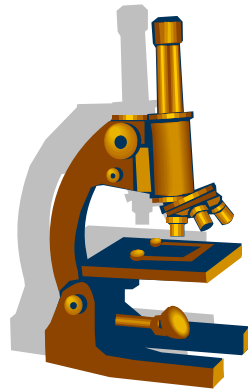


Endring av celleproliferasjonsmarkøren Ki-67 ved strålingsterapi av kolorektal cancer



5.årsoppgave i Stadium IV - medisinstudiet ved Universitetet i Tromsø

Student: Øyvind Jervan, MK-03

Veileder: Elin S. Mortensen, overlege og førsteamanuensis v/ avdeling for patologi v/ UNN

Tromsø 2008

Innholdsfortegnelse

Resyméside 3
Introduksjonside 4 – 8
Metode/arbeidsformside 9 – 16
Resultaterside 17 – 23
Diskusjonside 24 – 25
Referanserside 26 – 27

Resymé

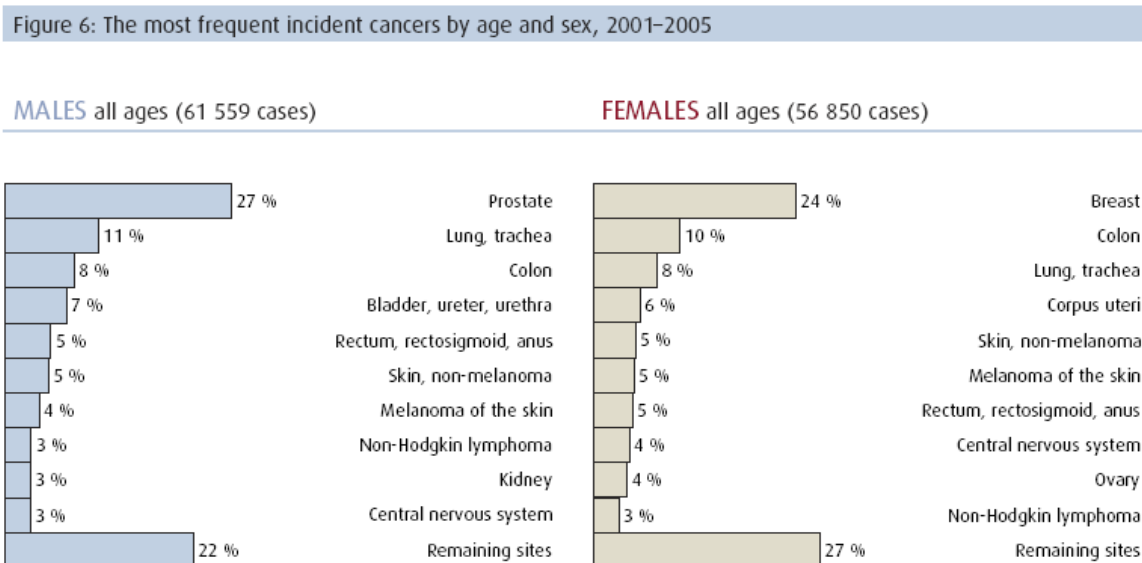
I 2005 fikk 1727 mennesker i Norge diagnosen kreft i kolon eller rektum/anus. Bedre operasjonsteknikker og adjuvant behandling i form av kjemoterapi og strålebehandling har gitt færre residiv og betydelig bedre prognose. Men pasienter responderer forskjellig på strålebehandlingen, og den kan gi alvorlige bivirkninger i form av mucositt, nerveskade og sekundær kreft. Derfor er det ønskelig å kunne forutsi hvilke pasienter som har nytte av strålebehandlingen. I denne studien har jeg sett på endringen av celleproliferasjonsmarkøren Ki67 i en pasientgruppe med kolorektalkreft hvor noen av pasientene hadde fått preoperativ stråling. Resultatene kan tyde på enkelte pasienter responderer veldig godt på stråling (med tanke på Ki67-ekspressjon), mens det hos andre er liten eller ingen endring. I denne oppgaven har jeg ikke sett på overlevelsen til pasientgruppen, men det ville vært svært interessant om det er en sammenheng mellom sterk nedgang i Ki67-ekspressjon og overlevelse.

Denne oppgaven er en pilotstudie som en del av et større prosjekt under Jørn Kjæve (gastrokirurg ved UNN) og Vidar Isaksen (overlege ved patologisk avdeling ved UNN).

Introduksjon;

Kreft i kolon og rektum utgjorde samlet 15 % av alle nye krefttilfeller i 2005 og er nest etter prostatakreft hos menn og brystkreft hos kvinner den hyppigste kreftformen hos hvert kjønn i Norge [1]. Fra 1950 til 1990 var det en insidensøkning på 150% [2]. I forhold til andre nordiske land har den norske økningen vært påfallende, da det i våre naboland er en stabil eller fallende innsidens [2]. kolorektalkreft har høy forekomst i industrialiserte land som USA, Canada og Norden, men forekommer langt sjeldnere i land som India, Sør-Amerika og Afrika [3]. Den geografiske variasjonen skyldes trolig miljømessige faktorer som diett, BMI og fysisk aktivitet [4, 5]. Kolorektalkreft sees først og fremst hos eldre personer, mer enn 80% er 50 år eller mer ved diagnostidspunktet [1]. I 98% av tilfellene med kolorektalkreft dreier det seg om adenocarcinom.

Figur 1



Figur 1 er fra kreftregisterets årsrapport fra 2005 og viser insidens av ulike typer kreft i Norge fra 2001 til 2005.

Behandling av colorektal kreft;

Hovedbehandlingen ved kolorektal kreft er kirurgi, supplert med kjemoterapi, immunoterapi og/eller strålingsterapi. På 1990-tallet ble det vanlig å utføre en såkalt total mesorektal eksisjon (TME) hvor man fjerner rectum samt nærliggende fett og lymfatisk vev. Dette har gitt en betydelig tilbakegang av lokale reisddiv, en nedgang fra ca. 20-30% til 10-15% [6]. Tradisjonelt har preoperativ strålebehandling vært forbeholdt pasienter med T4-svulster og svulster som truer å vokse inn i mesorektale fascie [7].

Preop vs postop stråle/kjemoterapi

Det er varierende tradisjon for bruk av preoperativ og postop adjuvant behandling. Det er blant annet mer vanlig å bruke preoperativ radiokjemoterapi i Europa enn i USA [8].

Det er godt dokumentert at preoperativ stråling ved rektalcancer bedrer muligheten for radikal operasjon hos pasienter som har primærtumor som i utgangspunktet er inoperabel [9, 10], og flere studier har vist at preoperativ strålingsterapi er å foretrekke fremfor postoperativ[11, 12]. Men det er samtidig en individuell variasjon i strålingrespons. Da strålingsterapi kan gi alvorlige bivirkninger (i form av sekundær kreft, mucositt, nerveskade), er det ønskelig å kunne forutsi hvilke pasienter som vil ha mest nytte av strålingsterapi.

Generelt om strålingens konsekvenser

Ved alle typer ioniserende stråling kan elektroner slås løs fra atomer og molekyler, og dette kan evt. føre til en endring av cellen og dens genprodukt. Strålingen kan skade DNA direkte (direct target theory) eller via dannelsen reaktive produkter (f.eks. frie radikaler) som så indirekte endrer DNA (indirect target theory).

Celler som deler seg raskt, slik som beinmarg, lymfatisk vev og mucosa i GI-tractus, er mer følsom for stråling enn celler med lav mitosefrekvens. Cancerceller har ofte en høy

mitosefrekvens. Dessuten har normale celler generelt en raskere og bedre evne til DNA-reparasjon enn tumorceller, og dette kan man utnytte ved å gi strålingen i flere doser m/ bestemte intervaller. Slik vil ikke tumorcellene få tid til å ”komme seg” etter forrige stråledose, med andre ord; tumorcellene vil kumulativt få mer stråleskade enn de raskt helende normale celler.

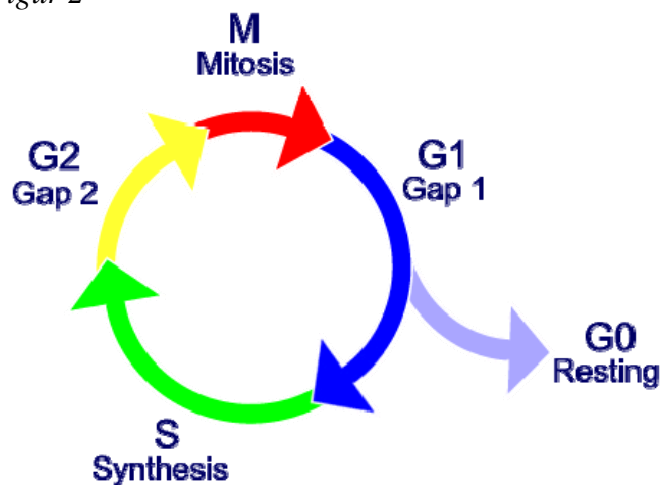
TP53 – the guardian of the genome

TP53 er et tumor suppressor gen som svært ofte er mutert ved kreft. Anoksi, unormal gen-ekspresjon og DNA-skade (f.eks som følge av stråling) er alle ulike typer stress som kan aktivere TP53. Den primære TP53-responsen innebærer oppregulering av gener som stopper cellesyklus i G1-fasen (blant annet p21), så vel som gener som er involvert i DNA-reparasjon (GADD45). P21-genet koder for en cyklin-avhengig kinase inhibitor, som er en viktig regulator i cellesyklus. Cellen får en ”pause” hvor den får anledning til å reparere sine skader. Hvis reparasjonen er vellykket, vil TP53 oppheve cellesyklus-blokkeringen og tillate videre mitose. Hvis derimot skadene ikke lar seg reparere, vil TP53 aktivere gener og kaspase-enzymmer som vil føre cellen inn i apoptose. TP53 har altså både en antiproliferativ effekt på cellers livsyklus og har i tillegg viktige funksjoner ved regulering av apoptose. Funksjonen til TP53 er tapt i 70–80 % av kolorektale cancere [13].

Litt om ki67

Ki67-antigenet ble oppdaget ved universitetet i Kiel da de injiserte mus med cellekjerner fra Hodgkins lymfom. Det ble oppdaget antistoffer mot et kjerneelement i brønn nr.67 og derav navnet. Antigenet viste seg å være et protein. Idag er hele dets aminosyresekvens kjent, men fremdeles er funksjonen til Ki67-proteinet i stor grad ukjent. Det man vet om antigenet er at det uttrykkes i cellekjernen i proliferative celler. Detaljerte cellesyklus-analyser viste at antigenet uttrykkes i G1, S, G2 og mitosefasen (se figur 2), men var helt fraværende i hvilende celler i G0-fasen [14]. Ved å tilsette et antistoff og farging som binder til ki67, får man et bilde av antall celler som er i delingsfasen (proliferativ fraksjon), og antigenet fungerer slik som en proliferasjonsmarkør [15].

Figur 2

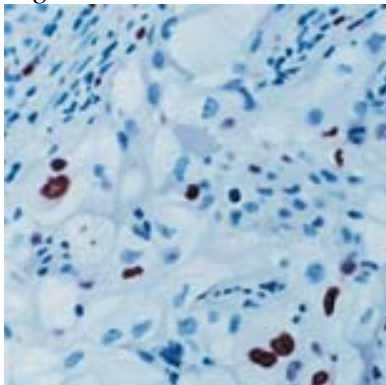


Ki67 har vist seg å være tilstede i alle prolifererende celler, både i normalt vev og i tumorvev, og dette taler for at proteinet spiller en svært nødvendig rolle i celledelingen. Likevel har funksjonen til proteinet vist seg å være vanskelig å avsløre.

Begrepet proliferasjonsmarkør og proliferasjonsrate

Begrepet proliferasjonsmarkør og proliferasjonsrate trenger kanskje diskuteres. Hensikten med en proliferasjonsmarkør er å vise hvilke celler som er i delingsfase og slik få et estimat for proliferasjonsraten til et vev, i dette tilfellet tumorvev. Proliferasjonsraten er et produkt av andel celler i celledeling (markert av proliferasjonsmarkør) og tiden det tar å fullføre celledeling. Men den intermitotiske fasen kan variere i tid, spesielt under suboptimale forhold in vitro og i tumorvev hvor cellene kan være svært heterogene [14]. Studier har også vist at celler som stanses i selve celledelingsfasen, enten ved hjelp av medisiner eller oppregulering av tumor-supressorgenene P21 og TP53, fortsetter å uttrykke Ki-67 [16]. På bakgrunn av denne studien advarer man mot å legge vekt på Ki-67-ekspresjon i cellepopulasjoner som har høy ekspresjon av TP53 og P21. Med andre ord; andelen Ki-67-positive celler vil ikke alltid samsvare med vevets sanne proliferasjonsrate, men som oftest er det en nær sammenheng mellom disse parameterne [14, 15].

Figur 3



Ki67 er i dag et viktig verktøy i patologi og forskning. I mange typer kreft, brystkreft, maligne lymfomer og astrocytomer, har en høy proliferasjonsrate i form av høy ekspresjon av Ki67 vist seg å være en dårlig prognostisk faktor [17-20]

Lungecarcinom farget med anti-Ki67-antigen (figur 3)

(Eksempelbilde fra Dako`s hjemmeside, <http://www.dako.com>)

Metode/arbeidsform;

Pasientmaterialet var opprinnelig 50 pasienter fra Universitetssykehuset i Nord-Norge som fortløpende fikk diagnosen kolorektal cancer. Flere av operasjonspreparatene var ikke flyttet til sykehusets arkiv da denne oppgaven skulle ferdigstilles, og kunne derfor ikke inkluderes. Én av pasientene hadde ikke cancer, men et adenom. Det endelige antall pasienter med komplett forskningsmateriale ble til slutt 23. Diagnosen var bekreftet med biopsi. Samtlige pasienter ble operert, 12 av disse hadde fått preoperativ stråling og kjemoterapi. Gruppen som ikke fikk stråling eller kjemoterapi, fikk heller ingen annen preoperativ behandling. TNM-klassifiseringen er basert på MR-bilder før operasjon. Gruppen som fikk preoperativ stråling ble TNM-klassifisert på ny etter strålebehandling (se tabell 2). Responsen ble vurdert som dårlig, middels eller god utifra TNM-staging og redusering av tumors størrelse. Denne vurderingen ble gjort av en erfaren gastrokirurg

Tabell 1- pasientdata

	Antall
Totalt antall	23 (100%)
Kjønn	
Mann	17 (75%)
Kvinne	6 (25%)
Alder (år)	
Gjennomsnitt	68,8
Spredning	50-84
TNM-klassifisering ikkestråle/strålegruppe	
T1	1/0
T2	2/0
T3	7/4
T4	1/8
Tid mellom biopsi og operasjon (dager)	
Gjennomsnitt	76,5
Spredning	8-166
Preop. Stråling	12 (52,2%)
Ikke preop. Stråling	11 (47,8%)

Tabell 2 - Strålegruppens respons på stråling – basert på MR

Pasientnummer	Staging før stråling / diameter tumor	Staging etter stråling / diameter tumor	Respons
1	T4N2M0 / 6cm	T3N1M0 / 3 cm	Dårlig
2	T4N1M0 / 10 cm	T4N1M0 / 6 cm	Dårlig
3	T3N1M0 / 6 cm	T3N1M0 / 6 cm	Dårlig
4	T4N0M0 / 5 cm	T4N0M0 / 2 cm	Middels
5	T4N0M1 / 7 cm	T3N0M1 / 5 cm	Middels
6	T4N1M0 / ?	T3N0M0 / 3 cm	Middels
7	T4N1M0 / 6 cm	T3N0M0 / 4 cm	Middels
8	T4N2M1 / 6 cm	T3N2M1 / 3 cm	Middels
9	T3N2M0 / 5 cm	T3N2M0 / 3 cm	Middels
10	T4 N1M0 / 6 cm	T3N0M0 / 3 cm	God
11	T3N1M0 / 5 cm	T2N0M0 / 3 cm	God
12	T3N1M0 / 6 cm	T2N1M0 / 1 cm	God

Multiblokk (tissue microarray)

En multiblokk er en vanlig parafinblokk som inneholder flere forskjellige vevsprøver, gjerne fra forskjellige pasienter. Dette gjør at man enkelt og raskt kan sammenligne de ulike vevsprøvene med forskjellige fargemetoder.

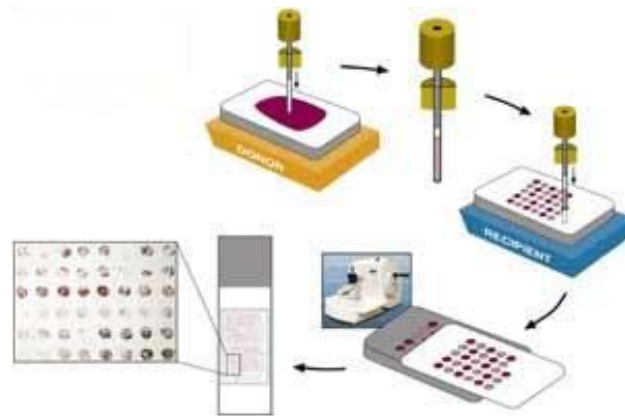
Figur 4



Multiblokkene ble laget med dette apparatet

Først studerte jeg de originale hematoxylinfargede parafinsnittene av operasjonsresektatene sammen med min veileder. Vi markerte området med tumorvev som vi skulle bruke til multiblokken. Deretter fant jeg de tilhørende parafinblokkene i sykehusets arkiv. Jeg brukte en stansenål for å ta ut små sylindere med vevsmateriale (1mm i diameter) fra de aktuelle områdene på parafinblokkene og plasserte vevssylindrene i en ny tom parafinblokk

Figur 5



Figur 5 viser fremgangsmåten ved tissue microarray

(Bildet hentet fra <http://www.microarraystation.com>)

Fordeler og ulemper med multiblokk

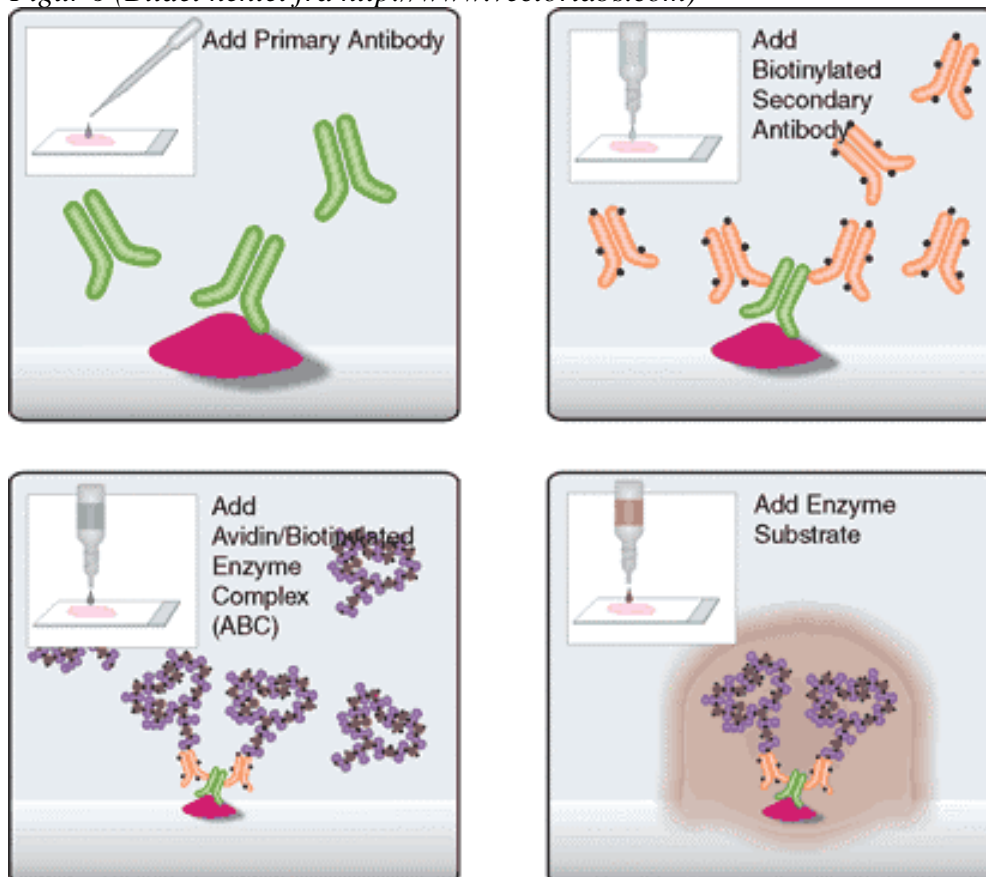
Bruk av multiblokk gjør arbeidet mye enklere og økonomisk; man trenger bare et snitt for å studere forskjellen mellom flere vevsprøver, og blokken kan enkelt farges med andre fargemetoder. Men multiblokk er samtidig en ekstra kilde til usikkerhet. Et riktig resultat er avhengig av at man stanser ut en representativ del av tumoren. Ved svært heterogene svulster kan dette være et problem og multiblokk vil være lite egnet [21].

Immunohistokjemisk farging med Ki67 og kvantifisering av Ki67-positive celler

Ved immunohistokjemi bruker man antistoffer rettet mot spesifikke anitgener i vev. Et antistoff vil binde seg til det tilsvarende antigen, og ved hjelp av ulike metoder kan man få visualisert hvor slik binding har tatt sted. ABC-metoden (avidin-biotin complex) er den mest brukte (se figur 6).

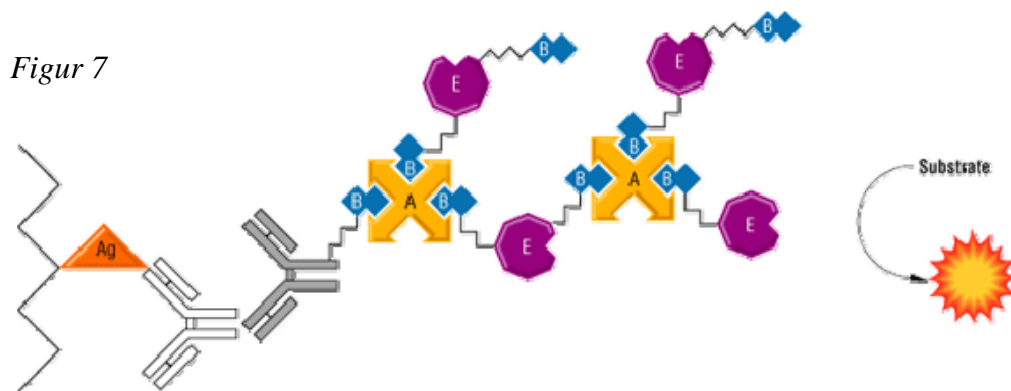
1. Først tilsettes et antistoff rettet mot det aktuelle antigenet (primært antistoff)
2. Så tilsetter man et sekundært antistoff som vil binde seg til det primære antistoffet.
Det sekundære antistoffet har bundet biotin.
3. Så tilsettes et kompleks av streptavidin og enzymet peroxydase. Streptavidin sørger for at komplekset binder seg sterkt til biotin på det sekundære antistoffet.
4. Til slutt tilsetter man et substrat for enzymet som nå er bundet til indirekte til det aktuelle antigenet.

Figur 6 (Bildet hentet fra <http://www.vectorlabs.com>)



Manuell immunohistokjemisk farging

Jeg gjorde først en manuell farging av multiblokken for å få en bedre forståelse av prosessen; Det ble skåret 4µm tykke snitt av samtlige biopsier og multiblokken på en vannfalls-mikrotom (microm). Snittene ble så deparafinisert i xylene, plassert i spritbad og deretter skylt i destillert vann. Avmaskering av antigene ble gjort ved å plassere snittene i en Tris/EDTA-buffer (10mM Tris, 1mM EDTA) som ble kokt i en mikrobølgeovn (600W) i 15 minutter. Snittene ble påført peroxidase block fra Dako Kit og inkubert i 5 minutter for å blokkere endogen peroxidase. Det ble så påført Ki67-antistoff (mus anti-human Ki67, clone MIB-1, nr M7240 fra Dako) fortynnet med Antibody Diluent (S0809 fra Dako) til en konsentrasjon 1/200. Denne fortynningen er i samsvar med produsentens anbefalinger. Deretter ble snittene påført sekundærantistoff; labelled polymer-HRP anti-mouse fra Dako. Snittene ble så farget med DAB+substrate-chromogen og hematoxylin.



(Figur 7 - En annen grafisk framstilling av ABC-metoden, fra <http://www.piercenet.com>)

Den endelige fargingene av snittene ble gjort på Patologisk avdeling ved UNN med avdelingens automatiserte immunohistokjemiske fargemaskin, Vintana Benchmark XT. Snittene ble fotografert ved hjelp av et vanlig lysmikroskop på 40x forstørrelse (sirkulært

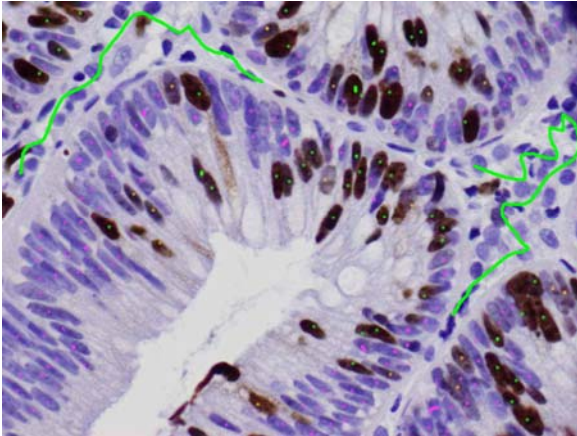
utsnitt med diameter 0,55mm) med et DP71 Olympus kamera. Det ble tatt 3 bilder fra hver biopsi/operasjonsresektat (sylinder på multiblokk), alle fra områder med tilsynelatende stor celledelings-aktivitet.

Cellene ble klassifisert som positive, negative eller svakt positive. Den proliferative fraksjon/index definerte jeg som antall tumorceller i delingsfasen i forhold til alle tumorcellene, slik at alle resultatene kunne uttrykkes som en prosent. Deretter regnet jeg ut gjennomsnittlig endring i proliferativ index for hver enkel pasient. For å sammenligne gruppen som fikk stråling og gruppen som ikke fikk stråling brukte jeg en to-utvalgs t-test og Mann-Whitney-test. De statistiske analysene ble gjort med dataprogrammet SPSS.

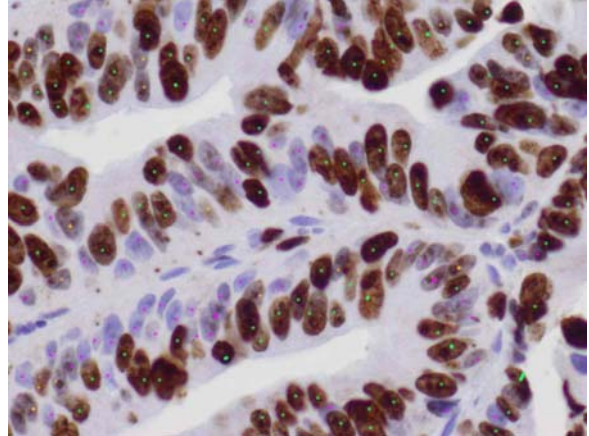
Til de statistiske analysene ble de svakt positive cellene inkludert i den positive gruppen. Noen av bildene var vanskelig å kvantifisere (se eksempelbilder). Ved kvantifiseringen av den proliferative fraksjonen var det ikke klart hvilke pasienter som hadde fått preoperativ stråling.

Eksempelbilder

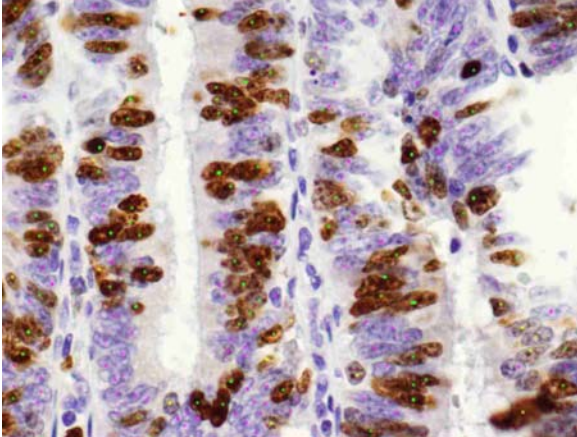
Bilde 1



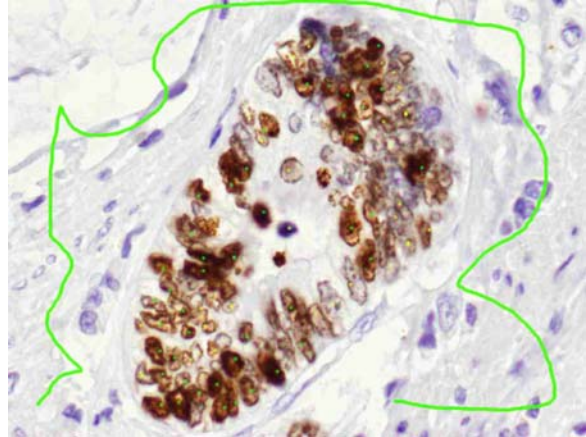
Bilde 2



Bilde 3



Bilde 4

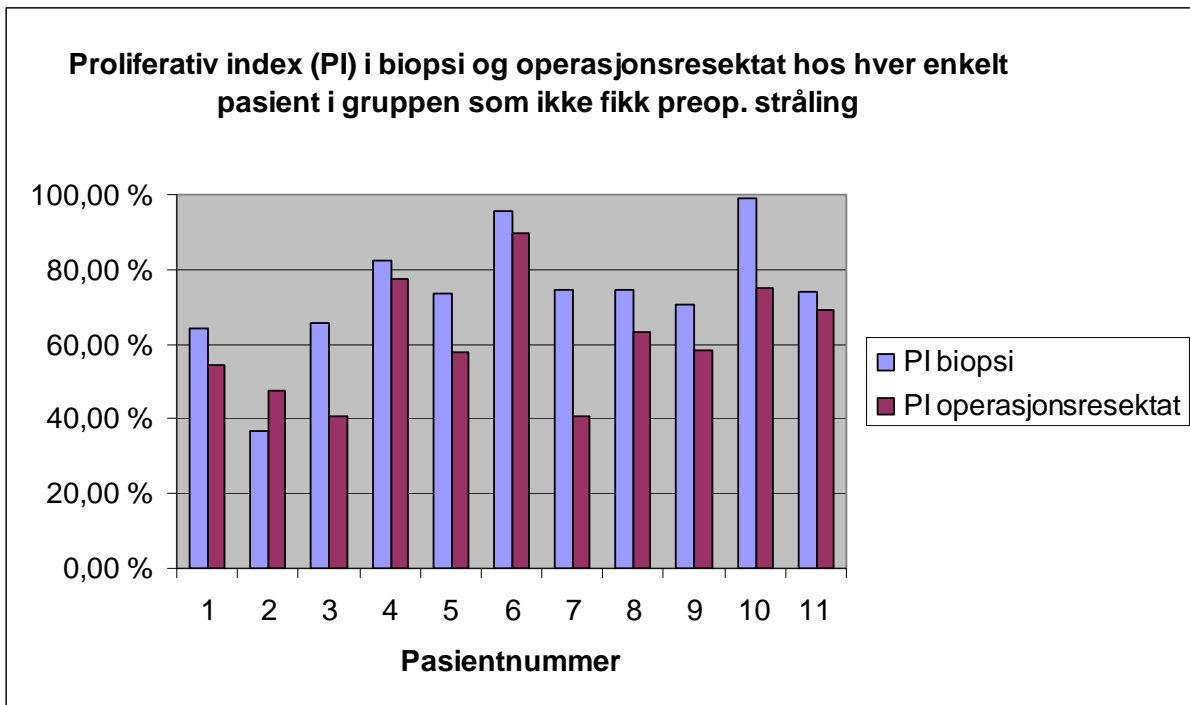


Bilde 1 og 2; eksempler på bilder hvor det var enkelt å kvantifisere den proliferative fraksjonen. Cellekjernene som er farget mørkt brune er positive for Ki67-antigenet og har fått en grønn prikk. Cellekjernene som er svakt positive har fått en gul prikk og de negative har fått en rosa prikk. Det skraverte området er ikke tumor.

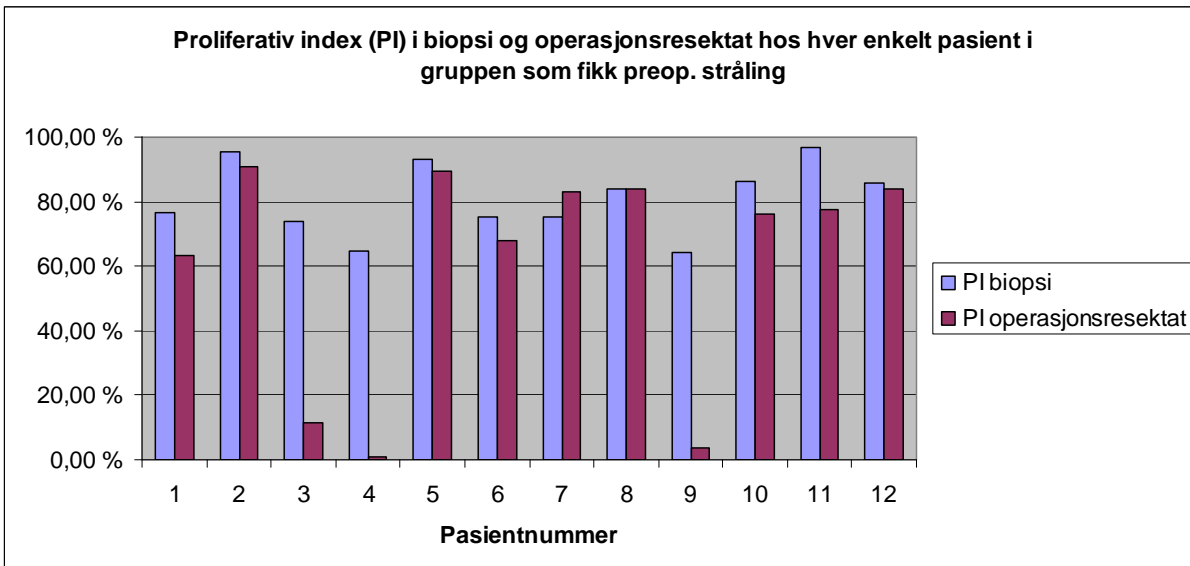
Bilde 3 og 4; stor variasjon i farging av cellekjernene og mange tettsittende kjerner gjør det vanskelig å avgjøre både hvilke celler som skal regnes som positive og antall celler.

Resultater

Figur 8



Figur 9

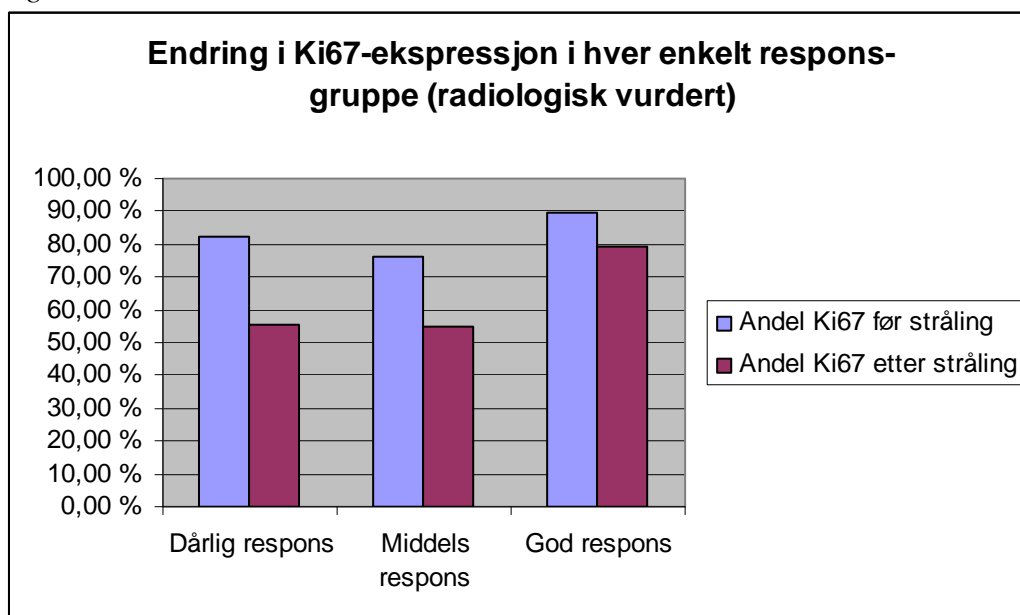


Figur 8 og 9 viser proliferativ index (PI) i biopsi og tilhørende operasjonsresektat hos hver enkelt pasient. Den lyseblå søylen viser PI i biopsi, altså før stråling. Den lilla søylen viser PI i operasjonsresektatet, altså etter stråling. Legg merke til pasient nummer 3, 4 og 9 i

strålegruppen, som alle har hatt en stor nedgang i andel Ki67-positive celler.

I figur 10 har jeg slått strålepatientene sammen i 3 forskjellige grupper, basert på radiologisk vurdering av tilbakegang av tumor (se tabell 2), og sammenlignet den gjennomsnittlige Ki67-ekspressjon før og etter stråling. Antall observasjoner i hver gruppe er for få til å kjøre en statistisk analyse, men utifra tabellen kan det virke som om pasientene som har stor nedgang i Ki67-ekspressjon har respondert dårlig (radiologisk vurdert) og vice versa. Dette er i så fall interessant.

Figur 10

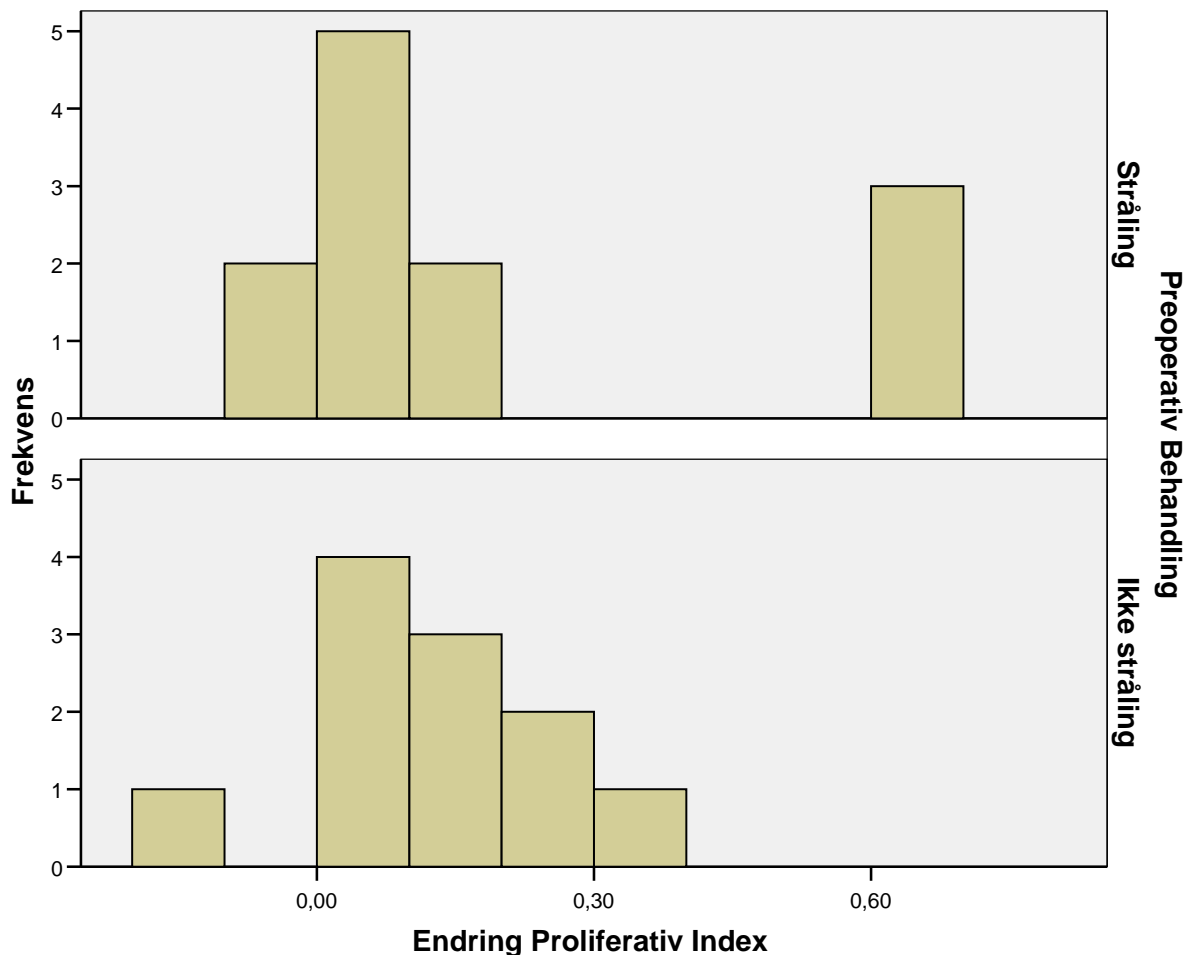


Tabell 3 – gruppedata fra SPSS

Preoperativ behandling	N	Gjennomsnitt PI biopsi	Gjennomsnitt PI operasjonsresektat	Gjennomsnittlig endring	Standardavvik
Ikke stråling (Gr.1)	11	73,8 %	61,3 %	12,5 %	0,12
Stråling (Gr.2)	12	80,9 %	61,0 %	19,9 %	0,26

Pasientgruppen som ikke fikk stråling (gruppe 1) har en gjennomsnittlig nedgang i proliferativ index på 0,125 (12,5 %), med et standardavvik på 0,12. Gruppen som fikk stråling (gruppe 2) har en gjennomsnittlig nedgang på 0,199 (19,9%) med et standardavvik på 0,26. Som vi ser er det en større spredning i gruppe 2.

Figur 11



Figur 11 viser fordelingen av resultatene i de to gruppene, altså differansen mellom proliferativ index før og etter stråling.

Jeg gjorde først en to-utvalgs t-test for å se om det var en signifikant forskjell i endring proliferativ index mellom gruppe 1 og gruppe 2 (tabell 4). P-verdien er 0,404, altså godt over 0,05, så vi kan ikke si at det er en signifikant forskjell mellom de to gruppene. Da fordelingen av observasjonene kan antyde at data ikke er normalfordelt og antall observasjoner er relativt få, gjorde jeg i tillegg en Mann-Whitney-test. Testen bekreftet at det var ingen signifikant forskjell mellom gruppe 1 og gruppe 2 (tabell 5 og 6). Figur 12 viser 95% konfidens-intervall for de to gruppene. Deretter gjorde jeg en ett-utvalgs t-test for hver av gruppene, for å se om det har vært en signifikant endring i hver enkelt gruppe (egentlig kan man utifra figur 12 se at det har vært en signifikant endring i begge gruppene). Testene (tabell 7 og 8) viser at gruppe 1 (ikke-stråling) har en signifikant endring i proliferativ index med p-verdi 0,07. Gruppe 2 (stråling) har og en signifikant endring i proliferativ index med p-verdi 0,024.

Tabell 4 – T-test utført i SPSS (to utvalgs t-test mellom de to gruppene)

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Endring Proliferativ Index	Equal variances assumed	6,271	,021	-,852	21	,404	-,07432	,08725	-,25577	,10714
	Equal variances not assumed			-,877	15,749	,394	-,07432	,08471	-,25413	,10549

Tabell 5 & 6 – Mann-Whitney-test utført i SPSS

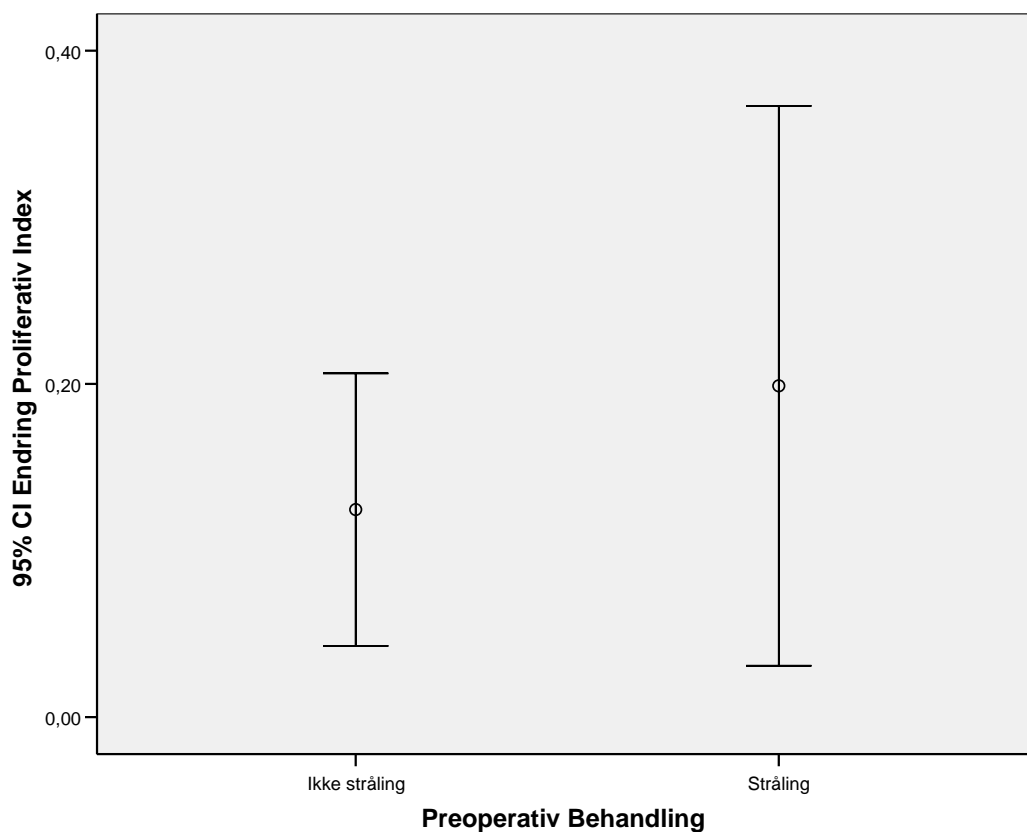
	PreoperativBehandling	N	Mean Rank	Sum of Ranks
EndringProliferativIndex	Ikke stråling	11	12,36	136,00
	Stråling	12	11,67	140,00
	Total	23		

	EndringProliferativIndex
Mann-Whitney U	62,000
Wilcoxon W	140,000
Z	-,246
Asymp. Sig. (2-tailed)	,806
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,833(a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: Preoperativ Behandling

Figur 12 – 95% konfidensintervall for de to gruppene



Tabell 7 - Ett-utvalgs t-test av gruppen som ikke fikk stråling

	Test Value = 0					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
VAR00001	3,392	10	,007	,12453	,0427	,2063

Tabell 8 – Ett-utvalgs t-test av gruppen som fikk stråling

	Test Value = 0					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
VAR00001	2,605	11	,024	,19885	,0308	,3669

Diskusjon

Det er tidligere gjort flere studier rundt temaet Ki67-ekspressjon og kolorektalkreft. Ved enkelte typer kreft er Ki67 blitt et viktig prognostisk verktøy [17-20], men det har vært sprikende resultater når man har undersøkt Ki67 som prognostisk faktor for kolorektalkreft. Flere studier har vist en tilsynelatende paradoksal sammenheng mellom Ki67-ekspressjon og overlevelse, i.e. de pasientene med høyest andel Ki67-positive celler hadde best prognose [22-24] Andre studier har vist en sammenheng mellom høy proliferasjonsrate og dårlig prognose [25]. Flere forklaringer på de sprikende resultatene har vært foreslått; preoperative prosedyrer som tømning og rensing av kolon kan øke celleproliferasjonen [26]. Et annet forslag har vært tumorenes heterogenitet og ulik prøvetaking i studiene [22]

Man må heller ikke glemme begrensningene til en proliferasjonsmarkør som Ki67. Som tidligere nevnt, er den sanne proliferasjonsraten til et vev et produkt av andelen celler i celledeling og den gjennomsnittlige tiden det tar å fullføre en celledeling, og sistnevnte kan sannsynligvis variere sterkt i forskjellige tumorer. Og i tumorer med høy ekspressjon av TP53 og P21 er det sannsynligvis en høy andel ”falsk positive” Ki67-celler [16].

Dette er bare en 5-årsoppgave med begrenset klinisk nytteverdig, men det er interessant å dra inn andre større studier rundt temaet i diskusjonen. Man kan likevel gjøre seg noen betraktninger om resultatene fra denne studien;

Det er en signifikant forskjell i proliferativ index mellom biopsi og operasjonsresektat både i gruppe 1 og gruppe 2. I utgangspunktet er det nærliggende å tro at en nedgang i PI i gruppe 2 skyldes stråle- og kjemoterapi, men jeg har ingen forklaring på nedgangen i gruppe 1. Gruppe

I har ikke fått noen behandling før operasjon, og det burde ideelt sett ikke være noen endring i Ki67-ekspresjon mellom biopsi og operasjonsresektat. Kanskje ligger forklaringen i bruken av multiblokk på operasjonspreparatene; mengden vev er mindre i multiblokken enn i biopsien, og da jeg har valgt ut områdene med tilsynelatende høyest celledelingsaktivitet er det naturligvis færre ”høyaktive” områder å velge blant i multiblokken. Man kunne tenke seg at tiden mellom operasjon og fiksering av tumor har påvirket andel Ki67-positive celler, da denne er forskjellig fra biopsi og operasjonsresektat. Men dette blir bare spekulasjoner da jeg ikke har funnet noen studier som viser noe slikt. Dette medfører at man må sette spørsmålsteget ved validiteten av disse resultatene.

Sammenligner man de to gruppene som helhet er det ingen signifikant forskjell. Men ser man på de individuelle endringene i gruppen med strålebehandling, ser man at enkelte pasienter har respondert svært godt på strålebehandlingen med hensyn til Ki67-ekspresjon, mens det hos andre er liten eller ingen endring. Dette kan tyde på at noen tumorer har vært mer mottagelig for strålingsterapi enn andre, og det ville vært interessant å undersøke om disse pasientene har en annen overlevelsesrate enn pasientene uten betydelig endring. Det neste steget ville da vært å utvikle en metode for å forhåndsplukke de pasientene som vil respondere bra på stråling.

Referanser

1. Krefregisteret, *Årsrapport*. 2005.
2. F, L., *Cancer of the rectum: epidemiology, improvement in survival and the role of a national cancer registry*. Berlin: Springer-Verlag, 1997: 3-16.
3. *Stat bite: Incidence of selected cancers in the developed and developing world*. J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(22): p. 1652.
4. Correa Lima, M.P. and M.H. Gomes-da-Silva, *Colorectal cancer: lifestyle and dietary factors*. Nutr Hosp, 2005. **20**(4): p. 235-41.
5. Heavey, P.M., D. McKenna, and I.R. Rowland, *Colorectal cancer and the relationship between genes and the environment*. Nutr Cancer, 2004. **48**(2): p. 124-41.
6. Wibe, A., et al., *Prognostic significance of the circumferential resection margin following total mesorectal excision for rectal cancer*. Br J Surg, 2002. **89**(3): p. 327-34.
7. Olav Dahl, N.N.G.C.G., *Adjuvant behandling ved operabel kolorektalcancer*.
8. Chau, I., S. Chan, and D. Cunningham, *Overview of preoperative and postoperative therapy for colorectal cancer: the European and United States perspectives*. Clin Colorectal Cancer, 2003. **3**(1): p. 19-33.
9. Mella, O., et al., *Radiotherapy and resection for apparently inoperable rectal adenocarcinoma*. Dis Colon Rectum, 1984. **27**(10): p. 663-8.
10. Frykholm, G., B. Glimelius, and L. Pahlman, *Preoperative irradiation with and without chemotherapy (MFL) in the treatment of primarily non-resectable adenocarcinoma of the rectum. Results from two consecutive studies*. Eur J Cancer Clin Oncol, 1989. **25**(11): p. 1535-41.
11. Cambray i Amenos, M., et al., *Preoperative radio-chemotherapy (RT-CT) in rectal cancer. Prospective study with postoperative RT-CT control group*. Clin Transl Oncol, 2007. **9**(3): p. 183-91.
12. Maschuw, K., et al., *Short-term preoperative radiotherapy in rectal cancer patients leads to a reduction of the detectable number of lymph nodes in resection specimens*. Langenbecks Arch Surg, 2006. **391**(4): p. 364-8.
13. Kumar, C., Robbins, *Robbins Basic Pathology*. (7th).
14. Scholzen, T. and J. Gerdes, *The Ki-67 protein: from the known and the unknown*. J Cell Physiol, 2000. **182**(3): p. 311-22.
15. Isola, J.J., et al., *Evaluation of cell proliferation in breast carcinoma. Comparison of Ki-67 immunohistochemical study, DNA flow cytometric analysis, and mitotic count*. Cancer, 1990. **65**(5): p. 1180-4.
16. van Oijen, M.G., et al., *Positivity of the proliferation marker Ki-67 in noncycling cells*. Am J Clin Pathol, 1998. **110**(1): p. 24-31.
17. Kirla, R., et al., *Prognostic value of the expression of tumor suppressor genes p53, p21, p16 and prb, and Ki-67 labelling in high grade astrocytomas treated with radiotherapy*. J Neurooncol, 2000. **46**(1): p. 71-80.
18. Pollack, A., et al., *Ki-67 staining is a strong predictor of distant metastasis and mortality for men with prostate cancer treated with radiotherapy plus androgen deprivation: Radiation Therapy Oncology Group Trial 92-02*. J Clin Oncol, 2004. **22**(11): p. 2133-40.
19. Tisell, L.E., et al., *The Ki67 index a prognostic marker in medullary thyroid carcinoma*. Br J Cancer, 2003. **89**(11): p. 2093-7.

20. Torp, S.H., *Diagnostic and prognostic role of Ki67 immunostaining in human astrocytomas using four different antibodies*. Clin Neuropathol, 2002. **21**(6): p. 252-7.
21. Linderoth, J., et al., *Tissue microarray is inappropriate for analysis of BCL6 expression in diffuse large B-cell lymphoma*. Eur J Haematol, 2007. **79**(2): p. 146-9.
22. Palmqvist, R., et al., *Low tumour cell proliferation at the invasive margin is associated with a poor prognosis in Dukes' stage B colorectal cancers*. Br J Cancer, 1999. **79**(3-4): p. 577-81.
23. Willett, C.G., et al., *Tumor proliferation in rectal cancer following preoperative irradiation*. J Clin Oncol, 1995. **13**(6): p. 1417-24.
24. Salminen, E., et al., *Increased proliferation activity measured by immunoreactive Ki67 is associated with survival improvement in rectal/recto sigmoid cancer*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(21): p. 3245-9.
25. Kimura, T., et al., *Clinical significance of MUC1 and E-cadherin expression, cellular proliferation, and angiogenesis at the deepest invasive portion of colorectal cancer*. Int J Oncol, 2000. **16**(1): p. 55-64.
26. Lehy T, A.J., Mignon M. . , *Influence de la preparathion rectale par lavement sur la proliferation cellulaire dans la muceuse rectale normale de l'homme*. Gastroenterol Clin Biol, 1984. **8**: p. 216-221.