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 reproduserbare 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.

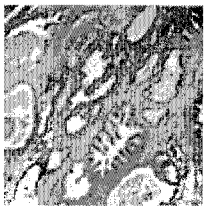
Det er vanskelig å finne områder hvor digitale prosesser og datamaskiner ikke benyttes, og medisin er ikke noe unntak. Dataassistert bildebehandling inngår allerede i mer enn 40 000 publiserte studier innen biomedisin, og dette er et felt i kraftig vekst. Ikke minst gjelder dette innen patologi, hvor 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

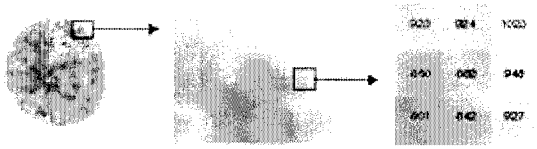
Anvendelsessområder for digital patologi

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 deoksiribose-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.

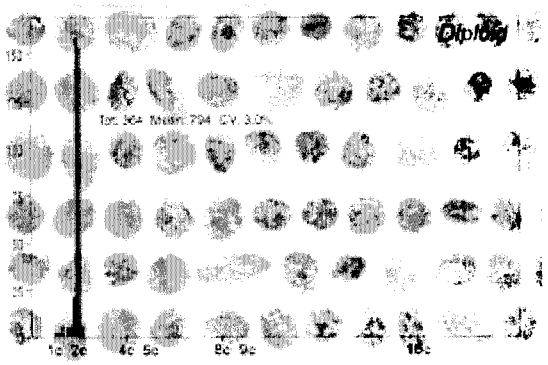


Figur 2 Digital bildebehandling av en Feulgen-farget kjerne fra prostatakjertel. Til venstre sees et gråtonebilde med 1 600 · forstørrelse, 1 024 · 1 024 piksler med 10 bits oppløsning per piksel. Bilde blir fanget som en 1 024 · 1 024 matrise og hver piksel blir lagret med tilhørende gråtoneverdi. Det 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 absorbsjon) til 1 023 (helt hvitt, ingen absorbsjon). 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

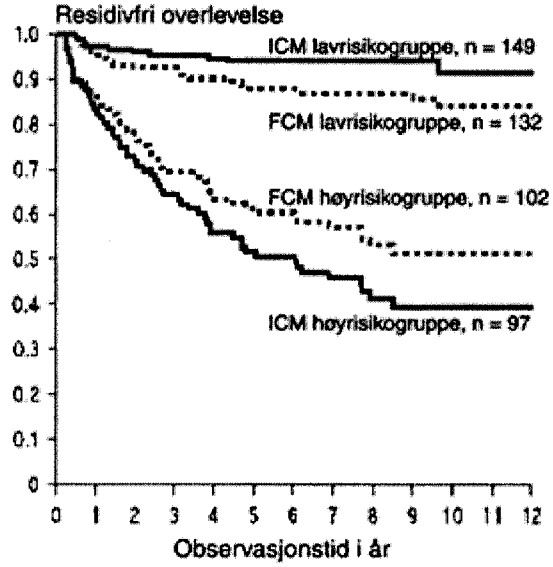
Væskestrømscytometri versus bildecytometri

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. Høyrisikogruppene 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 høyrisikogruppe 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-ploidiklassifikasjon. Av de 100 prøvene med forskjellig klassifikasjon 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-ploidiresultater 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-ploidiklassifikasjon 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 toparameteranalyse 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-ploidi). 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 væskestrømcytometri 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-ploidiundersøkelser 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-ploidiundersøkelse av de 100 adenokarsinomene 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-ploidindersøkelser 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-ploidiundersøkelser 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.

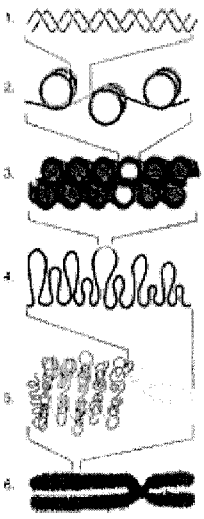
Ross og medarbeidere har publisert tre artikler som vurderte DNA-ploidi som prognostisk faktor. I ett arbeid (35) har de undersøkt DNA-ploidi bedømt bildecytometrisk og Gleason-skåre i nålebiopsier, og fant at kun DNA-ploidi gav uavhengig prognostisk informasjon vurdert opp mot sykdomsfri overlevelse. 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 reproduserbare forskjeller mellom de to gruppene, og benytter disse som en prognostisk nukleotype. Man kan identifisere et nærmest ubegrenset antall egenskaper fra kromatinstrukturen i en kjerne, 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.

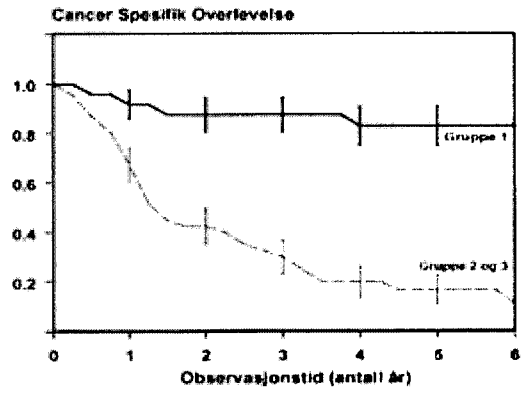
Kromatinstruktur og nukleotyping i cancer prostatae

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 kjernekromatinet 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 teksturestimatorer basert på en såkalt entropimatrise (grey level entropy matrix), egenskaper som gir et kvantitativt utrykk 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 overlevelsesdataene (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).



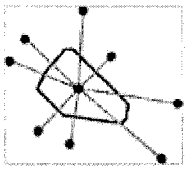
Figur 6 Kreftspesifikk overlevelse for 77 pasienter med avansert prostatakreft. Gruppe 1: Påvist remisjon og ingen tegn til progrediering tre år etter behandling (n = 30). Gruppe 2: Progrediering og død av prostatakreft innen to år (n = 36). Gruppe 3: Pasienter med stabil sykdom eller remisjon i første 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

gruppe 2 og 3. I en univariatanalyse ble hver undergruppe testet mot hverandre med hensyn til en variabel i en logranktest. Kurvene ble så beregnet ved aktuaroverlevelsesmetoden

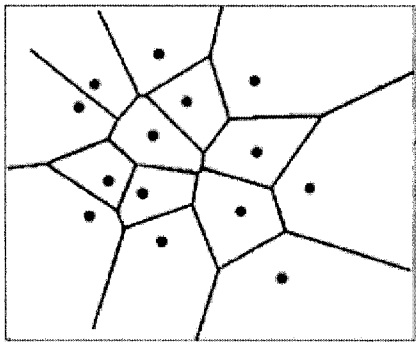
Disse studiene ble utført på «monolayers» fra kjernesuspensjoner farget med Feulgen-teknikken. Metodene for preparering og produksjon av digitale bilder er den samme som for bildecytometri, og kun databehandlingen er forskjellig. Vi evaluerer for tiden nukleotyping som prognostisk markør i store pasientmaterialer og for ulike kreftformer.

Databasert analyse av vevstopologi

En strikt kvantitativ og reproduserbar beskrivelse av vevsarkitektur er fremdeles en utfordring i diagnostisk patologi. De mest lovende metodene er basert på såkalt grafteori. Gråtonebilder fra standard HE-fargede snitt overføres fra mikroskop via kamera til datamaskinen. Fra disse gråtonebildene identifiseres cellekjernene, og man ser bort fra annen informasjon i bildet. Det geometriske tyngdepunktet i hver cellekjerne beregnes, og slik genereres en todimensjonal punktsverm. Dette danner utgangspunktet for konstruksjon av ulike grafer, f.eks. Voronoi-diagrammet (fig 7) og Delaunay-trianguleringen (fig 8). Fra de mosaikkene som genereres (fig 9), kan man trekke ut ulike formparametere som gir en numerisk beskrivelse av vevsarkitekturen. Disse data kan benyttes til histologisk klassifikasjon, noe som blant annet er godt dokumentert i studier av lungevev (84, 85).

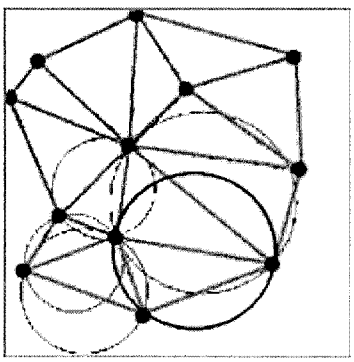


a

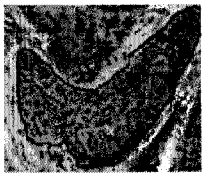


b

Figur 7 Konstruksjon av Voronoi-diagrammet. Ett enkelt Voronoi-polygon (a) er definert ved normalene til de linjer som danner forbindelsen fra et senterpunkt og de nærmeste nabopunkter. Når dette gjentas for alle punkter innenfor et gitt areal, oppnås et Voronoi-diagram som i b

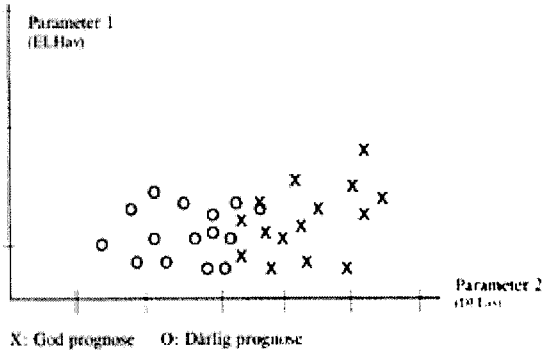


Figur 8 Delaunay-trianguleringen (DT) er matematisk relatert til Voronoi-diagrammet (VD). Dersom vi tar utgangspunkt i VD, kan DT konstrueres ved å opprette triangler mellom senterpunktet i tilstøtende VD. Forutsetningen for at et DT skal være gyldig, er at den sirkelen som konstrueres rundt de tre hjørnepunktene ikke omslutter ytterligere punkter



Figur 9 En epiteløy i den invasive fronten i et karsinom, med segmenterte kjerner, DT og VD markert

Vi har blant annet anvendt slike grafteoribaserte modeller i en pilotstudie på lokalisert prostatakreft, 15 pasienter med god og 15 med dårlig prognose. Alle pasientene var behandlet med radikal prostatektomi uten komplikasjoner. Som god prognose ble angitt overlevelse mer enn ti år, og gruppen med dårlig prognose hadde mindre enn fem års overlevelse. Som figur 10 viser, kunne vi i denne pilotstudien klart skille mellom prøver fra pasienter med henholdsvis god og dårlig prognose. Hvis disse resultatene kan bekreftes i en full studie (under arbeid), har vi nok en prognostisk metode for pasienter med prostatakreft.



Figur 10 Spredningsdiagram for to prognostiske grupper (overlevelse mer enn ti år, død innen fem år) av prostatakreft (n = 30). Både parameter 1 (DELav: Gjennomsnittlig kantlengde på DT) og 2 (ELHav: Gjennomsnittlig kantlengde homogenitet) er derivert fra DT

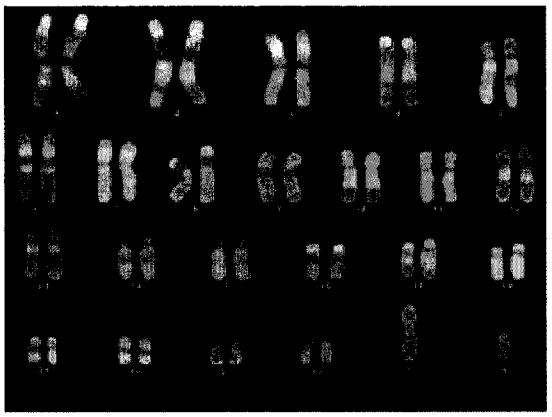
Ved å erstatte HE-fargingen av snitt med Feulgen-metoden har vi vist at vi kan øke presisjonen i disse analysemetodene, og dette muliggjør også en kombinasjonsanalyse med DNA-ploidi og nukleotyping analysert på de samme bildene.

Fluorescens in situ-hybridisering (FISH) og digital bildebehandling

Bruk av digitale teknikker i kombinasjon med in situ-hybridiseringsteknikker har gitt flere nye metoder med et stort potensial innen biomedisinsk forskning. Ett eksempel er CGH, (komparativ genomhybridisering), hvor DNA ekstrahert fra f.eks. tumorceller hybridiseres (i konkurranse med normalt DNA) til kromosomfragmenter fra normale celler. Ved å merke DNA fra maligne og normale celler med ulike fargestoffer kan man måle forskjeller i mengde hybridisert DNA, og på den måten identifisere og lokalisere tap eller økning av DNA-sekvenser i tumor. Metoden benyttes til å kartlegge hele genom, og et stort antall mulige kreftrelaterte DNA-sekvenser og deres lokalisasjon på kromosomene er identifisert på denne måten. En rekke CGH-studier (86, 87) har vist at tap av DNA-sekvenser (særlig lokalisert til 8p, 13q, 6q, 16q, 18q og 9p) er typiske for primære karsinomer. I residiverende svultster, derimot, finnes også ekstra kopier av DNA-sekvenser, ofte lokalisert til kromosomene 7, 8q og X. Det diskuteres derfor om utvikling av

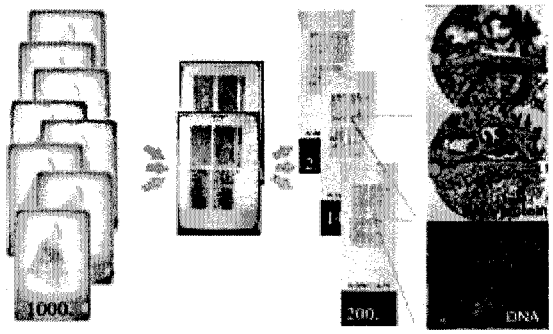
hormonuavhengig vekst i cancer prostatae kan ha en genetisk basis, som dersom den avdekkes, også ville kunne benyttes som en prognostisk markør.

«Cross species FISH» (RxFISH) (88) er en variant av FISH kombinert med digitale teknikker. Ulike kromosomfargeprober kan brukes til å påvise balanserte kromosomale rearrangeringer i enkeltceller (fig 11). Dette har vist seg nyttig for cytogenetisk kartlegging av leukemier, men det er også vist at teknikken kan ha anvendelse for solide svulster, f.eks. cancer prostatae.

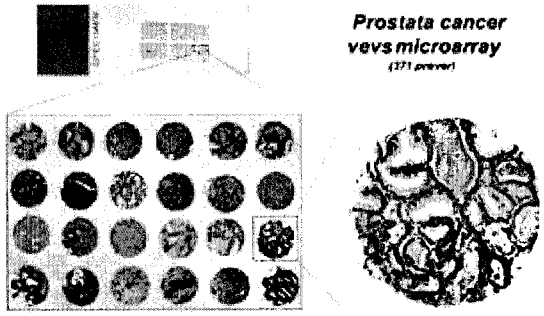


Figur 11 DNA-prober fra gibbonape hybridisert med humant DNA ved hjelp av RxFISH-metoden (Rainbow cross species FISH, etter det kommersielle navnet). Fem bilder med fem ulike prober er lagt på hverandre ved hjelp av digitale teknikker, etter fotografering av menneskets 24 kromosomer gjennom fem ulike filtre. Det dannes på denne måten et farget båndmønster spesifikt for hvert kromosom basert på genomisk homologi mellom artene. Metoden kan derfor brukes til å påvise balanserte kromosomale rearrangeringer, for eksempel i prostata (bildet er laget av M.R. Teixeira, og er benyttet med hans tillatelse)

Vevsmikroarray (89), er en metode delvis basert på de samme prinsippene som CGH. Med denne metoden kan man undersøke genekspresjon og DNA-sekvenser i så mye som 1 000 sylindriske vevsprøver samtidig (fig 12 og 13). Vevsprøvene støpes inn i parafinblokker, og snitt fra disse mikroarrays kan undersøkes parallelt med in situ-påvisning av DNA, RNA, samt proteiner. Basert på digitale bilder av slike parallelle snitt kan man raskt identifisere et stort antall molekylære markører av mulig prognostisk verdi.



Figur 12 Fremstilling av prøver til vevsmikroarray. Til venstre sees vev innstøpt i parafinblokker. Prøver fra mange parafinblokker overføres og støpes så inn i en enkelt parafinblokk. Snitt fra såkalte mikroarray kan undersøkes parallelt med in situ-påvisning av DNA, RNA, og proteiner. Basert på digitale bilder av parallelle snitt, kan man raskt analysere et stort antall molekylære markører fra de samme prøvene. (bildet er utarbeidet og trykkes etter godkjenning av Olli Kallioniemi)



Figur 13 Vevsmikroarraymetoden anvendt på 371 tilfeller av prostatakreft (89). Hvert tilfelle er representert ved små sylindriske biopsier. Til høyre sees detalj fra prostatakjertel (bildet er utarbeidet og trykkes etter godkjenning av Olli Kallioniemi)

Bubendorf og medarbeidere (90) gjennomførte en studie på 371 prøver fra cancer prostatae ved bruk av vevsmikroarray (fig 12). De fant at for primære karsinomer var høynivåamplifikasjon av gensekvenser ($\geq$ 3X) meget sjeldne (< 2 %). Hos pasienter med lokalt residiv fant man høynivåamplifikasjon av androgenreseptor, myconkogen og cyclin-D1 hos henholdsvis 23 %, 4 % og 8 %. De tilsvarende tallene for pasienter med hormonresistent metastatisk sykdom var henholdsvis 22 %, 11 % og 5 %. Resultatene tyder på at amplifisering av androgenreseptorer kan være en av årsakene til manglende respons på hormonbehandling hos pasienter med cancer prostatae. Resultatene indikerer også at myc-onkogenet kan være av betydning for utvikling av metastaser hos disse pasientene. Både androgenreseptor og myc-onkogenet kan således være aktuelle markører. Denne nye teknikken innebærer betydelig arbeidsbesparelse, og gjør at det nå er forholdsvis enkelt å studere mange markører parallelt hos et stort antall pasienter.

Vevsmikroarray er ett eksempel på de mulighetene en kombinasjon av molekylære og digitale teknikker gir. Ettersom vevsmikroarrayanalyser utføres på digitale bilder, kan denne metoden også relativt enkelt kombineres med de andre teknikker, f.eks. nukleotyping. Dette gir muligheter for mer komplette studier og ny innsikt i forholdet mellom strukturelle og funksjonelle forandringer i patologiske prosesser.

Kombinasjonen av tradisjonell patologi, molekylærbiologiske metoder og digital bildebehandling vil gi muligheter for større innsikt i patologiske prosesser og dermed også bedre diagnostikk. Dette representerer imidlertid en utfordring for patologer og klinikere, som må ta de nye metodene i bruk. DNA-ploidi som prognostisk markør ved tidlig cancer prostatae er bare ett av mange eksempler på at det allerede foreligger gode objektive metoder som ikke blir optimalt utnyttet.

Litteratur

1. Chieco P, Derenzini M. The Feulgen reaction 75 years on. Histochem Cell Biol 1999; 111: 345 – 58.
2. Jeffers MD, Michie BA, Oakes SJ, Gillan JE. Comparison of ploidy analysis by flow cytometry and image analysis in hydatidiform mole and non-molar abortion. Histopathology 1995; 27: 415 – 21.
3. Bertino B, Knape WA, Pytlinska M, Strauss K, Hammou JC. A comparative study of DNA content as measured by flow cytometry and image analysis in 1864 specimens. Anal Cell Pathol 1994; 377 – 94.
4. Banks ER, Jennings CD, Jacobs S, Davey DD. Comparative assessment of DNA analysis in effusions by image analysis and flow cytometry. Diagn Cytopathol 1994; 62 – 6.
5. Spyratos F, Briffod M. DNA ploidy and S-phase fraction by image and flow cytometry in breast cancer fine-needle cytopunctures. Mod Pathol 1997; 556 – 63.

6. Epp RA, Justice WM, Garcia FU, McGregor DH, Giri SP, Kimler BF. Retrospective DNA ploidy analysis by image and flow cytometry in head and neck cancer. Laryngoscope 1996; 106: 1306 – 13.

7. Goulandris N, Karakitsos P, Georgoulakis J, Bellos C, Deliveliotis C, Legaki S. Deoxyribonucleic acid measurements in transitional cell carcinomas: comparison of flow and image cytometry techniques J Urol 1996; 156: 958 – 60.

8. Chen TL, Luo I, Mikhail N, Raskova J, Raska K jr. Comparison of flow and image cytometry for DNA content analysis of fresh and formalin-fixed, paraffin-embedded tissue in breast carcinoma. Cytometry 1995; 22: 181 – 9.

9. Bowman R, Kanacki ZA, Garberoglio C, Chase DR. Comparison between image and flow cytometry. A priori factors that influence technique. Anal Quant Cytol Histol 1995; 17: 276 – 83.

10. Berner A, Danielsen HE, Juul NO, Juul ME, Pettersen EO, Reith A et al. Caveats in the estimation of DNA-ploidy in paraffin embedded specimens of primary prostate cancer and lymph node metastases by flow and image cytometry. Anal Cell Pathol 1993; 5: 339 – 52.

11. Dawson AE, Norton JA, Weinberg DS. Comparative assessment of proliferation and DNA content in breast carcinoma by image analysis and flow cytometry. Am J Pathol 1990; 136: 1115 – 24.

12. Perotti D, Corletto V, Giardini R, Parafioriti A, Fossati BF, Luksch R. Retrospective analysis of ploidy in primary osseous and extraosseous Ewing family tumors in children. Tumori 1998; 84: 493 – 8.

13. Alanen KA, Lintu M, Joensuu H. Image cytometry of breast carcinomas that are DNA diploid by flow cytometry: time to revise the concept of DNA diploidy? Anal Quant Cytol Histol 1998; 20: 178 – 86.

14. Peiro G, Lerma E, Climent MA, Segui MA, Alonso MC, Prat J. Prognostic value of S-phase fraction in lymph-node-negative breast cancer by image and flow cytometric analysis. Mod Pathol 1997; 10: 216 – 22.

15. Carey FA, Gray E, O"Mahony M, Craig SR, Salto-Tellez M, Lamb D. A comparison of flow and image DNA cytometry in prediction of patient prognosis in surgically resected small cell lung cancer. Anal Cell Pathol 1996 12: 137 – 43.

16. Kilpatrick SE, Teot LA, Geisinger KR, Martin PL, Shumate DK, Zbieranski N et al. Relationship of DNA ploidy to histology and prognosis in rhabdomyosarcoma. Comparison of flow cytometry and image analysis. Cancer 1994; 74: 3227 – 33.

17. O"Meara A, Gururangan S, Ball R, Kay E, Kelsey A. Ploidy changes between diagnosis and relapse in childhood renal tumours. Urol Res 1993; 21: 345 – 7.

18. Tavares AS, Costa J, de Carvalho A, Reis M. Tumour ploidy and prognosis in carcinomas of the bladder and prostate. Br J Cancer 1966; 20: 438 – 41.

19. Tavares AS, Costa J, Maia JC. Correlation between ploidy and prognosis in prostate carcinoma. J Urol 1973; 109: 676 – 9.

20. Atkin NB, Kay R. Prognostic significance of modal DNA value and other factors in malignant tumours, based on 1465 cases. Br J Cancer 1979; 40: 210 – 21.

21. Caspersson T, Auer G, Fallenius A, Kudynowski J. Cytochemical changes in the nucleus during tumour development. Histochem J 1983; 15: 337 – 62.

22. Zetterberg A, Esposti P-L. Cytophotometric DNA analysis of aspirated cells from prostate carcinoma. Acta Cytol 1976; 20: 46 – 57.

23. Lieber MM, Cheng WS. The role of nuclear DNA ploidy in the prognosis and management of patients with prostate cancer. Compr Ther 1991; 17: 26 – 32.

24. Rainwater LM, Zincke H. Nuclear DNA ploidy and prostate cancer. Cancer Treat Res 1992; 59: 53 – 63.

25. Gee JMP. An update on the role of ploidy in prostate carcinoma. Henry Ford Hosp Med J 1992; 40: 99 – 102.

26. Ross JS, Nazeer T, Church K, Amato C, Figge H, Rifkin MD et al. Contribution of HER-2/neu oncogene expression to tumor grade and DNA content analysis in the prediction of prostatic carcinoma metastasis. Cancer 1993; 72: 3020 – 8.

27. Visakorpi T, Kallioniemi O-P, Koivula T, Isola J. New prognostic factors in prostatic carcinoma. Eur Urol 1993; 24: 438 – 49.

28. Hedlund PO, Esposti P, Falkmer U, Jacobsson H. DNA as a prognostic marker in advanced high-grade prostatic cancer. A preliminary report. SPCG-I study. Acta Oncol 1991; 30: 215 – 7.

29. Shankey TV, Kallioniemi OP, Koslowski JM, Lieber ML, Mayall BH, Miller G et al. Consensus review of the clinical utility of DNA content cytometry in prostate cancer. Cytometry 1993; 14: 497 – 500.

30. Schroder F, Tribukait B, Bocking A, DeVere WR, Koss L, Lieber M et al. Clinical utility of cellular DNA measurements in prostate carcinoma. Scand J Urol Nephrol Suppl 1994; 162: 51 – 63.

31. Adolfsson J. Prognostic value of deoxyribonucleic acid content in prostate cancer: A review of current results. Int J Cancer 1994; 58: 211 – 6.

32. Tucci JS, Blumenfeld W, Narayan P. Ploidy status correlates with outcome in stage B prostate adenocarcinoma. Braz J Med Biol Res 1994; 27: 25 – 32.

33. Ross JS, Figge H, Bui HX, del Rosario AD, Jennings TA, Rifkin MD et al. Prediction of pathologic stage and postprostatectomy disease recurrence by DNA ploidy analysis of initial needle biopsy specimens of prostate cancer. Cancer 1994; 74: 2811 – 8.

34. Veltri RW, Partin AW, Epstein JE, Marley GM, Miller CM, Singer DS et al. Quantitative nuclear morphometry, Markovian texture descriptors, and DNA content captured on a CAS-200 Image analysis system, combined with PCNA and HER-2/neu immunohistochemistry for prediction of prostate cancer progression. J Cell Biochem Suppl 1994; 19: 249 – 58.

35. Ross JS, Figge HL, Bui HX, del Rosario AD, Fisher HA, Nazeer T et al. E-cadherin expression in prostatic carcinoma biopsies: correlation with tumor grade, DNA content, pathologic stage, and clinical outcome. Mod Pathol 1994; 7: 835 – 41.

36. Lieber MM. Practical clinical utility of DNA ploidy for managing patients with prostate carcinoma. Urology 1995; 45: 558 – 62.

37. Carmichael MJ, Veltri RW, Partin AW, Miller MC, Walsh PC, Epstein JI. Deoxyribonucleic acid ploidy analysis as a predictor of recurrence following radical prostatectomy for stage T2 disease. J Urol 1995; 153: 1015 – 9.

38. Cheng L, Sebo TJ, Slezak J, Pisansky TM, Bergstralh EJ, Neumann RM et al. Predictors of survival for prostate carcinoma patients treated with salvage radical prostatectomy after radiation therapy. Cancer 1998; 83: 2164 – 71.

39. Ross JS, Sheehan CE, Hayner-Buchan AM, Ambros RA, Kallakury BV, Kaufman-RP J et al. Prognostic significance of HER-2/neu gene amplification status by fluorescence in situ hybridization of prostate carcinoma. Cancer 1997; 79: 2162 – 70.

40. Ross JS, Sheehan C, Ambros RA, Nazeer T, Jennings TA, Kaufman-RP J et al. Needle biopsi DNA ploidy status predicts grade shifting in Prostate Cancer. Am J Surg Pathol 1999; 23: 296 – 301.

41. Pignatelli D, Leitao D, Maia M, Schmidt F. DNA quantification and ploidy patterns in human adrenocortical neoplasms. Endocr Res 1998; 24: 869 – 74.

42. Coetzee LJ, Layfield LJ, Hars V, Paulson DF. Proliferative index determination in prostatic carcinoma tissue: Is there any additional prognostic value greater than that of gleason score, ploidy and pathological stage? J Urol 1997; 157: 214 – 8.

43. Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. Hum Pathol 1992; 23: 273 – 9.

44. Morris JA. Information and observer disagreement in histopathology. Histopathology 1994; 25: 123 – 8.

45. Fleming KA. Evidence-based pathology. J Pathol 1996; 179: 127 – 8.

46. McLean M, Srigley J, Banerjee D, Warde P, Hao Y. Interobserver variation in prostate cancer. Clin Oncol 1997; 9: 222 – 5.

47. Lessels AM, Burnett RA, Howatson SR, Lang S, Lee FD, McLaren KM et al. Observer variability in the histopathological reporting of needle biopsy specimens of the prostate. Hum Pathol 1997; 28: 646 – 9.

48. Wolffe A. Chromatin – structure and function. 3. utg. San Diego: Academic Press, 1998.

49. Schulerud H, Kristensen GB, Liestol K, Vlatkovic L, Reith A, Albregtsen F et al. A review of caveats in statistical nuclear image analysis. Anal Cell Pathol 1998; 16: 63 – 82.

50. Marchevsky AM, Gil J. Methods in laboratory investigations. Lab Invest 1986; 54: 708 – 16.

51. Liautaud-Roger F, Dufer J, Pluot M, Delisle MJ, Coninx P. Contribution of quantitative cytology to the cytological diagnosis of thyriod neoplasms. Anticancer Res 1989; 9: 231 – 4.

52. Becker RL, Mikel UV, O"Leary TJ. Morphometric distinction of sclerosing adenosis from tubular carcinoma of the breast. Pathol Res Pract 1992; 188: 847 – 51.

53. Unger PD, Watson CW, Liu Z, Gil J. Morphometric analysis of neoplastic renal aspirates and benign renal tissue. Anal Quant Cytol Histol 1993; 15: 61 – 6.

54. Yogesan K, Schulerud H, Albregtsen F, Danielsen HE. Ultrastructural texture analysis as a diagnostic tool in mouse liver carcinogenesis. Ultrastruct Pathol 1998; 22: 27 – 37.

55. Baak JP. The relative prognostic significance of nucleolar morphometry in invasive ductal breast cancer. Histopathology 1985; 9: 437 – 44.

56. Van der Poel HG, Boon ME, Kok LP, van der Meulen EA, van Caubergh RD, De Bruijn WC et al. Morphometry, densitometry and pattern analysis of plastic-embedded histologic material from urothelial cell carcinoma of the bladder. Anal Quant Cytol Histol 1991; 13: 307 – 15.

57. Albregtsen F, Yogesan K, Nesland JM, Danielsen HE. Prognostic discrimination of mammae cancer using texture analysis. Proceedings of the Norwegian image processing and pattern recognition conference 1992; 1: 248 – 55. Oslo: Det Norske Radiumhospital, 1992.

58. Decaestecker C, Salmon I, Camby I, Dewitte O, Pasteels J-L, Brotchi J et al. Identification of high versus lower risk clinical subgroups in a group of adult patients with supratentorial anaplastic astrocytomas. J Neuropathol Exp Neurol 1995; 54: 371 – 84.

59. Narayan P, Michael M, Jajodia P, Stein R, Gonzalez J, Ljung B et al. Automated image analysis – a new technique to predict metastatic potential of prostate carcinomas? J Urol 1989; 141: 183A.

60. Epstein JI, Christensen WN, Steinberg GD, Carter HB. Comparison of dna ploidy and nuclear size, shape and chromatin irregularity in tissue sections and smears of prostatic carcinoma. Anal Quant Cytol Histol 1990; 12: 352 – 8.

61. Petein M, De Launoit Y, Kiss R, Deprez C, Crols K, Pasteels J-L et al. Characterization of the morphonuclear features and DNA ploidy of prostatic disease. Prostate 1990; 16: 199 – 208.

62. Armas OA, Pizov G, Pitcock RV, Partin AW, Epstein JI. Nuclear morphology of prostatic carcinoma: comparison of computerized image analysis (CAS 200) versus video planimetry (DynaCELL). Mod Pathol 1991; 4: 763 – 7.

63. Petein M, Michel P, Van Velthoven R, Pasteels JL, Brawer MK, Davis JR et al. Morphonuclear relationship between prostatic intraepithelial neoplasia and cancers as assessed by digital cell image analysis. Am J Clin Pathol 1991; 96: 628 – 34.

64. Wang N, Stenkvist BG, Tribukait B. Morphometry of nuclei of the normal and malignant prostate in relation to DNA ploidy. Anal Quant Cytol Histol 1992; 14: 210 – 6.

65. Irinopoulou T, Rigaut JP, Benson MC. Toward objective prognostic grading of prostatic carcinoma using image analysis. Anal Quant Cytol Histol 1993; 15: 341 – 4.

66. Christen R, Xiao J, Minimo C, Gibbons G, Fitzpatrick BT, Galera-Davidson H et al. Chromatin texture features in hematoxylin and eosin-stained prostate tissue. Anal Quant Cytol Histol 1993; 15: 383 – 8.

67. Veltri RW, Partin AW, Epstein JE, Marley GM, Miller CM, Singer DS et al. Quantitative nuclear morphometry, Markovian texture descriptors, and DNA content captured on a CAS-200 Image analysis system, combined with PCNA and HER-2/neu immunohistochemistry for prediction of prostate cancer progression. J Cell Biochem Suppl 1994; 19: 249 – 58.

68. Aziz DC, Barathur RB. Quantitation and morphometric analysis of tumors by image analysis. J Cell Biochem Suppl 1994; 19: 120 – 5.

69. Miller J, Horsfall DJ, Skinner JM, Rao DM, Leong AS, Marshall VR. Nuclear shape and prognosis following orchiectomy in stage D2 prostate cancer. Prostate 1994; 24: 306 – 12.

70. Van der Poel HG, Mulders PF, Aalders TW, Oosterhof GO, Debruyne FM, Schalken JA. Karyometric analysis of intra-tumour heterogeneity in prostate adenocarcinoma. Anal Cell Pathol 1994; 7: 153 – 70.

71. Petein M, Decaestecker C, Segers V, Janssen T, Fourmarier M, Van Leer P et al. Does any correlation exist between the Gleason classification system and the computer-assisted microscope analysis of Feulgen-stained nuclei features in human prostate adenocarcinoma? Anal Cell Pathol 1996; 12: 159 – 71.

72. Veltri RW, Miller MC, Partin AW, Coffey DS, Epstein JI. Ability to predict biochemical progression using Gleason score and a computer-generated quantitative nuclear grade derived from cancer cell nuclei. Urology 1996; 48: 685 – 91.

73. Yogesan K, Jorgensen T, Albregtsen F, Tveter KJ, Danielsen HE. Entropy-based texture analysis of chromatin structure in advanced prostate cancer. Cytometry 1996; 24: 268 – 76.

74. Jorgensen T, Yogesan K, Tveter KJ, Skjorten F, Danielsen, HE. Nuclear texture analysis: a new prognostic tool in metastatic prostate cancer. Cytometry 1996; 24: 277 – 83.

75. Veltri RW, O"Dowd GJ, Orozco R, Miller MC. The role of biopsy pathology, quantitative nuclear morphometry, and biomarkers in the preoperative prediction of prostate cancer staging and prognosis. Semin Urol Oncol 1998; 16: 106 – 17.

76. Mairinger T, Mikuz G, Gschwendtner A. Are nuclear texture features a suitable tool for predicting non-organ-confined prostate cancer? J Urol 1999; 162: 258 – 62.

77. Mairinger T, Mikuz G, Gschwendtner A. Nuclear chromatin texture analysis of nonmalignant tissue can detect adjacent prostatic adenocarcinoma. The Prostate 1999; 41: 12 – 9.

78. Epstein JI, Berry SJ, Eggleston JC. Nuclear roundness factor. A predictor of progression in untreated Stage A2 prostate cancer. Cancer 1984; 54: 1666 – 71.

79. Partin AW, Walsh AC, Pitcock RV, Mohler JL, Epstein JI, Coffey DS. A comparison of nuclear morphometry and Gleason grade as a predictor of prognosis in stage A2 prostate cancer: a critical analysis. J Urol 1989; 142: 1254 – 8.

80. Shaeffer J, Tegeler JA, Kuban DA, Philput CB, el Mahdi AM. Nuclear roundness factor and local failure from definitive radiation therapy for prostatic carcinoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1992; 24: 431 – 4.

81. Mohler JL, Figlesthaler WM, Zhang X-Z, Partin AW, Maygarden SJ. Nuclear shape analysis for the assessment of local invasion and metastases in clinically localized prostate carcinoma. Cancer 1994; 74: 2996 – 3001.

82. Jørgensen T, Yogesan K, Skjørten F, Berner A, Tveter KJ, Danielsen HE. Histopathological grading and DNA ploidy as prognostic markers in metastatic prostate cancer. Br J Cancer 1995; 71: 1055 – 60.

Jorgensen T, Kanagasingam Y, Kaalhus O, Tveter KJ, Bryne M, Skjorten F et al. Prognostic
83. factors in patients with metastatic (stage D2) prostate cancer: experience from the Scandinavian Prostatic Cancer Group Study-2. J Urol 1997; 158: 164 – 70.

84. Kayser K, Stute H. Minimum spanning tree, Voronoi"s tesselation and Johnson-Mehl diagrams in human lung carcinoma. Pathol Res Pract 1989; 185: 729 – 34.

Bigras G, Marcelpoil R, Brambilla E, Brugal G. Cellular sociology applied to neuroendocrine
85. tumors of the lung: quantitative model of neoplastic architecture. Cytometry 1996; 24: 74 – 82.

Visakorpi T, Kallioniemi A, Syvanen AC, Hyytinen ER, Karhu R, Tammela T et al. Genetic
86. changes in primary and recurrent prostate cancer by comparative genomic hybridization. Cancer Res 1995; 55: 342 – 7.

Cher ML, Bova GS, Moore DH, Small EJ, Carroll PR, Pin SS et al. Genetic alterations in
87. untreated metastases and androgen-independent prostate cancers detected by comparative genomic hybridization and allelotyping. Cancer Res 1996; 56: 3091 – 4102.

88. Wienberg J, Stanyon R. Chromosome painting in mammals as an approach to comparative genomics. Curr Opin Genet Dev 1995; 5: 792 – 7.

Kanonen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S et al. Tissue
89. microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. Nature Med 1998; 4: 767 – 8.

Bubendorf L, Kononen J, Koivisto P, Schraml P, Moch H, Gasser TC et al. Survey of gene
90. amplifications during prostate cancer progression by high-throughput fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. Cancer Res 1999; 59: 803 – 6.

Neste nummer:

4. november

4
Tidsskrift for Den norske legeforening, Postboks 1152 Sentrum, 0107 OSLO
Telefon: 23 10 90 00 • Telefaks 23 10 90 40 • E-post: tidsskriftet@legeforeningen.no
Redaktør Charlotte Haug: • Tidsskriftet redigeres etter redaktørplakaten
Redaksjonen • Om nettsidene • RSS