

# Identifisering av neoplastiske uroteliale forandringer i cyologisk materiale

*Ved bruk av væskebasert teknologi og  
immuncytokjemi*

Kirsten Margrethe Østbye



Masteroppgave i Helsefagvitenskap  
Avdeling for helsefag  
Institutt for helse og samfunn  
Det medisinske fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

1.juni 2017



# **Identifisering av neoplastiske uroteliale forandringer i cytologisk materiale ved bruk av væskebasert teknologi og immuncytokjemi**

© Forfatter Kirsten Margrethe Østbye

År 2017

Tittel Identifisering av neoplastiske uroteliale forandringer i cytologisk materiale ved bruk av væskebasert teknologin og immuncytokjemi

Forfatter Kirsten Margrethe Østbye

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

# Sammendrag

Kan immuncytokjemisk undersøkelse av prognostisk markør p16/Ki-67 være til hjelp i urincytologisk diagnostikk?

Urincytologiske prøver utgjør en stor del av den non-gynekologiske, eksfoliative diagnostikken i de fleste cytologiske laboratorier. Celler i urin degenerer raskt og diagnostikken er alltid en utfordring. I dette prosjektet ønsket vi å undersøke om de prognostiske markørene p16/Ki-67 vil kunne bedre diagnostikken.

Materiale og metoder: Immuncytokjemi av urin eller blæreskyllevæske primært fiksert i 50 % etanol, overført til SurePath boks og laget et ufarget SP preparat. Materiale fra normale kontroller (N=33), nydiagnostiserte uroteliale karsinomer (UC) (N=32) og kontrolluriner fra pasienter med tidligere behandlet UC (N=21). I tillegg noen få prøver fra benigne tilstander (N=4) samt anonymt restmateriale (N=31) fra eksterne cytologilaboratorier. De sistnevnte prøvene var diagnostisert som atypiske eller maligne i rutinediagnostikken.

Resultater: 8 høygradige UC og 6 anonyme prøver viste dobbeltfarging av p16/Ki-67. Ingen av de lavgradige eller kontrollprøvene etter tidligere behandlet UC viste dobbeltfarging. De normale kontrollene var komplett negative for både p16 og Ki-67. 15/84 symptomatiske prøver var negative for begge markørene. 59/84 positive for begge (men uten dobbeltfarging) og 27/84 var positive for enten p16 (n=5) eller Ki-67 (n=22).

Konklusjon: Sampositivitet for p16/ Ki-67 ble bare påvist i 16,6 % av de høygradige karsinomene og har dermed ingen praktisk betydning som tilleggsmarkør. Positivitet for p16 alene er en sterk indikasjon på at det kan foreligge malignitet, og er dermed en indikasjon for cystoskopi. Negativ p16 med Ki-67 over 5 % vil også kunne være indikasjon for cystoskopi som tilleggsmarkør i primærdiagnostikk. Begge markørene, sammen og hver for seg, kan gi tilleggsinformasjon til diagnostikken av urinprøver hos pasienter som kontrolleres etter behandling for uroteliale karsinomer.

# Abstract

Objective: to investigate the expression of the CINtecPlus (Roche) kit Ki-67/p16 in possible neoplastic urothelial cells in urine cytological specimens.

Methods: urine cytological samples from normal controls (N=33), anonymous rest urine from samples diagnosed as suspicious or malignant (N=31), benign conditions (N=4), controls after treatment for UC (N=21) and newly diagnosed UC (N=32). Samples were fixed for 24 hrs in SurePath and then an unstained SP sample was prepared. Immunocytochemistry for ki-67/p16 dual staining kit was done on all specimens.

Results: 8 newly diagnosed UC (all high grade) and 6 anonymous specimens showed dual positivity. None of the low grade UC and the control specimens after treated UC showed dual staining. Only 15/84 symptomatic cases were negative for both markers, whereas 59/84 showed positivity for both but not dual staining. 27/84 cases were positive for ki-67 (N=22) or p16 (N=5). Normal controls and known benign specimens were all negative for p16. The normal controls were also negativ for Ki-67, whereas 3 of 4 benign specimens expressed Ki-67, albeit at a low rate.

Conclusions: Coexpression of p16/Ki-67 in the same cells were only found in 16,6 % of the high grade cases, and thereby have no practical impakt as an additional marker. Positivity for p16 alone strongly indicate malignancy, and consequently indicates follow-up with cystoscopy. Negative p16 with positive Ki-67 above 5 % can also indicate for cystoscopy as an additional marker in primary diagnostics. Both markers, coexpressed and apart can give additional information in urine samples diagnostics on follow-up patients after treatment for urothelial carcinoma.

# Forord

Denne masteroppgaven er skrevet som et avsluttende arbeid ved masterprogrammet i Helsefagvitenskap, Institutt for Helse og Samfunn, Det Medisinske Fakultet ved Universitetet i Oslo.

Det har vært en lærerik, givende, frustrerende og inspirerende prosess. I arbeidet med denne oppgaven er det flere personer som har vært viktige for meg. En stor takk går først og fremst til min veileder, Torill Sauer, med sin høye kompetanse og lange erfaring i oppgavens tema, cytologi, har hun vært uvurderlig. Takk for klare og konstruktive tilbakemeldinger og stødig veiledning. Jeg vil også takke Mette Kristin Pedersen spesielt, og seksjon for cytologi generellt, ved Ahus og OUS, som har bidratt med innsamling og preparering av prøver, gode råd og nyttige innspill i forbindelse med dette arbeidet. Takk til alle som velvilligst har bidratt med å frambringe prøvemateriale, urologisk avdeling på Ahus, i Skien, Tønsberg og Lillehammer. Roche Diagnostics Norge, ved Pål Bodin og Cornelia Valebjørg, har vært uvurderlige i oppstarten og framdriften av prosjektet, med helt essensielle bidrag på mange måter. En stor takk til dere, og til Gøran Jacobsen i PULS. Uten dere hadde dette blitt vanskelig. Takk til min gode kollega Heidi Eilertsen for grundig veiledning i statistikk, viktige bidrag og nyttige innspill, og ikke å forglemme livlige og engasjerende diskusjoner. Takk til min arbeidsgiver, Høgskolen i Oslo Akershus, som har lagt til rett for at jeg har kunnet fullføre dette prosjektet. Og sist, men ikke minst vil jeg takke min familie for stor tolmodighet, oppmuntring og den beste omsorg og støtte.

Oslo

Juni 2017

Kirsten Østbye

## Forkortelser / ordforklaringer

LUC	Lavgradig urotelialt karsinom
HUC	Høygradig urotelialt karsinom
PUNLMP	Papillary Urothelial Neoplasm of Low Malignant Potential
CIS	Carcinoma in Situ (kreft på stedet = ikke innvasivt)
TUR-B	Transuretral reseksjon av blære
Uca	Urotelialt karsinom
BCG	Bacillus Calmette-Guerin. Ved å instillere BCG i blæren vil blæren selv starte produksjon av antistoffer, som så vil angripe kreftcellene, slik at kreftsvulsten skrumper inn og forsvinner.
N/C ratio	Kjerne / cytioplasma forhold
ICC	Immuncytokjemi
IHC	Immunhistokjemi
ISH	In situ hybridisering
FISH	Fluorescens in situ hybridisering
FNAC	Fin nåls aspirasjon. Celler trekkes ut av f.eks en tumor med en grov nål
WHO	World Health Organization
Calculi	Nyrestein
Residiv	Tilbakefall av sykdom
Reseksjon	Kirurgisk fjerning av del av organ eller kroppsdel
Reaktiv	Benign reaksjon/ celleforandring som oppstår pga irritasjon/ betennelse etc.



# Innholdsfortegnelse

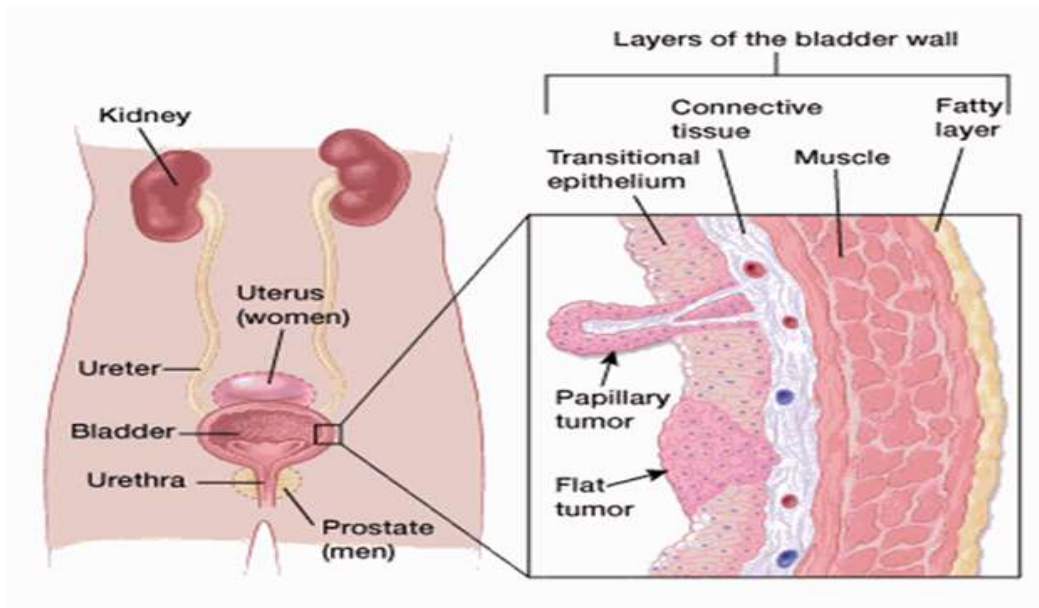
1	Introduksjon .....	11
1.1	Bakgrunn .....	11
1.2	Hensikt.....	13
1.3	Oppbygning av oppgaven.....	14
2	Teoretisk rammeverk.....	15
2.1	Forekomst av urotelialt karsinom .....	15
2.2	Risikofaktorer .....	17
2.3	Urotelialt karsinom (urinblærekreft) .....	18
2.3.1	Urinblærens anatomi .....	18
2.3.2	Normalt vev i blæren.....	19
2.3.3	Klassifisering av urinblærekreft .....	21
2.3.4	Stadieinndeling av blærekreft.....	22
2.3.5	Gradering av urotelialt karsinom.....	25
2.3.6	Tegn og symptomer på blærekreft .....	27
2.4	Undersøkelser .....	27
2.4.1	Cystoskopi.....	27
2.4.2	Cytologi.....	28
2.5	Behandling.....	31
2.6	Noen aktuelle metoder og markører i immuncytologisk diagnostikk .....	32
2.6.1	Papanicolaous fargemetode.....	32
2.6.2	Immuncytokjemi, immunologisk teknikk brukt på celleutstryk .....	32
2.6.3	In situ hybridisering .....	36
3	Materiale og metode.....	38
3.1	Innsamling og inklusjon .....	38
3.2	Forbehandling av prøver.....	39
3.3	Utvalg av prøver .....	42
3.4	Variabler .....	43
3.5	Statistisk analyse.....	43
3.5.1	Diagnostisk nøyaktighet .....	43
3.6	Etikk.....	44
4	Resultater.....	45

5	Diskusjon.....	49
6	Konklusjon .....	53
	Litteraturliste .....	54
	Vedlegg .....	57

# 1 Introduksjon

## 1.1 Bakgrunn

Urotelialt karsinom er den hyppigste kreftformen i urinveiene. Kreften oppstår i overgangsepitelet (urotelet) som dekker nyrebekken, urinledere, urinblæren og den proksimale delen av uretra (figur 1-1).



**Figur 1-1.** Nyre og urinveier. Snitt gjennom blærevæggen, figuren viser papillær- og flat tumor i overgangsepitelet/uroepitelet (Transitional epitelium).

Kilde: <http://www.cancer.org/cancer/bladdercancer>.

Blærekreft er den hyppigste urologiske kreftformen etter prostatacancer, og en av de største kreftformene i Norge. Insidensen ligger på 21,5 pr 100.000 for menn, og 6,4 for kvinner, og forekommer sjelden før 50 års alder (1). I 2015 fikk 1262 menn og 469 kvinner diagnosen i Norge. Til sammen lever 13382 pasienter med denne kreftformen (2). Blærekreft er assosiert til yrke, omgivelser og livsstil. De mest betydningsfulle karsinogener synes å være aromatiske aminer og sigarettøyking (1, 3). Behandling og kontroll av denne forholdsvis store pasientgruppen er svært differensiert og stadiavhengig (4). Svulster i urinveiene klassifiseres v.h.j.a. diagnostisk biopsi i henhold til WHO/ISUP fra 2004 (ny 2016) (5), et system med inndeling i lav- og høygradige tumores (4, 5). Mer enn 95 % av de uroteliale svulstene er

maligne og kalles urotelialt karsinom. De er enten ikke-invasive og papillære, lavgradige, eller invasive, høygradige. Den histologiske klassifikasjonen baserer seg på grad av atypi som igjen bidrar til vevsmønsterets arkitektur og organisasjon. Klassifikasjon er obligatorisk ved alle tilfeller av nyoppdaget blærecancer fordi den er bestemmende for primærbehandlingen (4). Diagnostisering av blærekreft baserer seg på at spesifikke symptomer gir mistanke om sykdom som så følges opp av diagnostiske tiltak som urincytologi og eventuelt biopsi (3).

Cytologi er studien av enkeltcellers struktur og funksjon. Cytopatologi er studien av sykdomsforandringer i eksfolierte (celler som faller av, eller som børstes, evt. skrapes fra en naturlig overflate), eller aspirerte (celler som trekkes ut med en nål) celler, og blir benyttet som et ledd i diagnostisering av sykdommer, først og fremst for å avkrefte, eventuelt bekrefte, en bakenforliggende neoplastisk prosess.

Hematuri (blod i urinen) er den hyppigste årsaken til at det blir tatt urinprøve til cytologisk undersøkelse. Samtidig kan urincytologi, ved at det oppdages abnorme celler, gi informasjon om pasienten har en betennelse (bakterier, virus), nyresykdom (sylinduri) eller gi indisier på nyrestein. Det foregår en konstant avstøtning av celler fra normalt urotel (celler som bekler urinblæren) og fra maligne forandringer. De avstøtte cellene kan prepareres fra en vanlig urinprøve og vurderes og klassifiseres som normale eller maligne, lavgradige eller høygradige celleforandringer (6, s. 381-405). Funn i urincytologiske prøver klassifiseres som følger:

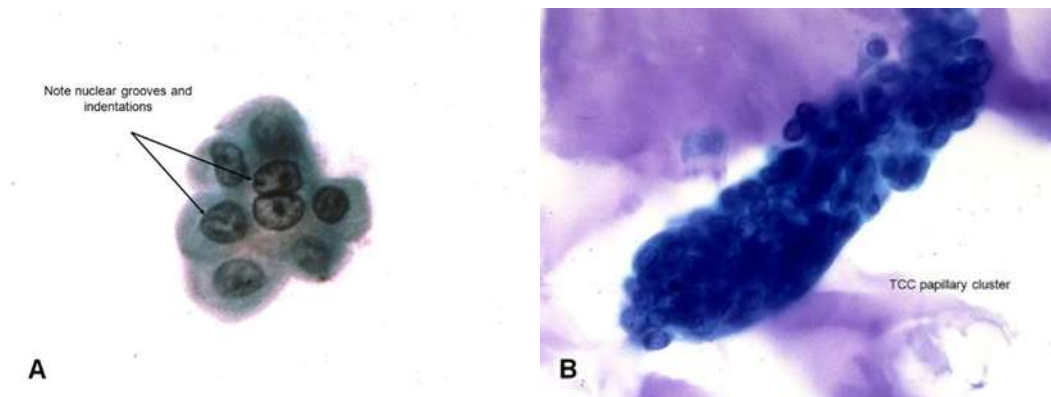
1. normale/benigne celler
2. irregulære celler, usikker reaktive/degenererte eller atypiske.

I den gruppen faller celleforandringer som er reaktive/proliferative og/eller degenerative/irritative på grunn av betennelse og/eller nyresten, samt pga BCG -, stråle- eller cytostatikabehandling. I tillegg lavgradig maligne lesjoner med diskrete kjerneforandringer (3). Dette utgjør en stor usikker gruppe som er vanskelig å diagnostisere for både patologer og klinikere, av den grunn er det ønskelig at diagnostikken i denne gruppen forbedres.

3. atypiske celler suspekt på karsinom
4. atypiske celler forenlig med lavgradig/høygradig karsinom

Urincytologi er mest pålitelig for påvisning av svulster av høyere malignitetsgrad. Lavgradig maligne urotelceller har en diskret atypi som er vanskelig, eller knapt mulig å erkjenne (Figur 1-2). Sensitiviteten varierer betydelig. Den angis som 29 - 84 % for lavgradige og 95 % for høygradige uroteliale karsinomer (7). Urotelceller som løsner og ligger fritt i urin degenererer

raskt, og optimal preparering er uhyre viktig for å bevare kjerne- og cytoplasmadetaljer så godt at de lar seg vurdere med henblikk på atypi. Ved bruk av væskebasert teknologi er morfologien bedre enn ved å lage vanlige utstryk (6), s. 900, (7) (fig. 2-11).



**Figur 1-2.** Generelt er diagnosen lavgradig Urothelialt Carcinom fra urincytologi svært vanskelig, ofte umulig, å stille på grunn av at kriteriene som anvendes til diagnostisering av kreft er temmelig like celleforandringene som sees i reaktivt urotel. Histologisk vil vevsarkitekturen gi et tydelig svar, men cytologisk, hvor man kun ser enkeltceller, er det vanskeligere å avgjøre om cellene stammer fra en papillær struktur eller ikke med mindre det oppdages en klart papillær cellegruppe med cytologisk atypi, helst fra spontanurin.

**A:** Kjernen varierer i størrelse og form, med grovt og ujevnt fordelt kromatin. Nukleoler er fraværende eller svært små. Cellene er ofte større enn normalt overgangsepitel med en høyere N/C ratio.

**B:** Gruppe/tredimensjonalt aggregat med tydelig papillær struktur, noe ”stikker ut”. Funn er mest uttalt i spontanurin.

## 1.2 Hensikt

For å kompensere for urincytologiens svakheter er det utviklet flere blæresvulstmarkørtester for urin, bla. UroVision (Fluorescence in situ hybridisering) (8), med ett sett av 3 kromosomer og en translokasjon. Metoden identifiserer kromosomabberasjoner som viser at aktuelle celler er neoplastiske, ikke reaktive eller degenererte, og plukker dermed også opp de lavgradige tumorene. Metoden har vært testet i Norge (8), men brukes ikke i urincytologisk diagnostikk i dag fordi den er komplisert og krever spesialkompetanse innen tyding av fluorescensmorfologi, noe få rutinelaboratorier har.

Det er rapportert at molekulære tester har bedre sensitivitet enn cytologi, men spesifisiteten er lavere. Pr. i dag har de molekulære urintestene enten vært for kompliserte å utføre (9), eller

ikke vist tilstrekkelig sensitivitet til å kunne være et effektivt supplement for cytologi for diagnostikk og oppfølging av blæresvulster (4). Vi ønsket derfor å prøve ut CINtek® PLUS kitet fra Roche. Dette er en immunocytochemisk (ICC) dobbeltfargemetode for cellemarkørene p16 og Ki-67 (10).

**Formålet** er å undersøke den diagnostiske effekten av p16 ekspresjon alene, og sammen med Ki-67 ekspresjon, i urinprøver og blæreskyllevæske med funn av irregulære/atypiske celler oppfattet som degenerative, atypiske/maligne eller usikre. Dette vil kunne gi en sikrere diagnostikk av funn i urincytologisk materiale og gi mer målrettet henvisning til cystoskopi og biopsitaking

Er CINtek® PLUS kitet fra Roche, for dobbeltfarging og deteksjon av p16 og Ki-67, egnet til å kunne skille rent degenerative celleforandringer fra degenerative, maligne uroteliale celler?

## 1.3 Oppbygning av oppgaven

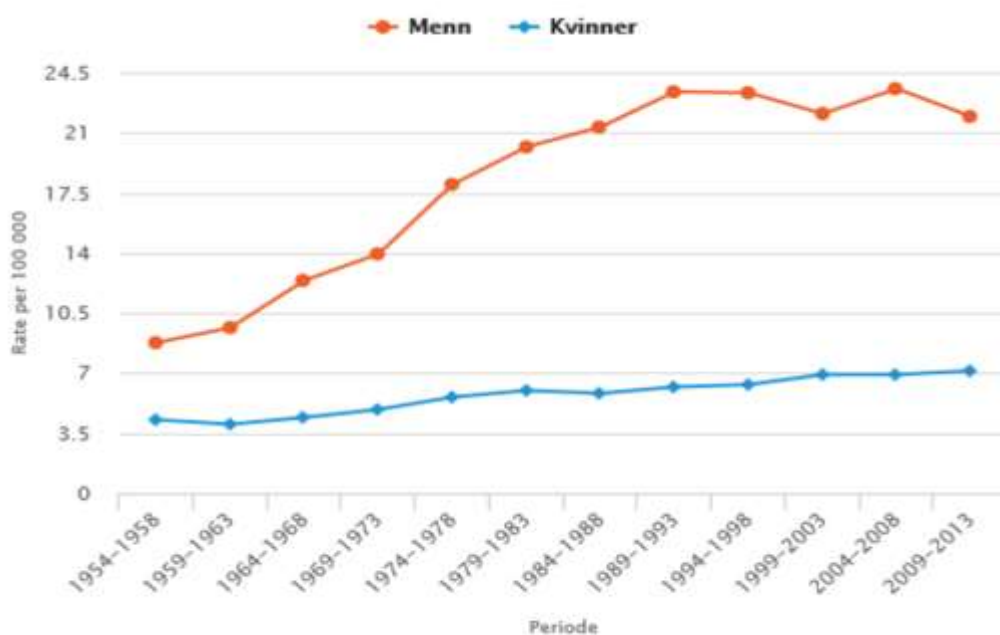
Oppgaven starter med en innledningsdel, hvor bakgrunn og hensikt med oppgaven forklares. I teorikapittelet redgjøres det for sykdommens etiologi, aktuelle undersøkelser og analysemetoder. I metodekapittelet beskrives prøveinnsamling, de aktuelle utvalgene og metodene som ble brukt. Til slutt presenteres resultatene fra analysen og anvendt statistisk metode. I diskusjonen drøftes resultatene og metodikken opp mot resultater og anvendte metoder fra andre sammenlignbare studier. Avslutningsvis konkluderes studien.

# 2 Teoretisk rammeverk

## 2.1 Forekomst av urotelialt karsinom

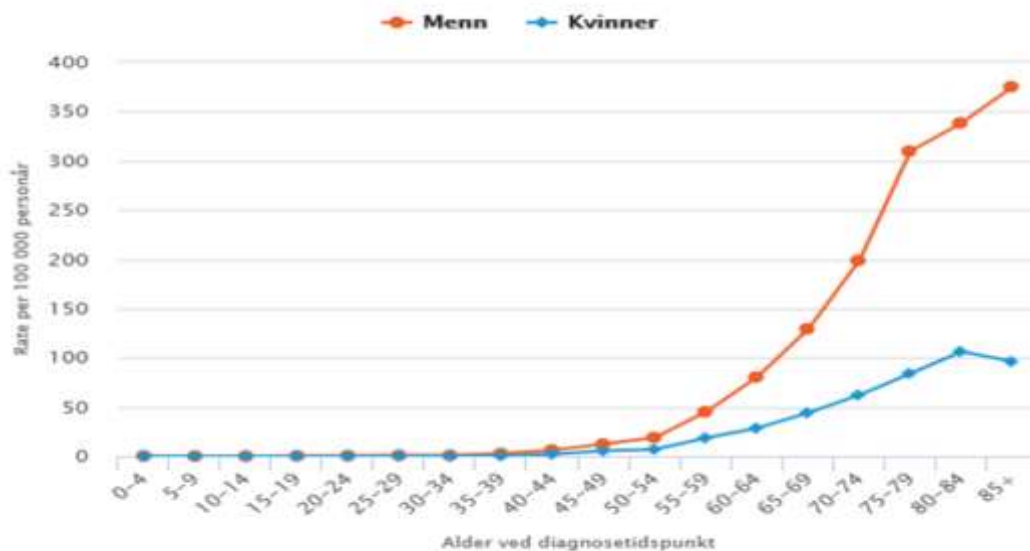
De aller fleste kreftformene opptrer hyppigere blant menn enn blant kvinner, og blærekreft er en av kreftformene med størst forskjell i risiko mellom kjønnene. Menn har mer enn tre ganger høyere insidens enn kvinner. Denne forskjellen er kjent også fra andre land, og har vært stabil over lang tid (3).

Blærekreft er den hyppigste urologiske kreftformen etter prostatacancer. I Norge ble det i 2013 meldt 1544 nye tilfeller av kreft i urinveiene, i 2015; 1731 tilfeller. Det ser ut til at kreftformen øker til tross for at den kan forebygges (1, 2). Insidensen ligger på 21,5 pr 100.000 for menn, og 6,4 for kvinner, og forekommer sjelden før 50 års alder (1).



**Figur 2-1.** Forekomst av urotelial kreft, 1954–2013. Kilde: Kreftregisteret (1).

Nesten tre ganger så mange men som kvinner får blærekreft.



**Figur 2-2.** Aldersspesifikk forekomst av urotelial kreft, 2009–2013. Kilde: Kreftregisteret



**Figur 2-3.** 5-års relativ overlevelse for pasienter med urotelial kreft, i prosent etter diagnoseperiode, 1974–2013. Kilde: Kreftregisteret

Kreft i urinveienes overgangs(uro-)epitel (Figur 1-1) lokaliseres hyppigst i blæren. Primær urotelkreft i urinrør (uretra) er sjelden. Oftest er urotelkreft i urinrør sekundært til kreft som har startet i blæren og som vokser nedover i øvre del av urinrøret (11). Oftest oppstår urotelkreft som en malign forandring av celler i et tilsynelatende normalt utseende urotel (carcinoma in situ (CIS)). Avhengig av startcellenes malignitetspotensiale, kan de danne



papillomatøse (utadvoksende, fig. 1-1) tumorer som ikke vokser infiltrerende før etter lang tid. Papillomatøse tumorer gir som regel tidlige symptomer i form av hematuri. Tumorer som vokser seg solide og knollete, begynner å vokse infiltrerende fra et tidlig tidspunkt. Flatt infiltrerende karsinom er en tumortype som ikke nødvendigvis ses som en tumor, men den kan metastasere uten at pasienten får synlig hematuri (11).

## 2.2 Risikofaktorer

En risikofaktor er en egenskap som påvirker risikoen for å få en sykdom. Forskjellige typer kreft har forskjellige risikofaktorer. Noen risikofaktorer, som f.eks. røyking kan endres, andre faktorer som alder eller arv, kan ikke endres.

Blærekreft er assosiert til yrke, omgivelser, livsstil og alder over 50 år. De mest betydningsfulle karsinogener synes å være aromatiske aminer og sigarettøyking (1, 3). Røykere har mer enn 3 ganger høyere risiko for å få blærekreft enn ikke-røykere. Langvarig irritasjon av urotelet i form av kroniske infeksjoner kan også føre til kreftutvikling. Av yrkesrelatert kreftrisiko har kjemisk industri vært knyttet til blærekreft. Aromatiske aminer som benzidine og beta-naphtylamine, som har vært mye brukt i tekstilindustrien, er kjente karsinogener.

Annen industri som benytter visse organiske kjemikalier i produksjonen gir også økt risiko for blærekreft som malingsprodusenter og trykkeribedrifter. Yrkesgrupper som malere, trykkere, frisører (hårfarge) og trailersjåfører (dieselgass) er derfor mer utsatt enn andre.

Røykere som også eksponeres for kreftfremkallende kjemikalier i sitt arbeid har spesielt høy risiko for å utvikle blærekreft.

Av genetiske faktorer er det rapportert tilfeller av blærekreft hos pasienter med arvelig retinoblastoma, Lynch syndrom m.m. (12).

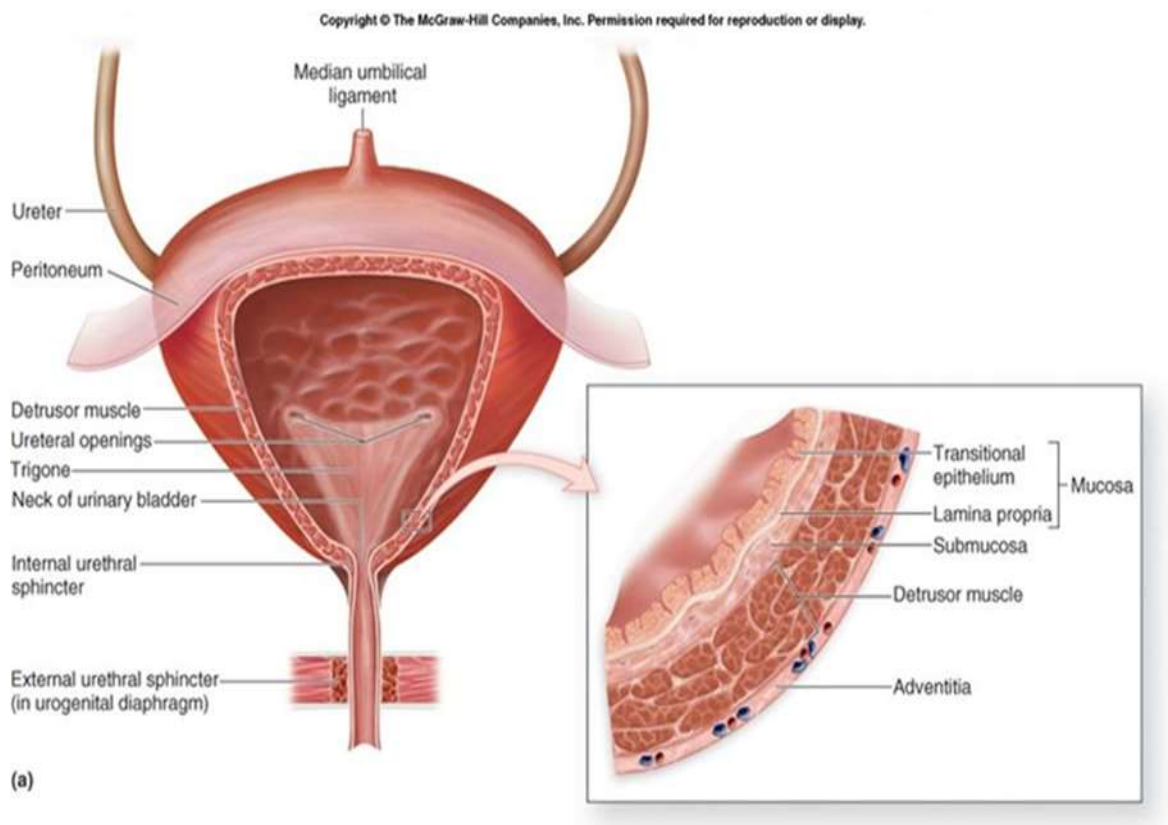
Urotelialt karsinom kan oppstå i forskjellige områder i blæren, også i nyrebekkenepitelet, uretra og ureter. Kreftsykdom i ethvert område av urintractus øker risikoen for at det oppstår kreft i andre deler av tractus også etter at tumor er fjernet fullstendig. Av den grunn trenger personer som har hatt blærekanser tett oppfølging for å oppdage residiv (tilbakefall) i tide (13). Behandling og kontroll av denne forholdsvis store pasientgruppen er svært differensiert og stadiavhengig (4).

## 2.3 Urotelialt karsinom (urinblærekreft)

Urinblæren er en hulmuskel som ligger i bunnen av bukhulen, et reservoar for urinen som skilles ut fra nyrene, inntil den tømmes vilkårlig gjennom urinrøret (14).

### 2.3.1 Urinblærens anatomi

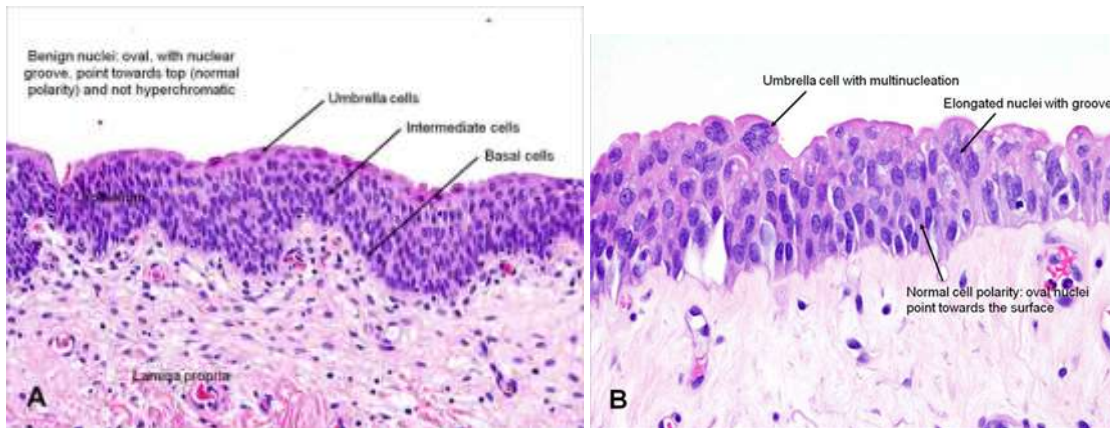
Urinblærens vegg består av fire lag (fig.2-4) Epitellaget/urotelet (transisional epithelium), underliggende bindevev (lamina propria), muskellaget (muscularis propria), og det ytterste laget (adventitia), bestående av fettvev, bindevev og blodårer.



**Figur 2-4.** Anatomisk bilde av urinblære, og snitt gjennom blærevegg.

Kilde: <http://helsen.top/hva-er-funksjonen-til-blren/>, hentet 17.11.16

### 2.3.2 Normalt vev i blæren



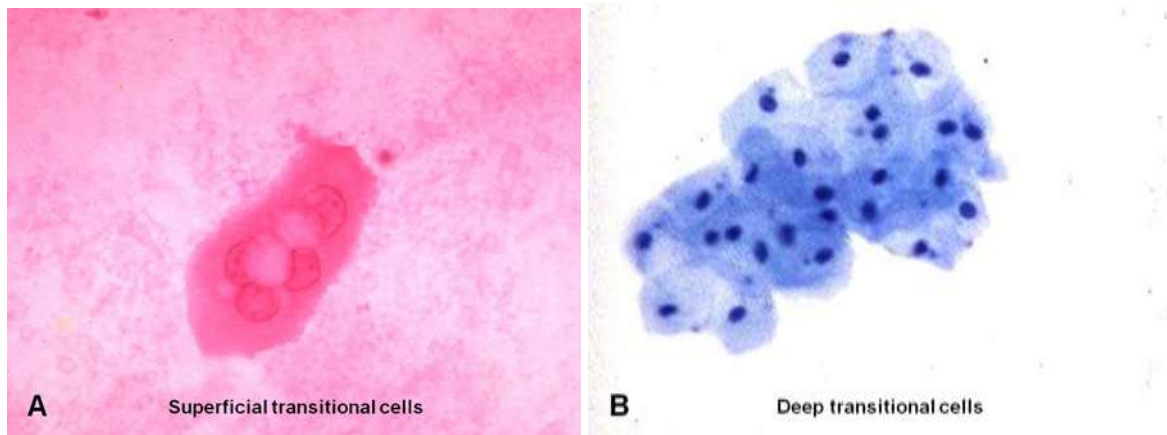
**Figur 2-5.** Normal histologi fra blærevegg. Bildet viser epitellaget med underliggende binde-/støttevev.

Kilde: American Urological Association, tilgjengelig fra <https://www.auanet.org/> hentet 18.11.16) (15).

Innvendig er urinblæren kledd med såkalt overgangsepitel (transitional epithelium), en slimhinne som har stor evne til å tåle strekk. Det er et flerradet epitel, som vanligvis er fra tre til seks cellerader tykk. På overflaten er cellene mer runde når blæren er tom, mens de avflates når veggen strekkes. Slikt epitel er spesifikt for urinveiene og kalles derfor også urotel. Mellom slimhinnen og det innerste muskellaget (detrusor muscle=muskularis propria) i blæreveggen er det løst bindevev (lamina propria og submucosa), slik at slimhinnen kan foldes når blæren tømmes, og strekkes når den fylles (14). Det finnes i tillegg usammenhengende glatt muskulatur (muskularis mucosa), blodårer, nerver og kjertler i enkelte regioner. Tumorer som infiltrerer lamina propria kan derfor metastasere til andre deler av kroppen via blod og lymfesystemet (9).

Det ytterste laget i blæreveggen, muskularis propria, består av et sammenflettet nettverk av muskelfibre, dominert av glatt muskulatur. Ved stadieinndeling av blærekreft deles muskularis propria inn i en indre og ytre halvdel (9).

## Urotel



**Figur 2-6.** Normalt urotel, cytologi.

**A:** superfisielle (overflate-) celler «paraplyceller». **B:** intermediære celler fra et dypere lag i urotelet.

Kilde: American Urological Association. Tilgjengelig fra: <https://www.auanet.org/>, hentet 18.11.16.(15).

De superfisielle cellene utgjør majoriteten av cellene i en cytologisk prøve fra urin eller blæreskyllevæske. Cellene kan variere sterkt i størrelse og form, men sees vanligvis som flate, store, polygonale celler (fig.2-6. **A**). Cytoplasma er transparent og kan ha vakuoler. Kromatinet i kjernen er lyst og fingranulert (“salt og pepper”) uten nukleoler. Multinukleære celler (>2, <50) forekommer som en reaktiv forandring, ofte sammen med små røde nukleoler, og er enkeltliggende.

Intermediære urotelceller, et dypere lag av urotelet, ses som runde eller sylinderformete, mindre enn superfisielle celler og med et tettere cytoplasma, farget blått med Pap (fig. 2-6. **B**). Kjernen har en vesikulær (ensartet, fin) kromatinstruktur. Økt antall ses ved instrumentering/ kateterisering, calculi (nyrestein) og inflammasjon/ neoplasi (15).

Urinveier som er dekket med overgangsepitel omfatter calyses, nyrebekken, urinledere (ureter), urinblære og øvre del av urinrør (uretra).

Den histologiske klassifikasjonen av urotelialt karsinom baserer seg på grad av atypi som igjen bidrar til vevsmønsterets arkitektur og organisasjon. Klassifikasjon er obligatorisk ved alle tilfeller av nyoppdaget blærecancer fordi den er bestemmende for primærbehandlingen (4). Histologisk bekreftelse (biopsi) av funn i urincytologi og/eller cystoskopi er nødvendig før behandling kan iverksettes.

### **2.3.3 Klassifisering av urinblærekreft**

Blærekanser er en svært heterogen sykdom. Mer enn 95% av de uroteliale svulstene er maligne og kalles urotelialt karsinom, 5 % er adenokarsinom, plateepitelkarsinom og andre typer kreft. Blærekreft er enten ikke-invasiv og papillær, lavgradig, eller invasiv, høygradig samt karsinom in situ (CIS).

Cystoskopi er første undersøkelse for å bestemme stadiet. Hvis en tumor identifiseres vil det tas biopsi eller transuretral reseksjon (TUR-B) av blæretumor for å verifisere diagnosen og bestemme hvor stort område av blæren som er affisert. Patologisk gradering avhenger av histologisk undersøkelse av blæreveggen. Dette er kritisk punkt for å bestemme utbredelsen av sykdom før eventuelt kirurgi. Krefttype, grad og spredning vurderes før prognose og valg av behandling bestemmes. Blærekreft utvikler seg fra det innerste laget/epitellaget i veggen.

Den histologiske klassifikasjonen baserer seg på grad av atypi som igjen bidrar til vevsmønsterets arkitektur og organisasjon (Tabell 2-1, Figur 2-8 og 2-9).

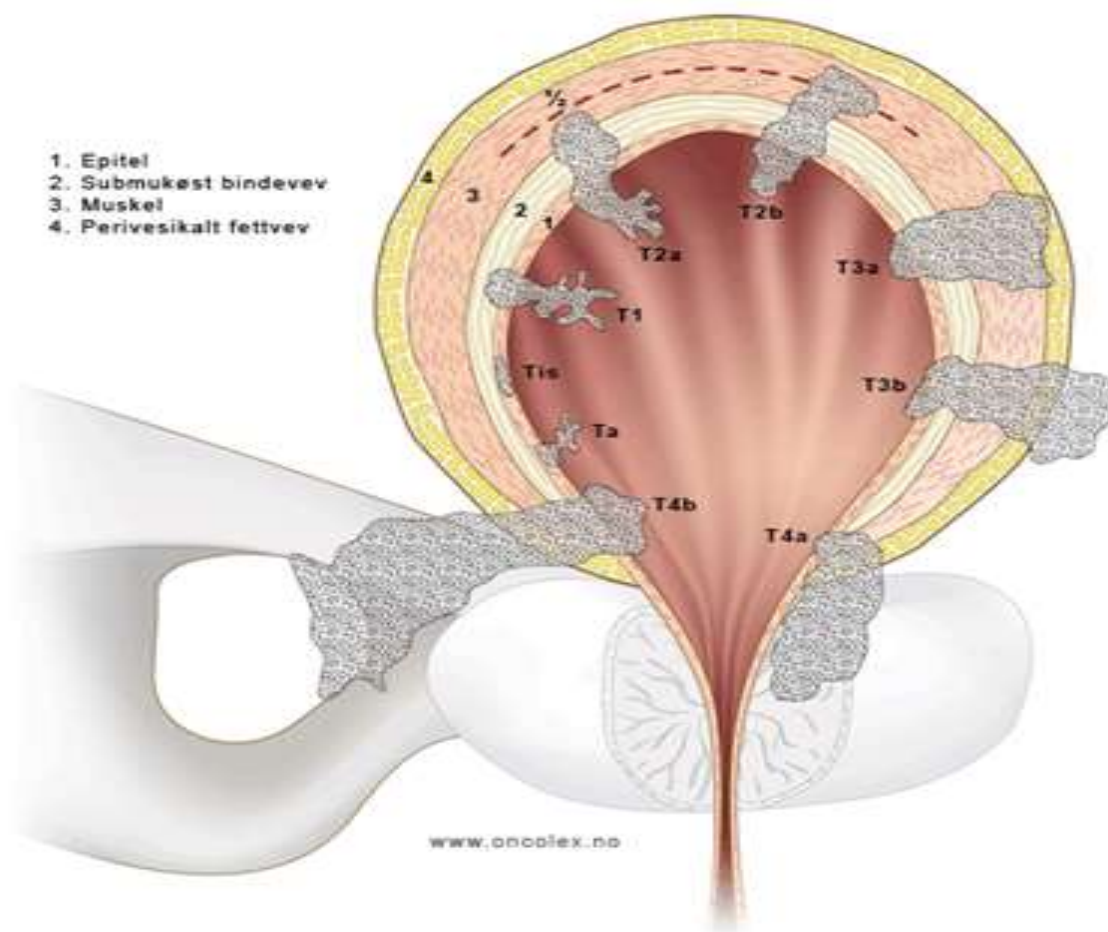
### 2.3.4 Stadieinndeling av blærekreft

De enkelte stadier av blærekreft bestemmes av hvor dypt svulsten invaderer organets vegg (figur 2-6).

Et internasjonalt system, TNM (**T**umor, **l**ymph**N**ode, **M**etastasis), benyttes for å klassifisere blærekreft etter tumorkarakteristika (T), spredning til regionale lymfeknuter (N), og tilstedeværelse av metastaser (M), (12).

Tabell 2-1. TNM klassifikasjon av karsinomer i urinblæren (2016) (12).

<b>T/N kategori</b>	<b>Vekstdybde (T) Størrelse (N)</b>
<b>T -</b>	<b>Primærtumor</b>
<b>TX</b>	Primærtumor kan ikke vurderes
<b>T0</b>	Intet bevis på primærtumor
<b>Ta</b>	Non-invasivt primært karsinom (papillært)
<b>Tis</b>	Carcinoma In Situ i flat slimhinne
<b>T1</b>	Tumor infiltrerer subepitelialt bindevev (lamina propria)
<b>T2</b>	Tumor infiltrerer muskulatur (muskularis propria)
<b>T2a</b>	Tumor infiltrerer superfisiell i muskularis (indre halvdel)
<b>T2b</b>	Tumor infiltrerer dypt i muskulatur (ytre halvdel)
<b>T3</b>	Infiltrasjon i perivesikalt vev
<b>T3a</b>	Mikroskopisk
<b>T3b</b>	Makroskopisk (ekstravesikal oppstuvning)
<b>T4</b>	Tumor infiltrerer et av følgende organer: prostata, seminale vesikler, uterus, vagina, bekken, abdominalvegg
<b>T4a</b>	Tumor infiltrer prostata, prostatisk stroma, vesicula seminali, uterus eller vagina
<b>T4b</b>	Innvekst i bekken og/eller abdominalveggen
<b>N -</b>	<b>Regionale lymfeknuter</b>
<b>NX</b>	Regionale lymfeknuter kan ikke påvises
<b>N0</b>	Ingen metastaser til regionale lymfeknuter
<b>N1</b>	Metastase til en lymfeknute
<b>N2</b>	Metastaser til multiple lymfeknuter i bekkenregionen Metastaser til iliakale lymfeknuter
<b>M -</b>	<b>Fjernmetastaser</b>
<b>M0</b>	Ingen fjern metastaser
<b>M1</b>	Fjernmetastaser påvist



**Figur 2-7.** Snitt gjennom blæreveggen med stadier av blærekreft.

Kilde: Tilgjengelig fra: [www.oncolex.no](http://www.oncolex.no) (11).

### T- Komponenten

Cystoskopi er ledd i utredningen av blærtumor, hvor stadiet bestemmes. Patologisk stadieinndeling krever histologisk undersøkelse av vevsprøven. Adekvat TUR-B inkluderer reseksjon av alt synlig tumorvev og prøver fra den underliggende muskularis propria, for å undersøke mulig tumorinfiltrasjon i veggmuskulatur.

Mikroskopisk undersøkelse av hele resektatet kan ofte være nødvendig for å bestemme stadiet av sykdom Ta, Tis, T1 eller T2 (tabell 2-1). Akkumulerte data viser at undergradering av T1 sykdom er klinisk relevant, men de spesifikke detaljer på hvordan man gjør det gjenstår å enes om.

Det er viktig å skille mellom stadium T1 og T2 av muskelinfiltrasjon. Nemlig hvor dypt tumor har vokst inn i blæreveggen.

Urincytologi er som oftest den første undersøkelsen som gjøres ved mistanke om malignitet i urinveiene. Positiv cytologi indikerer tilstedeværelse av en urotelial tumor et sted i urotelialtractus. Funn av positiv cytologi og normal cystoskopi, kan indikere sykdom i øvre urotelialtraktus.

### **N- Komponenten**

Spredning til lymfeknuter. Disseksjon av lymfeknuter i bekkenet er en integrert del av radikal cystektomi ved blærekreft. Fjerning av et høyt antall positive lymfeknuter i og rundt bekkenet er assosiert med større overlevelse og mindre grad av bekkenresidiv. Alle lymfeknuter bør undersøkes mikroskopisk fordi N- stadium og prognose bestemmes/avgjøres av både antallet og beliggenheten av de positive lymfeknutene.

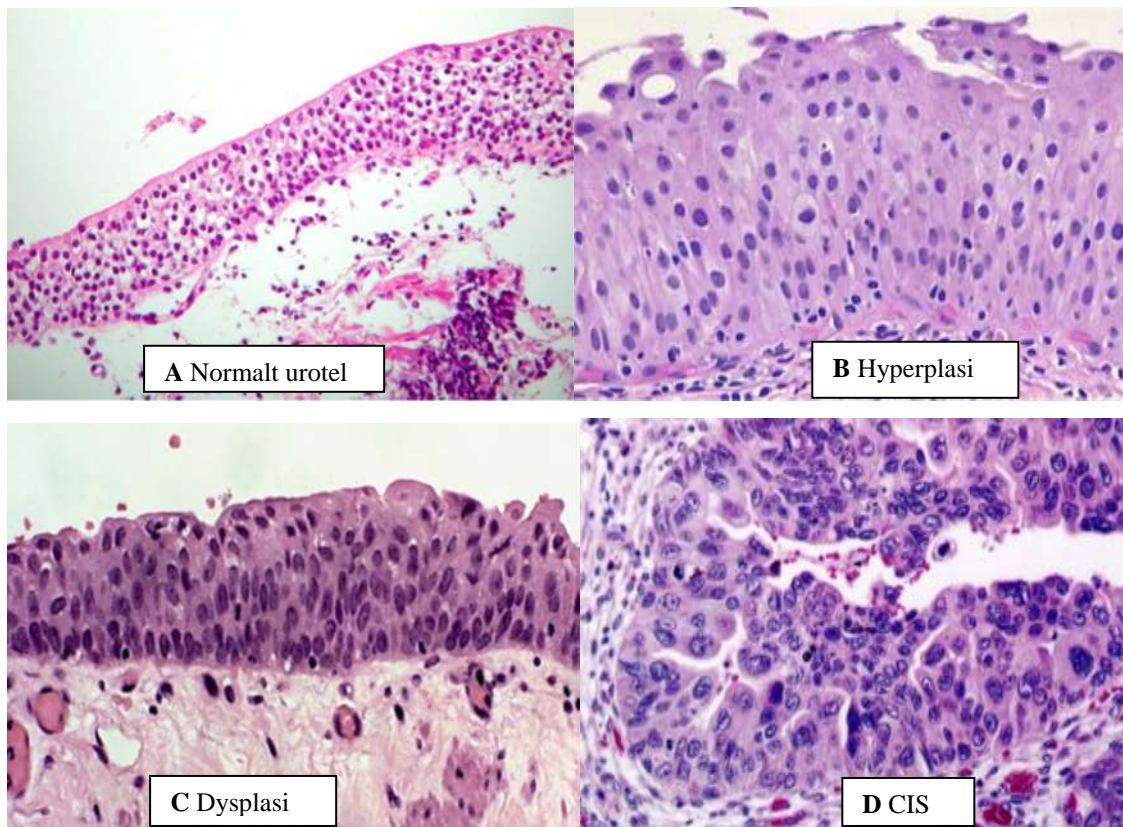
### **M- Komponenten**

Hos pasienter med T1 eller høyere grad av sykdom anbefales det at pasienten screenes med henblikk på fjernmetastaser før man utfører cystektomi (fjerner urinblæren) (12).



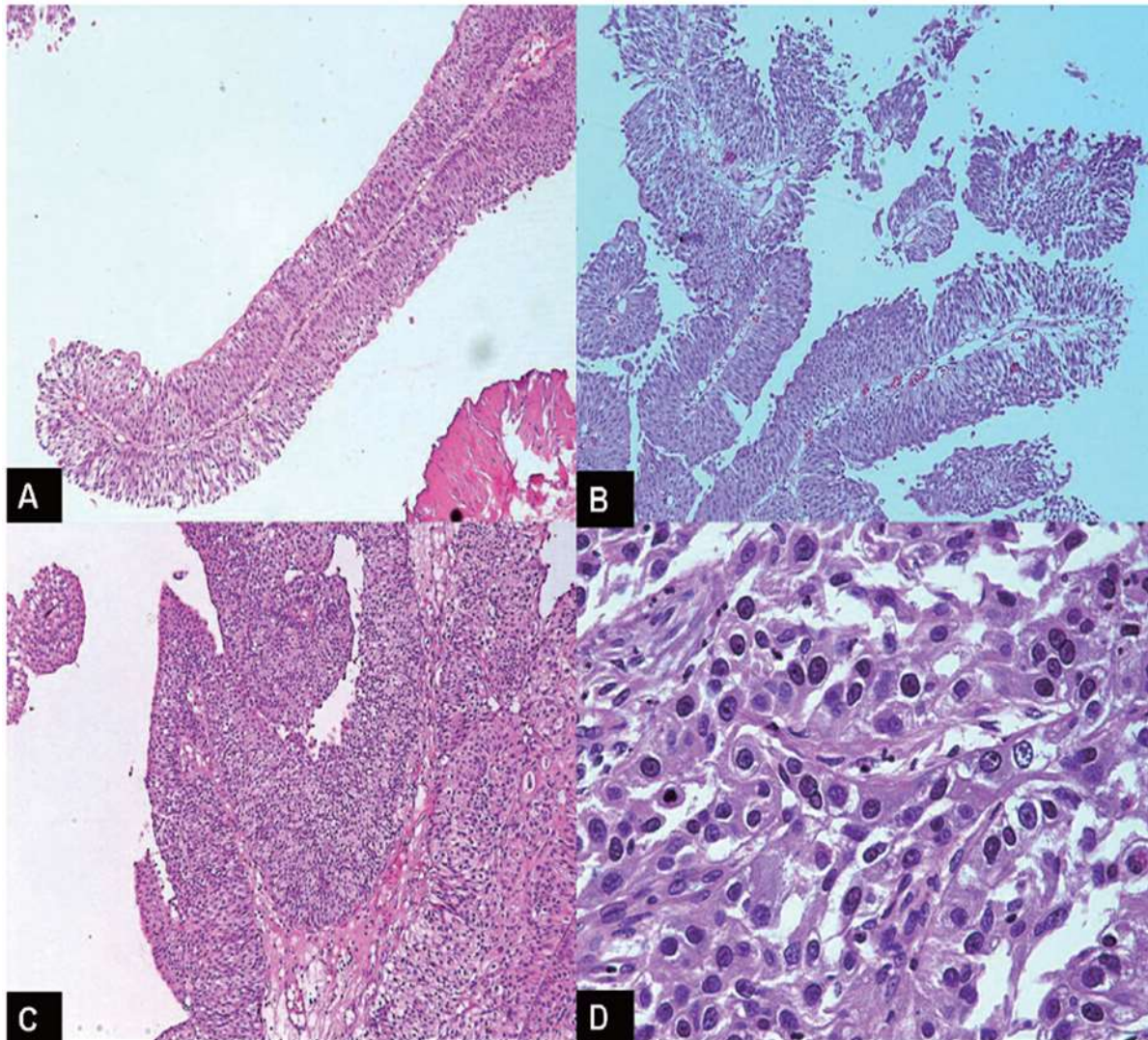
### 2.3.5 Gradering av urotelialt karsinom

Gradering av urotelialt karsinom (urinblærekreft) baserer seg på cellulær atypi (celleforandring) og inneholder viktige prognostiske indikatorer om progresjon og risiko for tilbakefall.



**Figur 2-8.** Bildene viser normalt urotel: **A**, og non-innvasive lesjoner. **B**: Økt celleproliferasjon (Hyperplasi), viser tegn på fortykket slimhinne uten atypiske forandringer. **C**: Flate lesjoner med atypi (Dysplasi), vekstforstyrrelse og cytologisk abnormalitet, regnes som forstadier til kreft. **D**: Carcinoma In Situ (CIS) = kreft på stedet. Urotelet har normal tykkelse men cellene er atypiske/maligne.

Kilde.: WHO/ISUP PP Rodolfo Montironi, MD Polytechnic University of Marche Region School of Medicine, Ancona, Italy and Arizona Cancer Center, Tucson, AZ, USA (16).



**Figur 2 -9:** De viktigste diagnostiske kategorier (2004 WHO klassifisering). Histologiske Haematoxylin-Eosinfargede snitt. Kilde: (17)

Tilgjengelig fra: URL: <http://www.ghrnet.org/index.php/JT/article/view/730>

**A:** Papillom, et begrenset område med en papillær prosess dekket av normalt urotel (HE, x100).

**B:** Papillær urotelial neoplasi med lavt malignitetspotensiale (PUNLMP), forgrenet papillært område dekket av moderat hyperplastisk urotel med minimal atypi (HE, x 200).

**C:** Lavgradig urotelialt karsinom (LUC/G1) med markant hyperplasi og moderat atypi (HE, x 200).

**D:** Høygradig urotelialt karsinom (HUC/G3) med markant cellulær og nukleær atypi, tap av polaritet og prominente nukleoler (HE, x 400).

### 2.3.6 Tegn og symptomer på blærekreft

De fleste pasienter med urotelialt karsinom har mikroskopisk hematuri, men alvorlighetsgraden av symptomene avhenger av hvor tumoren sitter og hvilket stadium den er i. Det vanligste kliniske symptomet er smertefri, evt massiv hematuri, fulgt av hyppig vannlatning, gjerne om natten, samt dysuri. Det siste er mest vanlig hos kvinner, noe som kan forsinke korrekt diagnose ved at pasienten først behandles over noe tid for antatt urinveisinfeksjon.

Urinveisinfeksjon (UVI) er ikke indikasjon for cytologisk undersøkelse, heller ikke steinsykdom (calculi).

## 2.4 Undersøkelser

Ved mistanke om blærekreft skal cystoskopi alltid utføres. Som oftest supplert av urincytologi og/eller biopsi av blæreslimhinnen.

### 2.4.1 Cystoskopi

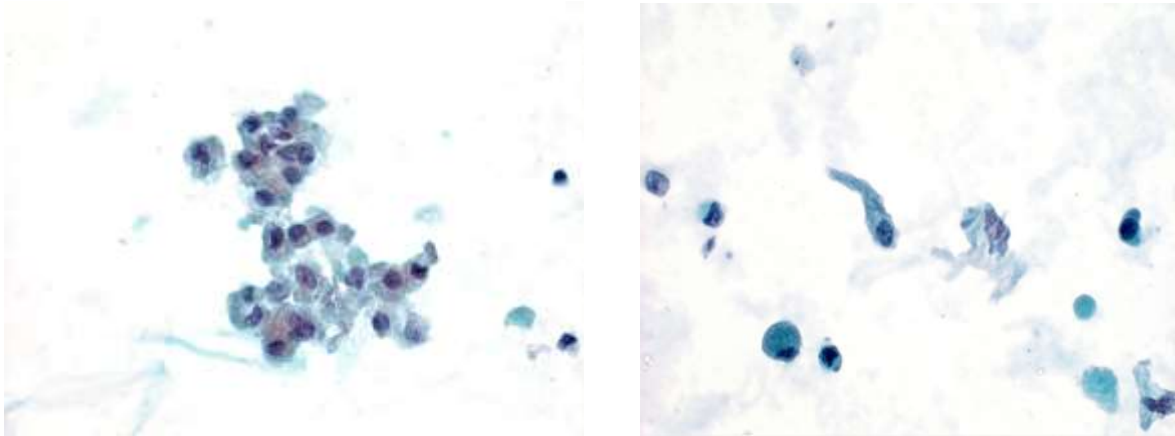
Cystoskopi benyttes til å undersøke urinrøret og urinblærens innside, til utredning ved mistanke om kreft og ved kontroller etter kreftbehandling.. Undersøkelsen gjøres ved at et tynt rørformet instrument med en lyskilde, og en slags «kikkert» ytterst, føres igjennom urinrøret og opp i urinblæren. Instrumentet kalles et endoskop. Et endoskop kan brukes både diagnostisk og terapeutisk. En smal tang kan føres gjennom endoskopet for å ta prøver (biopsier) og for å gjøre små inngrep.

For å få best mulig oversikt over blærens innside fylles denne, gjennom endoskopet, med væske. Det kan også benyttes et farmasøytisk middel, Heksaminolevulinate, som settes gjennom røret og opp i blæren. Middelet inneholder fargestoffer som binder seg til kreftceller og disse vil dermed bli lett synlige ved undersøkelse gjennom endoskopet (18).

**Blæreskyllevæsken** samles opp i forbindelse med en cystoskopi. Blæreveggen skylles med 50-100 ml. fysiologisk saltvann, som samles i en flaske med fiksativ. Biopsi kan så tas fra blæreveggen til histologisk undersøkelse. Blæreskyllevæsker er generelt cellerike og cellene bevares bedre enn i en spontanurin og gir en noe større diagnostisk sikkerhet. Prøven viser



kun forandringer i blæren. Cellet bildet er dominert av urotelceller i grupper, samt mange superfisielle urotelceller (fig. 2-10) (18, 19).



**Figur 2-10.** Blæreskyllevæske, normale celler.

Kilde: Tilgjengelig fra:

<http://danskcytologiforening.dk/Aarsmoede/Blaerecancer/urincytologi/AstridPetersenPatologiskInstitutAalborgSygehus.pdf>

Hentet 14.05.17.

## 2.4.2 Cytologi

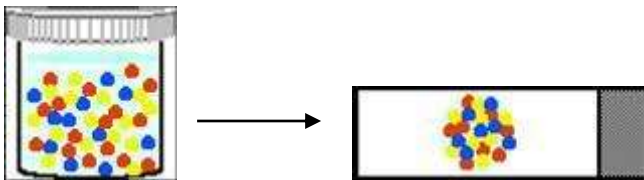
Det foregår en konstant avstøtning av celler fra normalt urotel og fra maligne forandringer. De avstøtte cellene kan prepareres fra en vanlig urinprøve og dermed vurderes og klassifiseres som normale eller maligne (3). Cellene farges med Pap og undersøkes i lysmikroskop (3-3 A). Urincytologi ble introdusert av Papanicolaou i 1945 for å identifisere maligne celler i urin. Metoden er fortsatt den dominerende i alle cytologiskelaboratorier.

Som tidligere nevnt (s.2) er sensitiviteten lav ved urincytologi, spesielt for de lavgradige, 29 - 84 %. Den totale sensitiviteten er kun ca. 60%. Kjerneforandringene i de lavgradige karsinomene er diskrete og lettest erkjennbare når det er mye materiale (celler) fra den maligne lesjonen. I spontanurin er det ofte sparsomt med celler i forhold til blæreskyllevæske. Cytologi gir et veiledende svar, det må alltid sammenlignes med den histologiske prøven, i vår studie er det biopsier eller TUR-B fra blæreslimhinnen.

**Konvensjonell cytologi.** Urinen blandes med 50% etanol, sentrifugeres og det lages utstryk av bunnfallet som består av avstøtte celler fra blæren og urinveiene. Liten mulighet for flere preparater.



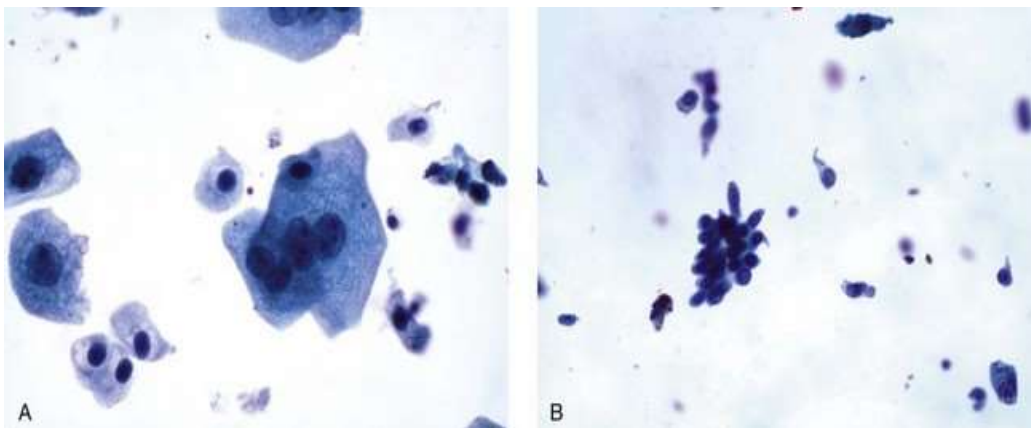
**Væskebasert cytologi.** Urinen sentrifugeres. Bunnfallet overføres til ThinPrep/SurePath beholdere som inneholder en fikserings-/oppbevaringsvæske, og det lages et, eller flere, standardiserte preparat i maskin.



**Figur 2-11.** Illustrasjoner av konvensjonell og væskebasert cytologipreparat.

Kilde: Tigjenegelig fra: Ref: <http://www.eurocytology.eu/en/course/819>

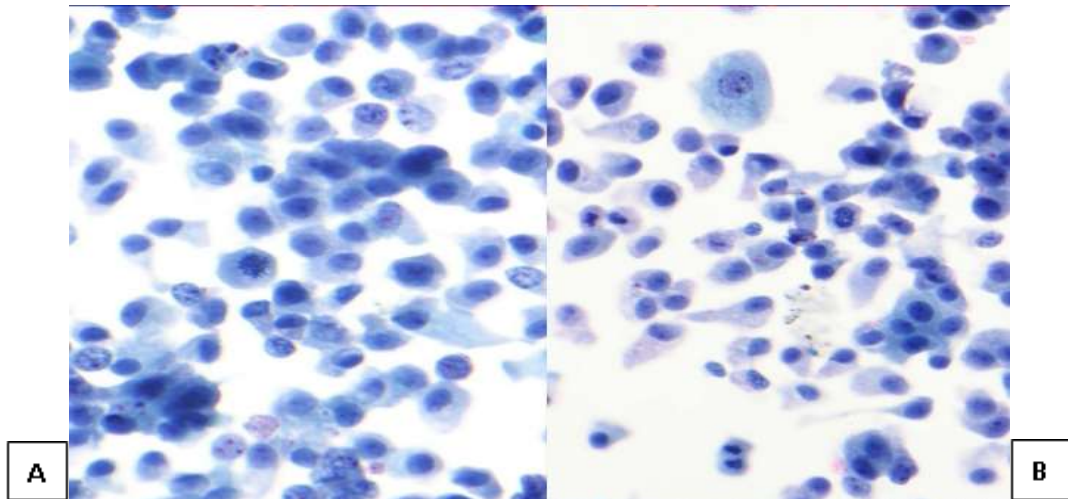
Metoden er opprinnelig laget for gynekologisk cytologi. Cellene fra livmorhalsen blir direkte slemmet opp i fikserings-/oppbevaringsvæsken i beholderen. Cellene viser lengre holdbarhet og forstyrrende elementer som blod og slim fjernes. Muliget for tilleggsanalyser fra restmaterialet.



**Figur 2 -12.** Cytologisk utstryk fra spontanurin. **A** Normale overflateceller fra urotel (Paraplyceller).

**B** Normalt urotel, dypere lag. Kilde: Tigjenegelig fra: <https://abdominalkey.com/urine-cytology/>

Hentet 27.05.17

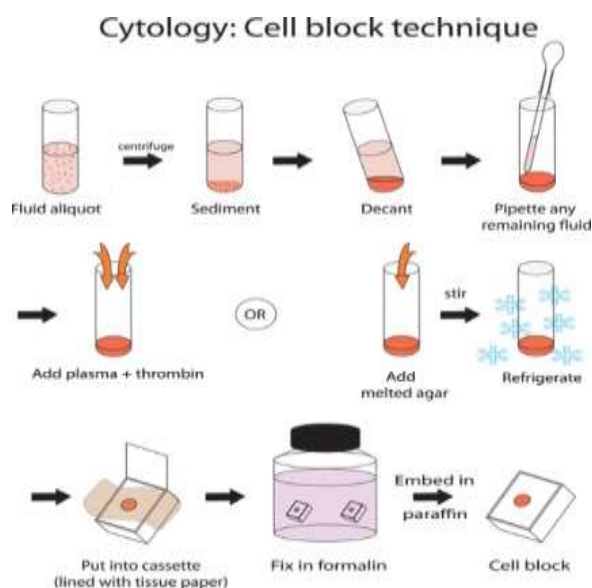


**Figur 2-13. A:** Uroteliale celler med lavgradig forandring. **B:** Uroteliale celler med reaktiv forandring.  
Kilde: Tilgjengelig fra: <https://www.slideshare.net/pranveerrao/urinecytology>. Hentet 27.05.17

### **Celleblokk.**

Cytologisk materiale kan også prepareres som celleblokk. En celleblokk er en prepareringsmetode som gjør det mulig å behandle enkeltceller som formalinfiksert parafininnstøpt histologisk materiale, som snittes og farges. Celleblokker er godt egnet til supplerende undersøkelser som f.eks. immunkjemiske metoder. De hyppigst brukte metodene er plasma-trombinmetoden eller agar metoden. Ved plasma-trombin metoden tilsettes det ufikserte materialet noen få dråper blodplasma og 1-2 dråper trombinoppløsning (fig. 2 – 14). Det får cellene til å koagulere i løpet av 1-2 minutter. Cellekoagelet kan pakkes i f.eks linsepapir og legges i en vevskapsel til formalinfiksering. Agar metoden går ut på at man pakker koagelet inn i linsepapir og legger det over i smeltet 3 % agar, slik at alt materiale er dekket i få minutter. Koagelet tas opp, overskytende agar fjernes, og koagelet plasseres i en kapsel til formalinfiksering.

Hologic (Hologic, inc. Marlborough, USA) har utviklet en automatisert metode (Cellient) til fremstilling av celleblokker ved hjelp av en filtreringsteknikk. Ved sparsomt materiale tilsettes celleblokken et par dråper eosin for å lette skjæringen av blokken (20).



**Figur 2-14.** Preparering av celleblokk fra koagel.

Kilde: Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1515/pp-2016-0001>

## 2.5 Behandling

Faktorer som tumorstadium, grad, eventuell spredning, pasientens alder, forventet livslengde, allmenntilstand og de ulike behandlingsformers bivirkninger avgjør behandlingsstrategi ved blærekreft.

Overflatiske blærekreftsvulster kan fjernes ved en kikkertoperasjon gjennom urinrøret. Den utføres med elektrisk kniv og svulsten kan ”brennes” bort. Blærefunksjonen vil være normal etterpå. Disse svulstene har en tendens til å komme tilbake. Derfor må man kontrolleres i mange år med celleundersøkelse av urinen og cystoskopi. Kontrollene gjøres vanligvis poliklinisk med lokalbedøvelse.

For å redusere faren for nye svulster, blir urinblæren skylt med cellegift eller immunologiske medisiner, BCG (Bacillus Calmette-Guerin)(21), som reduserer tendensen til tilbakefall. BCG- skyllinger kan gi influensalignende symptomer og svie/ubehag ved vannlating, samt uttalte reaktive forandringer i urotelcellene.

Ved muskelinfiltrerende svulster, dvs de som har vokst ned i dypet av blæreveggen, må hele urinblæren opereres bort (cystektomi). Hos menn fjernes urinblæren og prostata, såkalt cystoprostatektomi. Hos kvinner fjernes livmor, eggledere og ovarier i tillegg til urinblæren. I forbindelse med inngrepet fjernes også lymfeknuter i bekkenet. Dette er ikke bare for å se utbredelse av sykdommen, det har også vist å kunne gi bedre prognose av behandlingen (3, 4).

## 2.6 Noen aktuelle metoder og markører i immuncytologisk diagnostikk

### 2.6.1 Papanicolaous fargemetode

Cytologisk materiale farget med Papanicolaou (PAP) fargemetode ble opprinnelig utviklet for å skille mellom umodne, modne og keratiniserte celler som ledd i hormonell vurdering i vaginalslimhinnen. Metodens prinsipp er basert på de ulike fargestoffenes størrelse, ladning, pH og cytoplasmamembranens permeabilitet. Metoden ble først beskrevet av dr. Georgios Nikolaou Papanikolaou i 1928. Cytologi ble fra ca. 1940 godkjent som et diagnostisk verktøy for å bekrefte eller avkrefte kreft i livmorhalsen, og har senere blitt utvidet til å omfatte undersøkelser av celler som eksfolierer (avstøtes), eller børstes/skrapes fra en rekke naturlige overflater (slimhinner og hulrom) samt fra alle organer og lesjoner som kan nåes med en nål (aspirasjonscytologi, FNAC) (20).

**Prinsipp for PAP-farging:** Hematoxylin farger kjerner blå-svart ved at oksydert hematein bindes til fosforsyrerester på DNA ved egnet pH. RNA og proteiner i cytoplasma vil også kunne farges blå avhengig av pH.

**OG 6** er et lite anionfargestoff som trenger lett gjennom cytoplasmamembranen i alle cellene. Det bindes ved ionebinding til positivt ladde grupper i cytoplasma, da særlig i de superfisielle cellene som har en tett membranstruktur pga mange S-S bindinger. Farge: lys rød.

**EA 50** består av light green og eosin, og er et surt anionfargestoff med større molekyler enn OG 6. Ved forlenget fargetid vil de større molekylene fortrenge de små molekylene. Dette gjelder basale- og parabasale celler hvor strukturen i membranen ikke er så tett som i superfisielle celler pga mange S-H bindinger. Cellenes cytoplasma farges blått / blå-grønt (fig. 3-3 A) (20).

### 2.6.2 Immuncytokjemi, immunologisk teknikk brukt på celleutstryk

For å kompensere for urincytologiens svakheter er det utviklet flere blæresvulstmarkørtester for urin. Immunundersøkelser utgjør et supplement til vanlig histologisk og cytologisk (morfologisk) mikroskopisk undersøkelse av vev og enkeltceller, og forandringer (sykdom) i vev og celler. Undersøkelsene påviser spesifikke stoffer (som oftest proteiner) som finnes i



cellenes cytoplasma, i cellemembranene eller i cellekjernen. Dette er spesielt viktig for sikrere typebestemmelse av kreftsvulster, for sikker identifisering av infeksjøs agens (bakterier og virus) i celler og vev, og i diagnostisering av immunologisk sykdom i hud, nyrer og blodårer.

Immunundersøkelsene utføres ved at antistoffet legges på et vevssnitt

(immunhistokjemi=IHC) eller celleutstryk (cytologisk preparat; = immuncytokjemi ICC).

Dersom det relevante antigen (markør) finnes i vevet, vil antistoff og antigen bindes spesifikt til hverandre. Antigen-antistoffkomplekset synliggjøres deretter ved en substrat/kromogen fargereaksjon slik at man kan se om og eventuelt hvor reaksjonen har funnet sted i cellene og vevet. Deteksjonssystemene kan være såkalte immunfluorescenssteknikker, der man benytter fluorokromer, dvs. stoffer som lyser opp når de belyses ved en spesiell bølglengde, eller såkalte immunenzymteknikker, der man benytter enzymer, hvor fargekomplekser fremkalles av enzym og substrat/kromogen reaksjon, og farger resultatet kan studeres i vanlig lysmikroskop (22).

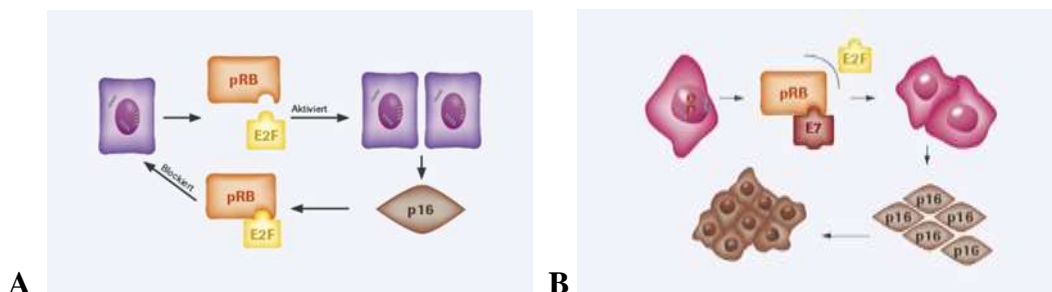
**Kvalitetssikring/ kvalitetskontroll.** Ved tilleggsundersøkelser, som for eksempel immuncytokjemi (ICC) er det viktig og ønskelig med både positive og negative kontroller. Ved bruk av væskebasert fiksering er det fullt mulig å lage ekstrapreparater, og dermed materiale til både positiv og negativ kontroll. Positive kontroller må lages fra prøver med kjent malignitet og kjent markørstatus, f.eks kjent positiv på p16. Skyllevæske fra pasienter som behandles med TUR-B for høygradige UC er velegnet til å lage positive kontroller fordi de ofte er cellerike.

Alternativt kan man spinne ned restmateriale fra mottatt urin og lage celleblokk (se 2.4.2. s.20). Vi benyttet ikke kontroller i vår studie.

## **Aktuelle markører**

**p16 INK4a** er et protein som er involvert i reguleringen av cellyklus, en syklinavhengig kinase som hemmer cellyklusprogresjon og virker som et tumorsupresorprotein. p16 er en del av den retinoblastomprotein(pRb)-medierte cellykluskontrollen som fremmer cellyklusarrest. Det har også en funksjon i forskjellige celletypers aldringsprosess, og uttrykkes i økende grad hos eldre individer (23). Stamceller spiller en rolle i mange vev for å erstatte modne celler som tapes pga. skade eller sykdom. Man vet at hematopoetiske stamceller fra eldre individer har redusert evne til repopulasjon og høyere forekomst av apoptose (programert celledød) (24). Når genet overuttrykkes vil proteinet detekteres i både kjernen og cytoplasma (figur 2-15). p16 uttrykkes i begrenset grad både i normalt vev og i de

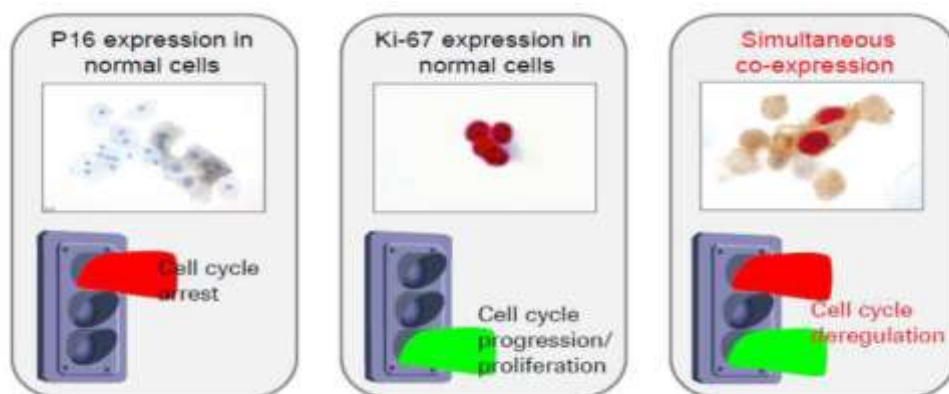
fleste non-gynekologiske tumores. Genet viser derimot en overekspressjon i nesten alle cervicale intraepiteliale lesjoner (CIN), og har blitt brukt som en markør for neoplasier forårsaket av høyrisiko HPV (humant papilloma virus). p16 overuttrykkes også i en del uroteliale carcinomer (11).



**Figur 2-15. A** Normal cellesykluskontroll. **B** Hemmet kontrollmekanisme med overuttrykk av p16. Kilde: Tilgjengelig fra: <http://www.ventana.com/cervical> Hentet 17.11.16

**Ki 67** er et proliferasjonsassosiert protein, dvs en proliferasjonsmarkør som viser at aktuelle celle er i ferd med å gå i mitose. Degenerative urotelceller, inklusive de med behandlingseffekt, vil forventes å være negative eller ha lav positivitetsrate for denne markøren. Dette proteinet uttrykkes i kjernen i alle aktive celler. Ki-67 er tilstede i alle faser av cellesyklus (mitose) bortsett fra i hvilefasen, G<sub>0</sub>. Ki-67 vekstfraksjonsindeks angir i prosent mengden av Ki-67 positive celler i en tumor ved immunhisto-/cytokjemisk farging. Vekstfraksjonsindeksen sier noe om hvor aktivt prolifererende cellene er og angir derfor prognose og kan brukes som et diagnostisk kriterium (25).

I celler som overuttrykker p16 er cellesykluskontrollmekanismen hemmet, og de vil aktivt proliferere selv med skade. Under normale fysiologiske forhold vil ikke proliferasjonsmarkøren Ki67 og tumorsuppressorproteinet p16 uttrykkes samtidig (figur 2-16). De skal gjensidig utelukke hverandre. Koekspressjon av de to markørene i bestemte celler er derfor en klar indikasjon på deregulering av cellesykluskontrollmekanismen og et tegn på onkogen transformasjon av cellene (26).

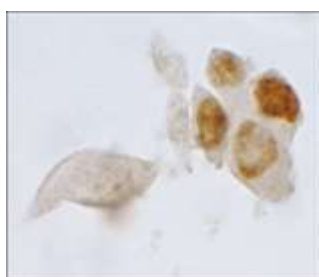


**Figur 2-16.** Samtidig ekspresjon av p16 og Ki-67 indikerer onkogen transformasjon.

Kilde: Tilgjengelig fra: <http://www.ventana.com/cervical> Hentet 17.11.16

**ProEx C** (BD diagnostics-TriPath, Burlington, USA) er en diagnostisk markør bestående av en antistoffcocktail rettet mot ekspresjon av topoisomerase II $\alpha$  og minikromosom vedlikeholdsprotein-2 og er en metode som blir brukt til diagnostisering av gynekologiske prøver. En studie av Moatamed et.al. (27) testet nytten av ProEx C i urincytologi for om mulig å forbedre påvisningen av urotelialt carcinom i prøver som var diagnostisert som atypiske. 51.4% av prøvene med atypi viste positiv kjernefarge. I denne studien hadde ProEx C farging en sensitivitet på 71%. Antall falsk negative prøver er høyere enn antall falsk positive, noe som gir en høy spesifisitet, men en lavere sensitivitet.

Testen ble utført manuelt på spontanurin fra kontrollpasienter. ThinPrep Pap-fargede slides ble avfarget, med en blanding av HCL og etanol, vasket med PBS (fosfatbuffret-



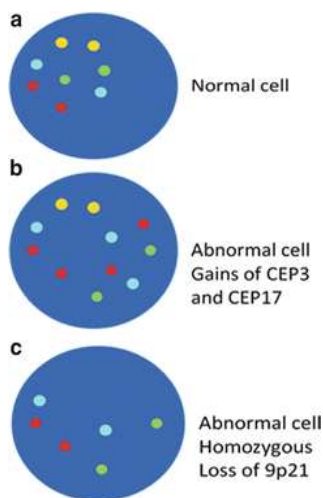
salvannsløsning)-buffer, og til slutt immunfarget med ProExC manuelt (27). Det ble konkludert med at ProEx C er en egnet tilleggsmarkør til cytologi for å fange opp malignitet i prøver med sparsomt cellemateriale, som er kategorisert som atypiske, men det finnes lite erfaring med denne markøren.

**Figur 2-17.** ProExC positive celler. Kjernene er farget brunt.

Kilde: Moatamed et.al (27).

### 2.6.3 In situ hybridisering

**FISH** (Fluorescence in Situ Hybridisering) er en teknikk som brukes til å oppdage numerisk og strukturell abnormitet i kromosomer ved forskjellige krefttyper og benyttes i stor grad til diagnostisering av brystkreft, leukemi, lymfom og sarkom som tilleggsdiagnostisk metode, og som prognostisk markør for å bestemme behandlingsstrategier. Metoden benytter seg av naturlige egenskaper hos enkeltrådig nukleinsyremolekyler for å danne dobbeltrådig molekyl etter komplementaritetsregler (9, 28).



**UroVysion Bladder Cancer Kit** (Abbot Molecular Inc. IL, USA) er en FISH metode med ett sett av 3 kromosomer og en translokasjon. Metoden identifiserer kromosomabberasjoner som viser at aktuelle celler er neoplastiske, ikke reaktive eller degenererte. Metoden har vært testet i Norge (8), men brukes ikke i urincytologisk rutinediagnostikk i dag. Det er en dyr, tidkrevende og komplisert metode som krever spesialkompetanse innen tyding av fluorescencemorfologi, noe få rutinelaboratorier har.

**Figur 2-18.** **a:** celle med normalt antall kromosomer, **b:** celle med økt antall kromosomer, **c:** celle med tap av kromosomer.

Kilde: tilgjengelig fra: <https://oncohemakey.com/molecular-diagnosis-of-bladder-and-kidney-cancer>  
Hentet 20.04.17.

Kunnskap om de molekylære prosessene som fører til urotelialt karsinom og videre utvikling av sykdommen kan gjøre det mulig å finne fram til prognostisk og prediktiv informasjon ved å undersøke patologisk materiale med en rekke molekylære markører. På den måte kan nye diagnostiske tester og behandlingsstrategier utvikles.

I en nylig publisert prospektiv sammenligningsstudie av UroVysion FISH og urincytologi, med fokus på blærekreft, konkluderer Lavery et. al. (29) med at celler med bekreftet patologi fra blæreskyllevæske ikke utkonkurrerer uFISH urincytologi i å detektere kreft. Gruppen fant at i celler fra høygradige lesjoner kunne man oppnå en sensitivitet med cytologi som var mye høyere enn i lavgradige med uFISH. I de lavgradige ble det oppnådd en sensitivitet på 36%, noe som er lavere enn for uricytologi i lavgradige lesjoner. Metoden har et stort potensiale fordi den kan avsløre kromosomforandringer i cellekjernen som kan føre til malignitet, før det

blir morfologisk synlig, og den egner seg like godt til urin som blæreskyllevæske. Dessuten vil, i motsetning til en biopsi, urinprøven inneholde celler fra hele blæreveggen og muligheten til å fange opp atypiske celler kan derfor være større enn ved biopsi (9). Men metoden må optimaliseres og det er behov for bedre standardiserte definisjoner angående hvordan positive resultater rapporteres. Spesielt med tanke på å oppdage tilbakefall på et tidlig tidspunkt (29). En ulempe med metoden er at kromosomale avvik kan forekomme i reaktive urotelceller og gi falsk positivt svar (30).

# 3 Materiale og metode

## 3.1 Innsamling og inklusjon

Materialet i denne studien er urotelceller fra urin og blæreskyllevæske.

Det ble inkludert prøver som alle ble fiksert og behandlet som væskebasert cytologi (LBC, Liquid Based Cytology) (6)s.900). Prøvene tilhørte følgende fem grupper:

- 1). Normale kontroller. Urinprøve fra frivillige, friske personer. (33 stk.)
- 2) Verifiserte cancere, diagnostisert som høygradige (HUC, 18 stk)
- 3) Verifiserte cancere, diagnostisert som lavgradige. (LUC, 8 stk.)
- 4). Kontrollprøver etter behandling for blærekarsinom. (18 stk.)
- 5). Anonyme resturiner fra 3 ulike cytologilaboratorier, fra pasienter som cytologisk ble vurdert som atypiske eller maligne eller maligne/suspekt maligne. (31 stk.)

**Gruppe 1**, normale kontroller, ble rekruttert fra en studentgruppe, friske personer i 20 årsalderen. På grunn av sin unge alder vil det ikke være noen risiko for at de har uopptaget blærekreft. Informasjon om studien ble gitt av prosjektmedarbeider (KØ), samt innhenting av samtykkeerklæring (vedlegg nr.4). Prøvene ble samlet inn i uke 43, 2015.

**Gruppe 2 og 3** ble rekruttert fra pasienter som har fått diagnostisert blærecancer ved histologisk undersøkelse ved Ahus.

**Gruppe 4** er pasienter som har fått diagnostisert blærecancer ved histologi, gjennomgått behandling og er inne til cytologikontroll.

Prøver fra **gruppe 2, 3 og 4** ble innhentet på Urologisk avdeling Ahus. Pasienter ble gitt skriftlig og muntlig informasjon, og forespurt om deltagelse i studien av sykepleier eller lege ved avdelingen. Underskrevet samtykkeskjema (Vedlegg nr.3) ble sendt prosjektansvarlig (TS), ved avdeling for patologi, Ahus.

**Gruppe 5.** Som innledning til studien ble det utført en pilot på anonymt restmateriale fra uricytologisk undersøkelse. Mål for dette var å teste metoden før vi undersøkte vårt pasientmateriale. Disse har vi ingen klinisk eller histologisk oppfølging på, men resultatene er brukt som sammenligning med tanke på hva man kan forvente i ukjent materiale.

## 3.2 Forbehandling av prøver

Samtlige prøver i vårt materiale ble overført til SurePath-beholdere for væskebasert cytologi før preparering. Beholderen inneholder etanol, (15- 20%), < 1 %, isopropylalkohol, < 1 % metanol og ca. 0,1 % formaldehyd (BD, Becton Dickinson inc.USA, BD.com).

For å undersøke formalinens effekt på cellene ble det i forkant av vår studie gjort en studie, en bacheloroppgave (31), som konkluderte med at antigenisiteten i cellene ble markant dårligere først etter fem dager. Vi oppbevarte derfor våre prøver i SurePath i maksimum et døgn.



**Normalmateriale:** Prøvene, morgenurin, ble fiksert 1:1 med 50% etanol umiddelbart, og fraktet til Avd. for Patologi, Ahus for videre preparering. Prøvene ble sentrifugert og cellematerialet ble overført til SurePath beholdere (fig. 3-1). Videre behandling som blæreskyllevæsken, se under.

**Figur 3-1.** SurePath beholder.

Kilde: BD, Becton, Dickinson and Company

**Anonyme resturiner:** Behandlet som normalmateriale.

**Pasientprøver, blæreskyllevæske:** Ca. 150 ml skyllevæske ble innsamlet ved transuretral reseksjon av blæretumoren (TUR-B), under utredning eller behandling i operasjonsstue. Prøven ble levert så raskt som mulig til cytologisk laboratorium, avdeling for patologi. Vanlig cytologisk remisse, utfylt og med påskrift: prosjekt p16/Ki67, ble sendt TS. Dersom prøven ble sendt på et tidspunkt der den ikke kunne leveres avdeling for patologi, ble den tilsatt like deler 50% etanol.

På cytologisk avdeling ble skyllevæsken sentrifugert, og cellematerialet overført til SurePath beholder med fikseringsmedium. (Unntak hvis prøven ble mottatt fredag ettermiddag, den ble da tilsatt etanol (som normalmateriale) og preparert videre påfølgende mandag). Neste dag

ble cellesuspensjonen preparert i en cytosentrifuge (Cytospin, ThermoFisher.com), (Fig. 3–2 B) en sentrifuge tilpasset cytologiske prøver for rask konsentrasjon av celler i et sparsomt eller cellefattig medium. I maskinen overføres de sentrifugerte, konsentrerte, cellene til et objektglass med barkode som prøveidentifikasjon. Glassene med prøvematerialet (celleutstryk) ble så oppbevart ufarget i fryser, -70° C, til videre undersøkelse. Prøvene ble samlet inn fra januar til august 2016.



**Figur 3-2. A:** Innsats til cytosentrifuge. Glassholder (Slide clip), objektglass (slide) og trakt med væskekammer til cellesuspensjonen (reusable chamber). Kilde: Tilgjengelig fra: <http://www.google.com/patents/US8257667>  
**B:** Innsatsen settes i Cytospin-sentrifugen. Kilde: Thermo Fisher. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A78300003>

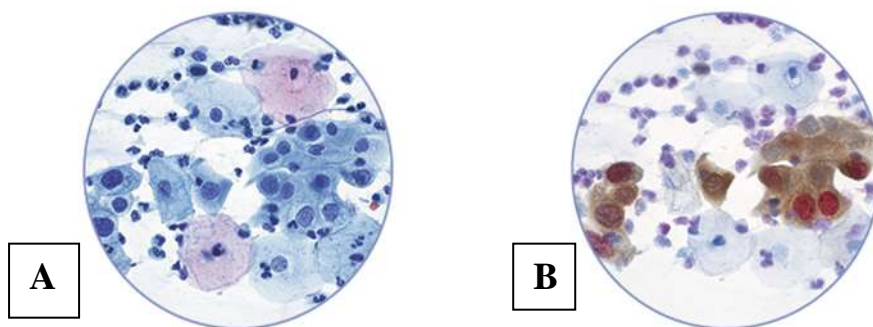
### **CINtec® PLUS Cytology Kit**

Umiddelbart før analyse ble preparatene tatt ut av fryser. De ble lagt på plate uten å tildekkes for å unngå kondens. Celleutstryket ble dynket med Reaction Buffer for ikke å tørke ut før analyseprogrammet ble startet. Analyseprotokollen, SurPath CINtec PLUS, ble kjørt på instrumentet Ventana Benchmark XT, IHC/ISH staining module fra Roche (figur 3-4). Protokollen (vedlegg nr.5) er tilpasset cytologiske prøver oppbevart i SurePath væske som inneholder noe formalin. Det innebærer et demaskeingstrinn (Heath Induced Epitope Retrieval) en forbehandling for å «klippe opp» kjemiske kryssbindinger forårsaket ved formalinfiksering.

CINtec® PLUS Cytology Kit (REF 605-100, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Germany) er en immuncytokjemisk dobbeltfargemetode for cellemarkørene p16 og Ki-67. Kitet inneholder en «ready to use» antistoffcocktail (Lot nr. F07342-F07348) med monoklonalt antistoff fra mus rettet mot human p16<sup>INK4a</sup> protein, og kanin monoklonalt



antistoff rettet mot humant Ki-67 protein. Kitet består også av et polymerreagens konjugert til pepperrotperoxidase (HRP) og geit-anti-mus fragment antigenbindende Fab-fragmenter (brun farge), og et polymerreagens konjugert til alkalisk fosfatase (rød farge) og geit-antikanin Fab-antistofffragmenter. Fargene framkommer ved at enzymet HRP indirekte omdanner 3,30 diaminibenzidine kromogenet, og enzymet alkalisk fosfatase indirekte omdanner Fast Red-kromogenet til henholdsvis brun og rød farge på bindingssetene til p16<sup>INK4a</sup> og Ki-67 antigenet, i kjerne og cytoplasma for p16, og kun kjerne for Ki-67 (figur 3-3 B). Etter kontrastfarging med alkoholfri Haematoxylin, før montering av dekkglass, gjennomgikk preparatene en to trinns monteringsprosedyre, tilpasset prøvemateriale fra SurePath væskebaset cytologi, først med et vandig monteringsmedium som skal hindre en alkoholbasert falming av Fast Red, etterfulgt av et permanent monteringsstrinn.



**Figur 3-3. A:** Pap-farget utstryk. **B:** CINtek® PLUS sampositiv på p16 og Ki67, prøve fra cervix. Kilde: Roche Tilgjengelig fra: <https://www.roche.de/diagnostics/tests-parameter/gewebediagnostik/cintec-plus.html#Merkmale>. Hentet 10.11.17.



**Figur 3-4.** Ventana Benchmark XT fra Roche. Automatisk IHC/ISH fargesystem for 30 slides .Kilde: Tilgjengelig fra: <http://www.ventana.com/product/page?view=benchmarkxt>

### 3.3 Utvalg av prøver

Tabell 3 - 1. Det fullstendige prøvematerial består av 121 prøver.

<b>Primær diagnostikk</b>	
Normale kontroller	33
PUNLUMP	5
Lavgradige LUC	8
Høygradige HUC	18
CIS	1
Benigne	4
Anonyme	31

<b>Kontrolluriner etter behandlet UC</b>	
PUNLUMP	1
Lavgradige LUC	5
Høygradige HUC	12
CIS	3

## 3.4 Variabler

**Vurdering av positivitet:** I alle prøver der minst en celle var positiv for aktuelle markør, ble denne registrert som positiv. Sampositivitet (dvs positivitet for begge markører i samme celle) ble registrert.

**Kvantitering av positive celler:** Det ble telt 200 urotelceller, og andel positive for hver markør ble registrert. Både KØ og TS screenet/telte preparater. For se på interobservervariasjon ble 5 preparater i utgangspunktet telt av begge. Variasjonen var minimal, så resten av preparatene ble telt separat.

## 3.5 Statistisk analyse

Tellerresultatene, negativ farging eller prosentandel positive farging med p16 og /eller Ki-67 ble lagt inn i “Statistical Package for Social Sciences” (SPSS) versjon 24, fra IBM.

### 3.5.1 Diagnostisk nøyaktighet

Diagnostisk treffsikkerhet ble vurdert for p16 og Ki-67 separat.

#### ROC-analyse

Arealet under kurven er tolket som sannsynligheten for at disse variablene plukker ut den korrekte diagnosen. Ideelt sett skal verdien være 1.

#### Sensitivitet og spesifisitet

Sensitivitet og spesifisitet kan anta verdier mellom 0 og 1. Sensitivitet lik 1 betyr at det er sannsynlig at testen fanger opp alle syke (sann positive). Diagnostisk sensitivitet og spesifisitet er tekniske egenskaper ved en test, og angir testens evne til å identifisere friske og syke individer i en gruppe.

Med en analyses diagnostiske sensitivitet forstås analysens evne til å identifisere syke individer (optimalt så nær 100% som mulig). Lav sensitivitet – mange falsk negative.

Med spesifisitet forstås analysens evne til å ekskludere friske individer (optimalt så nær 100% som mulig). Lav spesifisitet – mange falsk positive.

## 3.6 Etikk

Vurderingen av cellene fra urin og blæreskyllevæsker; og resultatene av disse, har ingen praktisk betydning for pasientene. Det vil ikke påvirke behandling eller prognose, eller ha noen negativ effekt. Pasientdata innbefatter tumors histologi og kliniske stadium, alder og kjønn. Prosjektet er godkjent av Regional Etisk Komite' (REK) (vedlegg 1.), og pasientvernombudet ved Ahus (Akershus Universitetssykehus) (vedlegg 2). Prøvetakningen vil si å avgi en urinprøve, altså ikke noe invasivt eller noe som vil skade pasienten. Blæreskyllevæsken ble tatt når pasient en var til cystoskopisk utredning eller behandling ved Urologisk avdeling, Ahus.

Ingen pasienter er under 18 år. Normalmaterialet er samlet inn fra anonyme, friske personer, ingen personsensitive data er innhentet fra disse.

## 4 Resultater

Tabell 4 -1. Resultater fra immunfarging. Antall positive på den ene andre eller begge markører satt opp etter histologisk diagnose.

Tumortype	p16 -		Ki-67		Dual p16/Ki67
	pos	neg	pos	neg	
5 PUNLUMP	4	1	4	1	0
8 LUC G1	6	2	6	2	0
18 HUC G3	13	5	16	2	8
1 CIS	0	1	1	0	0
<b>Kontroll etter behandling</b>					
1 PUNLUMP	1	0	1	0	0
5 LUC G1	3	2	4	1	0
12 HUC G3	8	4	11	1	0
3 CIS	3	0	2	1	0

Positivitet for en eller begge markørene er vanlig (71 av 84 = 84,5 %). Sampositivitet av p16/ki-67 ble påvist av 16,6 % av de urolteliale karsinomene, men ikke i noen av de lavgradige eller kontrollprøvene etter tidligere behandlet UC. 59 av 84 (70,2 %) symptomatiske prøver var positive for begge markørene, men ikke i de samme cellene. De normale kontrollene var komplett negative for begge markører. 27/84 (32,1%) var positive for enten p16 (n=5) eller Ki-67 (n=22).

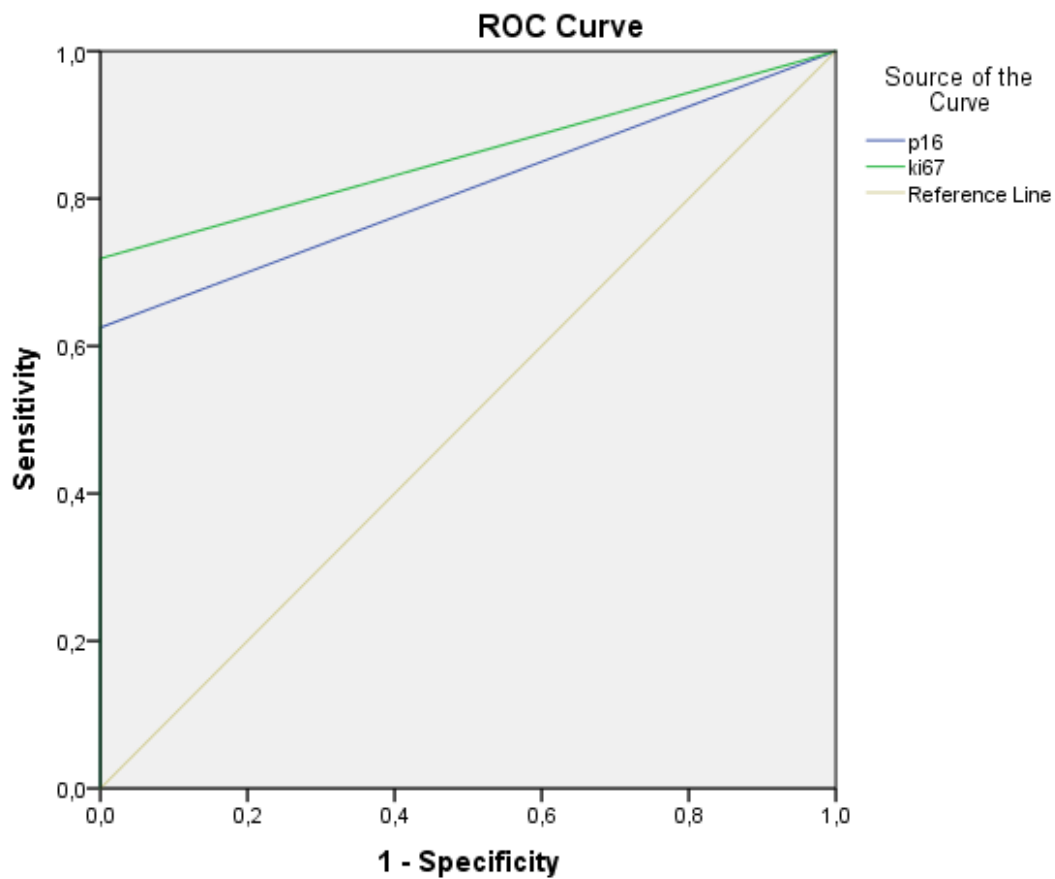
Tabell 4 - 2. Beregning av laveste, høyeste, middelvei og median for hver kategori av prøver etter prosent positivitet.

Diagnose:	N=	Laveste verdi		Høyeste verdi		Middelvei		Median	
		p16	Ki-67	p16	Ki-67	P16	Ki-67	P16	Ki-67
<b>PUNLUMP</b>	5	0	0	6	7	1,8	1,6	1	0
<b>Ktr.etter PUNLUMP</b>	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
<b>Lavgradig UC G1</b>	8	0	0	33	10,5	4,8	3	0,75	2
<b>Ktr. etter LUC</b>	5	0	0	12,6	5	3,7	1,6	2	1
<b>Høygradig UC G3</b>	18	0	0	63	58	8,8	13,2	1,6	8,8
<b>Kontroll etter HUC</b>	12	0	0,5	26	5	3,4	2,7	1,25	2,5
<b>Anonyme</b>	31	0	0	45	90	4,8	16,4	0	5
<b>CIS</b>	1	0	0,5	0	0,5	0	0,5	0	0,5
<b>Kontoll etter CIS</b>	3	2	0	6	7,5	4	3,3	4	2,5
<b>Normale</b>	33	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Benigne</b>	4	0	0	0	3,5	0	2,1	0	2,5

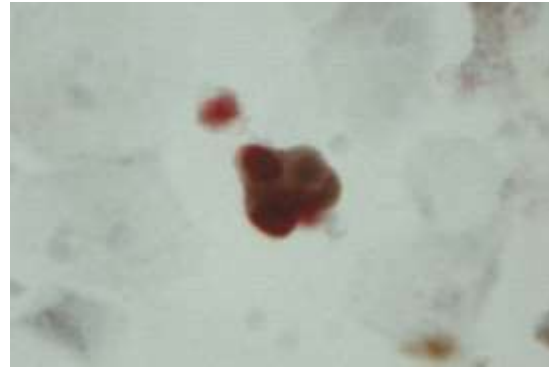
Prosentandel p16 positive celler er høyest for høygradige uroteliale karsinomer, opp til 63 %. Middelveidien og median for henholdsvis lavgradige og høygradige uroteliale karsinomer er: 4,8 % / 0,75 % og 8,8 % / 1,6 %.

15/21 (71 %) hhv. 18/21 (86 %) ktr. prøver var positive for p16 – Ki-67. Ingen av disse har fått påvist residivtumor.

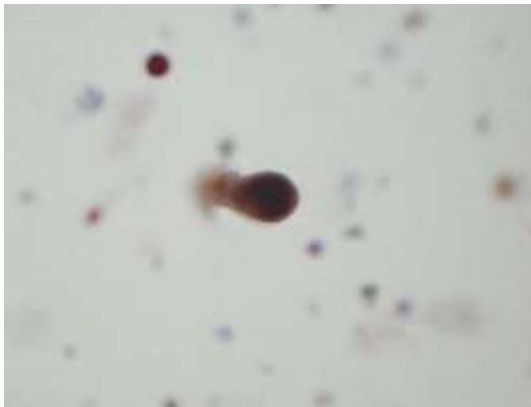
Ved å sette en cut-off på Ki-67 på 5 % (uavhengig av p16 verdi), faller alle de histologisk verifiserte benigne lesjonene under denne verdien og de maligne over.



**Figur. 4-1.** ROC-kurve. Danner grunnlag for cut-off for p16 og Ki-67. En cut-off på ca. 5% for Ki-67 gir en sensitiivitet på 42 %. Spesifisiteten er 100 %.



**Figur 4-2.** Foto av normalurin fra kontrollmaterialet. **Figur 4-3.** Foto av sampositiv positiv p16/Ki-67.



**Figur 4-4.** Foto av urotelcelle positiv på p16.



**Figur 4-5.** Foto av Ki-67 positiv urotelcelle.



## 5 Diskusjon

Tradisjonelle oppfølgingsrutiner for blærecanserpasienter består av regelmessig cystoskopi og cytologisk undersøkelse av spontanurin. Ca. 10% av tilbakefall fanges ikke opp ved disse metodene (9). De lavgradige lesjonene er vanskeligst å oppdage. Dette er delvis betinget av reaktive og degenerative forandringer i urotelkjernen, enten som direkte følge av intravesikal behandling (BCG), eller pga stråleskade i både benigne og maligne celler, samt reaktive og reparative forandringer i cellene etter avsluttet behandling. Omtrent halvparten av alle blærekreftpasienter får sykdommen mer enn en gang. Blærekreft er en kostbar og arbeidskrevende sykdom som innebærer omfattende oppfølging av pasientene med regelmessige prosedyrer. Sansynligheten for tilbakefall er stor. Av den grunn er det et stort behov for effektive og skånsomme metoder i oppfølgingen av pasientene (2). Økt sensitivitet og sikrere ikke-innvasive diagnostiske metoder vil kunne redusere behovet for cystoskopi (9).

Vi ønsket å undersøke om immuncytokjemisk påvisning av p16 og Ki-67 i urotel ville kunne bedre sensitivitet og spesifisitet i urincytopologisk diagnostikk. Så langt vi har kunnet finne i den cytologiske litteraturen, er dette første gang det er benyttet SurePath som medium i ICC av urincytopologisk material. Eksempler på ICC resultater kan sees i figurene 4-2 til 4-5.

Sampositivitet ("dualpositivitet") var en uvanlig hendelse i vårt materiale, og ble bare funnet i 16,6% av de maligne lesjonene. I motsetning til cervixcytologisk diagnostikk har derfor sampositivitet ingen diagnostisk nytteverdi i urincytopologi. Flere studier har vist at p16/Ki-67 dobbeltfarging ikke gir noen signifikant økt sensitivitet i urincytopologi.

Piaton et.al. har i flere studier undersøkt sammenhengen mellom dobbeltfarging av p16/Ki-67 og urotelialt karsinom, og sykdomsprogresjon i urincytopologi (26, 32, 33). Piaton fant at dobbeltfarging med p16/Ki-67 har høy sensitivitet for høygradig urotelialt karsinom, men at metoden ikke har signifikant høyere sensitivitet enn konvensjonell urincytopologi. I deres materiale var 16% av lavgradige UC /PUNLMP sampositive mens 76% var positive for p16 alene (26, 34).

I en oppfølgingsstudie fant samme gruppe at sensitiviteten for positiv p16/Ki-67 dobbeltfarging og livstruende kreftsykdom var 83,6% , og 82,2% for cytologi alene. Ved

negativ cytologi var sykdomsfri overlevelse signifikant kortere ved samtidig ICC positiv samfarging, i forhold til de som var ICC negative (33).

Det er gjort noen studier på immuncytokjemisk ekspresjon av p16 alene i maligne celler i urin. I en studie fra 2012, indikerer Alameda et al.(35) at måling av p16 vil kunne øke sensitivitet og spesifisitet av karsinomdiagnostikken i uriner. Gruppen fant at 66,3 % (55 av 83 med atypi) uttrykte p16 positivitet. 36 av de 55 hadde positiv biopsi.

Nakazawa et al. (36) fant at 80 % av høygradige uroteliale karsinomer og 50 % lavgradige var positive for p16.

I primærdiagnostikken er de høygradige uroteliakarsinomcellene morfologisk greit erkjennbare, og tilleggsundersøkelser er ikke nødvendige. Lavgradige uroteliale karsinomer har en meget diskret cellulær atypi og er ofte vanskelig å erkjenne morfologisk. Ved klinisk mistanke vil p16 kunne påvise noen av disse i primærdiagnostikk (i vårt materiale var 75% av de lavgradige positive på p16). Hos pasienter som har vært behandlet for uroteliale karsinomer finner man ofte celler med usikre kjerneforandringer. Disse kan representere rent degenerative eller reaktive forandringer eller være maligne celler (residiv) med sekundær forandringer. Dette er ofte umulig å skille rent morfologisk. I tvilstilfeller vil funn av positive p16 kunne være suspekt på residiv. De anonyme prøvene i vårt materiale viste en andel positive på p16 på 43,8%, på samme nivå som de primærdiagnostiserte karsinomene. Vi har ingen oppfølging på disse, men resultatet passer med at de fleste av disse stammer fra maligne lesjoner. Ingen av de benigne prøvene var positive på p16. Det vil si at p16 positivitet uansett antall positive celler vil være en meget sterk indikasjon på at cellene kan være maligne og at det bør gjøres cystoskopi for videre utredning.

Ki-67 er en proliferasjonsmarkør som viser økt andel positive celler i maligne lesjoner, men som også vil vise øket ekspresjon ved reparasjon av celledøde av ulike årsaker. Benigne forandringer vil som oftest ha lave Ki-67 verdier. I våre benigne prøver var den høyeste verdien 3,5%. Under pågående BCG behandling er det en betydelig reparativ respons, det representerer en aktiv proliferasjon av celler der vi kunne forvente en økt uttrykk av Ki-67. Materialet inneholder kun en slik prøve, og den hadde 4% Ki-67 positive celler. I henhold til våre funn ville en andel Ki-67 positive celler på 5 % kunne indikere at det forelå maligne celler, eventuelt residiv (tilbakefall) av tidligere kjent uroteliale karsinomer og dermed være en indikasjon for å gjøre cystoskopi. Med en cut-off på 5% vil vi i følge ROC-kurven få en sensitivitet på 42% og en spesifisitet på 100%.

Courtade-Saidi (37) testet dobbelt immunfarging på urincytologi med markørene p53 og Ki67 for påvisning av urotelialt karsinom. P53 er, som p16, et cellesyklusregulerende tumorsupressorprotein. At endringer i proteinet kan føre til uhemmet cellevekst og utvikling av urotelialt karsinom er veldokumentert. Overekspressjon er assosiert med høyere tumorgrad og stadium, sykdomsprogresjon og redusert overlevelse (37, 38). Den optimale cut-off for påvisning av alle typer urotelialt karsinom (UC), sett under ett, ble beregnet til 5% for p53 og 3% for Ki-67. Dette ga den høyeste spesifisiteten på 97,6%, mens sensitiviteten sank til 68,9%. Dette er et bedre resultat enn UroVysion FISH (Abbot Molecular, Abbot Park, Illinois, USA) eller p16/Ki-67-dobbeltfarging kan vise til. De konkluderer med at å teste for markørene p53 og/eller Ki-67 som tilleggsundersøkelse til cytologi øker spesifisiteten uten å redusere sensitiviteten.(37, 39, 40).

Studiene som er sitert ovenfor bruker ulike prepareringsmetoder og fiksativer, noe som kan forklare de ulike resultatene i forhold til vår egne resultater. I cytologi brukes forskjellige fiksativer. Etanol er den vanligste fikseringsmetoden. Til spesialundersøkelser som In Situ-hybridisering og immuncytokjemi brukes ofte andre fiksativer som aceton eller metanol, evt. sekvensfiksering med flere ulike fiksativer. Aceton anses for å være det mest sensitive fiksativet, men gir ofte endel uspesifikk bakgrunnsfarging. Det brukes en del ved fluorescens ISH (FISH) der uspesifikk bakgrunn er et mindre problem. Det er likeledes kjent at metanol gir bedre immunreaktivitet enn etanol (41-43). Formalin er lite brukt til fiksering av cytologisk material, men kan være verdifullt som etterfiksering (44). SurePath inneholder en liten mengde formalin. I en Bacheloroppgave fra 2015 (31) ble det testet effekten av oppbevaring/lagring av celler i SurePath over lengre tid, først etter 5 dager ble det observert lavere immunreaktivitet av betydning. I vår studie ble cellene oppbevarte i SurePath i maksimum et døgn.

Både Piaton et.al. (33) og Courtade-Saidi et.al. (37) primærfikserte i 50% etanol på samme måte som oss. Piaton et.al. sekundærfikserte i metanol (ThinPrep). Courtade-Saidi et.al brukte aceton som sekundærfiksering, mens vi brukte etanol/formalin (SurePath). Alameda et.al. primærfikserte i metanol uten sekundærfiksering. I tillegg kan ulik forbehandling og ulik immunprotokoll bidra til ulike resultater. Selv om vi visste at metanol kan være bedre egnet til immunundersøkelser, ønsket vi å bruke SurePath fordi et økende antall cytologilaboratorier i Norge har det som rutinemetode for preparering av både ervixcytologi og non-gyn cytologi.

UroVysion FISH og ProEx C er diagnostiske metoder som også hevdes å være godt egnet til å fange opp uroteliale carcinomer men vi har ingen erfaring med noen av disse.

Det er mulig å bruke både cytologiske preparater og celleblokk til immuncytologiske undersøkelser. Celleblokk er foretrukket metode ved mange institusjoner fordi metoden avviker lite fra den histologiske. Det er da vanlig å bruke histologisk material som kontroll. I urincytologi er det vanligvis begrenset mengde celler og det er vanskelig å lage celleblokk, selv med automatisering. Det vil imidlertid som oftest være nok material til å lage 1 til 2 ekstra preparater i tillegg til Pap-farget rutinepreparat. Immuncytokjemisk protokoll avviker fra den som brukes til histologisk material og må optimaliseres spesielt. Positivt kontrollmateriale kan være en utfordring. Blæreskyllevæske fra verifiserte karsinomer inneholder rikelig med tumorceller. Disse kan prepareres og brukes som positive kontrollprøver.

Cytologiske preparater kan fryses ned og oppbevares i lang tid. Pedersen et.al. har vist at langtidslagring av væskebaserte preparater av ved  $-20^{\circ}\text{C}$  eller  $-74^{\circ}\text{C}$  i minst 6 måneder ikke gir signifikant tap av immunoreaktivitet (45).

## 6 Konklusjon

Sampositivitet p16/ Ki-67 ble bare påvist i 16,6 % av de høygradige karsinomene, og har dermed ingen praktisk betydning som tilleggsmarkør. Positivitet for p16 alene er en sterk indikasjon på at det kan foreligge malignitet og er dermed en indikasjon for cystoskopi. Negativ p16 med ki-67 ekspresjon over 5 % vil også kunne være indikasjon for cystoskopi som tilleggsmarkør i primærdiagnostikk. Begge markørene, sammen og hver for seg, kan gi tilleggsinformasjon diagnostikk av urinprøver hos pasienter som kontrolleres etter behandling for urotelialt karsinom.

# Litteraturliste

1. Krefregisteret. Institutt for populasjonsbasert kreftforskning 2013 <https://www.krefregisteret.no/Registrene/Kreftstatistikk/>. 10.07.2016
2. Skaaheim Haug E, Kulle Andreassen B. Hvorfor holder alle kjeft om blærekreft? Aftenposten. 2017 09.05.2017.
3. Stensvold A, Brennhovd B. Kreft i urinblære Oncolex, onkologisk oppslagsverk, Oslo Universitetssykehus HF 2014 [Available from: <http://www.oncolex.no/no/Urotel>]. 10.10.2016
4. R W, Helsedirektoratet. Nasjonalt handlingsprogram med retningslinjer for diagnostikk, behandling og oppfølging av blærekreft 04.04.2013. Available from: <http://www.helsedirektoratet.no/publikasjoner/>.
5. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs—part A: renal, penile, and testicular tumours. *Eur. urol.* 2016;70(1):93-105.
6. Gray W, Kojan G. *Diagnostic Cytopathology*. 3 ed: Churchill Livingstone 2011.
7. Thiryayi SA, Rana DN. Urine cytopathology: challenges, pitfalls, and mimics. *Diagn Cytopathol.* 2012;40(11):1019-34.
8. © Abbott Laboratories. Abbott Park I, U.S.A. UroVysion Bladder Cancer Kit (CE) Illinois, USA 2016 <https://www.molecular.abbott/int/en/products/oncology/urovysion-bladder-cancer-kit>. 20.04.2017
9. Berggren E. Identifisering av atypiske uroteliale celler ved hjelp av cytologisk undersøkelse og deteksjon av kromosom- og genkopiendringer i urotelceller ved hjelp av fluorescens in situ hybridisering. [Masteroppgave]. In press 2010.
10. Roche. CINtec® PLUS Cytology Kit. In: GmbH RD, editor. Mannheim Germany Roche; 2016.
11. Oncolex. Krefttyper 2016 [Available from: <http://oncolex.no/Urotel>].
12. Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, Reuter VE. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol.* 2016;70(1):106-19.
13. Society AC. USA 2016 <http://www.cancer.org/cancer/bladdercancer>. 07.02.2017
14. Holck P. Urinblære Store Medisinske Leksikon 2016 <https://sml.snl.no/urinblære>. 08.02.17
15. Association AU. Bladder neoplasms 2016: <https://www.auanet.org/> 09.02.2017 <https://www.auanet.org/education/modules/pathology/bladder-neoplasms/low-grade.cfm>.
16. Montironi R, Lopez-Beltran A, Scarpelli M, Mazzucchelli R, Cheng L. 2004 World Health Organization classification of the noninvasive urothelial neoplasms: inherent problems and clinical reflections. *eur urol suppl.* 2009;8(5):453-7.
17. Mubarak M. WHO/ISUP Classification of Papillary Urothelial Tumors: have We Finally Settled for it? *Journal of Tumor.* 2014;2(6):145-7.
18. Normannvik E. Cystoskopi 2016 :<https://kreftforeningen.no/om-kreft/undersokelse-ved-kreft/cystoskopi/> 10.02.2017
19. Ejersbo D. Urinvejscytologi 2014 [3.utgave: <http://www.danskytologiforening.dk/07.02.2017>
20. Ejersbo. D. Kompendium i klinisk cytologi: Dansk cytologiforening; 2014. 01.05.2017 [Kompendium]. <http://danskytologiforening.dk/Kompendier/Cytopraeparation.pdf>.
21. Lamm DL. Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for bladder cancer. *The Journal of urology.* 1985;134(1):40-7.
22. Roald B. Immunhistokjemi. 2016. <https://sml.snl.no/immunhistokjemi>. 31.05.2017

23. Romagosa C, Simonetti S, Lopez-Vicente L, Mazo A, Lleonart ME, Castellvi J, et al. p16(Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene*. 2011;30(18):2087-97.
24. Janzen V, Forkert R, Fleming HE, Saito Y, Waring MT, Dombkowski DM, et al. Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature*. 2006;443(7110):421-6.
25. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000;182(3):311-22.
26. Piaton E, Advenier AS, Carre C, Decaussin-Petrucci M, Mege-Lechevallier F, Ruffion A. p16(INK4a) /Ki-67 dual labelling as a marker for the presence of high-grade cancer cells or disease progression in urinary cytopathology. *Cytopathology* 2013;24(5):327-34.
27. Moatamed NA, Rao JY, Alexanian S, Cobarrubias M, Levin M, Lu D, et al. ProEx C as an adjunct marker to improve cytological detection of urothelial carcinoma in urinary specimens. *Cancer Cytopathol*. 2013;121(6):320-8.
28. Hajdinjak T, editor *UroVysion FISH test for detecting urothelial cancers: meta-analysis of diagnostic accuracy and comparison with urinary cytology testing*. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*; 2008: Elsevier.
29. Lavery HJ, Zaharieva B, McFaddin A, Heerema N, Pohar KS. A prospective comparison of UroVysion FISH and urine cytology in bladder cancer detection. *BMC Cancer*. 2017;17(1):247.
30. Tapia C, Glatz K, Obermann EC, Grilli B, Barascud A, Herzog M, et al. Evaluation of chromosomal aberrations in patients with benign conditions and reactive changes in urinary cytology. *Cancer Cytopathol*. 2011. 119(6):404-10.
31. Bjønness-Jacobsen EC, Kallevåg Eriksen AK, Nyløkken Hagen V, Østbye KM, Wittersø A, Pedersen MK, et al. The effect of small amount of formaldehyde in SurePath Liquid hwn establishing protocols for immunocytochemistry. *Cytojournal*. 2016;13(27):5.
32. Piaton E, Casalegno JS, Advenier AS, Decaussin-Petrucci M, Mege-Lechevallier F, Ruffion A, et al. p16(INK4a) overexpression is not linked to oncogenic human papillomaviruses in patients with high-grade urothelial cancer cells. *Cancer Cytopathol*. 2014;122(10):760-9.
33. Piaton E, Advenier AS, Carré C, Decaussin-Petrucci M, Mège-Lechevallier F, Hutin K, et al. p16/Ki-67 dual labeling and urinary cytology results according to the New Paris System for Reporting Urinary Cytology: Impact of extended follow-up. *Cancer Cytopathol*. 2017.
34. Piaton E, Carre C, Advenier AS, Decaussin-Petrucci M, Mege-Lechevallier F, Lantier P, et al. p16 INK4a overexpression and p16/Ki-67 dual labeling versus conventional urinary cytology in the evaluation of urothelial carcinoma. *Cancer Cytopathol*. 2014;122(3):211-20.
35. Alameda F, et al. Value of p16ink4a in the Diagnosis of Low-Grade Urothelial Carcinoma of the Urine Bladder in Urinary Cytology. *Cancer Cytopathology* 2012(25 ):276 – 82.
36. Nakazawa K, Murata S-i, Yuminamochi T, Ishii Y, Ohno S, Nakazawa T, et al. p16(INK4a) expression analysis as an ancillary tool for cytologic diagnosis of urothelial carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2009;132(5):776-84.
37. Courtade-Saïdi M, Aziza J, D' Aure D, Bérard E, Evrard S, Basset C, et al. Immunocytochemical staining for p53 and Ki-67 helps to characterise urothelial cells in urine cytology. *Cytopathology*. 2016;27(6):456-64.
38. Alexander RE, Williamson SR, Richey J, Lopez-Beltran A, Montironi R, Davidson DD, et al. The expression patterns of p53 and p16 and an analysis of a possible role of HPV in primary adenocarcinoma of the urinary bladder. *Plos One*. 2014;9(4):e95724.

39. Piaton E, Decaussin-Petrucci M, Mege-Lechevallier F, Advenier AS, Devonec M, Ruffion A. Diagnostic terminology for urinary cytology reports including the new subcategories 'atypical urothelial cells of undetermined significance'(AUC-US) and 'cannot exclude high grade'(AUC-H). *Cytopathology*. 2014;25(1):27-38.
40. Dimashkieh H, Wolff DJ, Smith TM, Houser PM, Nietert PJ, Yang J. Evaluation of Urovysion and cytology for bladder cancer detection. *Cancer cytopathol*. 2013;121(10):591-7.
41. Hudock JA, Hanau CA, Christen R, Bibbo M. Expression of estrogen and progesterone receptors in cytologic specimens using various fixatives. *Diagn Cytopathol*. 1996;15(1):78-83.
42. Suthipintawong C, Leong ASY, Chan KW, Vinyuvat S. Immunostaining of estrogen receptor, progesterone receptor, MIB1 antigen, and c-erbB-2 oncoprotein in cytologic specimens: A simplified method with formalin fixation. *Diagn Cytopathol*. 1997;17(2):127-33.
43. Raymond WA, Leong AS-Y. An evaluation of potentially suitable fixatives for immunoperoxidase staining of estrogen receptors in imprints and frozen sections of breast carcinoma. *Pathology*. 1988;20(4):320-5.
44. Beraki E, Sauer T. Determination of HER-2 status on FNAC material from breast carcinomas using in situ hybridization with dual chromogen visualization with silver enhancement (dual SISH). *Cytojournal*. 2010;7(1):21.
45. Sauer T, Ebeltoft K, Pedersen MK, Kåresen R. Liquid based material from fine needle aspirates from breast carcinomas offers the possibility of long-time storage without significant loss of immunoreactivity of estrogen and progesterone receptors. *Cytojournal*. 2010;7(1):24.



# Vedlegg

1 Godkjenning REK

2 godkjenning pasientvernombudet Ahus

3 Samtykkeskjema pasienter

4 Samtykkeskjema normalmateriale

5 Analyseprotokoll CINtec PLUS XT