

Digital billedanalyse af immunhistokemiske dobbeltfarvninger for tumorcelledeling

# Lovende diagnostisk og prognostisk værktøj ved modernærkekræft

## Diagnostik af modernærkekræft

For at udelukke diagnosen modernærkekræft mikroskopere patologer i Danmark titusindvis af melanocytære hudlæsioner hvert år. Vurderingen kræver stor erfaring, og vurderingsfejl er desværre forholdsvis hyppige med store konsekvenser for den enkelte patient. Opgørelser fra USA viser, at den hyppigste årsag til sagsanlæg mod patologer er oversete tilfælde af modernærkekræft (1).

Ukontrolleret celledeling er afgørende for kræfttumors udvikling (2) og kan visualiseres ved hjælp af immunhistokemi. Anvendes immunhistokemiske dobbeltfarvninger, fremhæves tumorcellernes delingsaktivitet i en sådan grad, at kvantitering kan foretages automatisk vha. digital billedanalyse. Her ved kan en mere effektiv og objektiv bestemmelse opnås set i forhold til traditionel celledælling i mikroskop. Ved modernærkekræft kan denne automatiske kvantitering både være et vigtigt diagnostisk og prognostisk værktøj.

## Bestemmelse af celledeling

Ved modernærkekræft, hvor tumorkomponenten er tynd (tumortykkelse  $\leq 1$  mm), er antallet af celledelinger (mitoseindeks) netop blevet indført som en del af den danske tumorstadietildeling (3). Dette mitoseindeks skal bestemmes ud fra mikroskopi af hæmatoxylin-eosin-farvet væv (se figur 1A og 1B) (4). Men metoden er kritiseret, da mitoser her kan være svære og meget tidskrævende at identificere, ligesom der stilles spørgsmålstejn ved reproducerbarheden (5,6).

Et simpelt alternativ kan opnås ved hjælp af immunhistokemi. Her anvendes proliferationsmarkøren Ki67, der farver alle celler i de aktive faser af celleyklus (G1, S, G2 og M) allerede ved diagnostik, og mange studier viser en sammenhæng mellem graden af Ki67-ekspression og patientens prognose. Konklusionerne af forskellige Ki67-studier er dog langt fra entydige (7). Én årsag kan være, at der ofte, både i ondartede og godarte-

de modernærker, forekommer et betydeligt inflammatorisk infiltrat. Inflammatoriske celler, der er aktive i celleyklus, farves også af Ki67 ligesom andre celler i bindevæv og kar. Derfor kan disse celletyper ikke med sikkerhed skelnes fra relevante Ki67-positive tumorceller i en traditionel Ki67-enkeltfarvning (se figur 2A og 2C).

Kombineres Ki67 i stedet med en melanocytmarkør som Melan-A i en immunhistokemisk dobbeltfarvning, tydeliggøres Ki67-positive tumorceller, og de forskellige Ki67-positive celletyper kan nemt skelnes (se figur 2B og 2D). Således opnås et langt mere akkurat mål for tumorcellernes Ki67-positivitet end ved de traditionelle enkeltfarvninger. Endnu en betydelig fordel ved Ki67/Melan-A-dobbeltfarvningerne er, at relevante celler kan genkendes og kvantiteres ved hjælp af digital billedanalyse. En sådan automatisk kvantitering er stort set umulig med Ki67-enkeltfarvningerne (se figur 2E og 2F). Ki67/Melan-A-dobbeltfarvninger muliggør derfor en hurtig og repeterbar måling af Ki67, der kan foretages af en computer i stedet for en patolog bag et mikroskop.

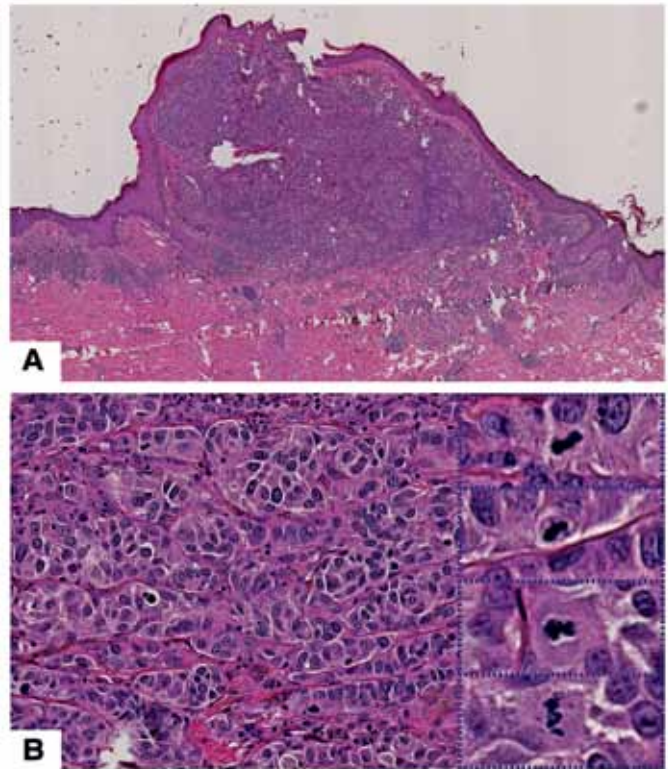
En anden helt ny markør for celledeling, phosphohistone H3 (PHH3), farver kun celler i den sidste aktive fase af cellens cyklus, selve mitosen (M) (5). Da modernærkekræft ikke nødvendigvis indeholder en PHH3-positiv mitose, er PHH3's diagnostiske anvendelighed formentlig begrænset. Fokus er derfor primært rettet mod PHH3's prognostiske egenskaber. Ligesom ved Ki67 kan en dobbeltfarvning med en melanocytmarkør styrke vurderingen af PHH3 (se figur 3A og 3B), og der er igen mulighed for automatisk kvantitering ved hjælp af digital billedanalyse.

Vi har i et pilot- og et større valideringsstudium vist, at Ki67/Melan-A-dobbeltfarvninger med høj sikkerhed kan skelne godartede og ondartede modernærker både ved manuel og automatisk kvantitering (8-10). Dog kan enkelte godartede modernærker også indeholde betydelig Ki67-positivitet, mens

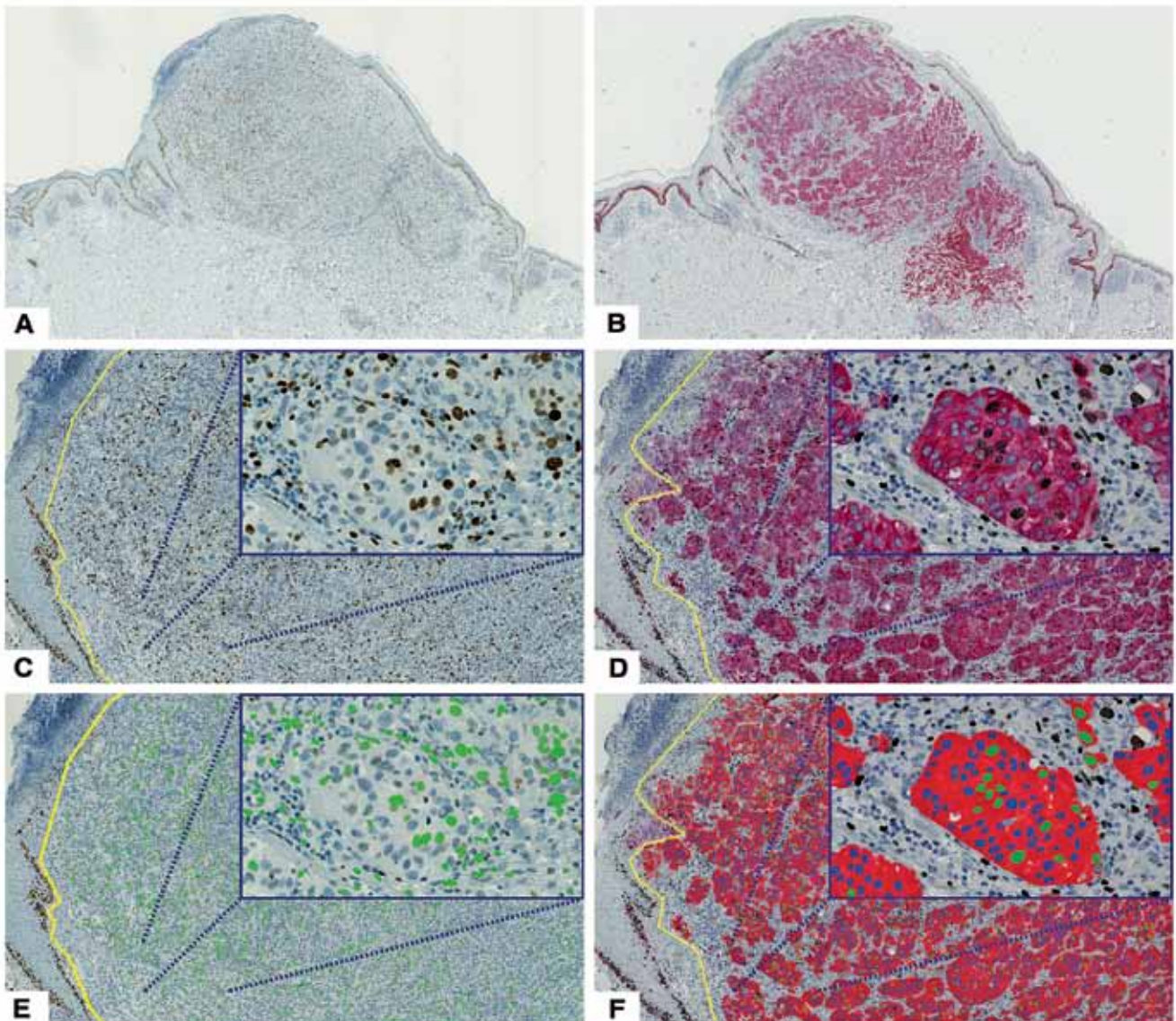


Af  
**bioanalytiker, cand.scient.med., ph.d. //**  
**Patricia Switten Nielsen**  
Patologisk Institut,  
Aarhus Universitetshospital

**Figur 1** Mitoser i et ondartet modermærke farvet med hæmatoxylin-eosin. I B ses mitoser ved højere forstørrelse.



**Figur 2** Ki67 enkeltfarvning (A, C og D) og Ki67/Melan-A dobbeltfarvning (B, D og F) af ondartet modermærke. Alle celler, der er aktive i celleyklus, farves med Ki67 (B) og digital billedanalyse af Ki67 enkeltfarvninger er derfor vanskelig, når celletyperne ikke kan bestemmes (C). Dobbeltfarvning medfører markant tydeliggørelse af Ki67 positive tumorceller (D), hvormed kvantitering vha. billedanalyse muliggøres (F).





**Figur 3.** PHH3/Melan-A-dobbeltfarvning af ondartet modermærke. I A ses et hotspot samt arealindtegning af hele læsionen. I B ses PHH3/Melan-A-positive mitoser ved højere forstørrelse.

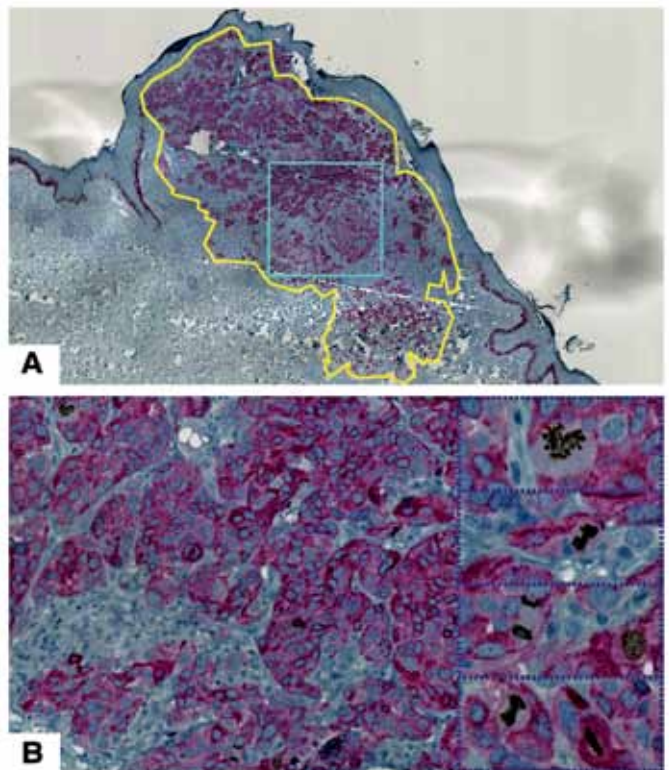
ekspressionen kan være lav i meget tynde typer af modermærkekræft. Metoden må derfor betragtes som et supplement til patologens vanlige diagnostik. Traditionel mikroskopivurdering af dobbeltfarvningen er allerede værdsat i vores rutinediagnostik, men vi håber, at computerens rent kvantitative mål også på sigt vil vinde indpas i takt med udbredelsen af digital patologi. Perspektivet er, at computerens rent kvantitative mål vil øge patologens opmærksomhed og derved reducere risikoen for, at modermærkekræft overses ved den traditionelle mikroskopi af modermærker. Hermed sikres patienten rettidig behandling og en bedre prognose.

### Prognostisering af modermærkekræft

På nuværende tidspunkt er tumortykkelse den mest betydningsfulde prognostiske faktor for patienter med modermærkekræft uden metastaserende sygdom. Dog oplever en subgruppe af patienter med tynde typer et uventet aggressivt forløb, mens andre patienter med tykke typer klarer sig bedre end forventet (11). Udvikling af nye prognostiske markører er derfor essentiel for disse patientgrupper. I tillæg er alternativer til det netop indførte, men kritiserede, mitoseindeks ønskværdigt.

Et af vore studier tyder på, at både Ki67- og PHH3-dobbeltfarvninger kan anvendes som uafhængige prognostiske markører; PHH3 tilsyneladende med et større potentiale end Ki67 (12). I studiet afprøvede vi forskellige metoder til at estimere Ki67- og PHH3-positivitet, blandt andet som antalsfraktioner, arealfractioner, antal i et hotspot (område med højest delingsaktivitet) og antal i forhold til hele tumorarealet (se figur 3A) og korrelerede disse mål med patientens prognose. Her skilte hotspotmetoden sig nævneværdigt ud. Ki67 og PHH3 i hotspots forudså prognose med langt større sikkerhed end positivitet i hele tumor (12). Dette kan understøtte tanken om, at én subklon med progressive tumorceller har størst betydning for patientens prognose.

Selvom vi har opnået gode resultater med automatiseringen af Ki67, har vi oplevet problemer med den automatiserede analyse af PHH3. Primært grundet en generelt svag eller negativ Melan-A-farvning, men også på grund af et meget varierende udseende af mitosefigurene samt reduktion af Melan-A-intensiteten omkring selve mitosefiguren (se figur 3B). Heldigvis er bestemmelsen af PHH3 i hotspots meget simpel ved hjælp af konventionel mikroskopi, og automatisering er derfor ikke en forudsætning for indførelse i klinisk praksis. Potentielt kan en manuel bestemmelse af PHH3 erstatte det konventionelle mitoseindeks. Dog er der stadig brug for validerende undersøgelser af PHH3-dobbeltfarvningerne, og her kan automatiseret analyse mindske arbejdsbyrden markant. □



### Referencer:

1. Kornstein MJ, Byrne SP. The medicolegal aspect of error in pathology: a search of jury verdicts and settlements. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131:615-8.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-74.
3. The Danish Melanoma Group. The guidelines of the Danish Melanoma Group. <http://www.melanoma.dk/>.
4. Piris A, Mihm MC, Jr., Duncan LM. AJCC melanoma staging update: impact on dermatopathology practice and patient management. *J Cutan Pathol* 2011; 38:394-400.
5. Casper DJ, Ross KI, Messina JL, et al. Use of anti-phosphohistone H3 immunohistochemistry to determine mitotic rate in thin melanoma. *Am J Dermatopathol* 2010;32:650-4.
6. Weyers W. The magic of numbers: malignant melanoma between science and pseudoscience. *Am J Dermatopathol* 2011;33:371-8.
7. Ohsie SJ, Sarantopoulos GP, Cochran AJ, Binder SW. Immunohistochemical characteristics of melanoma. *J Cutan Pathol* 2008;35:433-44.
8. Nielsen PS, Riber-Hansen R, Steiniche T. Immunohistochemical double stains against Ki67/MART1 and HMB45/MITF: promising diagnostic tools in melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol* 2011;33:361-70.
9. Nielsen P, Spaun E, Riber-Hansen R, Steiniche T. Automated quantification of MART1-verified Ki67 indices: useful diagnostic aid in melanocytic lesions. *Human Pathology* 2013; in press.
10. Nielsen PS, Riber-Hansen R, Raundahl J, Steiniche T. Automated quantification of MART1-verified Ki67 indices by digital image analysis in melanocytic lesions. *Arch Pathol Lab Med* 2012;136:627-34.
11. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 2009;27:6199-206.
12. Nielsen PS, Riber-Hansen R, Jensen TO, Schmidt H, Steiniche T. Proliferation indices of phosphohistone H3 and Ki67: strong prognostic markers in a consecutive cohort with stage I/II melanoma. *Mod Pathol* 2013;26:404-13.