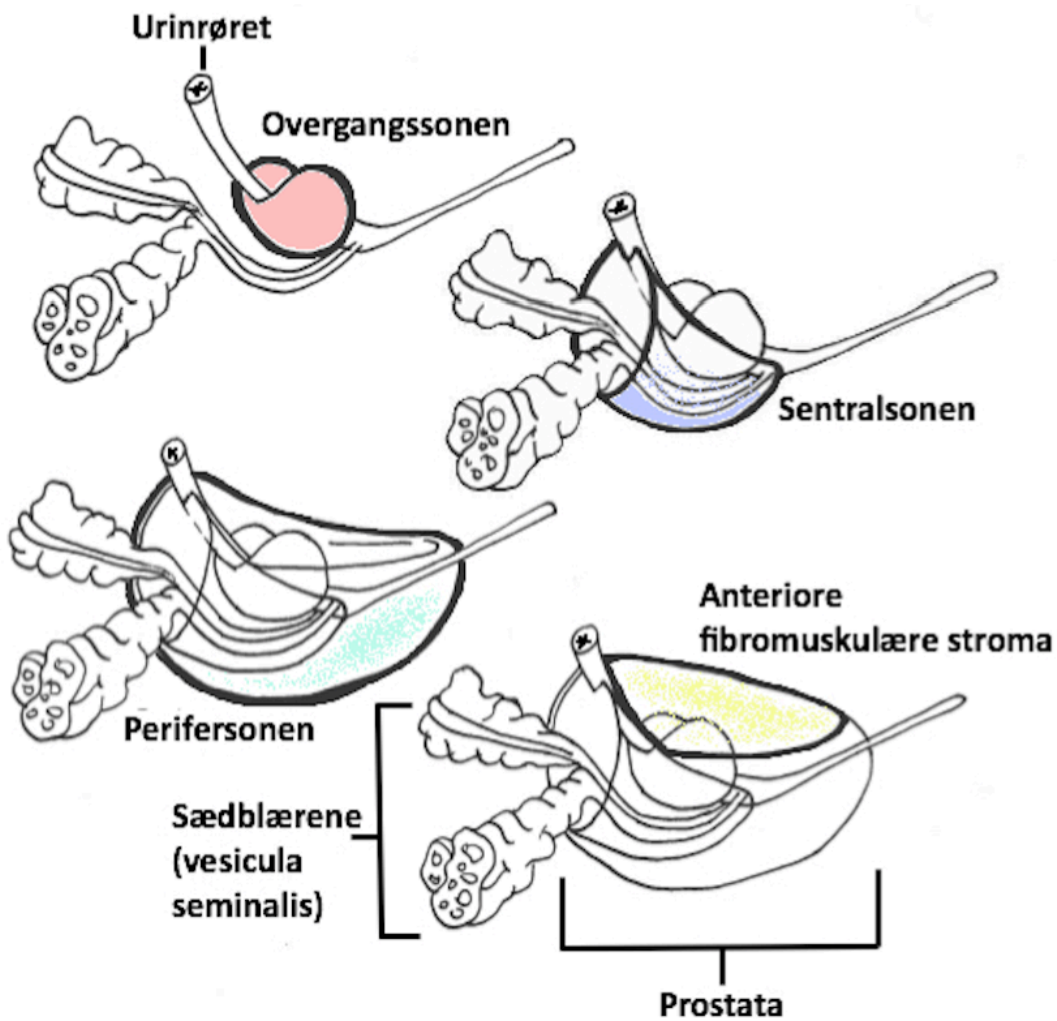
3.4 Normal anatom, fysiologi og histologi

Prostata er en del av mannens reproduktive system (Figur 5). Prostatakjertelen sekreterer en tynn, melkeaktig væske, og ved ejakulasjon blander denne væsken seg med sekretet fra de to sædkanalene (ductus ejaculatorii), og danner ejakulatet. Prostata deles inn i ulike soner; overgangssonen (ca. 5%), sentralsonen (ca. 20%), perifersonen (ca. 70%), og anteriore (fremre) fibromuskulære stroma (ca. 5%) (Figur 6). Denne inndelingen er viktig da de ulike delene ofte gir opphav til ulike sykdomstilstander. I tillegg har prostatakjertelen en lappeinndeling (Figur 7). Prostatakjertelen består av kjertler og stroma. Stromaet består av kollagenøst bindevev (fast vev) og glatte muskelfibre. Hoveddelen av epitelet i prostata er sekretorisk sylinderepitel med runde, prominente, basale kjerner og cytoplasma som farges blekt ved Hematoxylin og Eosin-farging (H&E-farging), og i kontakt med basalmembranen er

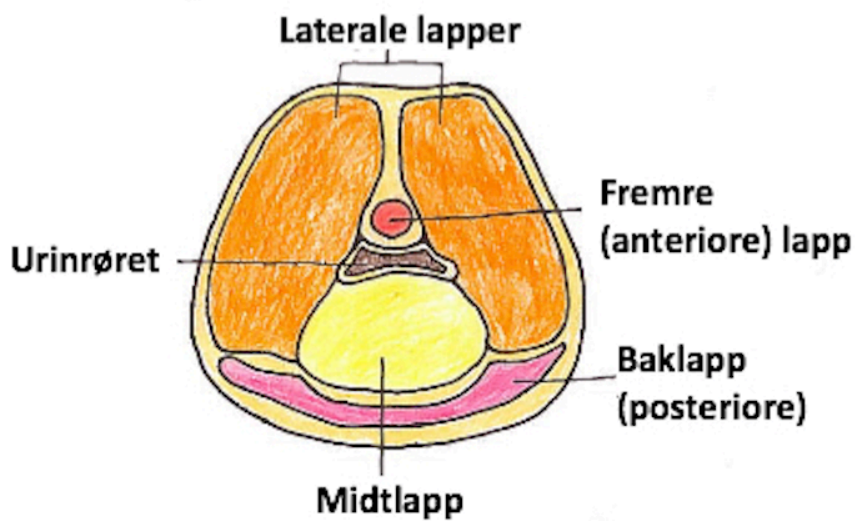
en liten populasjon av basalceller (Figur 8). Kjertlene har et komplekst mønster hvor epitelet ligger i folder, og kan ha en papille (finger-) -lignende struktur (Figur 8) (9-11).



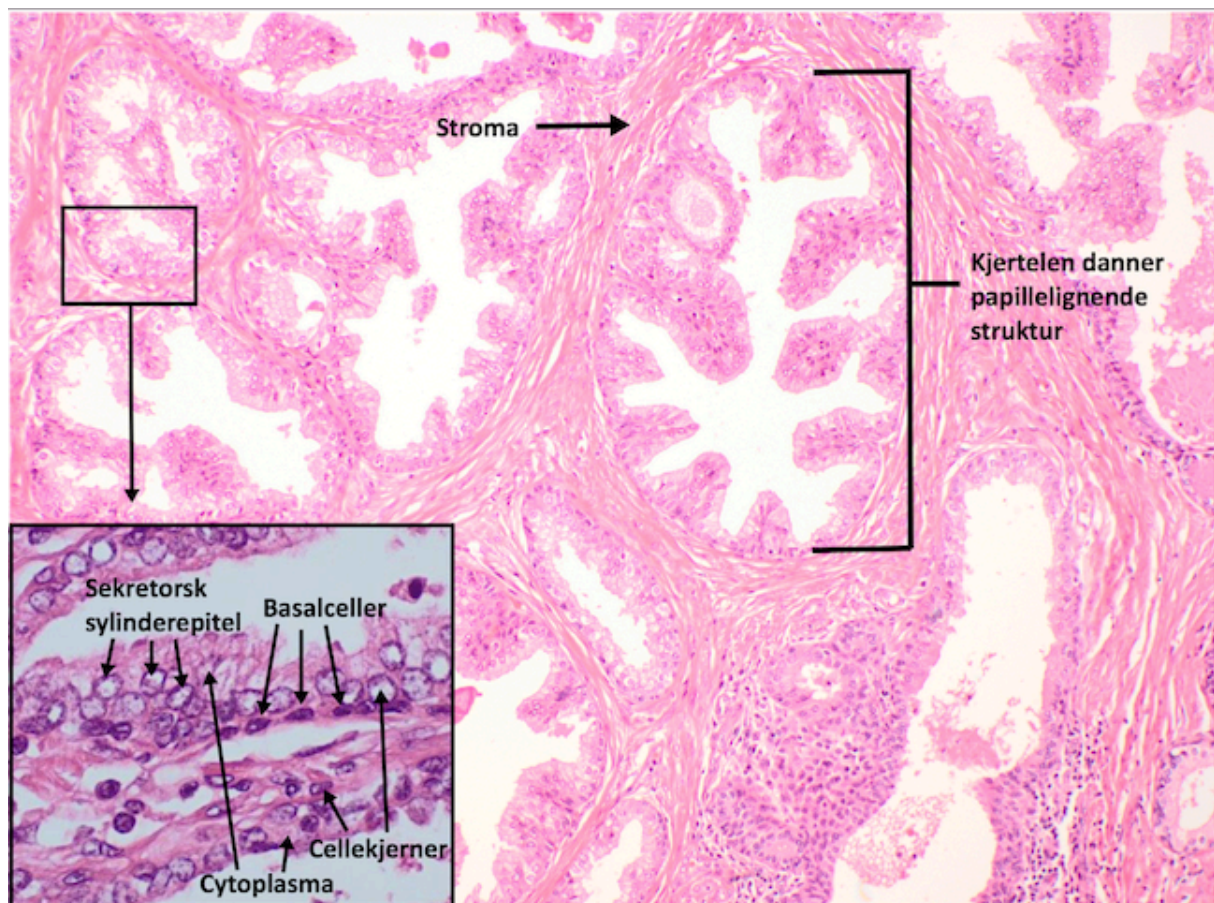
Figur 5: Prostatakjertelens plassering i bekkenet (12).



Figur 6: De ulike sonene i prostatakjertelen. (Ingeborg Marie Movik)



Figur 7: Prostatakjertelens lappeinndeling. (Ingeborg Marie Movik)



Figur 8: Bilde tatt via lysmikroskop. Normal prostatahistologi (normalt prostatavev). Bildet viser den papillelignende strukturen til kjertlene som ligger omgitt av stroma, samt sekretorisk sylinderepitel med runde, lyse cellekjerner omgitt av blekt cytoplasma, og basalceller med smalere og mørkere cellekjerner. (Ingeborg Marie Movik)

3.5 Utvikling av prostatakraft

3.5.1 Prostatakraft

De vanligste kreftsvulstene i prostata er adenokarsinomer, og utgår fra kjertelepitelet.

Omtrent 80% vokser multifokalt (det kan være flere større eller mindre kreftsvulster i

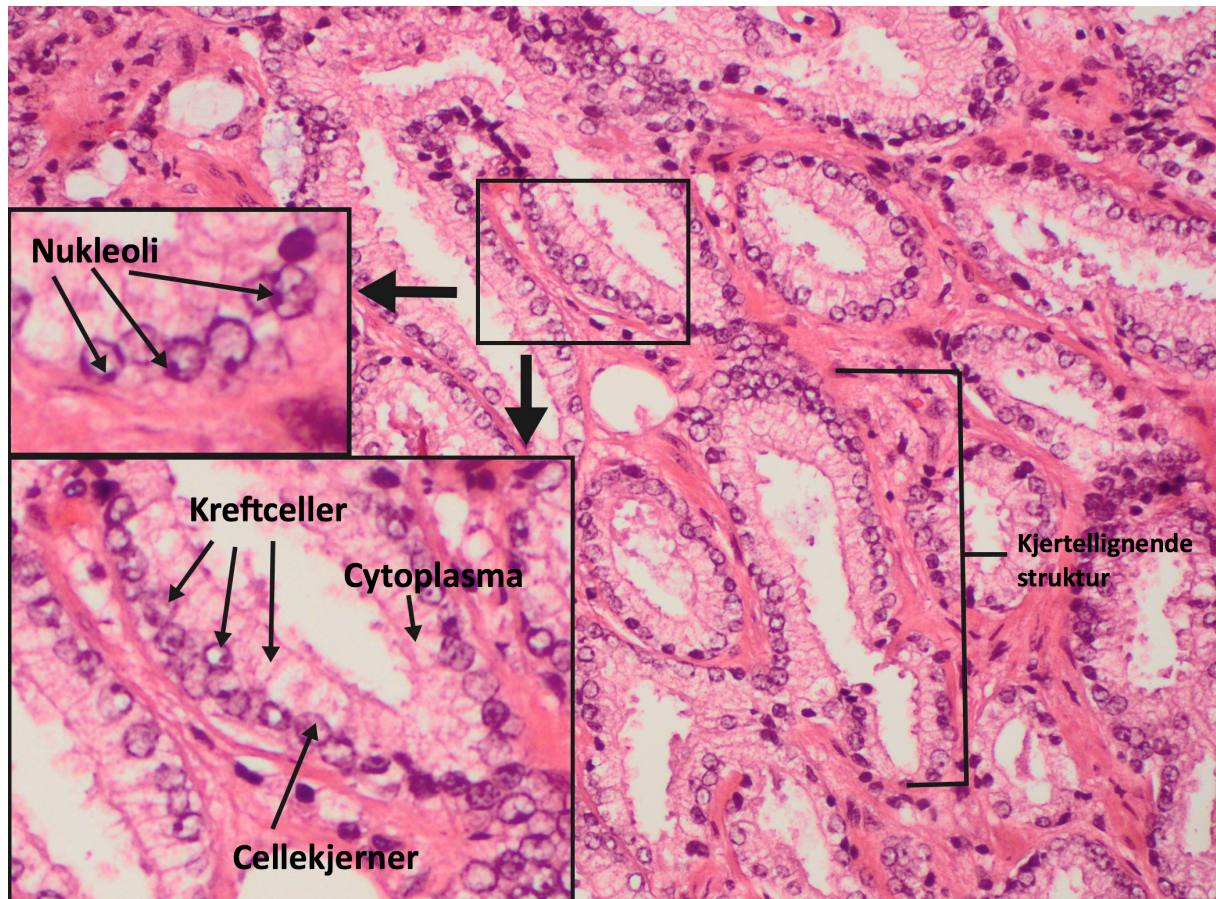
prostata), mens kun i 20% er det en solid svulst. Cirka 75% av tilfellene oppstår i

perifersonen, 20% i overgangssonen og 5% i sentralsonen. Av adenokarsinomene er mer enn

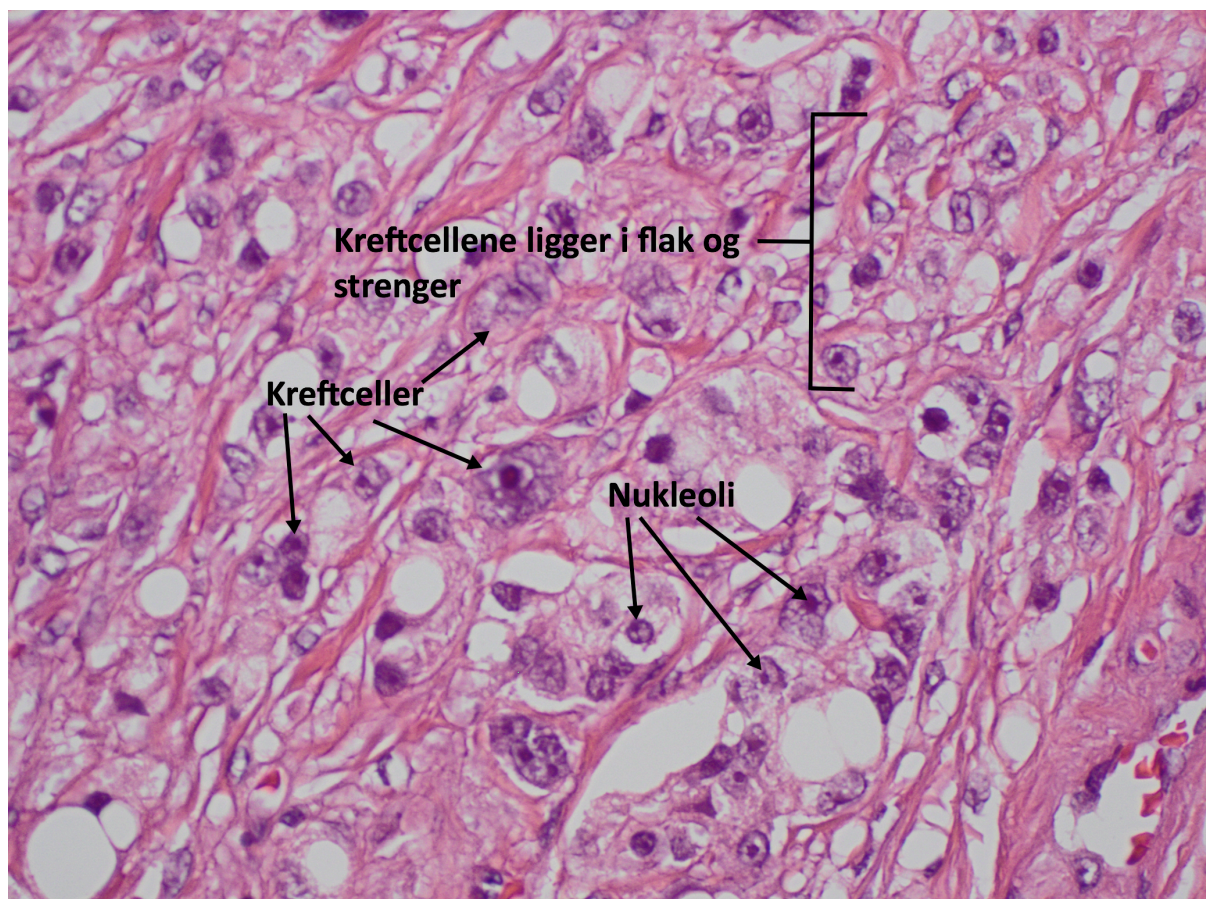
95% av acinær type, og disse benevnes ofte som prostatakarsinomer. De mer sjeldne

variantene har ofte svært dårlig prognose (duktalt karsinom, mucinøst karsinom, signetringcellekarsinom og småcellet karsinom). Primære kreftsvulster i prostata kan også utgå fra overgangsepitelet i urinrøret og gangepitelet i prostata (urothelialt karsinom), støttevevet (sarkomer) eller lymfoid vev (lymfomer). Det er svært sjeldent med metastaser til prostata, direkte innvekst fra primærsvulster i nærområdet (som for eksempel fra urinblæren eller tykktarm) er vanligere (6).

Arkitektonisk danner kreftcellene kjertler som typisk er mindre enn de benigne (godartede), og mikroskopisk sett har de et enkelt lag av kubiske eller lave sylinderepitelceller, og mangler laget av basalceller som benigne kjertler har (Figur 9 og 10). Tumorcellene tenderer til å vokse infiltrerende og uorganisert, og ligger ofte tett sammen og mangler folder og forgreininger (Figur 9 og 10). Ettersom kreftcellene blir mindre og mindre differensierte forsvinner kjertelstrukturen og kreftcellene kan da ligge i flak og strenger (Figur 10). Ved H&E-farging varierer cytoplasma fra lyst til distinkt mørk lilla farge. Kjernene er ofte forstørrede, irregulære og hyperkromatome, og har en eller flere fremtredende nukleoli (Figur 9 og 10). Det er ikke vanlig å se mitoser (celler som er i delingsfasen: S-fasen i cellesyklus). Man kan også se intraluminale krystalloider, amorf sekresjon, eller blåfarget mucinøs sekresjon (13).



Figur 9: Høyt differensiert prostatakraft, Gleason grad 3+3 = score 6 (Gleason gruppe 1). Krefcellene ligger i kjertellignende strukturer, men den typiske papillelignende strukturen er borte. Merk at basalcellene ikke er til stede. Inne i cellekjernene til krefcellene sees flere nukleoli som små, mørkelilla flekker. (Ingeborg Marie Movik)

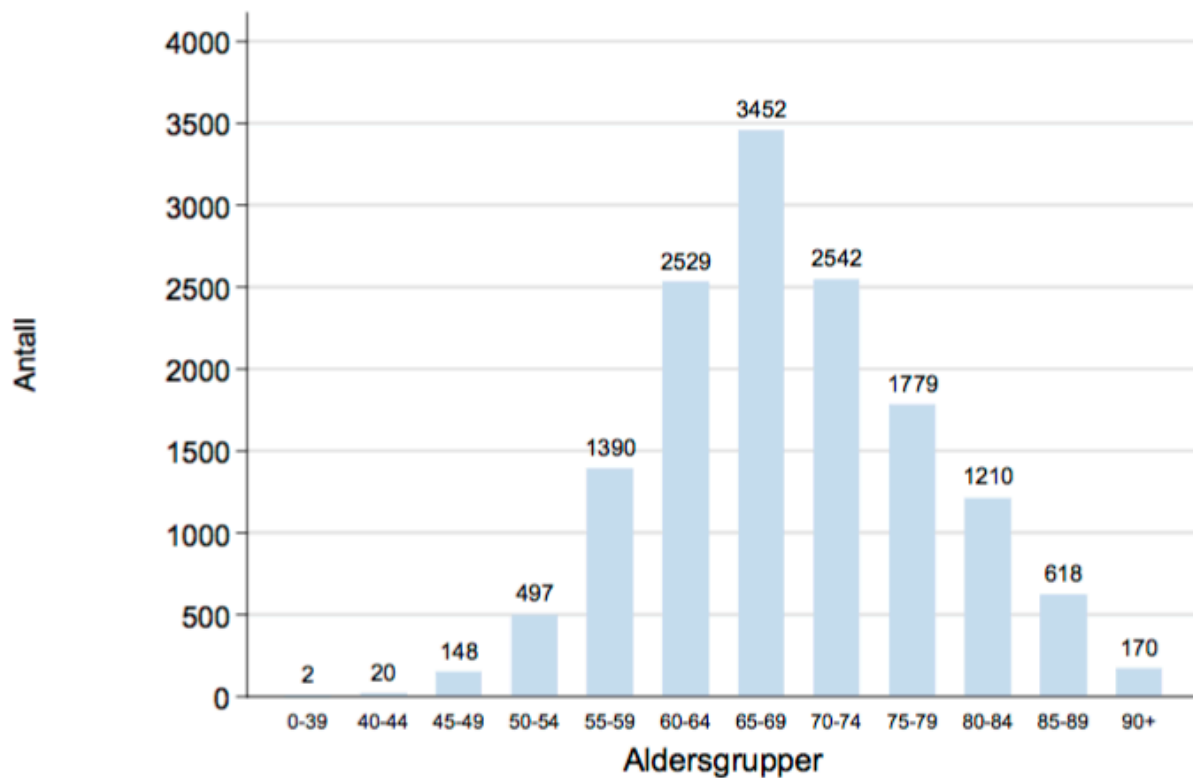


Figur 10: Lite differensiert prostatakraft, Gleason grad 5+5 = score 10 (Gleason gruppe 5). Kjertelstrukturene er borte og kreftcellene ligger uorganisert i flak og strenger. Cellekjernene er irregulære og har flere fremtredende nukleoli. (Ingeborg Marie Movik)

3.5.2 Risikofaktorer for å utvikle prostatakraft

Den viktigste risikofaktoren for å utvikle prostatakraft er økende alder (Figur 11). I 2013 var median alder ved diagnosetidspunkt for norske menn 68 år (4). Opphopning av prostatakraft i nær familie øker også risikoen. Hvis en førstelinjeslektning (foreldre, søsken og barn) har prostatakraft, er sjansen for selv å få sykdommen minst doblet. Dersom to eller flere har prostatakraft øker sjansen 5-11 ganger (14, 15). Omkring 5% av alle tilfeller av prostatakraft og 10-20% av tilfellene før 60 års alder skyldes arv (16). Arvelig prostatakraft er assosiert med mutasjoner i genene BRAC1 og BRAC2, men det begynner også å bli kartlagt at familiær opphopning kan skyldes flere ulike gener hvor spesielle mutasjoner gir en moderat økning i

risiko (6, 17-19). Studier har vist en økt risiko hos afroamerikanske menn sammenlignet med kaukasiske og latinamerikanske, mens asiatiske menn har den laveste risikoen (20-23).



Figur 11 : Krefregisteret 2015: Aldersgruppert insidens av prostatakraft 2011-2013, 3 år, Norge (4).

3.5.3 Forebygging

Mange former for kreft er mulig å forebygge. Spesifikke faktorer som er assosiert med en økt risiko for kreft er tobakk (24, 25), kosthold (rødt kjøtt øker risiko for tarmkreft) (26, 27), alkohol (28-30), lite fysisk aktivitet (31, 32), overvekt (33), enkelte virusinfeksjoner (for eksempel er human pappilomavirus (HPV) blant annet assosiert med livmorhalskreft (34) og hepatitt B (HBV) og hepatitt C (HCV) med leverkreft (35)) og ultrafiolett stråling (36). Når det

gjelder prostatakraft finnes det ikke vitenskapelig grunnlag for at redusert alkoholforbruk, spesielle kosttiltak og vektreduksjon reduserer risiko, og det er derfor ikke sterke anbefalinger utover myndighetenes generelle anbefalinger (6). Det er mulig at økt fysisk aktivitet og røykestopp kan redusere risikoen, men det vitenskapelige grunnlaget er foreløpig utilstrekkelig. Forebygging hos risikogrupper karakterisert med PSA-verdier, høygradig PIN (endring i prostata som kan bli kreft) eller familiær opphopning av prostatakraft, har i dag ingen bevist effekt av preventive tiltak, men flere studier pågår nå (6). Det pågår også studier på forebyggende behandling med et type medikament (5-alpha reductasehemmere) som i dag benyttes i behandling av godartet prostataforstørrelse, men det er foreløpig ikke grunnlag for generelle anbefalinger om bruk av dette medikamentet som forebyggende tiltak (6).

3.5.4 Risikogrupper

Pasienter med prostatakraft deles ofte inn i risikogrupper, og risikogruppering er en av faktorene som er anbefalt brukt i forbindelse med valg av behandling (4). EAU's risikogruppering ble revidert i 2015 (Tabell 2) (37).

Tabell 2: EAU risikogrupper for biokjemisk tilbakefall av lokalisert og lokalavansert prostatakraft (37).

	Low-risk	Intermediate-risk	High-risk	
Definition	PSA < 10 ng / mL and GS < 7 and cT1-2a	PSA 10-20 ng /mL or GS 7 or cT2b	PSA > 20 ng / mL or GS > 7 or cT2c	any PSA any GS cT3-4 or cN+
	Localised			Locally advanced

3.6 Diagnostikk

3.6.1 Utredning og diagnose

For å stille diagnosen prostatakreft kreves funn av kreft i biopsier (vevsprøver) fra prostata, eventuelt i TUR-P resektat (deler av prostata "høvles" av gjennom urinrøret). Viktige verktøy i utredning av prostatakreft er rektal eksplorasjon (prostata palperes med en finger via endetarmen), måling av serum PSA, bildediagnostikk (MR, skjelettsintigrafri mm.), mikroskopisk undersøkelse av vevsarkitekturen i prostata, og eventuell spesialundersøkelse med immunhistokjemi (på nålebiopsier, TUR-P resektater og hele prostatakjertelen etter radikal prostatektomi). På bakgrunn av den mikroskopiske undersøkelsen blir det gjort en vurdering av Gleason score (prognostisk markør) og TNM-klassifisering (Se kap. 3.6.3 og 3.6.4) (6).

3.6.2 Prostataspesifikt antigen (PSA)

PSA er en protease som nesten utelukkende produseres i epitelcellene i prostata. PSA uttrykkes av både normalt og neoplastisk prostatavev. En forhøyet PSA-verdi betyr dermed ikke at man har prostatakreft. En normal PSA-verdi kan heller ikke utelukke alvorlig prostatakreft. Andre årsaker til forhøyet PSA er økende alder, benign prostatahyperplasi (BPH), prostatitt (betennelse i prostata) og perianalt traume (6, 8). Det er vanskelig å sette en absolutt grenseverdi for PSA-nivå som grunnlag for videre utredning. Dette begrenser sensitiviteten og spesifisiteten til PSA som markør for prostatakreft (Tabell 3) (38-42). Tradisjonelt har en grenseverdi på 4,0 ng/mL blitt brukt i de store screeningsstudiene (Tabell 3) (38, 43-45). I Norge er det ikke anbefalt med PSA-screening av symptomfrie menn uten arvelig belastning, grunnet fare for overdiagnostikk og overbehandling. Måling av serum-PSA

benyttes også til vurdering av omfang samt oppfølging etter at pasienten er behandlet for sin prostatakraft (4, 6).

Tabell 3: Prognostiske og prediktive verdier for PSA (38-42).

	Sensitivitet	Spesifisitet	Positiv prediktiv verdi (PPV)	Negativ prediktiv verdi (NPV)
Grenseverdi 4,0 ng/mL	21 % for deteksjon av enhver prostatakraft 51 % for deteksjon av høygradig prostatakraft (Gleason score ≥ 8)	91 %	Ca. 30 %.	85 % (PSA $\leq 4,0$ ng/ml)
Grenseverdi 3,0 ng/mL	32 % for deteksjon av enhver prostatakraft 68 % for deteksjon av høygradig prostatakraft (Gleason score ≥ 8)	85 %		

3.6.3 TNM-klassifisering

TNM står for tumor (T), node (N) og metastase (M). TNM-klassifisering benyttes for å beskrive utbredelsen av en kreftsykdom ved diagnosetidspunkt og før definitiv behandling.

T-stadium (lokal stadieinndeling) angir utbredelse og størrelse av primærsvulsten, og baserer seg på funn ved digital rektal eksplorasjon, bildediagnostikk og histologi. N-stadium beskriver lymfeknutestatus/spredning, og er viktig hos pasienter hvor man ønsker å gi behandling med

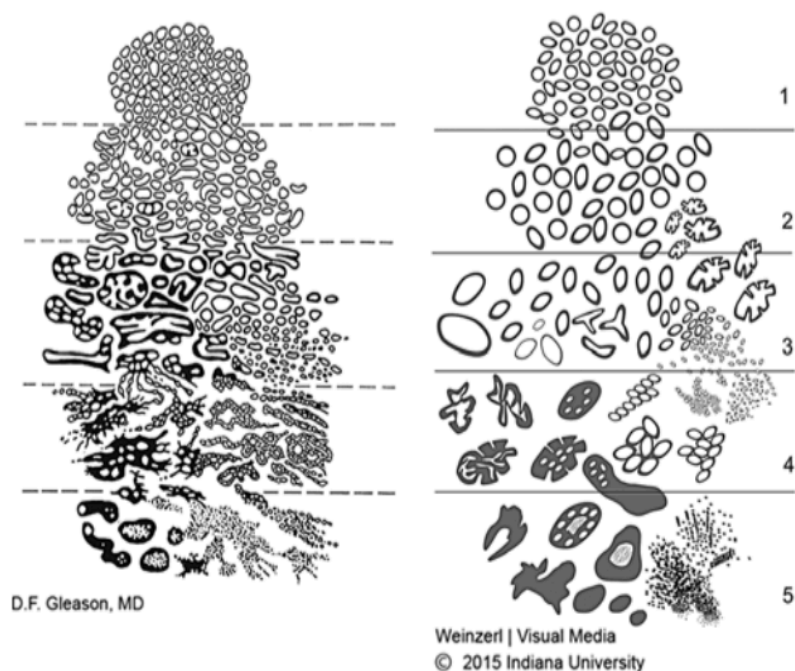
kurativ intensjon. M-stadium beskriver eventuelle fjernmetastaser, og disse påvises med skjelettscintigrafi , CT eller MR (Vedlegg 1) (6).

3.6.4 Gleason score

Gleason score er en av de viktigste prognostiske faktorene ved prostatakraft. Den er en veletablert prognostisk indikator, og er forbundet med en rekke kliniske endepunkt som klinisk stadium, progresjon til metastatisk sykdom og overlevelse. Gleason score er basert på lysmikroskopisk undersøkelse av vevsprøver fra prostata, og baserer seg på histologisk utseende av kreftcellene etter H&E-farging. Gleason score graderes fra 2-10, og settes sammen av 2 Gleason grader fra 1-5 hvor hver grad hører til et utseende av kreftcellene. Det mønsteret man ser mest av blir den primære graden og angis først. Det mønsteret man ser nest mest av blir sekundær grad, og angis etter dem primære, eksempelvis Gleason score 3 (primær) + 4 (sekundær) = 7. Høy score tyder på aggressiv tumor. I 2005 hadde International Society of Urological Pathology (ISUP) en konsensuskonferanse hvor Gleason systemet ble modifisert, og det ble blant annet konkludert at grad 1 og 2 ikke lenger skal inngå i graderingen, og primær grad + verste grad (ikke sekundære) skal utgjøre scoren. I praksis ble score 6 den laveste som benyttes. I november 2014 anerkjente man at ytterligere modifisering var nødvendig, og ISUP hadde da en ny konsensuskonferanse (Tabell 4, Figur 12-13) (4, 6, 46, 47).

Tabell 4: Det nye og gamle Gleason-systemet (47).

Problemer med Gleason-systemet, modifisert av ISUP 2005	Fordeler med det nye graderingsystemet, ISUP 2014
Gleason gradering har en rangering fra 2-10, men den laveste scoren som benyttes i praksis er 6, dvs. score 2-5 benyttes ikke.	Den nye klassifiseringen gir en mer korrekt inndeling av tumorer enn det aktuelle systemet.
Når pasienter får vite at de har en score på 6 av 10, så impliserer dette at de har en intermediær prognose, og dette bidrar til frykt for at de har en mer alvorlig kreftsykdom, og de forventer at behandling er nødvendig.	Det nye systemet har forenklet antallet graderingskategorier fra Gleason score 2-10, med flere inndelinger basert på kombinasjonen av ulike mønster og grader, til graderingsgrupper 1-5.
I litteraturen og for terapeutiske formål, har ulike scorere ukorrekt blitt satt i samme gruppe og dermed antatt og ha lik prognose. F.eks. regner mange klassifiseringssystemer Gleason score 7 som en enkel score, uten å skille mellom 3+4 og 4+3, selv om studier har vist signifikant verre prognose for sistnevnte.	Den laveste graden er nå 1 og ikke 6 slik som i det gamle Gleason-systemet, hvor det da var potensiale for overbehandling og unødvendig engstelse hos pasienter.



Figur 12: Prostata adenokarsinom (histologisk mønster): original (venstre) og 2015 modifisert ISUP Gleason skjematisk diagram (47).

Histological Definition of New Grading System

Grade Group 1 (Gleason score ≤ 6) – Only individual discrete well-formed glands

Grade Group 2 (Gleason score $3 + 4 = 7$) – Predominantly well-formed glands with lesser component of poorly- formed/fused/cribriform glands

Grade Group 3 (Gleason score $4 + 3 = 7$) – Predominantly poorly-formed/fused/cribriform glands with lesser component of well-formed glands†

Grade Group 4 (Gleason score $4 + 4 = 8$; $3 + 5 = 8$; $5 + 3 = 8$)

Only poorly-formed/fused/cribriform glands *or*

Predominantly well-formed glands and lesser component lacking glands†† *or*

Predominantly lacking glands and lesser component of well-formed glands††

Grade Group 5 (Gleason scores 9-10) – Lacks gland formation (or with necrosis) with or w/o poorly formed/fused/cribriform glands†

†For cases with $> 95\%$ poorly-formed/fused/cribriform glands or lack of glands on a core or at RP, the component of $< 5\%$ well-formed glands is not factored into the grade.

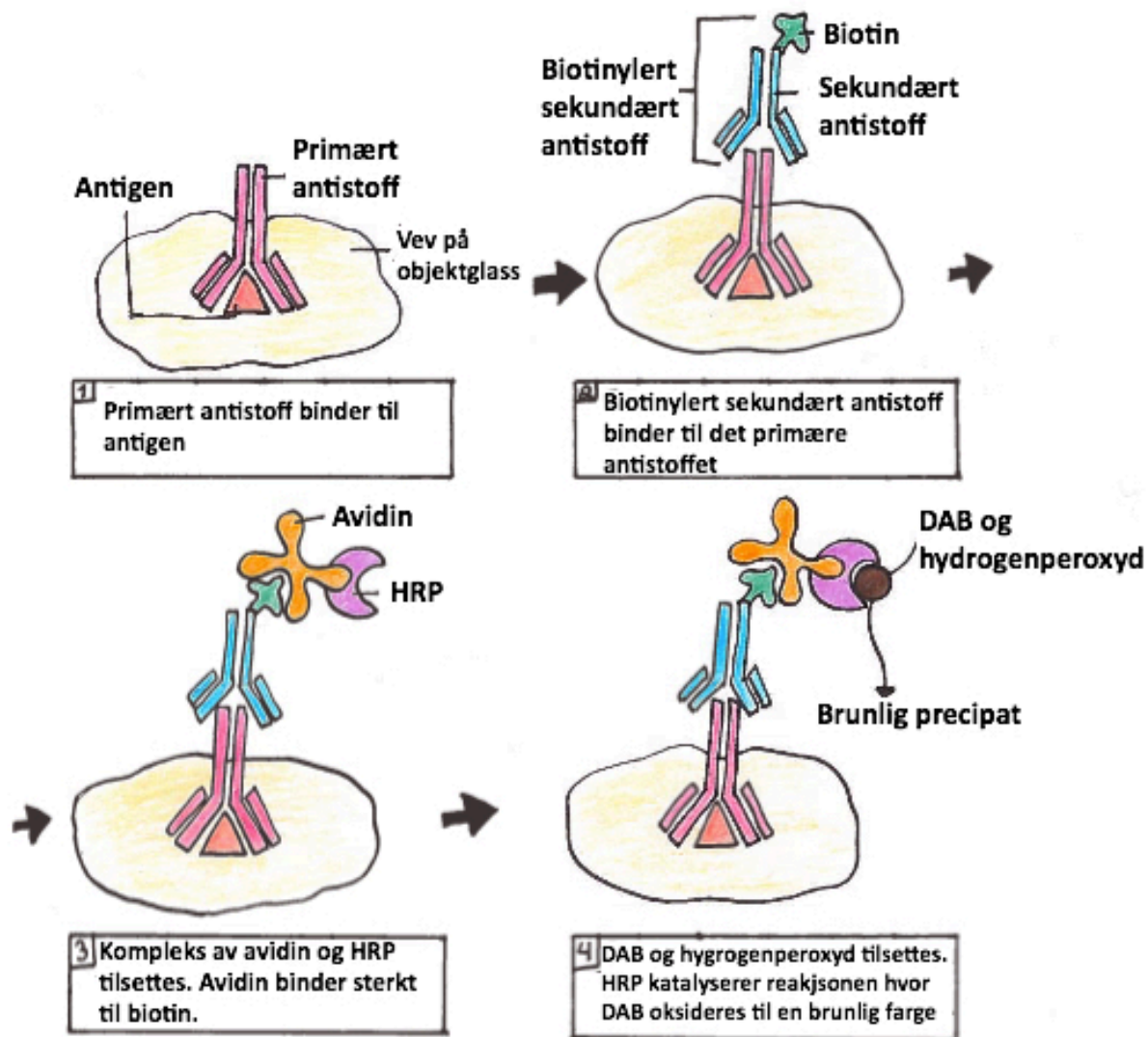
††Poorly-formed/fused/cribriform glands can be a more minor component.

Figur 13: Histologiske definisjoner for det nye Gleason graderingsystemet (47).

3.6.5 Immunhistokjemi (IHC)

IHC er en metode for å påvise proteiner i vevssnitt. Det er også en fargemetode som baserer seg på prinsippet hvor et antistoff binder et antigen. En type hvite blodceller (B-celler) produserer proteiner som kan binde spesifikt til ulike antigen. Disse antigen-bindende proteinene kalles for immunglobuliner. Et antistoff er den sekreerte formen av immunglobuliner. Et antigen er et molekyl som kan utløse en spesifikk immunrespons, når det binder til sitt antistoff (48). Ved IHC benytter man isolerte antistoff direkte rettet mot spesifikke cellekomponenter, enzymer, normale vevskomponenter, hormoner, eller kreftmarkører. Farging med IHC utføres på formalinfiksert, parafin-innstøpt vev på objektglass (49). Metoden går ut på at man tilsetter ønsket antistoff til vevet for å se om det antigenet man leter etter er til stede. Hensikten med IHC er altså å oppnå en visualisering av antistoff-antigen interaksjonen.

Vevet man ønsker å undersøke for et antigen tilsettes først et primært antistoff. Hvis det aktuelle antigenet er til stede får man en antistoff-antigen binding. Deretter tilsettes et nytt antistoff (sekundærantistoff) som er merket med biotin (vitamin). Sekundærantistoffet med biotin (biotinylert sekundært antistoff) binder seg så til det primære antistoffet. Så tilsettes et nytt kompleks som består av avidin (protein) og enzymet Horse Radish Peroxydase (HRP). Avidin binder seg sterkt til biotin, og det tilsatte komplekset vil da reagere med det biotinylerte sekundære antistoffet. HRP katalyserer reaksjonen, og ved tilsetting av en fargeløsning (DAB) og hydrogenperoxyd, vil DAB oksideres ut som en brunlig farge som vi kan gjenkjenne i mikroskopet (Figur 14) (50, 51).



Figur 14: Prinsippet for den immunhistokjemiske metoden. (Ingeborg Marie Movik)

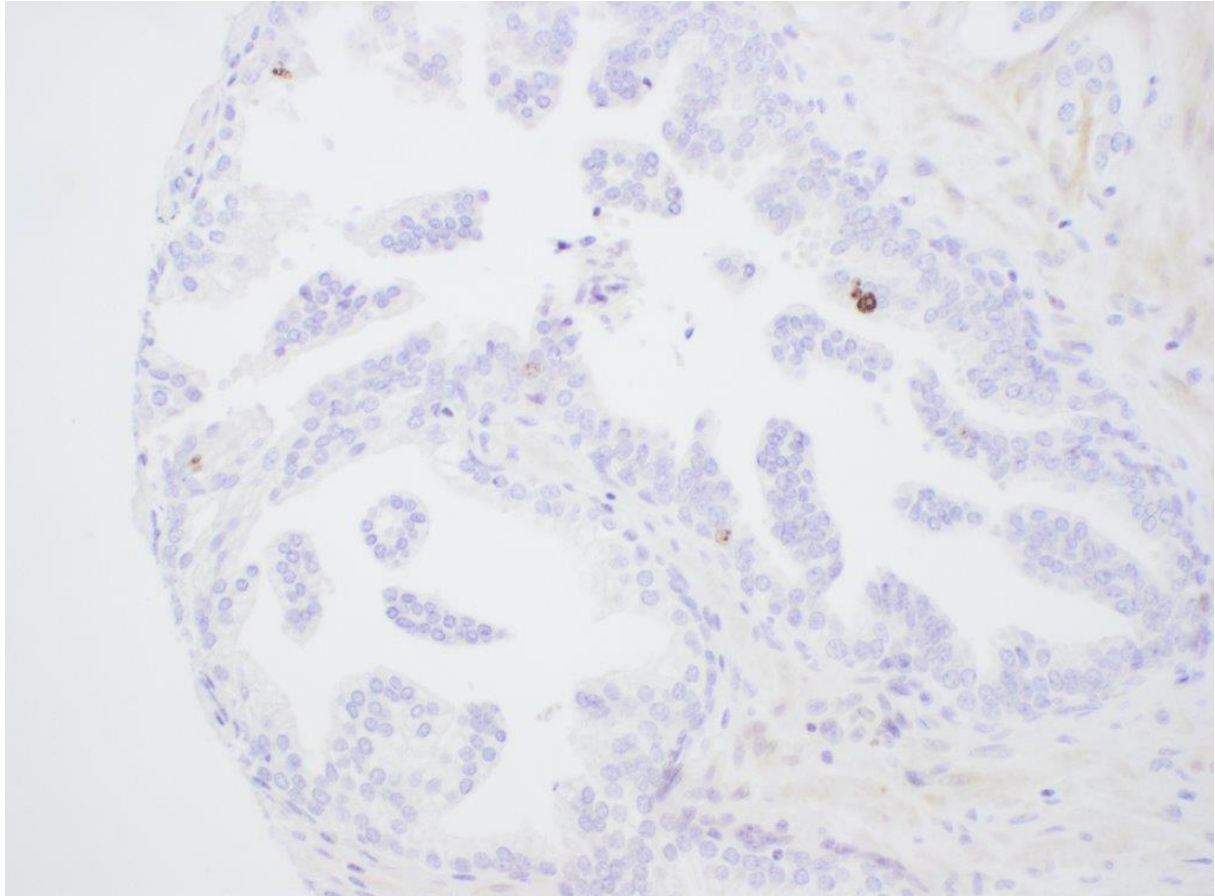
Ved usikker diagnose anbefales IHC. Man kan da benytte antistoffer for høymolekylært cytokeratin, p63 og AMACR, eventuelt trippelfarge for disse (6). IHC for høymolekylært cytokeratin kan benyttes for å identifisere basalceller, som er til stede i godartede, men ikke ondartede kjertler (52, 53). Noe av ulempen med denne fargingen er at noen kreftceller kan farge positivt, og noen godartede kjertler kan farges svakt (54). p63 er et nukleært protein som er meget spesifikt for basalceller i prostata, som har vist seg å være en mer pålitelig

markør enn høymolekylært cytokeratin grunnet sin tydelige farging av kjernene i basalcellene (55). AMACR (P504S) er en molekylær markør for adenokarsinomer i prostata (56, 57). Adenokarsinomer i prostata skal da farge negativt for høymolekylært cytokeratin og p63 (da de basale cellene ikke er til stede ved prostatakreft), og positivt for AMACR.

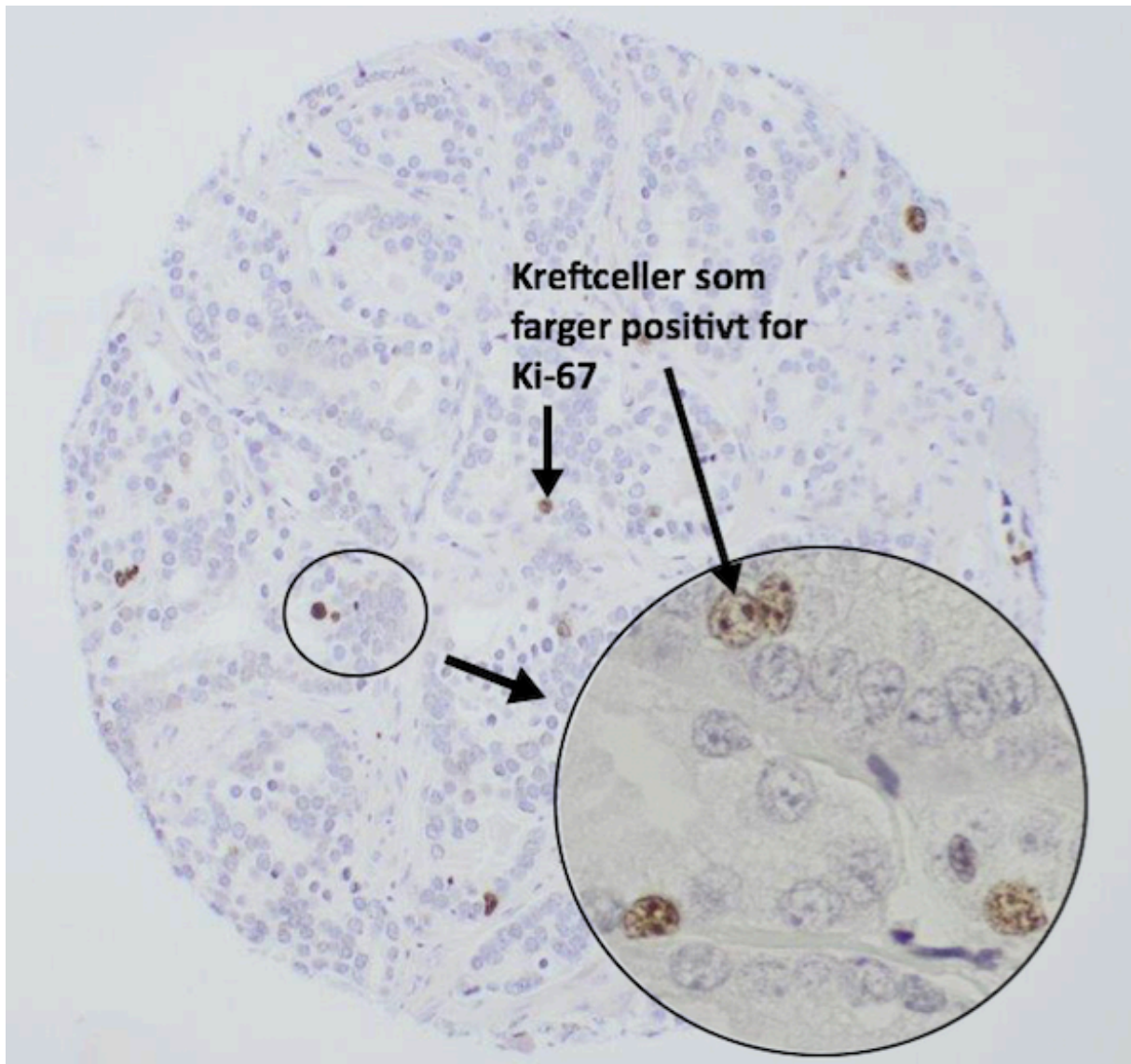
3.7 Proliferasjonsmarkøren Ki-67

3.7.1 Ki-67

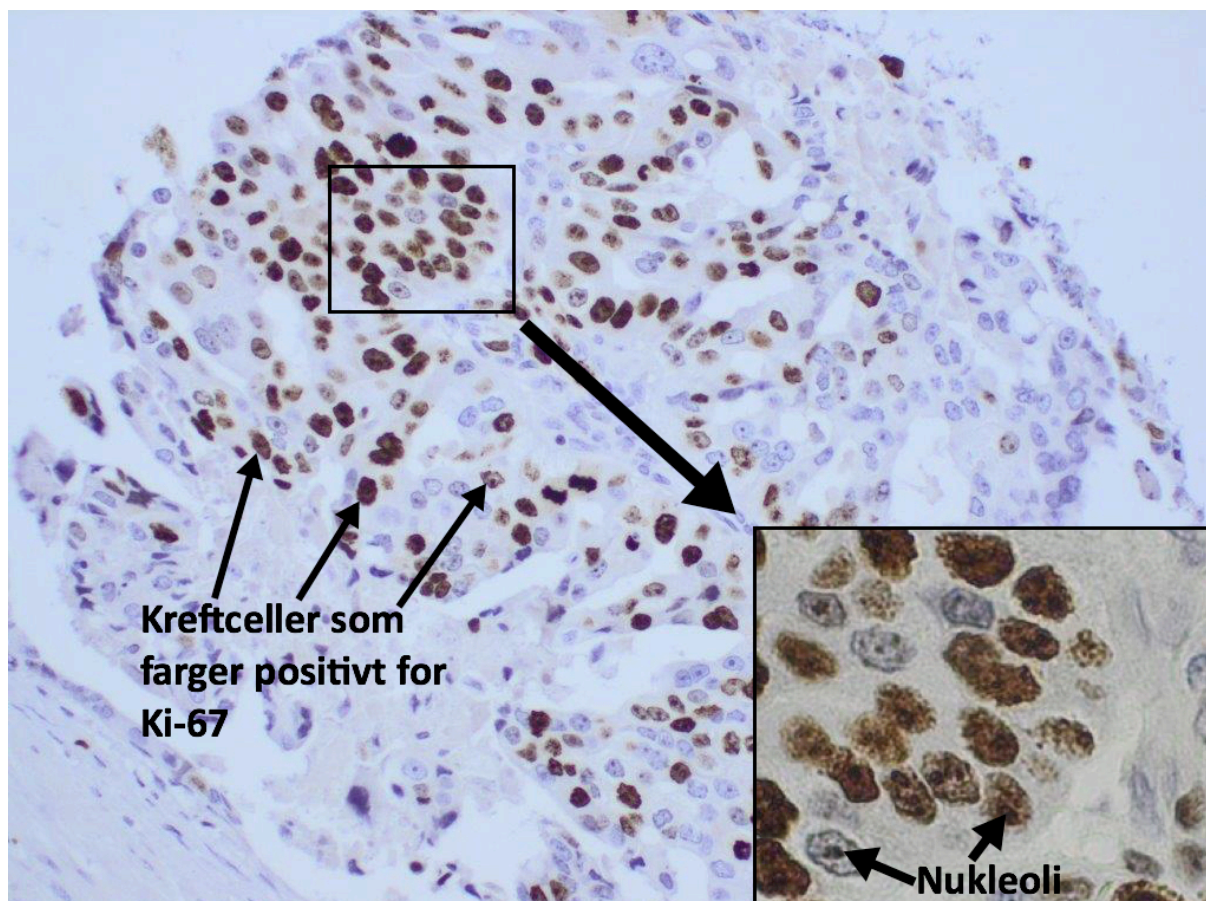
Ki-67 er et nukleært protein forbundet med ribosomal RNA-syntese og proliferasjon (hastigheten på celledeling) gjennom cellyklus. Ki-67-proteinet uttrykkes i de aktive fasene G1-, S-, G2- og M-fase i cellyklus. Celler som er i G0-fase er i hvilefasen, og uttrykker ikke Ki-67. Dette gjør at Ki-67-proteinet, også kalt Ki-67-antigenet, kan benyttes som markør for proliferasjon av tumorceller. Proliferasjonshastigheten har vist seg å være en indikator for hvor aggressiv en kreft er. Ved mikroskopisk undersøkelse av prostatakreft ses det oftest ingen mitoser (celledelingsfasen). Derfor kan ikke telling av mitoser benyttes som indikator for proliferasjon og aggressivitet for kreftsvulster i prostata, slik det for eksempel gjøres ved brystkreft der mitosetelling er et nyttig verktøy for gradering av aggressivitet. Graden av proliferasjon/aggressivitet kan undersøkes ved IHC hvor man benytter antistoffer direkte rettet mot Ki-67-antigenet. Celler som er i de aktive fasene av cellyklus vil da farges positivt, mens celler i hvilende fase vil være negative (Figur 15-17). Typisk oppgis mengden Ki-67 som prosentandel av den totale cellepopulasjonen som farger positivt (Tabell 6) (58-61).



Figur 15: Normalt prostatavev. IHC med visualisering av Ki-67. Cellekjerne som farger positivt for Ki-67 er brune. Bildet viser en normal prostatakjertel med normal Ki-67 score. (Ingeborg Marie Movik)



Figur 16: Prostatakraft med Gleason grad 3+3 = score 6 (Gleason gruppe 1). Bildet viser en lav Ki-67 score. (Ingeborg Marie Movik)



Figur 17: Prostatakraft med Gleason grad 4+4 = score 8 (Gleason gruppe 4). Bildet viser en høy Ki-67 score. (Ingeborg Marie Movik)

3.7.2 Ki-67 som prognostisk markør for prostatakraft

Graderingssystemet for prostatakraft tar ikke hensyn til proliferasjonsraten til kreftcellene, i motsetning til mange andre graderingssystemer. Det er dermed tenkelig at måling av proliferasjonsraten til kreftcellene kan gi ytterligere prognostisk informasjon (62). I den eksisterende litteraturen er det støtte for at bruk av Ki-67 er et godt mål for evaluering av den prolifererende celleandelen i vev (61, 63-66). I en oppsummeringsstudie av Kristiansen i 2012 (67), der han har sett på en rekke kohortstudier med et stort antall prøver fra prostata etter radikal prostatektomi eller TURP-operasjon, viste at målinger av Ki-67 ved bruk av IHC har en signifikant prognostisk verdi for utfallet for prostatakraft (67). Flere andre studier har

også vist at måling av proliferasjonsraten, ved bruk av Ki-67, kan forbedre vår vurdering av prognosen for prostatakraft, hos menn behandlet både konservativt og radikalt (62, 64, 67-72). I de overnevnte studiene har Ki-67 vist å ha en selvstendig prognostisk verdi, og at Ki-67 gir ekstra prognostisk informasjon i tillegg til Gleason score og serum PSA.

4 Materiale og metode

Utvelgelsen av pasienter, innhenting av data, fremstilling av histologiske snitt med H&E-farging, konstruksjon av TMA, IHC og scoringen av Ki-67 er utført av medlemmer av Translasjonell Forskningsgruppe ved Institutt for Medisinsk Biologi.

4.1 Materialet

4.1.1 Pasienter

671 pasienter ble retrospektivt indentifisert med radikal prostatektomi for adenokarsinom i prostata mellom 01.01.1995 til 31.12.2005 fra arkivene til Avdeling for patologi ved St. Olavs hospital/Trondheim Universitetssykehus (St. Olav) (n = 341), Nordlandssykehuset Bodø (NLSH) (n = 63) og Universitetssykehuset i Nord Norge (UNN) (n = 267). Av disse pasientene ble 131 ekskludert grunnet manglende vevsblokker for reevaluering (St. Olav n = 112, NLSH n = 3, UNN n = 15), fire pasienter ble ekskludert da de hadde annen kreftsykdom 5 år innen diagnosen prostatakraft (UNN n = 4), en pasient ble ekskludert grunnet tidligere radioterapi av bekkenområdet (NLSH) og en pasient ble ekskludert på bakgrunn av manglende

oppfølgingsdata (St. Olav). Dermed hadde 535 pasienter komplett oppfølgingsdata og vevsblokker for reevaluering, og disse ble inkludert i studien (Tabell 5).

Tabell 5: Utvalget av pasienter til studien.

Sykehus	Pasienter	Ekskludert	Inkludert
UNN	267	19	248
St. Olav	341	113	228
NLSH	63	4	59
Totalt	671	136	535

4.1.2 Scoringssystemet

Siden prostatakraft er en heterogen svulsttype som er bygget opp av flere vevstyper ble de ulike vevstypene scoret hver for seg hos den enkelte pasient. De ulike vevstypene fikk benevningene; H = hyperplasi, PIN = prostataintraepitelial neoplasi, N = normalt vev, NS = normalt stroma, S = tumorassosiert stroma og T = tumorepitel. Det var også flere scoringer innenfor hver kategori: H1-4, PIN1-4, NS1-3, N1-5, S1-6 og T1-6. Kombinerer man S og T får man Ki-67 score i tumorvevet som helhet. PIN kan være forstadiet til prostatakraft, og det ble laget to ulike kategorier hvor den ene inkluderte PIN med T og S og en med kun T og S (Tabell 6). For å se på Ki-67 score i normalt prostatavev (ikke kreft) ble kategoriene N, NS og H slått sammen (Tabell 6). Det ble også laget en egen kategori for normalt prostatavev uten H (Tabell 6). Dette ble gjort for å se om H og PIN hadde noen betydning. Sammenslåingen til de fire hovedkategoriene ble gjort ved bruk av gjennomsnitt. De fire hovedkategoriene fikk benevningene; 1. normalt prostatavev inkludert hyperplasi, 2. normalt prostatavev ekskludert hyperplasi, 3. tumorvev inkludert PIN og 4. tumorvev ekskludert PIN (Tabell 6).

Det også opprettet to grupper hvor Ki-67 score ble delt inn etter høy og lav score. Denne inndelingen ble gjort for å finne den beste grenseverdien som deretter ble definert som median = 1,5. Lav score ble definert som < 1,5 og høy score som ≥ 1,5.

Tabell 6: De fire hovedkategoriene for Ki-67 score i normalt prostatavev og tumorvev.

Hovedkategoriene	1	2	3	4
	Normalt prostatavev inkludert hyperplasi	Normalt prostatavev	Tumorvev inkludert PIN	Tumorvev
Gjennomsnitt av scoringene i	N1-5 + NS1-3 + H1-4	N1-5 + NS1-3	S1-6 + T1-6 + PIN1-4	S1-6 + T1-6

Forkortelser: N = normalt prostatavev; NS = normal stroma ; H = hyperplasi; S = tumorassosiert stroma; T = tumorepitel; PIN = prostataintraepitelial neoplasi

4.2 Metoder

4.2.1 H&E-farging av histologiske snitt

Prøvematerialet er vevsbiter fiksert i bufret 4% formalin. Materialet legges i briketter med prøvenummer på og fremføres, før det støpes i parafinblokker, snittes og farges. Snittene avparafineres i xylen, så hydreres de ved hjelp av 95% alkohol, tilsettes rennende vann, før hematoxylin (farge) tilsettes. Deretter skylles snittene i rennende vann før de settes i Scotts væske hvor snittene får en blåfarge. Snittene skylles igjen i rennende vann før eosin (farge) tilsettes, og deretter skylles snittene igjen i rennende vann. Så fjerner man vannet ved å tilsette 96% alkohol og et organisk løsemiddel (xylen). Til slutt innstøpes snittene.

Cellekjerner blir dermed farget blålig og cytoplasma farges rødlig.

4.2.2 Vevsmatriser (TMA, Tissue Microarray)

Vevsmatriser er svært verdifulle samlinger av vev fra pasienter med bestemte sykdomsbilder. I dette tilfellet benyttet vi vev fra 535 prostatakreftpasienter. Fordelen med vevsmatriseteknologi er at det er en metode som gjør det mulig å undersøke mange vevsprøver fra ulike pasienter samtidig. Flere vevsskiver på 4 µm ble kuttet med et Micron microtom (HM355S), festet til objektglass og deretter forseglet med parafin.

Metoden går ut på følgende: vevsbiter som allerede er innstøpt i parafinblokker og som er arkivert i en diagnostisk- eller forskningsbiobank blir brukt. I dette tilfellet var materialet fra en diagnostisk biobank. Små sylindere av vev (0,6 mm) fjernes fra donorblokken (vevsblokken til pasienten) og overføres til en vevsmatriseblokk. Opp til for eksempel 150 slike sylindere kan legges i den nye vevsmatriseblokken. Vevsmatriseblokken utgjør da en standardisert samling av vev fra de inkluderte pasientene. Det var slike vevsmatriser som ble brukt i vår studie. Før utstansing av vevssylindrene var 2 ulike områder med epitelialt tumorvev og stromalt tumorvev avmerket (utført av patolog, ER) og disse områdene ble da overført til vevsmatrisen. Totalt ble det laget 12 slike matriser. Det ble også gjort tilsvarende for normale epitelceller og normalt stromalt vev hos de samme kreftpasientene. I tillegg valgte vi å lage en TMA med vev fra pasienter uten prostatakreft.

4.2.3 Ki-67 farging

For farging på Ki-67 brukte vi IHC. Dette ble gjort ved at vi brukte en fargemaskin: Ventana Benchmark XT som benytter et automatisk fargesystem (utstyret er fra Ventana Medical

Systems, Tucson, AZ). Fra fabrikanten var det også spesifikke reagenser som ble brukt. TMA på objektglass ble avparafinisert med xylen og rehydrert i økende konsentrasjoner av etanol. Endogen peroxidase (enzym) ble blokkert med bruk av Ventana endogen-peroxidase sett (Ventana endogenous peroxidase blocking kit), etter rensing med destillert vann. Følgende antistoff fra Ventana Medical (Tucson, Arizona, USA) ble brukt for å vurdere den proliferative aktiviteten til vevet: CONFIRM ANTI-Ki-67 (30-9) som er et monoklonalt primært antistoff fra kanin, som kan reagere på C-terminalen av Ki-67-antigenet. Det er dette antistoffet man bruker i rutinediagnostikk ved patologiavdelinger i Norge. Positiv farging for Ki-67 ble identifisert lysmikroskopisk med tilstedeværelse av brunfarging (DAB) av cellekjernen i kreftceller.

4.2.4 Scoring

Alle snittene ble re-klassifisert med tanke på Gleason gradering og semikvantitativt scoret av ER ved hjelp av lysmikroskop og uten patologisk eller klinisk informasjon om pasientene. Prosentandelen av positivt farget tumorcellekjerner fra minst 200 tumorceller ble telt opp, og deretter gitt en score ved bruk av følgende system: 0 = 0 %, 1 = 1 – 2,5 %, 2 = 2,6 – 4 %, 3 ≥ 5 %. Verdiene gitt ved scoring ble så delt inn i høye og lave verdier (Tabell 7).

Tabell 7: Klassifisering av scoringen basert på intensiteten av farging fra 0 – 4.

Prosentandel	Score	Definisjon av score
0 %	0	Ingen farging
1 – 2,5 %	1	Svak farging
2,6 – 4 %	2	Moderat farging
≥ 5 %	3	Sterk farging
	4	Manglende kjerne eller manglende relevante celler

4.2.5 Statistikk

Alle de statistiske analysene ble utført med bruk av det statistiske programmet IBM SPSS, versjon 21 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Spearmans korrelasjonskoeffisient ble brukt for å undersøke assosiasjonen mellom Ki-67-score og de kliniske- og patologiske variablene. For univariate analyser brukte vi Kaplan-Meier-kurver med følgende endepunkter: 1) Biokjemisk svikt (BF), 2) Klinisk svikt (CF) og 3) Prostatakraft død (PCD). BF ble definert som en stigning i PSA til $\geq 0,4$ ng/ml i minimum 2 ulike blodprøver postoperativt. CF ble definert som bekreftet lokal symptomatisk progresjon som ikke lar seg behandle og/eller funn av metastaser til skjelettet, viscerale organer eller lymfeknuter på med CT, MR, skjelettscanning eller ultralyd. PCD ble definert som død grunnet progressiv og disseminerende kastrasjonsresistent prostatakraft, som ikke lar seg kontrollere med behandling. Alle de signifikante variablene fra den univariate analysen ble satt inn i en multivariat analyse med bruk av Cox regresjonsmodell. p-verdier $< 0,05$ ble regnet som signifikante for alle analysene.

5 Resultat

5.1 Korrelasjonsanalyser

Av alle de kliniske- og patologiske variablene hadde Ki-67-score i tumorvev i prostata signifikant korrelasjon til Gleason grad ($p < 0,001$), tumorstørrelse ($p = 0,025$) og positiv apikal margin ($p = 0,001$) (Tabell 8). I tumorvev hvor PIN var ekskludert hadde Ki-67 score signifikant korrelasjon til Gleason grad ($p < 0,001$) og positiv apikal margin ($p = 0,005$) (Tabell 8). Ki-67-score i normalt prostatavev hadde ingen signifikant korrelasjon til noen av variablene.

Tabell 8: Signifikant korrelasjon mellom Ki-67-score i tumor og kliniske og patologiske variabler.

Signifikant korrelasjon		
	Ki-67-score i tumor inkludert PIN	Ki-67-score i tumor ekskludert PIN
Gleason grad		
p-verdi	< 0,001	< 0,001
Tumorstørrelse		
p-verdi	0,025	-
Apikal PSM		
p-verdi	0,001	0,005

Forkortelser: Apikal PSM = positiv apikal reseksjonsrand; PIN = prostataintraepitelial neoplasi.

5.2 Univariat analyser

De følgende kliniske og patologiske variablene var alle signifikante prognostiske faktorer for BF: preoperativ PSA, pT-stadie, pN-stadie, perineural infiltrasjon, tumorstørrelse, ufri kirurgisk reseksjonsrand, ufri sirkumferent reseksjonsrand, vaskulær infiltrasjon og Gleason

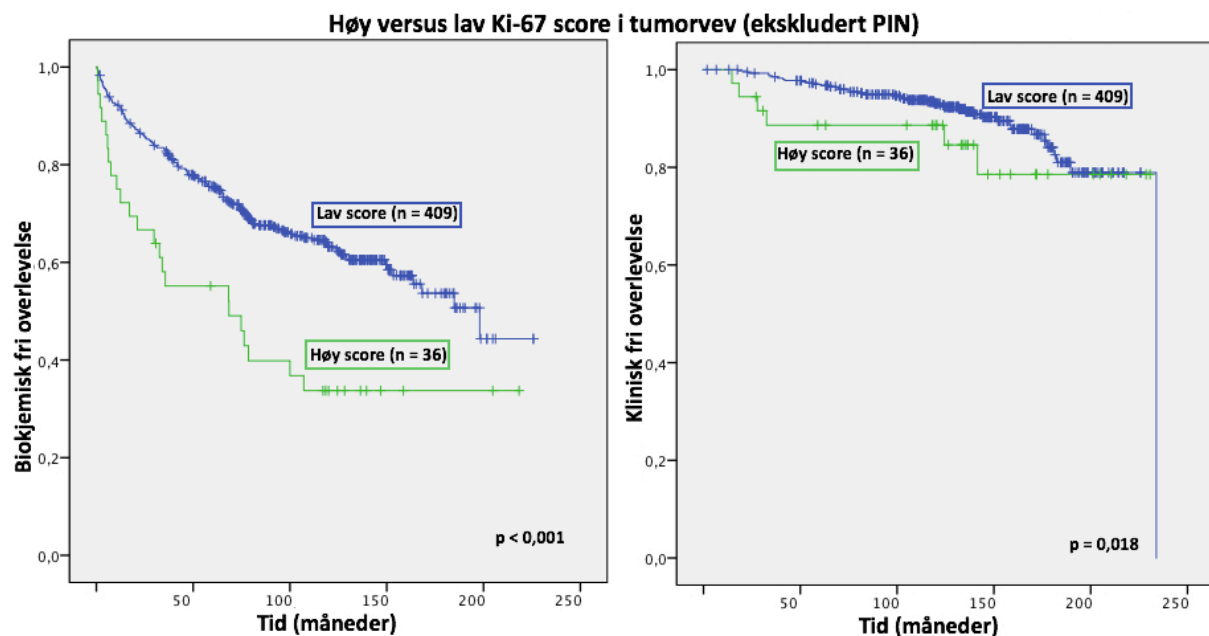
grad. For CF var følgende variabler signifikant prognostiske: alder, preoperativ PSA, pT-stadie, pN-stadie, perineural infiltrasjon, tumorstørrelse, ufri sirkumferent reseksjonsrand, vaskulær infiltrasjon og Gleason grad. For PCD var preoperativ PSA, pT-stadie, pN-stadie, perineural infiltrasjon, ufri sirkumferent reseksjonstand, vaskulær infiltrasjon og Gleason grad signifikante prognostiske faktorer. Resultatene er presentert i Tabell 9.

Tabell 9: Pasientkarakteristika, kliniske- og patologiske variabler som prediktorer for BF, CF og PCD hos pasienter med prostatakreft (n = 535) (univariat analyse; log rank test). Signifikante p-verdier er uthevet (grense p ≤ 0,05).

Karakteristika	Pasienter (n)	Pasienter (%)	BF (n=200)		CF (n=56)		PCD (n=18)	
			5-års EFS (%)	p	10-års EFS (%)	p	10-års EFS (%)	p
Alder				0,237		0,038		0,404
< 65 år	357	67	77		94		98	
≥ 65 år	178	33	70		91		98	
Preop. PSA				< 0,001		0,029		0,003
PSA < 10	308	58	81		95		99	
PSA > 10	221	41	68		89		97	
Mangler	6	1						
pT-stadie				< 0,001		< 0,001		0,001
pT2	374	70	83		97		99	
pT3a	114	21	61		87		98	
pT3b	47	9	43		74		91	
pN-stadie				< 0,001		< 0,001		< 0,001
NX	264	49	79		96		99	
N0	268	50	72		90		97	
N1	3	1	0		33		67	
PNI				< 0,001		< 0,001		< 0,001
Nei	401	75	80		96		99	
Ja	134	25	60		83		95	
Tumorstørrelse				< 0,001		0,002		0,085
< 20 mm	250	47	83		96		99	
≥ 20mm	285	53	68		90		97	
PSM				0,049		0,198		0,843
Nei	286	53	69		90		98	
Ja	249	47	81		96		98	
Apikal PSM				0,063		0,427		0,128
Nei	381	71	82		96		99	
Ja	154	29	57		85		96	
Sirkum. PSM				< 0,001		< 0,001		0,022
Nei	381	71	82		96		99	
Ja	154	29	57		85		96	
VI				< 0,001		< 0,001		< 0,001
Nei	492	92	77		95		99	
Ja	43	8	47		70		90	
Kirurgisk pros.				0,466		0,308		0,965
Retropubisk	435	81	77		92		98	
Perineal	100	19	68		95		99	
Gleason				< 0,001		< 0,001		< 0,001
Grad. gruppe 1	183	34	83		98		99	
Grad. gruppe 2	219	41	77		94		99	
Grad. gruppe 3	81	15	70		90		96	
Grad. gruppe 4	17	3	58		86		94	
Grad. gruppe 5	35	7	36		65		91	

Forkortelser: BF = biokjemisk svikt; CF = klinisk svikt; PCD = prostatakreft død; EFS = hendelsesfri overlevelse i måneder; VI = vaskulær infiltrasjon; PNI = perineural infiltrasjon; Preop = preoperativ; PSA = prostataspesifikt antigen; PSM = fri kirurgisk reseksjonsrand; Sirkum. PSM = positiv sirkumferent reseksjonsrand; Apikal PSM = positiv apikal reseksjonsrand; Kirurgisk pros = kirurgisk prosedyre; Grad. gruppe = graderingsgruppe.

Ki-67 score i tumorvev inkludert høygradig PIN var signifikant prognostisk for BF ($p < 0,001$). I tumorvev hvor høygradig PIN var ekskludert var også Ki-67-score signifikant assosiert med BF ($p < 0,001$) i tillegg til CF ($p = 0,018$). Det var ingen signifikant assosiasjon mellom Ki-67 score i normalt prostatavev fra kreftpasienter og endepunktene. Resultatene er presentert i Figur 18 og Tabell 10.



Figur 18: Kaplan-Meier kurver som viser andelen av prostatakreftpasienter ($n = 535$) med overlevelse uten biokjemisk svikt (A) og klinisk svikt (B) over tid, fordelt etter høy og lav Ki-67 score i tumorvev (ekskludert PIN). Høy Ki-67 score var signifikant assosiert med redusert overlevelse for biokjemisk svikt (A) og klinisk svikt (B). Lav score var definert som $< 1,5$ og høy score som $\geq 1,5$. P-verdiene er fra log-rank test med alle scoringsverdiene av Ki-67 (ikke dikotomisert). En p-verdi $< 0,05$ ble regnet som statistisk signifikant.

Tabell 10: Ki-67 score som prediktor for BF, CF og PCD hos pasienter med prostatakreft (n = 535) (univariat analyse; log rank test). Signifikante p-verdier er uthevet (grense $p \leq 0,05$).

	Pasienter (n)	Pasienter (%)	BF (n=200)	CF (n=56)
Ki-67 score			5-års EFS (%)	10-års EFS (%)
Normalt prostatavev inkludert hyperplasi				
				p-verdi
				0,601
				0,855
<i>Lav score</i>	251	47	83	96
<i>Høy score</i>	9	2	67	88
<i>Mangler</i>	275	51	-	-
Tumorvev inkludert PIN				
				p-verdi
				< 0001
				0,223
<i>Lav score</i>	410	77	76	93
<i>Høy score</i>	35	7	54	88
<i>Mangler</i>	90	17	-	-
Normalt prostatavev				
				p-verdi
				0,311
				0,731
<i>Lav score</i>	221	41	82	95
<i>Høy score</i>	5	1	80	100
<i>Mangler</i>	309	58	-	-
Tumorvev				
				p-verdi
				< 0,001
				0,018
<i>Lav score</i>	409	77	76	93
<i>Høy score</i>	36	7	55	89
<i>Mangler</i>	90	27	-	-

Forkortelser: BF = biokjemisk svikt; CF = klinisk svikt; PCD = prostatakreft død; EFS = hendelsesfri overlevelse i måneder; PIN = prostataintraepitelial neoplasi

5.3 Multivariate analyser

I den multivariate analysen (Tabell 11) var høy Ki-67 score (dikotomisert) i tumorvev ekskludert PIN en selvstendig prognostisk faktor for biokjemisk svikt (HR: 1,8, 95% KI: 1,14 – 2,84, $p = 0,011$) i tillegg til pT-stadie ($p < 0,001$), positiv sirkumferent margin ($p = 0,006$) og perineural infiltrasjon ($p = 0,006$).

Tabell 11: Cox regresjonsanalyse som summerer de selvstendig signifikante prognostiske faktorene for biokjemisk svikt for pasienter med prostatakraft ($n = 535$). P-verdier $< 0,05$ ble regnet som signifikante.

Variabel	Biokjemisk svikt		
	HR	KI 95%	p
pT-stadie			$< 0,001$
pT2	0,348	0,22 – 0,56	$< 0,001$
pT3a	0,572	0,36 – 0,91	0,019
Sirkum. PSM			0,006
Nei			
Ja	1,96	1,21 – 3,16	
PNI			0,006
Nei			
Ja	1,6	1,15 – 2,26	
Ki-67 score i tumorvev ekskludert PIN			0,011
Lav			
Høy	1,8	1,14 – 2,84	

Forkortelser: Sirkum. PSM = positiv sirkumferent margin/reseksjonsrand; PNI = perineural infiltrasjon; PIN = prostataintraepitelial neoplasi; KI = konfidensintervall; HR = hazard ratio.

6 Diskusjon

I denne studien som består av 535 pasienter har vi undersøkt om celleproliferasjonsmarkøren Ki-67 spiller en rolle hos pasienter med prostatakreft sammenliknet med veletablerte patologiske- og kliniske variabler. I følge våre funn så har pasienter med en høy Ki-67 i kreftsvulstene betydelig økt risiko for å få biokjemisk- og klinisk svikt. Flere andre studier har funnet en signifikant assosiasjon mellom Ki-67 score og biokjemisk svikt, noe som er i tråd med våre funn. I oppsummeringsartikkelen til Kristiansen som inkluderte 21 ulike studier var konklusjonen at Ki-67 har vist signifikant prognostisk verdi for pasienter med prostatakreft (både i univariate og multivariate analyser) (67). Andre studier har også støttet dette. Høy Ki-67 score var prognostisk for biokjemisk svikt i ulike kohortstudier med pasienter behandlet med radikal prostatektomi (68, 69, 73-77), og for pasienter behandlet med radioterapi (64, 71, 78-80). Felles for disse studiene var at antallet pasienter var lavt (gjennomsnitt $n = 244$). Størrelsen på kohortstudier kan stor ha betydning for resultatene. En av fordelene med denne studien er det relativt store antallet pasienter ($n = 535$).

I analysene våre var det statistisk signifikant korrelasjon mellom Gleason score og Ki-67, men når man ser på dataene var det nødvendigvis ikke slik at størstedelen av dem med høy Ki-67 score hadde mest aggressiv kreft i følge sin Gleason score. Av pasientene med høy Ki-67 score i tumorvev (dikotomisert, $n = 36$) hadde ca. 31% en Gleason score ≥ 8 . Blant pasientene med Ki-67 score ≥ 2 (moderat til sterk farging, $n = 21$) hadde 58 % en Gleason score ≥ 8 . Av de 4 pasientene med Ki-67 score på 3 (sterk farging) hadde 50 % en Gleason score 9 (Graderingsgruppe 5), mens de resterende hadde Gleason score 7a

(Graderingsgruppe 2) og 7b (Graderingsgruppe 3). I de multivariate analysene hadde Ki-67 score i tumorvev (ekskludert PIN) en selvstendig prognostisk verdi, mens Gleason score ble slått ut. Gleason score baserer seg på utseende av kreftvevet, men da vi ikke kan se cellene dele seg inngår ikke dette i scoringen. Funnene i vår studie kan tyde på at proliferasjonshastigheten, her målt med Ki-67, spiller en signifikant rolle i vurderingen av prognosen. Ved å visualisere graden av celledeling får man i denne studien ytterligere prognostisk informasjon når man studerer prostatakraftvev i mikroskopet. Dette vil være en nyttig tilleggsinformasjon i tillegg til Gleason score som sier noe om hvor aggressiv prostatakraften er hos den enkelte pasient.

I vår studie hadde vi ikke mange nok pasienter som var døde av prostatakraft ($n = 18$) for å tilstrekkelig undersøke sammenhengen mellom Ki-67 score og død, men flere andre studier har undersøkt dette og funnet en signifikant sammenheng. Størrelsen på disse studiene varierte mellom 125 – 221 inkluderte pasienter. I en stor studie av Berney et. al fant man at Ki-67 var prognostisk for død av prostatakraft for pasienter under aktiv overvåkning. I denne studien var det inkludert 693 pasienter (71).

Den definerte grenseverdien for høy Ki-67 score varierer mellom ulike studier, og det er ingen fastsatt grenseverdi for scoring av Ki-67. I vår studie ble Ki-67 score dikotomisert til å separere dem med følgende: lav score ble definert som $< 1,5$ og $\geq 1,5$ som høy score, som tilsvarer en prosentvis farging av kreftceller på $\approx 2,4 - 2,5\%$. Farging på $\geq 5\%$ ble definert som sterk farging. I følge Kristiansen (67) varierer grenseverdien for Ki-67 for positiv farging av

tumorcellekjerner fra 2,4% – 26%, og i alle disse studiene har Ki-67 en signifikant prognostisk verdi (67). Hvilken grenseverdi som benyttes vil kunne ha stor betydning for hvordan de statistiske analysene slår ut. En lav grenseverdi vil gi økt sensitivitet, men en lavere spesifisitet. Dette betyr at man kan fange opp flere av dem med en dårligere prognose, men flere pasienter med en potensielt bedre prognose vil også ende opp med en definert høy Ki-67 score. Generelt tolererer man en lavere spesifisitet i diagnostikken av veldig alvorlige sykdommer hvor det finnes god behandling. For prostatakreft pågår det allerede en debatt rundt overdiagnostikk og overbehandling med risiko for potensielt alvorlige bivirkninger, og det er av avgjørende betydning å finne markører som kan hjelpe til med å skille disse pasientene slik at de får mest mulig persontilpasset diagnostikk og behandling.

Det finnes ingen uniform metodologi for Ki-67 IHC og evaluering av resultatene (81). Metoden har en utfordring i forhold til reproduserbarhet da det er vanskelig å fullstendig standardisere IHC, selv med automatisert utstyr. Faktorer som påvirker resultatet er blant annet hvordan vevet håndteres før, etter og under fiksering, fikseringstiden, hvilket utstyr som benyttes, ulike immunhistokjemiske protokoller, hvordan vevet snittes (tykke snitt gjør det vanskelig å skille kjerner og cellestrukturer fra hverandre), dårlig vasking av vevet mellom trinnene i fargeprosessen (kan gi falsk positive svar) og hvilket vev som velges ut for undersøkelse. På grunn av at prostatakreft er en heterogen krefttype som vokser multifokalt, er det ikke sikkert at de vevsprøvene vi undersøker kommer fra de områdene med høyest risiko og dermed er representative for alvorlighetsgraden av sykdommen (81, 82). I tillegg er manuell telling av fargede cellekjerner og scoring med IHC subjektivt og har en betydelig intra- og interobservasjons-variasjon (67). Det finnes også flere antistoffer

rettet mot Ki-67. De fleste studier har benyttet antistoffet MIB-1 for visualisering av Ki-67 med IHC (67), mens i denne studien er antistoffet CONFIRM ANTI-Ki-67 brukt. Det at vi benytter et annet antistoff kan sees på som en ulempe. Slik jeg kjenner det, er det ingen studier som sammenligner de ulike antistoffene rettet mot Ki-67 for å undersøke eventuelle forskjeller mellom dem.

7 Konklusjon

Når man ser på prostatakraft i lysmikroskop ser man stort sett ingen mitoser, noe som er vanlig for mange andre solide kreftsvulster. Derfor er heller ikke proliferasjonsraten til kreftcellene en del av graderingssystemet for prostatakraft. Funnene i vår studie tyder på at selv om vi visuelt ikke kan se at cellene deler seg (ser mitoser), så har proliferasjonsraten til kreftcellene i prostatakraft en betydning for prognosen og gir ytterligere prognostisk informasjon til de veletablerte kliniske og patologiske markørene brukt ved prostatakraft. I vår studie fant vi at Ki-67 gir ytterligere prognostisk informasjon om hvor aggressiv en kreftsvulst i prostata er da den kan gi informasjon om risiko for biokjemisk- og klinisk svikt.

8 Referanser

1. International Agency for Research on Cancer. Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Prostatecancer. Hentet 17.03.16 fra: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
2. World Cancer Research Fund International. Cancer facts & figures - Worldwide data. Hentet 30.03.16 fra: <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/worldwide-data>.
3. Kreftregisteret. Prostatakraft 2016. Hentet 17.03.16 fra: <http://www.kreftregisteret.no/no/Generelt/Fakta-om-kreft-test/Prostatakraft/>.
4. Gjelsvik YM, Haug ES, Berge V, Muller C, Kvåle R, Johansen TB. Årsrapport 2004-2013(2014) Prostatakraft. Institutt for populaskonsbasert kreftforskning, 2015.
5. Kreftforeningen. PSA-Prostata spesifikt Antigen. Helsedirektoratet. IS-nr. 0291. <https://helsedirektoratet.no/Lists/Publikasjoner/Attachments/248/Psa-prostata-spesifikt-antigen-IS-0291.pdf>
6. Johannessen K, Berge, et. al. Nasjonalt handlingsprogram med retningslinjer for diagnostikk, behandling og oppfølging av prostatakraft. 6. utgave. Helsedirektoratet; 2015. ISBN 978 - 82 - 8081 - 380 - 0.
7. Carter HB. Prostate cancers in men with low PSA levels--must we find them? The New England journal of medicine. 2004;350(22):2292-4.
8. Norsk urologisk forening. PSA, Norsk urologisk forenings anbefalinger for allmennleger 2013. <http://legeforeningen.no/PageFiles/131694/PSA%20mars%202013.pdf>
9. Richard L. Drake, A. Wayne Vogl, Adam W. M. Mitchell. Gray's Anatomy for students Second ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2010.
10. John. E. Hall PD. Gyton and Hall Textbook of Medical Physiology. Twelfth ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2011.
11. Barbara Young, James S. Lowe, Alan Stevens, Heath JW. Wheater's Functional Histology, A text and Colour Atlas. Fifth ed: Churchill Livingstone Elsevier; 2011.
12. Michael Schuenke, Erik Schulte, Udo Schumacher. Atlas of Anatomy. Second ed. New York: Thieme Medical Publishers, Inc; 2009.
13. Vinay Kumar, Abbas Abul K., Jon C Aster. Robbins Basic Pathology. Ninth ed. Philadelphia: Elsevier; 2013.
14. Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC. Family history and the risk of prostate cancer. The Prostate. 1990;17(4):337-47.
15. Gronberg H, Wiklund F, Damber JE. Age specific risks of familial prostate carcinoma: a basis for screening recommendations in high risk populations. Cancer. 1999;86(3):477-83.
16. Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1992;89(8):3367-71.
17. Ewing CM, Ray AM, Lange EM, Zuhlke KA, Robbins CM, Tembe WD, et al. Germline mutations in HOXB13 and prostate-cancer risk. The New England journal of medicine. 2012;366(2):141-9.
18. Hsu FC, Lindstrom S, Sun J, Wiklund F, Chen SH, Adami HO, et al. A multigenic approach to evaluating prostate cancer risk in a systematic replication study. Cancer genetics and cytogenetics. 2008;183(2):94-8.

19. Edwards SM, Kote-Jarai Z, Meitz J, Hamoudi R, Hope Q, Osin P, et al. Two percent of men with early-onset prostate cancer harbor germline mutations in the BRCA2 gene. *American journal of human genetics*. 2003;72(1):1-12.
20. Parker PM, Rice KR, Sterbis JR, Chen Y, Cullen J, McLeod DG, et al. Prostate cancer in men less than the age of 50: a comparison of race and outcomes. *Urology*. 2011;78(1):110-5.
21. Baquet CR, Horm JW, Gibbs T, Greenwald P. Socioeconomic factors and cancer incidence among blacks and whites. *Journal of the National Cancer Institute*. 1991;83(8):551-7.
22. Platz EA, Rimm EB, Willett WC, Kantoff PW, Giovannucci E. Racial variation in prostate cancer incidence and in hormonal system markers among male health professionals. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000;92(24):2009-17.
23. Ito K. Prostate cancer in Asian men. *Nature reviews Urology*. 2014;11(4):197-212.
24. Sasco AJ, Secretan MB, Straif K. Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*. 2004;45 Suppl 2:S3-9.
25. Brawley OW. Avoidable cancer deaths globally. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2011;61(2):67-8.
26. Chao A, Thun MJ, Connell CJ, McCullough ML, Jacobs EJ, Flanders WD, et al. Meat consumption and risk of colorectal cancer. *Jama*. 2005;293(2):172-82.
27. Norat T, Bingham S, Ferrari P, Slimani N, Jenab M, Mazuir M, et al. Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. *Journal of the National Cancer Institute*. 2005;97(12):906-16.
28. Praud D, Rota M, Rehm J, Shield K, Zatonski W, Hashibe M, et al. Cancer incidence and mortality attributable to alcohol consumption. *International journal of cancer*. 2016;138(6):1380-7.
29. Allen NE, Beral V, Casabonne D, Kan SW, Reeves GK, Brown A, et al. Moderate alcohol intake and cancer incidence in women. *Journal of the National Cancer Institute*. 2009;101(5):296-305.
30. Jin M, Cai S, Guo J, Zhu Y, Li M, Yu Y, et al. Alcohol drinking and all cancer mortality: a meta-analysis. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2013;24(3):807-16.
31. Ezzati M, Lopez AD, Rodgers A, Vander Hoorn S, Murray CJ. Selected major risk factors and global and regional burden of disease. *Lancet (London, England)*. 2002;360(9343):1347-60.
32. Kushi LH, Doyle C, McCullough M, Rock CL, Demark-Wahnefried W, Bandera EV, et al. American Cancer Society Guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2012;62(1):30-67.
33. Wolin KY, Carson K, Colditz GA. Obesity and cancer. *The oncologist*. 2010;15(6):556-65.
34. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *The Lancet Oncology*. 2010;11(11):1048-56.
35. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *Journal of hepatology*. 2006;45(4):529-38.

36. Whiteman DC, Whiteman CA, Green AC. Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies. *Cancer causes & control : CCC*. 2001;12(1):69-82.
37. N. Mottet, J. Bellmunt, E. Briers, R.C.N. van den Bergh, M. Bolla, N.J. van Casteren, et al. *Guidelines on Prostate Cancer*. European Association of Urology, 2015.
38. Brawer MK, Chetner MP, Beatie J, Buchner DM, Vessella RL, Lange PH. Screening for prostatic carcinoma with prostate specific antigen. *The Journal of urology*. 1992;147(3 Pt 2):841-5.
39. Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR, Hudson MA, Scardino PT, Flanigan RC, et al. Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *The Journal of urology*. 1994;151(5):1283-90.
40. Schroder FH, van der Crujisen-Koeter I, de Koning HJ, Vis AN, Hoedemaeker RF, Kranse R. Prostate cancer detection at low prostate specific antigen. *The Journal of urology*. 2000;163(3):806-12.
41. Wolf AM, Wender RC, Etzioni RB, Thompson IM, D'Amico AV, Volk RJ, et al. American Cancer Society guideline for the early detection of prostate cancer: update 2010. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2010;60(2):70-98.
42. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, et al. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level \leq 4.0 ng per milliliter. *The New England journal of medicine*. 2004;350(22):2239-46.
43. Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Basler JW. Detection of organ-confined prostate cancer is increased through prostate-specific antigen-based screening. *Jama*. 1993;270(8):948-54.
44. Crawford ED, DeAntoni EP, Etzioni R, Schaefer VC, Olson RM, Ross CA. Serum prostate-specific antigen and digital rectal examination for early detection of prostate cancer in a national community-based program. *The Prostate Cancer Education Council. Urology*. 1996;47(6):863-9.
45. Mettlin C, Lee F, Drago J, Murphy GP. The American Cancer Society National Prostate Cancer Detection Project. Findings on the detection of early prostate cancer in 2425 men. *Cancer*. 1991;67(12):2949-58.
46. Humphrey PA. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2004;17(3):292-306.
47. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *The American journal of surgical pathology*. 2016;40(2):244-52.
48. Parham P. *The Immune System*. Third edition ed: Garald Science, Taylor & Francis Group, LLC; 2009.
49. John D Hainsworth M, F Anthony Greco, MD. Poorly-differentiated cancer from an unknown primary site. *UpToDate*. 2014.
50. Bratthauer GL. The avidin-biotin complex (ABC) method and other avidin-biotin binding methods. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2010;588:257-70.
51. Ramos-Vara JA. Principles and methods of immunohistochemistry. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2011;691:83-96.

52. Brawer MK, Peehl DM, Stamey TA, Bostwick DG. Keratin immunoreactivity in the benign and neoplastic human prostate. *Cancer research*. 1985;45(8):3663-7.
53. Hedrick L, Epstein JI. Use of keratin 903 as an adjunct in the diagnosis of prostate carcinoma. *The American journal of surgical pathology*. 1989;13(5):389-96.
54. Yang XJ, Lecksell K, Gaudin P, Epstein JI. Rare expression of high-molecular-weight cytokeratin in adenocarcinoma of the prostate gland: a study of 100 cases of metastatic and locally advanced prostate cancer. *The American journal of surgical pathology*. 1999;23(2):147-52.
55. Shah RB, Zhou M, LeBlanc M, Snyder M, Rubin MA. Comparison of the basal cell-specific markers, 34betaE12 and p63, in the diagnosis of prostate cancer. *The American journal of surgical pathology*. 2002;26(9):1161-8.
56. Jiang Z, Woda BA, Rock KL, Xu Y, Savas L, Khan A, et al. P504S: a new molecular marker for the detection of prostate carcinoma. *The American journal of surgical pathology*. 2001;25(11):1397-404.
57. Rubin MA, Zhou M, Dhanasekaran SM, Varambally S, Barrette TR, Sanda MG, et al. alpha-Methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer. *Jama*. 2002;287(13):1662-70.
58. Hegab A, Shuman M, El-Akher MA, Arwlan D. Ki-67 immunohistochemical expression in mandibular ameloblastoma: A prognostic indicator for local recurrence. *Open Journal of Stomatology*. 2013;Vol.03No.09:7.
59. Luporsi E, Andre F, Spyrtos F, Martin PM, Jacquemier J, Penault-Llorca F, et al. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast cancer research and treatment*. 2012;132(3):895-915.
60. Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstadter F, Zeman F, Koller M, Gerstenhauer M, et al. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast cancer research and treatment*. 2013;139(2):539-52.
61. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*. 2000;182(3):311-22.
62. Fisher G, Yang ZH, Kudahetti S, Moller H, Scardino P, Cuzick J, et al. Prognostic value of Ki-67 for prostate cancer death in a conservatively managed cohort. *British journal of cancer*. 2013;108(2):271-7.
63. Zhong W, Peng J, He H, Wu D, Han Z, Bi X, et al. Ki-67 and PCNA expression in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Clinical and investigative medicine Medecine clinique et experimentale*. 2008;31(1):E8-e15.
64. Cowen D, Troncoso P, Khoo VS, Zagars GK, von Eschenbach AC, Meistrich ML, et al. Ki-67 Staining Is an Independent Correlate of Biochemical Failure in Prostate Cancer Treated with Radiotherapy. *Clinical Cancer Research*. 2002;8(5):1148-54.
65. van Weerden WM, Moerings EP, van Kreuningen A, de Jong FH, van Steenbrugge GJ, Schroder FH. Ki-67 expression and BrdUrd incorporation as markers of proliferative activity in human prostate tumour models. *Cell proliferation*. 1993;26(1):67-75.
66. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1984;133(4):1710-5.
67. Kristiansen G. Diagnostic and prognostic molecular biomarkers for prostate cancer. *Histopathology*. 2012;60(1):125-41.

68. Sebo TJ, Cheville JC, Riehle DL, Lohse CM, Pankratz VS, Myers RP, et al. Perineural invasion and MIB-1 positivity in addition to Gleason score are significant preoperative predictors of progression after radical retropubic prostatectomy for prostate cancer. *The American journal of surgical pathology*. 2002;26(4):431-9.
69. Gunia S, Albrecht K, Koch S, Herrmann T, Ecke T, Loy V, et al. Ki67 staining index and neuroendocrine differentiation aggravate adverse prognostic parameters in prostate cancer and are characterized by negligible inter-observer variability. *World journal of urology*. 2008;26(3):243-50.
70. Berney DM, Gopalan A, Kudahetti S, Fisher G, Ambroisine L, Foster CS, et al. Ki-67 and outcome in clinically localised prostate cancer: analysis of conservatively treated prostate cancer patients from the Trans-Atlantic Prostate Group study. *British journal of cancer*. 2009;100(6):888-93.
71. Khor LY, Bae K, Paulus R, Al-Saleem T, Hammond ME, Grignon DJ, et al. MDM2 and Ki-67 predict for distant metastasis and mortality in men treated with radiotherapy and androgen deprivation for prostate cancer: RTOG 92-02. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(19):3177-84.
72. Zellweger T, Gunther S, Zlobec I, Savic S, Sauter G, Moch H, et al. Tumour growth fraction measured by immunohistochemical staining of Ki67 is an independent prognostic factor in preoperative prostate biopsies with small-volume or low-grade prostate cancer. *International journal of cancer*. 2009;124(9):2116-23.
73. Bubendorf L, Sauter G, Moch H, Schmid HP, Gasser TC, Jordan P, et al. Ki67 labelling index: an independent predictor of progression in prostate cancer treated by radical prostatectomy. *The Journal of pathology*. 1996;178(4):437-41.
74. Bettencourt MC, Bauer JJ, Sesterhenn IA, Mostofi FK, McLeod DG, Moul JW. Ki-67 expression is a prognostic marker of prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. *The Journal of urology*. 1996;156(3):1064-8.
75. Rubio J, Ramos D, Lopez-Guerrero JA, Iborra I, Collado A, Solsona E, et al. Immunohistochemical expression of Ki-67 antigen, cox-2 and Bax/Bcl-2 in prostate cancer; prognostic value in biopsies and radical prostatectomy specimens. *Eur Urol*. 2005;48(5):745-51.
76. Laitinen S, Martikainen PM, Tolonen T, Isola J, Tammela TLJ, Visakorpi T. EZH2, Ki-67 and MCM7 are prognostic markers in prostatectomy treated patients. *International journal of cancer*. 2008;122(3):595-602.
77. Miyake H, Muramaki M, Kurahashi T, Takenaka A, Fujisawa M. Expression of potential molecular markers in prostate cancer: correlation with clinicopathological outcomes in patients undergoing radical prostatectomy. *Urologic oncology*. 2010;28(2):145-51.
78. Khoo VS, Pollack A, Cowen D, Joon DL, Patel N, Terry NHA, et al. Relationship of Ki-67 labeling index to DNA-ploidy, S-phase fraction, and outcome in prostate cancer treated with radiotherapy. *The Prostate*. 1999;41(3):166-72.
79. Pollack A, Cowen D, Troncoso P, Zagars GK, von Eschenbach AC, Meistrich ML, et al. Molecular markers of outcome after radiotherapy in patients with prostate carcinoma: Ki-67, bcl-2, bax, and bcl-x. *Cancer*. 2003;97(7):1630-8.
80. Pollack A, DeSilvio M, Khor LY, Li R, Al-Saleem TI, Hammond ME, et al. Ki-67 staining is a strong predictor of distant metastasis and mortality for men with prostate cancer treated with radiotherapy plus androgen deprivation: Radiation Therapy Oncology Group Trial 92-02. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004;22(11):2133-40.

81. Pelosi G, Rindi G, Travis WD, Papotti M. Ki-67 Antigen in Lung Neuroendocrine Tumors: Unraveling a Role in Clinical Practice. *Journal of Thoracic Oncology*.9(3):273-84.
82. Iczkowski KA. Prostate pointers and pitfalls: the 10 most prevalent problems in prostate biopsy interpretation. *Annals of diagnostic pathology*. 2014;18(5):301-11.
83. UpToDate 2016. Tumor node metastasis (TNM) stage definitions for prostate. Hentet 18.05.16 fra:
http://www.uptodate.com/contents/image?imageKey=ONC%2F75565&topicKey=ONC%2F16992&rank=1%7E150&source=see_link&search=prostate+cancer+tnm&utdPopup=true.

9 Vedlegg

Vedlegg 1: TNM-klassifisering av prostatakreft (83).

Tumor node metastasis (TNM) stage definitions for prostate cancer

Primary tumor (T)	
Clinical (cT)	
TX	Primary tumor cannot be assessed
T0	No evidence of primary tumor
T1	Clinically inapparent tumor neither palpable nor visible by imaging
T1a	Tumor incidental histologic finding in 5% or less of tissue resected
T1b	Tumor incidental histologic finding in more than 5% of tissue resected
T1c	Tumor identified by needle biopsy (eg, because of elevated PSA)
T2	Tumor confined within prostate*
T2a	Tumor involves one-half of one lobe or less
T2b	Tumor involves more than one-half of one lobe but not both lobes
T2c	Tumor involves both lobes
T3	Tumor extends through the prostate capsule [†]
T3a	Extracapsular extension (unilateral or bilateral)
T3b	Tumor invades seminal vesicle(s)
T4	Tumor is fixed or invades adjacent structures other than seminal vesicles such as external sphincter, rectum, bladder, levator muscles, and/or pelvic wall
Pathologic (pT)^Δ	
pT2	Organ confined
pT2a	Unilateral, one-half of one side or less
pT2b	Unilateral, involving more than one-half of side but not both sides
pT2c	Bilateral disease
pT3	Extraprostatic extension
pT3a	Extraprostatic extension or microscopic invasion of bladder neck [◊]
pT3b	Seminal vesicle invasion
pT4	Invasion of rectum, levator muscles, and/or pelvic wall
Regional lymph nodes (N)	
Clinical	
NX	Regional lymph nodes were not assessed
N0	No regional lymph node metastasis
N1	Metastasis in regional lymph node(s)
Pathologic	
pNX	Regional nodes not sampled
pN0	No positive regional nodes
pN1	Metastases in regional node(s)
Distant metastasis (M) [§]	
M0	No distant metastasis
M1	Distant metastasis
M1a	Nonregional lymph node(s)
M1b	Bone(s)
M1c	Other site(s) with or without bone disease

* Tumor found in one or both lobes by needle biopsy, but not palpable or reliably visible by imaging, is classified as T1c.

[†] Invasion into the prostatic apex or into (but not beyond) the prostatic capsule is classified not as T3 but as T2.

^Δ There is no pathologic T1 classification.

[◊] Positive surgical margin should be indicated by an R1 descriptor (residual microscopic disease).

[§] When more than one site of metastasis is present, the most advanced category is used. pM1c is most advanced.

Used with the permission of the American Joint Committee on Cancer (AJCC), Chicago, Illinois. The original source for this material is the AJCC Cancer Staging Manual, Seventh Edition (2010) published by Springer New York, Inc.

UpToDate®