



**Uio • Universitetet i Oslo**

# **Kliniske data og immunhistokjemiske analyser på 30 pasienter med peritonealt mesoteliom**

Prosjektoppgave ved Det medisinske fakultet

Universitetet i Oslo

Skrevet av: Charlotte Hummel

Hovedveileder: Annette Torgunrud, PhD

Biveiledere: Olaf Sørensen, MD PhD

Ben Davidson, MD professor

Kjersti Flatmark, MD professor

Dato: 27.01.2022

# Abstract

**Background:** Peritoneal mesothelioma is a rare disease that originates from mesothelial cells lining the abdominal cavity. Peritoneal mesothelioma is divided into three subtypes; malignant peritoneal mesothelioma (MPM), benign multicystic peritoneal mesothelioma (BMPM) and well differentiated papillary mesothelial tumor (HDPMT). MPM has a poor prognosis with few treatment options. Cytoreductive surgery (CRS) and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) is first-line treatment for all subtypes. Second-line treatment for MPM is systemic chemotherapy, but the response is often poor. The aim of this project thesis is to contribute to increased knowledge based on clinical data and immunohistochemistry (IHC) to hopefully find better treatment strategies for this rare disease in the future.

**Patients and methods:** This study includes 30 patients diagnosed with peritoneal mesothelioma and referred to CRS-HIPEC at the Norwegian Radium Hospital in the time period 2009-2021. All subtypes were included; MPM (n=20), BMPM (n=6) and HDPMT (n=4). IHC analyses were performed using five antibodies: calretinin, epithelial membrane antigen (EMA), desmin, BRCA-associated protein 1 (BAP1) and methylthioadenosine phosphorylase (MTAP).

**Results:** In this study 25 patients received CRS-HIPEC. Five MPM (45%) and two (33%) BMPM had recurrent disease after complete cytoreductive surgery. Median disease free survival for MPM was 14 months (95% CI 8-19). After CRS-HIPEC, estimated 5-year survival was 51% for MPM. Median overall survival for MPM including the inoperable patients was 45 months (95% CI 24-66). HDPMT had no recurrences or deaths, one BMPM most likely died of another cause. Four patients received immunotherapy, two started the treatment recently and two have shown remarkable response. In this study 18 patients (60%) had loss of BAP1 (15 MPM (75%), 2 BMPM (33%) and 1 HDPMT (25%)) and 7 patients (23%) had partial loss of MTAP (5 MPM (25%), 1 BMPM (17%) and 1 HDPMT (25%).

**Discussion and conclusion:** Despite a small cohort and some non-significant statistical analysis, most results were comparable to larger studies. The unique findings of this study were the effect of immunotherapy in two patients and the MTAP results. The effect of immunotherapy raises the question whether this could be a new treatment option for MPM, but more research is required. IHC with MTAP also needs more research and we have already started analyzing a larger cohort of mesotheliomas with MTAP.

## Takk til...

Først og fremst vil jeg rette en stor takk til min hovedveileder, Annette Torgunrud, som gjennom hele prosjektet har gitt meg god veiledning, støtte og motivasjon. Jeg er svært takknemlig å ha fått en så tålmodig og flink veileder som har vært tilgjengelig gjennom hele perioden, holdt ut med flere utsatte tidsfrister, brukt mye tid på gjennomlesing og virkelig har satt seg ned for å forklare og diskutere ulike deler av oppgaven. I tillegg har hun inkludert meg i miljøet på tumorbiologisk avdeling og gitt meg et godt innblikk i hva kreftforskning innebærer. Takk for at jeg har fått delta på gruppemøter, seminarer og tverrfaglig dag, det har vært utrolig spennende og lærerikt!

Jeg vil også takke min bi-veileder, Olaf Sørensen, som i sin travle hverdag har tatt seg god tid til å hjelpe meg med de kliniske dataene i DIPS og grundig forklare og lese igjennom de kliniske delene av oppgaven. I tillegg satt jeg stor pris på at jeg fikk være med på operasjonssalen, der han viste og forklarte behandlingen med CRS-HIPEC.

I tillegg vil jeg takke Ben Davidson for å ha vært en motiverende bi-veileder som har hjulpet meg med all immunhistokjemien i denne oppgaven. Han tok seg tid til å gjennomgå og vise meg alle resultatene i mikroskopet, noe som gjorde at jeg fikk en mye bedre forståelse for immunhistokjemien. Takk for all hjelp med tolkning og diskusjon av resultatene, bilder av snittene og gjennomlesing av oppgaven.

En stor takk rettes også til Arild Holth som har stått for den immunhistokjemiske fargingen og vist meg denne protokollen en hel dag på laben.

Jeg vil også takke sekretærene på avdeling for gastrokirurgi som har hjulpet til med innhenting av journaler fra andre sykehus.

Sist, men ikke minst, vil jeg takke Kjersti Flatmark for at jeg fikk skrive denne oppgaven og for å ha inkludert meg i forskningsgruppen. I tillegg har hun tatt seg god tid til å svare på spørsmål og hjulpet meg med de kliniske dataene.

# 1. Innholdsfortegnelse

<b>1</b>	<b>Introduksjon .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Peritonealt mesoteliom .....</b>	<b>2</b>
1.1.1	Symptomer .....	2
1.1.2	Diagnostikk.....	2
1.1.3	Behandling.....	4
1.1.4	Prognose.....	7
1.2	Immunhistokjemi .....	7
1.2.1	Biomarkører .....	8
1.3	Målet med prosjektoppgaven.....	9
<b>2</b>	<b>Pasienter og metode .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1</b>	<b>Pasientkohort.....</b>	<b>10</b>
2.1.1	Histologisk subtype.....	11
2.2	Parametere.....	11
2.2.1	PCI .....	12
2.2.2	CC-score .....	12
2.2.3	Accordion Severity Grading Scale .....	12
2.2.4	Residiv.....	13
2.2.5	Kontroller og oppfølging.....	13
2.3	Immunhistokjemi .....	13
2.3.1	Prøvemateriale .....	13
2.3.2	Fremgangsmåte.....	14
2.3.3	Forbehandling.....	14
2.3.4	Visualisering.....	15
2.3.5	Dehydrering og montering.....	17
2.3.6	Positiv og negativ kontroll.....	17
2.3.7	Tolkning.....	17
2.4	Statistiske analyser.....	17
<b>3</b>	<b>Resultater .....</b>	<b>18</b>
3.1	Sykdomsfri overlevelse .....	21
3.2	Total overlevelse.....	22
3.3	Immunterapi.....	23
3.4	Immunhistokjemi .....	24
<b>4</b>	<b>Diskusjon.....</b>	<b>28</b>



<b>5</b>	<b>Konklusjon</b> .....	<b>34</b>
<b>6</b>	<b>Referanseliste:</b> .....	<b>35</b>

**Figurer:**

Figur 1: Malignt peritonealt mesoteliom farget med ulike antistoffer immunhistokjemisk. ....	3
Figur 2: Histologi av de ulike subtypene av peritonealt mesoteliom. HE-fargede snitt. ....	4
Figur 3: Regioner og score til bruk ved utregning av Peritoneal Carcinomatosis Index (PCI)	5
Figur 4: Flytskjema over pasientkohorten og antall pasienter behandlet/ikke behandlet med CRS-HIPEC. ....	10
Figur 5: Inndeling etter histologisk diagnose .....	11
Figur 6: Skjematisk fremstilling av betydningen av antigendemaskering ("antigen retrieval"), etter tilsetning av antistoff. ....	15
Figur 7: Skjematisk fremstilling av DAKO Flex+ deteksjonsystem.....	16
Figur 8: Sykdomsfri overlevelse, etter behandling med CRS-HIPEC.....	21
Figur 9: Total overlevelse, fra CRS-HIPEC til død/sensur. ....	23
Figur 10: IHC-fargede snitt av benignt multicystisk peritonealt mesoteliom.....	26
Figur 11: IHC-fargede snitt av høyt differensiert papillær mesotelial tumor. ....	27
Figur 12: IHC-fargede snitt av malignt peritonealt mesoteliom (epitelioid type).....	27

**Tabeller:**

Tabell 1: Beskrivelse av de ulike gradene i Accordion Severity Classification .....	12
Tabell 2: Fremgangsmåte ved Dako Flex+ immunhistokjemi protokoll .....	14
Tabell 3: Informasjon om de primære antistoffene vi har brukt. ....	16
Tabell 4. Pasientkarakteristikk og kliniske parametere, inndelt etter histologisk diagnose.....	19
Tabell 5: CC-score og PCI .....	20
Tabell 6: Accordion og PCI .....	20
Tabell 7: Accordion og CC-score.....	20
Tabell 8: Individuelle resultater i immunhistokjemi inndelt etter biomarkørene.....	25
Tabell 9: De immunhistokjemiske resultatene for de ulike markørene inndelt etter histologisk diagnose.....	25

**Forkortelser:**

MPM = Malignt peritonealt mesoteliom

BMPM = Benigt multicystisk peritonealt mesoteliom

HDPMT = Høyt differensiert papillær mesotelial tumor

CRS = Cytoreductive surgery

HIPEC = Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy

IHC = Immunhistokjemi

MDT = Multidisiplinært team

PCI = Peritoneal Carcinomatosis Index

CC-score = Completeness of cytoreduction score

CEA = Carcinoembryonalt antigen

BerEP4 = Epithelial cell adhesion molecule/EPCAM

WT1 = Wilms tumor 1 protein

D2-40 = Podoplanin

CK5/6 = Cytokeratin 5/6

EMA = Epithelial membrane antigen

BAP1 = BRCA- associated protein 1

MTAP = Methylthioadenosine phosphorylase

DNR = Det norske radiumhospital

# 1 Introduksjon

Kreft er en sykdom som forårsakes av unormal vekst av celler gjennom økt celledeling eller nedsatt celledød, og kan oppstå i alle kroppens organer og vev. Dette skjer ved DNA-mutasjoner i gener som inngår i kontroll av cellesyklus. Forandringer i disse genene kan gi endret uttrykk av ulike proteiner som kan måles eller detekteres ved ulike metoder, som immunhistokjemi (IHC). Økt eller tapt uttrykk av proteiner kan derfor si noe om DNA-mutasjoner og kalles biomarkører. DNA forandringene kan være medfødte eller oppstå som følge av akkumulert DNA-skade forårsaket av ytre faktorer (kjemiske stoffer, stråling eller virus) eller pasientavhengige faktorer (aldersavhengige, genetiske og fysiologiske) (1). Denne oppgaven skal omhandle kreft i bukhinnen, nærmere bestemt peritonealt mesoteliom. Kreft i bukhinnen skyldes som oftest spredning av kreftceller fra andre organer i bukhulen, som tykktarm, blindtarm, ovarier, bukspyttkjertel og magesekk (2). I sjeldnere tilfeller kan kreft oppstå i bukhinnen, og denne kreftypen kalles peritonealt mesoteliom.

Mesoteliom er en tumor utgått fra mesotel, som er det celledaget som kler kroppens hulrom og utgjør pleura, peritoneum, pericard og tunica vaginalis (3). Malignt mesoteliom oppstår som oftest i pleura (70-90%) (3), sjeldnere i peritoneum (7-30%) (4) og meget sjelden i pericard og tunica vaginalis (5). Asbesteksponering er den vanligste årsaken til malignt pleuralt mesoteliom (ca. 80% av tilfellene) (6), mens det kun i 8% av tilfellene er observert en sammenheng mellom asbesteksponering og peritonealt mesoteliom (7). Det finnes flere histologiske subtyper av mesoteliom, både lavgradig maligne og maligne. Malignt peritonealt mesoteliom (MPM) er en aggressiv kreftform med dårlig prognose. De lavgradig maligne subtypene har en betydelig bedre prognose, men kan ha malign transformasjon og residivere (8, 9). Behandlingsalternativene er enten en kombinasjon av cytoreduktiv kirurgi (CRS) med fjernelse av all makroskopisk tumor og oppvarmet intraperitoneal cellegift (HIPEC), eller systemisk kjemoterapi. CRS-HIPEC gis ved alle typene peritonealt mesoteliom, mens systemisk kjemoterapi gis til de pasientene med MPM som er inoperable eller som får residiv. MPM viser ofte dårlig respons på systemisk kjemoterapi, og det er derfor et håp om å finne flere og bedre behandlingsalternativer for denne pasientgruppen.

Peritonealt mesoteliom er en sjelden sykdom med insidensrate på 0,04 – 0,08 per 100 000 i Norge (10), og det finnes naturlig nok lite forskning på denne sykdommen. I denne

prosjektoppgaven skal jeg se på kliniske og immunhistokjemiske data på 30 pasienter fra 2009 - 2021 med peritonealt mesoteliom, både de lavgradig maligne og maligne subtypene. Denne oppgaven kan derfor bidra til en økt forståelse av sykdommen og forandringene i tumorvevet slik at man etter hvert kan finne flere behandlingsalternativer og forhåpentligvis bedre prognosen til denne pasientgruppen. Innledningsvis vil jeg utdype mer om denne sjeldne sykdommen og gjøre rede for hovedprinsippene i IHC, samt hvilke biologiske markører vi har brukt i studien.

## **1.1 Peritonealt mesoteliom**

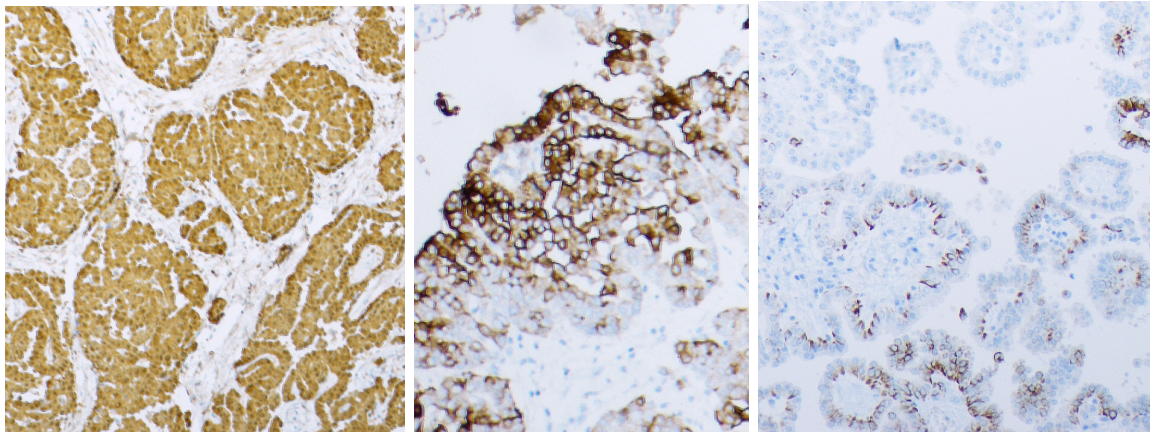
### **1.1.1 Symptomer**

Peritonealt mesoteliom presenterer seg oftest med uspesifikke symptomer som økt bukomfang og abdominale smerter (6, 11). Vekttap, metthetsfølelse, kvalme, akutte smerter og nyoppstått hernie er også symptomer som kan forekomme (4, 11). Disse symptomene skyldes økende tumormasser og økt mengde væske i bukhulen (ascites). På grunn av mindre aggressiv tumorvekst hos de benigne subtypene, er disse ofte asymptomatiske. Dermed kan sykdommen oppdages som tilfeldig funn på CT eller ved kirurgi i bukhulen (12). MPM kan også i noen tilfeller være asymptomatisk og oppdages tilfeldig (11, 13). De uspesifikke eller fraværende symptomene kan dermed føre til forsinket diagnostikk slik at sykdommen oppdages på et sent stadium med en dårligere prognose.

### **1.1.2 Diagnostikk**

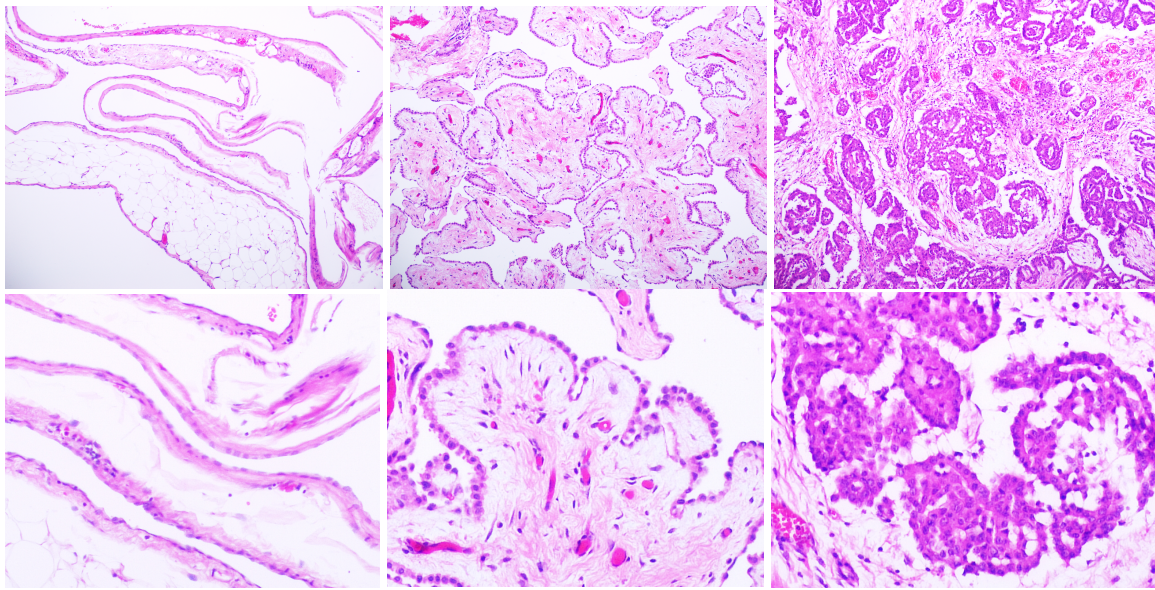
Det er flere differensialdiagnoser til peritonealt mesoteliom som verken kan skilles klinisk eller radiologisk. Endelig diagnose stilles derfor av en patolog etter en histologisk/cytologisk vurdering av vevsprøver og/eller ascitesvæske. Viktige metoder i diagnostikken av peritonealt mesoteliom er immunhistokjemi/immuncytokjemi. Diagnostikk ved hjelp av immuncytokjemi krever dog en mer erfaren patolog med god kjennskap til diagnosen (14). De to viktigste differensialdiagnosene til MPM er metastase fra adenokarsinom og benigne mesotel proliferasjoner (reaktivt mesotel), og disse kan utelukkes ved hjelp av IHC (14). Tuboovarialt serøst karsinom og primært peritonealt serøst karsinom derimot er mer utfordrende å skille fra MPM da disse kreftformene har samme histogenese og ligner morfologisk. Tumorvevet farges derfor likt med mange av de samme antistoffene, men det er noen antistoffer som også skiller disse diagnosene (14, 15). Det anbefales å bruke minst fire ulike markører for å kunne stille diagnosen MPM, to positive som calretinin og epithelial membrane antigen (EMA)

(Figur 1) og to negative som carcinoembryonalt antigen (CEA) og epithelial cell adhesion molecule BerEP4 (14). Flere markører som er positive ved MPM er Wilms tumor 1 protein (WT1), podoplanin (D2-40), mesothelin og cytokeratin 5/6 (CK5/6) (14). BRCA- associated protein 1 (BAP1) er en markør som skiller reaktivt mesotel og malignt mesoteliom og er tapt i 79% av tilfellene ved peritonealt mesoteliom (16). Ingen av disse diagnostiske markørene er helt spesifikke og det brukes ofte flere markører for å stille riktig diagnose. Dette viser at immunhistokjemi er en essensiell metode i tillegg til histologi ved diagnostikk av MPM og diagnosen bør stilles av en erfaren patolog.



*Figur 1: Malignt peritonealt mesoteliom farget med ulike antistoffer immunhistokjemisk. Fra venstre: Calretinin (+), epithelial membrane antigen (EMA) (+) og Desmin (delvis +). Snittene er fra pasientkohorten og bildene er tatt av Ben Davidson.*

Inndelingen av de peritoneale mesoteliomene i subtyper gjøres basert på tumorvevets morfologi. De lavgradig maligne deles inn i benignt multicystisk peritonealt mesoteliom (BMPM) og høyt differensiert papillær mesotelial tumor (HDPMT) (Figur 2). Det er ikke lenger anbefalt å bruke den tidligere terminologien høyt differensiert papillært mesoteliom (17). MPM kan deles inn tre histologiske subtyper: epitelioid, bifasisk og sarcomatoid type. Bifasisk type har både epitelioid og sarcomatoid vekstmønster. Den epitelioiden typen er vanligst og utgjør ca. 75% av MPM, mens bifasisk type er sjeldnere (25%) (4). Sarcomatoid type er ekstremt sjelden og har i likhet med den bifasiske typen mye dårligere prognose enn den epitelioiden (4, 18). Sugarbaker et al. (18) viste en median overlevelse på 13 mnd hos pasientgruppen med bifasisk/sarcomatoid type vs. 55 mnd hos de med epitelioid type.



*Figur 2: Histologi av de ulike subtypene av peritonealt mesoteliom. HE-fargede snitt. Fra venstre: benignt multicystisk peritonealt mesoteliom (BMPM), høyt differensiert papillær mesotelial tumor (HDPMT) og malignt peritonealt mesoteliom (MPM) (epitelioid type). Her ser man den cystiske og papillære morfologien ved henholdsvis BMPM og HDPMT, der tumorcellene kler de cystiske og papillære strukturene. Ved epithelioid MPM er tumorcellene strukturert i papillære, tubulære og solide mønstre. Øverste rekke er 40x forstørrelse, nederste rekke er zoomet inn. Bildene er tatt fra pasientkohorten av patolog Ben Davidson.*

### 1.1.3 Behandling

#### CRS-HIPEC

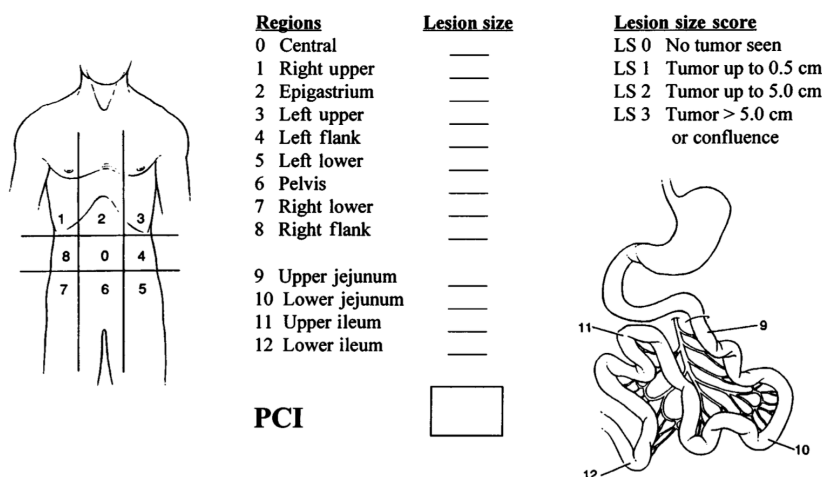
Behandling av pasienter med kreft i bukhinnen innebærer kirurgisk fjernelse av alt synlig tumorvev (CRS), etterfulgt av skylning av bukhulen med varm cellegift (HIPEC). Ved å gi cellegiften direkte i bukhulen oppnår man høyere konsentrasjoner lokalt og mindre systemisk toksisitet (19). Målet med cellegiften er å drepe de gjenværende kreftcellene i bukhulen. Varm cellegift gir en økt cytotoxisk effekt og diffunderer lenger inn i vevet (20). HIPEC-prosedyren er ikke standardisert, og hvilken temperatur, varighet av behandling og hvilket medikament varierer mellom ulike institusjoner. Ved Radiumhospitalet gis en kombinasjon av Cisplatin og Doxorubicin ved peritonealt mesoteliom. Cellegiften varmes opp til ca. 42 °C og sirkulerer i bukhulen i 90 min. Noe cellegift absorberes gjennom bukhinnen til systemisk sirkulasjon. For å kompensere for dette og likevel ha stabil cellegiftkonsentrasjon gjennom hele prosedyren gis 50 % av dosen initialt, 25% etter 30 min og 25% etter 60 min.

I Norge er CRS-HIPEC organisert som en nasjonal behandlingstjeneste og behandlingen utføres ved Radiumhospitalet på pasienter med peritoneale metastaser, pseudomyxoma peritoneii og peritonealt mesoteliom. Pasienter som henvises til Radiumhospitalet for CRS-

HIPEC blir diskutert ved et multidisiplinært team (MDT) møte der spesialister innenfor gastrokirurgi, radiologi og onkologi vurderer om pasienten er kandidat for CRS-HIPEC. Dette vurderes på bakgrunn av diagnose, sykehistorie, komorbiditet og CT-bilder.

Kontraindikasjoner for denne typen kirurgi er utbredt sykdom, metastaser og høy alder (>75 år) eller mye komorbiditet.

Sykdomsutbredelsen i bukhinnen angis med Peritoneal Carcinomatosis Index (PCI) som beregnes under operasjonen. PCI er et klassifikasjonssystem som ble utviklet av Jaquet og Sugarbaker i 1996 (21). Ved beregning av PCI bestemmes tumorstørrelse i 13 regioner i bukhulen. Deretter summeres disse tallene og PCI blir et tall mellom 0 og 39 (Figur 3).



Figur 3: Regioner og lesjonstørrelse til bruk ved utregning av Peritoneal Carcinomatosis Index (PCI) (22)

Et annet klassifiseringssystem brukt ved CRS-HIPEC er CC-score (Completeness of Cytoreduction Score). CC-score er en klassifisering av det kirurgiske resultatet og angir størrelsen på resterende tumorvev etter cytoreduktiv kirurgi (22). CC-0 defineres som fullstendig cytoreduksjon, ved CC-1 er største gjenværende lesjon < 2,5mm, ved CC-2 er gjenværende lesjon mellom 2,5mm og 2,5cm og ved CC-3 er lesjonen > 2,5cm (22).

Cellegiften som gis under HIPEC trenger 2-3mm inn i vevet og er bakgrunnen for denne klassifikasjonen (22). Hensikten med HIPEC er å eliminere gjenværende mikroskopisk tumorvev på bukhinnen og frittflytende tumorceller som er tilstede også ved CC-0. Ved CC-0 og CC-1 anses dermed pasienten som kurativt behandlet. Ved CC-2 og CC-3 vil resterende tumorvev være over 2,5mm og cellegift vil ikke trenge fullstendig inn i tumorvevet. Det gis derfor ikke HIPEC ved CC-2 og CC-3.

CRS-HIPEC har blitt førstevalget i behandling av peritoneale mesoteliomer og er det eneste kurative behandlingsalternativet. Pasienter behandlet med CRS-HIPEC har vist en høyere overlevelse sammenlignet med systemisk kjemoterapi i tidligere studier, men det har ikke blitt utført randomiserte studier. Yan et al. (23) viste en median overlevelse på 53 mnd og en 5-års overlevelse på 47% i en stor multi-institusjonal studie der CRS-HIPEC ble utført på 405 MPM-pasienter. Til sammenligning var median overlevelsen 13,1 mnd hos pasienter som fikk systemisk kjemoterapi (Pemetrexed + Cisplatin) (24). Disse tallene illustrerer hvorfor CRS-HIPEC er et bedre behandlingsalternativ for MPM.

Selv om behandlingen med CRS-HIPEC er å foretrekke over systemisk kjemoterapi, er det likevel en behandling med høy morbiditet og mortalitet. I en studie fra Sverige (25) fikk 18 av 32 pasienter postoperative komplikasjoner, der de vanligste komplikasjonene var nedsatt nyrefunksjon, intraabdominal infeksjon/sepsis, pneumoni/pleuralvæske og dyp vene trombose, og 5 pasienter ble reoperert. Magge et al. (26) rapporterte at 4 av 65 pasienter døde innen 60 dager postoperativt. Som følge av høy morbiditet knyttet til behandlingen, har kirurgene ved Radiumhospitalet vært mer tilbakeholdene med behandling av de lavgradig maligne typene de siste årene.

### **Systemisk kjemoterapi**

Systemisk kjemoterapi er et palliativt behandlingsalternativ for de pasientene med MPM som er inoperable eller har fått residiv. Flere studier både på pleurale og peritoneale mesoteliomer har vist at kombinasjonsterapi med Cisplatin og Pemetrexed gir den beste effekten sammenlignet med monoterapi (24, 27, 28). Jänne et al. (24) viste en median overlevelse på 8,7 mnd vs. 13,1 mnd hos de som ble behandlet med kun Pemetrexed vs. Pemetrexed + Cisplatin. Det ble utført en responsevaluering av 73 pasienter, der 4 (5,5%) hadde fullstendig respons, 15 (20,5%) partiell respons, 33 (45,2%) hadde stabil sykdom og 21 (28,8%) hadde progredierende sykdom (24). Selv om disse tallene viser at effekten av kombinasjonsterapi er noe bedre, ser man også at MPM har varierende og stort sett dårlig respons på systemisk kjemoterapi.

### **Molekylær terapi og immunterapi**

Den beskjedne effekten av systemisk kjemoterapi har ført til forskning på andre behandlingsalternativer ved MPM. Flere cellulære signalveier som påvirkes ved MPM har blitt identifisert som potensielle behandlingsmål for molekylær terapi (29-31), men mer



forskning på dette området er nødvendig. Immunterapi er ikke godkjent som behandling av peritonealt mesoteliom, og forskningen har fokusert mest på pleurale mesoteliomer. En nylig publisert randomisert fase 3 studie på 605 pleurale mesoteliomer viste at immunsjekkpunkt-hemmere (Nivolumab + Ipilimumab) hadde en bedre effekt enn systemisk kjemoterapi med en median overlevelse på 18,1 mnd vs. 14,1 mnd (32). Som følge av gode resultater på pleurale mesoteliomer, har Nivolumab også blitt testet på et fåtall MPM-pasienter. En studie på fire pasienter med langtkommen, behandlingsrefraktær MPM viste beskjeden effekt av Nivolumab (33). En kasusrapport beskrev en 70 år gammel mann med progredierende sykdom etter systemisk kjemoterapi som derimot viste god respons på behandlingen (34). Det bør derfor forskes mer på effekten av immunterapi hos MPM-pasienter for å finne ut av hvilke pasienter som kan ha nytte av denne behandlingen.

#### **1.1.4 Prognose**

I tillegg til histologisk subtype og behandling, har flere prognostiske faktorer som metastaser og tumorutbredelse blitt identifisert i ulike studier. Peritonealt mesoteliom metastaserer sjelden til lymfeknuter eller ekstraperitonealt, men når dette forekommer er prognosen dårligere. I den multi-institusjonale studien til Yan et al. (23) var median overlevelse for de med lymfeknutemetastaser 20 mnd vs. 56 mnd for de uten metastaser. I tillegg ble tre andre prognostiske faktorer identifisert: epitelial subtype, CC-score 0/1 og behandling med HIPEC (23). Magge et al. (26) fant lignende resultater der histologisk subtype (epitelioid MPM, HDPMT og BMPM), CC-0/1, lav sykdomsutbredelse (PCI<15) og alder <65 år, var assosiert med økt overlevelse.

## **1.2 Immunhistokjemi**

Immunhistokjemi er en viktig metode i kreftdiagnostikk og forskning, og det er denne metoden vi skal bruke for å analysere vevsprøvene på proteinnivå. Ved hjelp av IHC kan proteiner påvises i vevet ved å tilsette spesifikke antistoffer på vevssnittet. Antistoffet vil binde seg til antigenet (epitopen) på proteinet og denne reaksjonen kan synliggjøres ved hjelp av et deteksjonssystem. Deteksjonssystemet farger området i vevet eller cellen der reaksjonen har funnet sted og proteinet kan påvises i et lysmikroskop (35)

### 1.2.1 Biomarkører

En biomarkør er et stoff eller molekyl i kroppen som kan påvises eller måles og som gir informasjon om en underliggende tilstand eller sykdom (36). I denne oppgaven brukes ”biomarkør” om de proteinene vi vil påvise i vevsprøvene og har samme navn som de spesifikke antistoffene. Ved å se på assosiasjonen mellom markører og kliniske data kan man finne prognostiske eller prediktive markører. Prognostiske markører gir informasjon om prognosen til pasienten, uavhengig av hvilken behandling pasienten får. Prediktive markører derimot, gir informasjon om pasienten vil ha effekt av behandlingen (37).

Biomarkørene vi har brukt i analysen av vevsprøvene har blitt valgt av patolog Ben Davidson. Valget er basert på erfaringer og de biomarkørene som blir brukt rutinemessig for mesoteliom, som calretinin, EMA, desmin og BAP1. I tillegg ønsker vi å se på en ny spennende kandidat MTAP (methylthioadenosine phosphorylase). MTAP ble brukt i immunhistokjemisk analyse av pleurale mesoteliomer i en nylig publisert artikkel (38).

#### Utvalgte biomarkører i denne oppgaven:

**Calretinin** er et kalsiumbindende protein og er en sensitiv og spesifikk markør for reaktive (benigne) og neoplastiske (maligne) mesotelceller (39). Diagnostisk brukes calretinin for å skille mellom mesoteliom og metastatisk adenokarsinom.

**Epithelial membrane antigen (EMA)** er et stort glykoprotein i cellemembranen til epitelceller. Den brukes som en markør for malignitet og skiller mellom MPM og reaktivt mesotel (40). Denne er positiv i både mesoteliomer og adenokarsinomer, men oftest kun membranfarging ved mesoteliomer og i tillegg cytoplasmafarging ved adenokarsinomer.

**Desmin** er et intermediærfilament i sarcomerer som finnes i glatt, tverrstripet og hjertemuskelatur. Desmin kan brukes til å differensiere reaktivt mesotel og maligne mesotelceller. I en studie av Davidson et al. var desmin positiv i 84% av tilfellene ved reaktivt mesotel og kun 8% av tilfellene ved maligne mesotelceller i effusjoner (41).

**BAP1 (BRCA assosiert protein 1)** regulerer flere viktige funksjoner i cellen som DNA reparasjon (42), metabolisme (43) og celledød (44, 45), og spiller derfor en viktig rolle i å

forhindre krefututvikling i cellen (tumorsuppressor). BAP1 er tapt i 87% av maligne mesoteliomer uten signifikant forskjell mellom peritoneale og pleurale (16).

**MTAP (methylthioadenosine phosphorylase)** er kodet av et gen som ligger i nær relasjon til genet for CDKN2A og har i 68% av tilfellene en homo- eller heterozygot delesjon ved malignt mesoteliom (38). Siden disse genene ligger i nærheten av hverandre, er de ofte co-deletert, og det er vist at 74% av maligne mesoteliomer med CDKN2A delesjon også har MTAP delesjon (38). MTAP kan derfor brukes som en IHC-markør for CDKN2A delesjon med en sensitivitet på 59% og en spesifisitet på 100% (38). CDKN2A er det tumorsuppressorgenet som er hyppigst inaktivert i malignt mesoteliom og koder for proteiner som regulerer cellesyklus (46).

### **1.3 Målet med prosjektoppgaven**

Peritonealt mesoteliom er en sjelden krefdtype, med ca. 5 årlige tilfeller i Norge (47). Det er derfor gjort lite forskning på denne sykdommen. Utfordringen med forskning på sjeldne sykdommer er at det er vanskeligere å få økonomisk støtte og at det ofte tar tid å samle en stor nok pasientkohort. Radiumhospitalet har siden 2009 registrert alle peritoneale mesoteliomer som har blitt henvist til CRS-HIPEC. Ved Institutt for kreftforskning leder Kjersti Flatmark en forskningsgruppe som forsker på peritoneal kreftsykdom. Forskningsgruppen har biobanket tumorvev fra pasienter som har blitt behandlet for peritoneal kreft ved Radiumhospitalet siden 2013. Dette har ført til en rekke kasus i biobanken til tross for at sykdommen er sjelden.

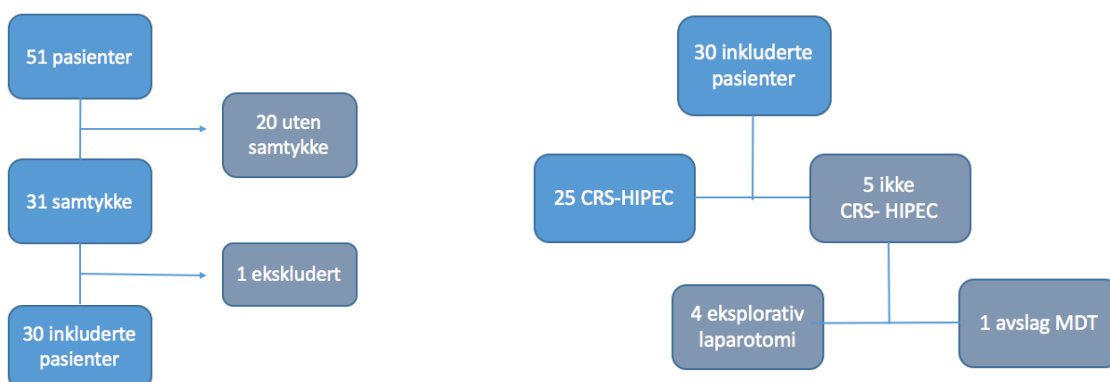
I Norge har patolog Ben Davidson publisert flere artikler om peritonealt mesoteliom på molekylært nivå (14-16, 31, 41, 48-50). I tillegg har Flatmarks forskningsgruppe analysert tumorvev på gen- og transkripsjonsnivå før og etter systemisk kjemoterapi hos en ung pasient med god respons på denne behandlingen (31). Det er likevel behov for mer forskning for å få mer kunnskap om denne sjeldne sykdommen. I denne oppgaven skal jeg presentere både kliniske og immunhistokjemiske data på en kohort på 30 pasienter med peritonealt mesoteliom som ikke har blitt beskrevet tidligere. Målet med denne oppgaven er å bidra til økt molekylær og klinisk forståelse av peritonealt mesoteliom for å danne grunnlag for utvikling av nye og bedre behandlingsformer.

## 2 Pasienter og metode

### 2.1 Pasientkohort

I denne oppgaven startet jeg med en kohort på 51 pasienter med peritonealt mesoteliom som i perioden 2009-2021 ble henvist til Radiumhospitalet (DNR) for CRS-HIPEC. Kliniske data om disse pasientene er prospektivt registrert i databasen MedInsight og i det kliniske journalføringsystemet, DIPS OUS. Denne prosjektoppgaven er en del av forskningsprosjektet ”Kreft i bukhinnen” ved Radiumhospitalet og innhenting av pasientenes kliniske og biologiske data er godkjent av REK Sør-Øst (2010/2390 s-07160b). Clinical trials nr. er NCT02073500.

Informert skriftlig samtykke var innhentet hos 31 av 51 pasienter. Samtykket innebærer bruk av pasientenes kliniske data og blod- og vevsprøver til forskning. Av de 20 pasientene uten samtykke har 13 kun blitt vurdert på MDT-møtet og fått avslag grunnet stor sykdomsutbredelse. Dermed har disse pasientene blitt behandlet ved andre sykehus og vi har ikke fått informert om studien eller levert samtykkeskjema. Samtykke var heller ikke registrert på 7 pasienter som enten ble behandlet med CRS-HIPEC (n=3) eller ble vurdert inoperable etter eksplorativ laparotomi (n=4). Av de 31 pasientene med samtykke er én pasient ekskludert fra studien. Kirurgene ved DNR fant ingen tumormasser under eksplorativ laparotomi på denne pasienten og biopsi av bukhinnen viste reaktivt mesotel. Studien har inkludert 30 pasienter med peritonealt mesoteliom der 25 av disse har blitt behandlet med CRS-HIPEC (Figur 4).

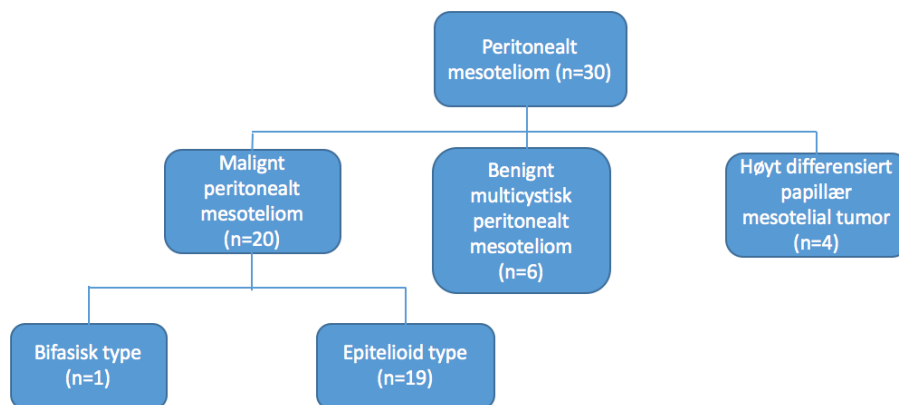


Figur 4: Flytskjema over pasientkohorten og antall pasienter behandlet/ikke behandlet med CRS-HIPEC.

CRS = cytoreductive surgery, HIPEC = Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy

### 2.1.1 Histologisk subtype

Pasientkohorten på 30 pasienter med peritonealt mesoteliom deles inn i subgrupper etter histologisk diagnose (Figur 5): MPM (n=20), BMPM (n=6) og HDPMT (n=4). Av pasientene med MPM er det én pasient som har den sjeldne bifasiske typen. Tre biopsisvar ble vurdert som usikker maligne/benigne (BMPM (n=2) og HDPMT (n=1)). Grunnen til dette var avvikende immunprofil. Ved diskrepans mellom to ulike biopsisvar eller biopsisvar vurdert med usikker malignitet, har jeg konferert med patolog Ben Davidson.



Figur 5: Inndeling etter histologisk diagnose

## 2.2 Parametere

De kliniske og biologiske dataene er hentet fra MedInsight og DIPS. Pasientopplysningene ble først registrert ved gjennomgang av journaldokumenter i DIPS, og deretter kontrollert med opplysningene i MedInsight. Ved usikkerhet i tolkningen av journalopplysninger har jeg konferert med gastrokirurg Olaf Sørensen.

Flere ulike parametere ble brukt i informasjonshenting: Kjønn, diagnosetidspunkt (biopsidato), alder ved diagnosetidspunkt, histologisk diagnose, IHC-markører, serummarkører (CEA, CA-19,9 og CA-125) før CRS-HIPEC, dato for HIPEC, ECOG, PCI, CC-score, HIPEC-medikament, komplikasjoner/accordion, annen behandling (systemisk kjemoterapi, stråling, immunterapi), glandelmetastaser, ekstraabdominale metastaser, dato første residiv etter HIPEC, dato siste kontroll, eventuell morsdato. Serummarkører var ikke tatt på alle pasientene og lå i referanseområdet med svært få unntak. ECOG var kun beskrevet på 23 av pasientene, der kun 2 pasienter hadde score >0. Serummarkører og ECOG ble derfor ikke brukt videre i oppgaven.

### 2.2.1 PCI

PCI ble beregnet av kirurgene under operasjon med CRS-HIPEC eller eksplorativ laparotomi. Kun én pasient i pasientkohorten ble ikke operert og PCI ble derfor registrert på 29 av 30 pasienter. I statistiske analyser har vi delt pasientene inn i fire grupper basert på PCI-intervaller: PCI 0-10, PCI 11-20, PCI 21-30 og PCI > 30.

### 2.2.2 CC-score

CC- score på de inkluderte pasientene ble vurdert av kirurgene under CRS-HIPEC (n=21) eller angitt av operatøren i ettertid på bakgrunn av operasjonsbeskrivelsen (n=4).

Én pasient med MPM ble beskrevet som CC-0 i operasjonsnotat, men 3mnd kontroll viste ”missed lesion” resttumor 43mmx18mm på både CT og MR og ble derfor endret til CC-3. Pasientene med CC-2 og CC-3 (n=4) ble også behandlet med HIPEC.

### 2.2.3 Accordion Severity Grading Scale

Behandlingen med CRS-HIPEC kan gi alvorlige komplikasjoner hos noen pasienter, mens andre pasienter kun har milde eller ingen komplikasjoner i det postoperative forløpet. Alvorlighetsgraden av postoperative komplikasjoner klassifiseres etter ”Accordion Severity Grading Scale”, der vi har brukt den utvidede klassifikasjonen med 6 nivåer (51) (Tabell 1).

---

#### Accordion Severity Classification of Postoperative Complications: Expanded Classification

---

1. Milde komplikasjoner	Krever mindre invasive prosedyrer som intravenøs væske, urinkateter, nasogastrisk sonde, drenering av sårinfeksjoner. Fysioterapi. Medikamenter som antiemetika, analgetika, antipyretika, diuretika og elektrolytter.
2. Moderate komplikasjoner	Krever farmakologisk behandling med andre medikamenter enn de for milde komplikasjoner, som antibiotika. Blodtransfusjoner og total parenteral ernæring.
3. Alvorlige komplikasjoner	Krever invasive prosedyrer uten generell anestesi
4. Alvorlige komplikasjoner	Reoperasjon med generell anestesi
5. Alvorlige komplikasjoner	Multiorgansvikt
6. Død	Postoperativ død (innen 100 dager)

---

Tabell 1: Beskrivelse av de ulike gradene i Accordion Severity Classification (51).

## **2.2.4 Residiv**

Residiv er tilbakefall av sykdommen etter maksimal cytoreduktiv kirurgi (CC-0 og CC-1). Ved CC-2/3 kan resterende tumorvev i bukhinnen progrediere, men det er ikke et residiv. Det er få behandlingsalternativ ved residiv. CRS-HIPEC er i utgangspunktet en operasjon som kun gjennomføres én gang, men indikasjon for reoperasjon kan vurderes. Ved residiv av MPM er ofte systemisk kjemoterapi det eneste behandlingsalternativet.

## **2.2.5 Kontroller og oppfølging**

Hensikten med kontroller etter CRS-HIPEC og oppfølging av de pasientene som ikke har fått CRS-HIPEC er å se etter residiv eller sykdomsprogresjon og vurdere behovet for annen behandling. Dette vurderes på bakgrunn av CT-bilder av thorax, abdomen og bekken, blodprøver med serummarkører (CEA, CA-19,9 og CA-125), klinisk undersøkelse og anamnese. Første året etter CRS-HIPEC blir det tatt hyppige kontroller, henholdsvis etter 3, 6 og 12 mnd. Deretter følges det ikke et standardisert kontrollopplegg, da behovet for kontroller og hyppigheten vurderes i hvert tilfelle.

De siste opplysningene fra MedInsight ble innhentet: 06.05.2021 og fra DIPS OUS: 25.11.2021. Vi har fått ettersendt journaldokumenter på 4 av 12 pasienter som ble fulgt opp ved andre sykehus. Formålet var å registrere eventuelle residiv etter kirurgi. Pasientene vi ikke hentet inn opplysninger på var enten inoperable (n=3), hadde CC-score > 1 (n=3), hadde allerede residiv (n=1) eller døde kort tid (< 6 mnd) etter siste kontroll ved DNR (n=1).

## **2.3 Immunhistokjemi**

### **2.3.1 Prøvemateriale**

I denne studien har vi innhentet diagnostiske IHC-resultater og supplert med ytterligere IHC-undersøkelser for å få en fullstendig oversikt over de valgte biomarkørene på alle pasientene. Pasientenes vevsprøver ble tatt ved DNR i forbindelse med CRS-HIPEC eller eksplorativ laparotomi/laparoskopi (n=27) eller ved andre sykehus (n=3). Vevsprøvene ble så fiksert i formalin og parafininnstøpt før de ble snittet i tynne skiver (3 µm) og lagt på objektglass der den immunhistokjemiske prosedyren ble utført. De fleste snittene ble farget manuelt av ingeniør Arild Holth etter DAKO FLEX+ immunhistokjemi protokoll (Dako, Agilent Technologies, Danmark) (Tabell 2). BAP1 fargingen ble utført på IHC laboratoriet på Oslo

Universitetssykehus med Ventana Benchmark Ultra immunostainer (Oro Valley, AZ)  
Nedenfor beskrives de viktigste prinsippene bak de ulike trinnene i DAKO FLEX+ immunhistokjemi protokollen.

### 2.3.2 Fremgangsmåte

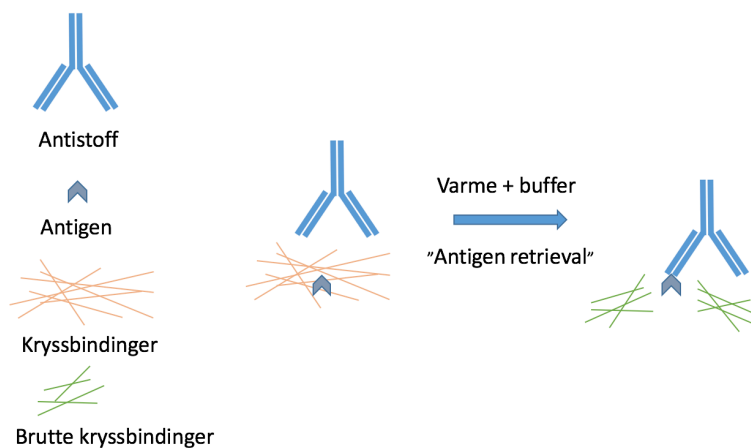
Trinn	Reagens	Varighet
PT Link	DAKO Flex Target Retrieval Solution (høy eller lav pH) *	90 min
Vasking	DAKO vaskebuffer *	2-5 min
Peroksidase blokk	Hydrogenperoksid	5 min
Vasking	DAKO vaskebuffer *	
Primært antistoff	Primært antistoff	30 min
Vasking	DAKO vaskebuffer *	
Linker	EnVision FLEX+ Linker (mouse or rabbit) *	15 min
Vasking	DAKO vaskebuffer *	
Sekundært antistoff	EnVision FLEX+ HRP *	30 min
Vasking x2	DAKO vaskebuffer *	
Farging	DAB chromogen *	10 min
Skylling	Vann	
Farging	Hematoxylin	10-15 sek
Skylling	Vann	
Ammonium skylling	Ammonium	
Skylling	Vann	3-5 min
Montering og dehydrering	Etanol og xylen	

Tabell 2: Fremgangsmåte ved Dako Flex+ immunhistokjemi protokoll (Dako, Agilent Technologies, Danmark). \*Produsent Agilent Dako, Danmark

### 2.3.3 Forbehandling

PT Link (Agilent Dako, Danmark) er en forbehandling som brukes på formalinfiksert, parafininnstøpt vev for å klargjøre vevet for farging med antistoff. Forbehandlingen deparafiniserer og rehydrerer vevet samtidig som kryssbindinger dannet under formalinfikseringen brytes. Deparafinisering gir vevet økt permeabilitet for antistoffet og bryting av kryssbindinger fremmer interaksjonen mellom antigen og antistoff (52). Grunnen til dette er at kryssbindinger mellom proteiner i vevet kan gjøre epitopene på antigenet utilgjengelig for antistoffbinding (53). Antigenene må derfor demaskeres ("antigen retrieval") og dette skjer ved oppvarming i en bufferløsning som bryter disse kryssbindingene (Figur 6). Denne prosessen kalles HIER (heat induced epitope retrieval).





Figur 6: Skjematisk fremstilling av betydningen av antigendemaskering ("antigen retrieval"), etter tilsetning av antistoff. Modifisert fra (54).

Under forbehandlingen varmes snittene gradvis opp til 97 grader i PT Link. Bufferen som brukes er DAKO Flex Target Retrieval Solution (Agilent Dako, Danmark), med høy pH (pH 9) eller lav pH (pH 6). Om det er bufferen med lav eller høy pH som er best egnet, er avhengig av det primære antistoffet og er som regel oppgitt i antistoffets dataark. Dersom det benyttes feil retrievalbuffer, kan fargingen bli svak eller uspesifikk. Forbehandlingen har derfor stor betydning for kvaliteten på immunhistokjemi-fargingen.

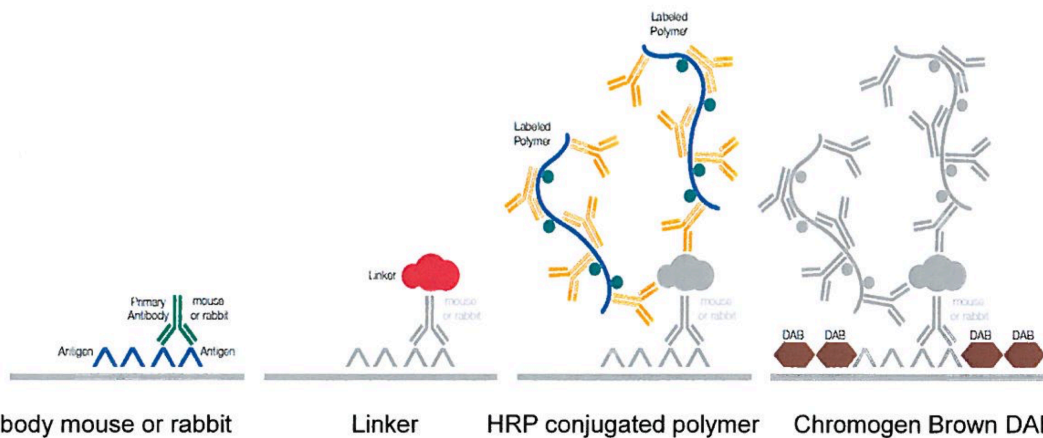
For å oppnå et pålitelig sluttresultat, er det viktig å hindre at noe annet enn det proteinet vi er interessert i farges. I denne protokollen benyttes Horse radish peroksidase (HRP) som enzymmarkør og kan føre til uspesifikk farging fordi enzymet peroksidase finnes naturlig i flere celletyper i kroppen (53). Denne uspesifikke bakgrunnsfargingen kan forstyrre tolkningsprosessen og endogen peroksidaseaktivitet må derfor blokkeres. Dette gjøres ved å forbehandle vevet med hydrogenperoksid (53).

### 2.3.4 Visualisering

Det finnes flere ulike systemer for å detektere antigen-antistoff reaksjoner i immunhistokjemi. I denne protokollen består deteksjonssystemet av tre lag før tilsetning av DAB+ chromogen (Agilent Dako, Danmark) (Figur 7):

1. Primært antistoff fra mus eller kanin (Tabell 3)
2. Linker (EnVision FLEX+ Linker) (Agilent Dako, Danmark)
3. HRP-konjugert sekundært antistoff (EnVision FLEX+ HRP) (Agilent Dako, Danmark)

Først tilsettes primært antistoff som bindes til antigenet. I neste trinn tilsettes en linker som igjen binder seg til det primære antistoffet. Linkeren har flere bindingssteder for det sekundære antistoffet og amplifiserer dermed signalet fra det primære antistoffet. Dette fører til en kraftigere farging med færre antigener tilstede. Så tilsettes polymerer med multiple sekundære antistoff og HRP-enzymet. Deretter tilsettes DAB+ chromogen (Agilent Dako, Danmark) som danner en brun farge i reaksjon med HRP og dermed synliggjør den primære antistoff-antigen bindingen. Videre farges snittene med hematoxylin og skylles i ammonium. Cellekjernen farges lilla med hematoxylin som omdannes til en blå farge ved skylning i høy pH (ammonium). Denne blåfargen kan enklere differensieres fra den rødbrune DAB fargingen.



Figur 7: Skjematiske fremstillinger av DAKO Flex+ deteksjonssystemet (55). Antigenet i vevet blir gjenkjent og bundet av det primære antistoffet. I neste trinn binder linker seg til antistoffet. Polymerer med multiple sekundære antistoff og HRP-molekyler binder seg så til linkerens mange bindingssteder. Til slutt vil HRP-enzymene indukere farge ved tilsetning av kromogenet DAB og vevet farges brunt.

	Mus/ kanin	Fortyn- ning	Retrievalbuffer	Mono/ polyklonal	Pos kontroll	Katalog nr.	Produsent
<b>Calretinin</b>	Mus	1:100	Høy pH (pH 9)	- (mono)	Appendix	M7245	Agilent Dako *
<b>EMA</b>	Mus	1:200	Høy pH (pH 9)	E29 (mono)	Adenokarsinom	-	Agilent Dako *
<b>Desmin</b>	Mus	1:500	Høy pH (pH 9)	D33 (mono)	Appendix	-	Agilent Dako *
<b>BAP1</b>	Mus	1:100	pH 7,8	C-4 (mono)	Tonsille, lever, pankreas, appendix	Sc-28383	Santa Cruz Biotechnology **
<b>MTAP</b>	Mus	1:500	Lav pH (pH 6)	47-T (mono)	Mesoteliom multiblokk	Sc- 100782	Santa Cruz Biotechnology **

Tabell 3: Informasjon om de primære antistoffene vi har brukt.

\*(Glostrup, Danmark). \*\*(Dallas, Texas, USA). EMA = epithelial membrane antigen, BAP1 = BRCA associated protein 1, MTAP = Methylthioadenosine phosphorylase.

### **2.3.5 Dehydrering og montering**

Monteringsmediumet som brukes til montering av dekkglass avhenger av hvilket deteksjonssystem som brukes (53) og er i denne protokollen xylenbasert. Xylen er ikke vannløselig og snittene må derfor dehydreres for å unngå uløselige vanndråper som kan ødelegge tolkningen. Dehydrering skjer ved at snittene dyppes i etanol med økende konsentrasjon, henholdsvis 70%, 95% og 100%, som gradvis vil fjerne mer og mer vann fra snittene. Snittene dyppes så i xylen og dekkglass monteres i en monteringsmaskin (Coverslipper, Dako, Danmark). Eventuelle luftbobler presses ut manuelt.

### **2.3.6 Positiv og negativ kontroll**

For hvert antistoff kreves det en positiv og en negativ kontroll som skal avdekke uspesifikk farging og eventuelle feil i analysen. Til den positive kontrollen velges det en vevstype som kjent inneholder antigenet (53) (Tabell 3). Til den negative kontrollen brukes det et snitt fra den samme vevsblokken som til den positive kontrollen, men i stedet for primært antistoff tilsettes normalserum fra samme art (mus/kanin) med antistoff som har samme isotype og samme spesifikke konsentrasjon som det primære antistoffet (56). Falskt negativt resultat på den positive kontrollen kan skyldes analysefeil og falskt positivt resultat på den negative kontrollen kan skyldes kryssreagerende substanser eller endogen enzymaktivitet (52).

### **2.3.7 Tolkning**

Tolkningen av de immunhistokjemiske resultatene er utført av patolog Ben Davidson og er basert på antall tumorceller og hvilke deler av cellen som er farget. Resultatene deles inn i kategoriene: positiv (ca. 100% av cellene er farget), delvis positiv (ca. 5-50%) og negativ (ca. 0%). For EMA regnes kun membranfarging som positivt og for BAP1 har vi kategorisert også de delvis positive resultatene som negative ettersom at det er tap av BAP1 vi er interessert i.

## **2.4 Statistiske analyser**

Statistiske analyser er utført i IBM SPSS Statistics (versjon 27.0.1.0). De statistiske metodene som er brukt er Kaplan-Meier i overlevelsesanalyse, revers Kaplan Meier for oppfølgingstid, Log-Rank test for sammenligning av gruppene i overlevelsesanalysen, og Life Tables for beregning av "No. at risk". Pearson Correlation test (2-tailed) har blitt brukt i korrelasjonstesting, der 0 er ingen korrelasjon og 1 eller -1 er 100% korrelasjon. Resultater med p-verdi <0.05 ble regnet som statistisk signifikant.

### 3 Resultater

Tabellen nedenfor viser en oversikt over de kliniske parameterne inndelt etter diagnose (Tabell 4). Det var 8 menn (40%) og 12 kvinner (60%) med MPM, og kun kvinner med BMPM og HDPMT. Median alder ved diagnostidspunkt var 54 år (min 19 - maks 72). Alle pasientene med BMPM og HDPMT ble operert med CRS-HIPEC. I MPM-gruppen ble 5 pasienter vurdert som inoperable grunnet stor sykdomsutbredelse. Én av disse fikk avslag på MDT møtet pga. metastaser til kardiofreniske lymfeknuter. CRS-HIPEC var planlagt for de fire andre pasientene, men på grunn av omfattende peritoneal sykdomsutbredelse (PCI 29 – 38) og lesjoner på tynntarm/tyntarmskrøs ble disse vurdert som inoperable under operasjon. Kun én pasient hadde mulig asbesteksponering i tidligere arbeid som blikkenslager.

PCI-score var lavest ved BMPM (median 12) og HDPMT (median 6), og høyest ved MPM (median 29). Alle pasientene med BMPM og HDPMT og 11 MPM-pasienter ble radikalt behandlet (CC-0/1). Medikamentene som brukes under HIPEC på Radiumhospitalet er vanligvis Cisplatin og Doxorubicin og dette ble gitt til 22 pasienter (88%). Én pasient ble gitt Mitomycin C grunnet tidligere allergisk reaksjon på Cisplatin og en annen grunnet funn av peritoneale metastaser fra en nevroendokrin tumor under operasjon. I et annet tilfelle ble ikke Doxorubicin gitt ved en feil, og denne pasienten fikk derfor kun Cisplatin.

#### **Accordion**

De fleste pasientene hadde milde (52%) og moderate (16%) komplikasjoner (Tabell 4). Milde komplikasjoner (accordion 1) var behov for intravenøs væske og medikamenter som analgetika og antiemetika. De moderate komplikasjonene (accordion 2) var nyresvikt (n=3) (ikke dialysetrengende) og behov for blodtransfusjon (n=1). Det var 8 pasienter (32%) med alvorlige komplikasjoner (accordion 3,4 og 5). Pasienten med accordion 3 hadde behandlingstrengende pneumothorax og pleuravæske. Pasientene med accordion 4 (20%) måtte reopereres grunnet anastomoselekkasje (n=2), drenering av abscess (n=2) og blødning (n=1). Én av disse pasientene fikk i tillegg nyresvikt og pankreaslekkasje. Pasienten med accordion 5 fikk thoraxdren grunnet hull i diafragma under operasjon, perikarditt og dialysetrengende nyresvikt. Én pasient ble klassifisert som accordion 6. Under operasjon ble det fjernet 3 kg tumorvev og tappet for 47 liter ascites, og HIPEC ble gitt i palliativ hensikt. Pasienten fikk komplikasjoner som pancreaslekkasje, colonperforasjon, abscesser og gjentatte infeksjoner i tillegg til langvarig respiratorbehandling og døde 99 dager etter operasjon.

	MPM	BMPM	HDPMT	Totalt	
	N.	N.	N.	N.	%
<b>Kjønn</b>					
Mann	8			8	27
Kvinne	12	6	4	22	73
<b>Alder</b>					
Median	57	54	42	54	
SD	15	11	15	14	
Min-maks	19-72	34-63	35-68	19-72	
CRS-HIPEC	15	6	4	25	83
Inoperabel	5			5	17
<b>PCI (n = 29)</b>					
0-10		2	3	5	17
11-20	7	3		10	35
21-30	6	1	1	8	28
over 30	6			6	21
Median	29	12	6	20	
Min-maks	13-39	7-23	2-22	2-39	
<b>CC-score (n = 25)</b>					
CC-0	9	5	4	18	72
CC-1	2	1		3	12
CC-2	1			1	4
CC-3	3			3	12
<b>HIPEC-medikament (n = 25)</b>					
Cisplatin/Doxorubicin	13	6	3	22	88
Mitomycin C	1		1	2	8
Cisplatin	1			1	4
<b>Accordion (n = 25)</b>					
1	8	2	3	13	52
2	2	1	1	4	16
3	1			1	4
4	2	3		5	20
5	1			1	4
6	1			1	4
<b>Residiv</b>	5	2		7	33*
<b>Ekstraabdominale metastaser</b>	6			6	20

\* av de 21 pas med CC-0/1.

Tabell 4. Pasientkarakteristikk og kliniske parametere, inndelt etter histologisk diagnose. MPM= malignt peritonealt mesoteliom, BMPM = benignt multicystisk peritonealt mesoteliom, HDPMT = høyt differensiert papillær mesotelial tumor, CRS = cytoreductive surgery, HIPEC = hyperthermic intraperitoneal chemotherapy, PCI = peritoneal carcinomatosis index, CC- score = completeness of cytoreduction score.

### Ekstraabdominale metastaser

Seks pasienter (30%) i MPM-gruppen fikk ekstraabdominale metastaser i sykdomsforløpet (Tabell 4). Før CRS-HIPEC hadde to pasienter metastaser, én hadde abdominale lymfeknutemetastaser og én hadde ekstraabdominale metastaser (lymfeknuter i mediastinum).

Pasienten med abdominale lymfeknutemetastaser fikk peritonealt residiv og ekstraabdominale metastaser senere i sykdomsforløpet. Én pasient fikk levermetastaser etter peritonealt sykdomsresidiv. To pasienter hadde metastaser til lymfeknuter i kardiofrenisk vinkel, men ble ikke operert med CRS-HIPEC grunnet avslag på MDT-møtet (n=1) og vurdert inoperabel etter eksplorativ laparotomi (n=1). En annen pasient som ikke ble operert med CRS-HIPEC, fikk metastaser til supraklavikulære lymfeknuter senere i sykdomsforløpet.

### Korrelasjon mellom ulike parametere

Korrelasjonen mellom PCI og CC-score (Tabell 5), PCI og Accordion (Tabell 6) og CC-score og Accordion (Tabell 7) er vist i tabellene nedenfor. Tabell 5 viser at CC-score øker når PCI øker, med ett unntak. Unntaket er pasienten med PCI 11-20 som ble CC-3 grunnet en ”missed lesion”. Korrelasjonstest viser en signifikant ( $p=0.001$ ) positiv korrelasjon på 0.64 mellom PCI-score (ikke kategorisert) og CC-score. Tabell 6 viser at pasientene med accordion 1 har PCI-score innen alle PCI-kategoriene. PCI-score ved accordion 4 viser også stor variasjon. Pasientene med accordion 5 og 6 hadde  $PCI > 30$ , mens de to andre pasientene med  $PCI > 30$  hadde accordion 1. Vi ser derfor ingen tydelig sammenheng mellom PCI-score og accordion. Korrelasjonstest viser svak korrelasjon (0.3) mellom PCI-score (kategorisert) og accordion og er ikke signifikant ( $p=0.14$ ). Tabell 7 viser heller ingen tydelig sammenheng mellom CC-score og accordion. Pasienter med CC-0 hadde accordion fra 1-4, og pasienter med accordion 1 hadde CC-score fra 0-3. Korrelasjonstest viser ingen korrelasjon (0.13) og er ikke signifikant ( $p=0.5$ ).

	CC-0	CC-1	CC-2	CC-3
PCI 0-10	5	0	0	0
PCI 11-20	8	1	0	1
PCI 21-30	5	1	0	0
PCI > 30	0	1	1	2

Tabell 6: CC-score og PCI

	Accordion					
	1	2	3	4	5	6
PCI 0-10	3	1	0	1	0	0
PCI 11-20	5	3	0	2	0	0
PCI 21-30	3	0	1	2	0	0
PCI > 30	2	0	0	0	1	1

Tabell 5: Accordion og PCI

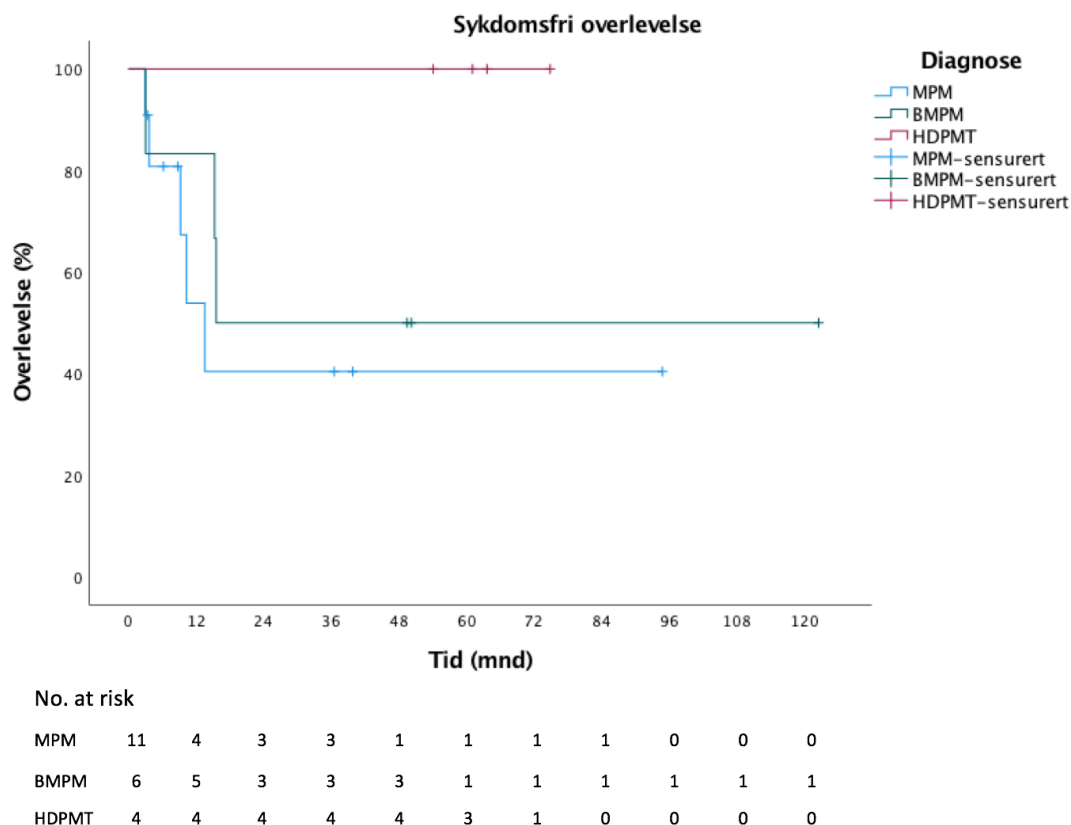
	Accordion					
	1	2	3	4	5	6
CC-0	9	4	1	4	0	0
CC-1	1	0	0	1	1	0
CC-2	1	0	0	0	0	0
CC-3	2	0	0	0	0	1

Tabell 7: Accordion og CC-score

CC-score = Completeness of cytoreduction score,  
PCI = peritoneal carcinomatosis index

### 3.1 Sykdomsfri overlevelse

Sykdomsfri overlevelse er tiden fra operasjon til påvist residiv (CT/biopsi) eller død uansett årsak (Figur 8). Det var 21 pasienter (84%) med CC-0/1, og av disse fikk 7 pasienter (33%) residiv (Tabell 4). Fem pasienter (45%) i MPM-gruppen (n=11) og to pasienter (33%) i BMPM-gruppen fikk residiv. I tillegg var det én pasient med BMPM som ikke har fått påvist residiv, men som døde 15 mnd etter CRS-HIPEC. De 14 pasientene (67%) uten påvist residiv ble sensurert etter siste kontroll. Median sykdomsfri overlevelse for MPM var 14 mnd (95% KI 8 – 19 mnd). Median overlevelse for BMPM og HDPMT ble ikke nådd og det var ikke signifikant forskjell mellom gruppene ( $p = 0.18$ ). Det var kort oppfølgingstid ( $< 12$  mnd) for 3 av MPM-pasientene, og median oppfølgingstid for MPM var 37 mnd (95% KI 0 - 87 mnd), min-maks 3,5 – 95 mnd. For BMPM var median oppfølgingstid 50 mnd (95% KI 49 – 52 mnd), min-maks 40 - 123 mnd. Ingen av de 4 pasientene med HDPMT fikk residiv, og median oppfølgingstid er 61 mnd (95% KI 52 – 70 mnd), min-maks 54 – 75 mnd.



Figur 8: Sykdomsfri overlevelse, etter behandling med CRS-HIPEC (cytoreduktive surgery – hyperthermic intraperitoneal chemotherapy). Fra operasjonsdato til residiv eller død, sensurdato er siste kontroll.

MPM= malignt peritonealt mesoteliom, BMPM = benignt multicystisk peritonealt mesoteliom, HDPMT = høyt differensiert papillær mesotelial tumor

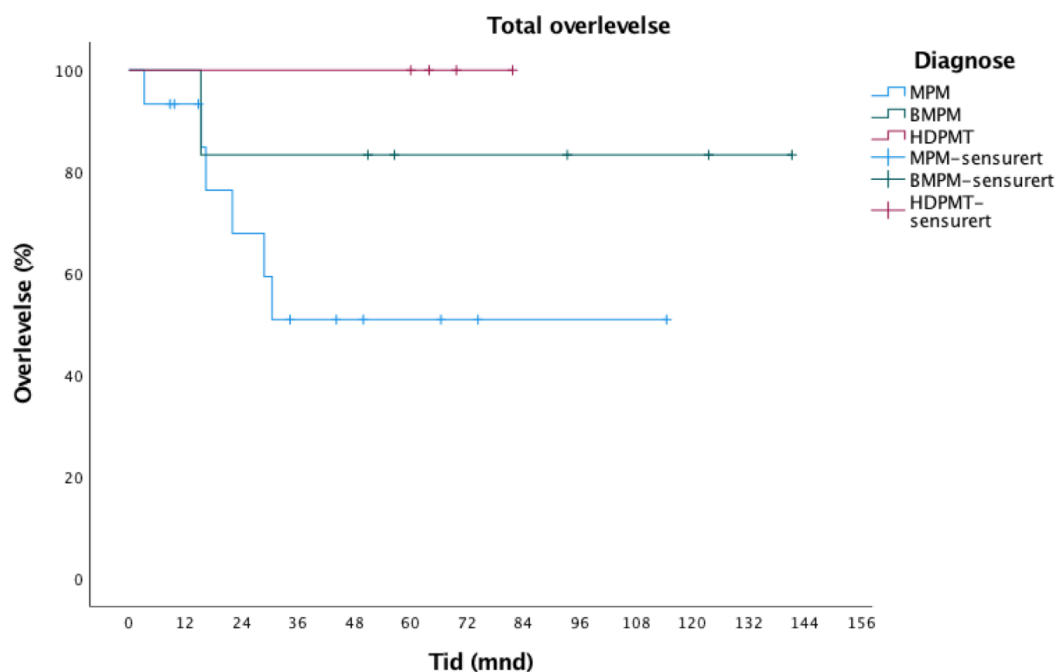
To pasienter med BMPM fikk påvist residiv. Den ene fikk påvist residiv på CT 3 mnd etter operasjon. Det ble diskutert om dette var resttumor, men operasjonsbeskrivelsen viste grundig gjennomgang av dette området. Lesjonen økte fra 11x7 mm til 24x12 mm i løpet av 6 mnd og pasienten ble reoperert ett år etter CRS-HIPEC der lesjonen ble fjernet. Pasienten har ikke fått påvist re-residiv og oppfølging ble avsluttet etter 10 år. Den andre pasienten fikk påvist residiv etter 16 mnd under operasjon for tilbakelegging av stomi og lesjonene ble ekstirpert. Pasienten fikk ikke re-residiv og oppfølging ble avsluttet etter 7,5år. BMPM-pasienten som døde hadde normal CT 4 mnd tidligere og dødsårsaken er mest sannsynlig ikke knyttet til sykdommen. BMPM-pasientene som fikk residiv hadde PCI på 8 og 23 og MPM-pasientene som fikk residiv hadde PCI under medianen, PCI 13-25. Av MPM-pasientene med residiv er 3 av 5 døde og de to som fortsatt lever har i tillegg blitt behandlet med immunterapi.

### **3.2 Total overlevelse**

Total overlevelse er tiden fra CRS-HIPEC til død/sensur (Figur 9). De inoperable pasientene (n=5) ble ekskludert og det var 25 pasienter ved starttidspunkt. De sensurerte pasientene levde fortsatt ved tidspunkt for sensur, 24.11.2021. Syv pasienter døde, 6 (40%) i MPM-gruppen og 1 (17%) i BMPM-gruppen. Den ene pasienten med BMPM var den samme som beskrevet i sykdomsfri overlevelse, der det mest sannsynlig var en annen dødsårsak. Ingen av pasientene med HDPMT døde. Median overlevelse ble ikke nådd for noen av gruppene og det var ikke signifikant forskjell mellom gruppene ( $p=0.17$ ). Estimert 5-års overlevelse var 51% for MPM (SE 14%). Tre av de fem inoperable MPM-pasientene døde med en overlevelse på 17 mnd, 40 mnd og 45 mnd. To av de inoperable lever fortsatt etter 17 mnd og 70 mnd. Median overlevelse for MPM-gruppen, inkludert de inoperable, var 45 mnd (95% KI 24 – 66 mnd).

Oppfølgingstiden varierte for de ulike diagnosene. Median oppfølgingstid for MPM var 50 mnd (95% KI 30 – 70 mnd), min-maks 9 mnd - 115 mnd. I BMPM-gruppen var median oppfølgingstid 93 mnd (95% KI 14 - 172 mnd), min-maks 51 – 141 mnd. For HDPMT var median oppfølgingstid 64 mnd (95% KI 54 - 74 mnd), min-maks 60 – 82 mnd. I MPM-gruppen døde 5 av 10 pasienter med PCI over medianen på 29. Til sammenligning døde 3 av 9 MPM-pasienter med PCI under medianen. Det var ikke signifikant forskjell i overlevelse for PCI over og under medianen med Kaplan Meier ( $p=0.36$ ). Av MPM-pasientene med CC-0/1 døde 3 av 11 pasienter, og 3 av 4 pasienter med CC-2/3 døde. Det var ikke signifikant forskjell i overlevelse mellom CC-0/1 og CC-2/3 med Kaplan Meier ( $p=0.18$ ).





No. at risk													
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144
MPM	15	12	8	5	4	3	2	1	1	1	0	0	0
BMPM	6	6	5	5	5	3	3	3	2	2	2	1	0
HDPMT	4	4	4	4	4	4	1	0	0	0	0	0	0

Figur 9: Total overlevelse, fra CRS-HIPEC (cytoreduktive kirurgi – hypertermisk intraperitoneal kjemoterapi) til død/sensur.

MPM= malignt peritonealt mesoteliom, BMPM = benignt multicystisk peritonealt mesoteliom, HDPMT = høyt differensiert papillær mesotelial tumor

### 3.3 Immunterapi

I denne kohorten har 4 pasienter med MPM fått immunterapi off-label (bruk av legemiddel utenfor godkjent markedsføringstillatelse) da dette ikke er et etablert behandlingsalternativ for MPM. Pasientene har fått PD1-hemmer (Nivolumab) (n=3) og en kombinasjonsbehandling med Nivolumab og CTLA-4 hemmer (Ipilimumab) (n=1). Felles for disse pasientene er at alle andre behandlingsalternativer er prøvd og det er unge pasienter (25-48 år). Tre av pasientene hadde MSS (mikrosatellitt stabile) tumores og det er ikke funnet journaldokumenter av slike prøver på den fjerde pasienten. Én pasient hadde også PD-L1- uttrykk i >50% av tumorcellene, men journaldokumenter for samme undersøkelse ble ikke funnet hos de andre pasientene. Den ene pasienten hadde betydelig størrelsesreduksjon av levermetastase etter ett år med behandling (6,8 x 8,7cm til 2,7 x 4,0cm) og fikk Nivolumab i 24 mnd med stabil peritoneal tumor. Etter 6 mnd behandlingspause viste tumor progresjon, behandlingen ble startet opp igjen og pasienten hadde hatt stabil tumor i 4 mnd etter dette ved siste kontroll.

Dette viser god effekt av immunterapi og pasienten lever fortsatt 74 mnd etter CRS-HIPEC og 35 mnd etter oppstart av immunterapi. En annen pasient med bifasisk type fikk residiv kun 3 mnd etter CRS-HIPEC. Denne pasienten hadde fullstendig tilbakegang av lymfeknuter og en 1,5 cm metastase etter 6 mnd behandling med Nivolumab, i tillegg til størrelsesreduksjon av tumor (6,7cm x 5cm til 4,6cm x 2,1cm). Pasienten fikk videre behandling i 24 mnd der tumor var stabil. Ved siste kontroll hadde pasienten hatt behandlingspause i 24 mnd med stabil tumor. Pasienten lever fortsatt 66 mnd etter CRS-HIPEC og 57 mnd etter oppstart med immunterapi, som viser at denne pasienten også hadde svært god effekt av immunterapi.

Den tredje pasienten fikk godkjent off-label søknad om Nivolumab etter god erfaring fra behandling av de to første pasientene. Det ble for denne pasienten anbefalt med immunterapi kort tid etter CRS-HIPEC i "en slags adjuvant setting" da pasienten hadde reagert allergisk mot Cisplatin og fikk Mitomycin C som HIPEC-medikament. Pasienten har blitt behandlet i 7 mnd ved siste kontroll og har foreløpig ingen residiv eller metastaser. Den fjerde pasienten var inoperabel og har fått systemisk kjemoterapi med mye bivirkninger og allergisk reaksjon på karboplatin. Derfor fikk pasienten kombinasjonsbehandling med Nivolumab og Ipilimumab i en palliativ hensikt. Pasienten hadde kun fått to kurer og ingen kontroll ved siste innhenting av journalopplysninger.

### **3.4 Immunhistokjemi**

Resultatene av de immunhistokjemiske analysene er vist i tabellen nedenfor (Tabell 8). Tabell 9 viser antall positive, delvis positive og negative resultater for de ulike diagnosene. Det var kun positive resultater for calretinin. EMA viser positivitet hos flertallet av MPM og BMPM, mens det er flest med negativ EMA i HDPMT-gruppen. Desmin var tapt hos 14 av 20 pasienter (70%) med MPM, 3 av 6 (50%) med BMPM og i 4 av 4 (100%) med HDPMT. BAP1 var negativ hos 15 av 20 pasienter (75%) med MPM, to BMPM og én HDPMT. Totalt var BAP1 tapt i 18 (60%) tilfeller. Farging med MTAP ga kun positive eller delvis positive resultater. Femten (75%) av MPM var positive for MTAP og 5 (25%) viste delvis tap. Kun 1 BMPM og 1 HDPMT hadde delvis tap av MTAP.

Pas nr	Diagnose	Calretinin	EMA	Desmin	BAP1	MTAP
1	MPM	+	+	-	-	Delvis +
2	MPM	+	+	-	-	Delvis +
3	MPM	+	-	-	-	Delvis +
4	MPM	+	+	-	-	Delvis +
5	MPM	+	+	-	-	Delvis +
6	MPM	+	+	Delvis +*	-	+
7	MPM	+	+	Delvis +	+	+
8	MPM	+	+	Delvis +	-	+
9	MPM	+	Delvis +	Delvis +	+	+
10	MPM	+	Delvis +	Delvis +	-	+
11	MPM	+	Delvis +	Delvis +	-	+
12	MPM	+	Delvis +	-	-	+
13	MPM	+	Delvis +	-	+	+
14	MPM	+	Delvis +	-	-	+
15	MPM	+	Delvis +	-	-	+
16	MPM	+	- **	-	-	+
17	MPM	+	-	-	+	+
18	MPM	+	+	-	-	+
19	MPM	+	+	-	-	+
20	MPM	+	+	-	+	+
21	BMPM	+	-	-	+	Delvis +
22	BMPM	+	Delvis +	-	-	+
23	BMPM	+	Delvis +	-	+	+
24	BMPM	+	Delvis +	Delvis +	+	+
25	BMPM	+	+	Delvis +	-	+
26	BMPM	+	+	+	+	+
27	HDPMT	+	-	-	-	Delvis +
28	HDPMT	+	Delvis +	-	+	+
29	HDPMT	+	-	-	+	+
30	HDPMT	+	-	-	+	+

Tabell 8: Individuelle resultater i immunhistokjemi inndelt etter biomarkørene.

\* svak og diffus farging. \*\* positiv i få celler.

EMA				
	MPM	BMPM	HDPMT	Totalt n(%)
Positiv	10	2	0	12 (40)
Delvis positiv	7	3	1	11 (37)
Negativ	3	1	3	7 (23)

DESMIN				
	MPM	BMPM	HDPMT	Totalt n(%)
Positiv	0	1	0	1 (3)
Delvis positiv	6	2	0	8 (27)
Negativ	14	3	4	21 (70)

BAP1				
	MPM	BMPM	HDPMT	Totalt n(%)
Positiv	5	4	3	12 (40)
Negativ	15	2	1	18 (60)

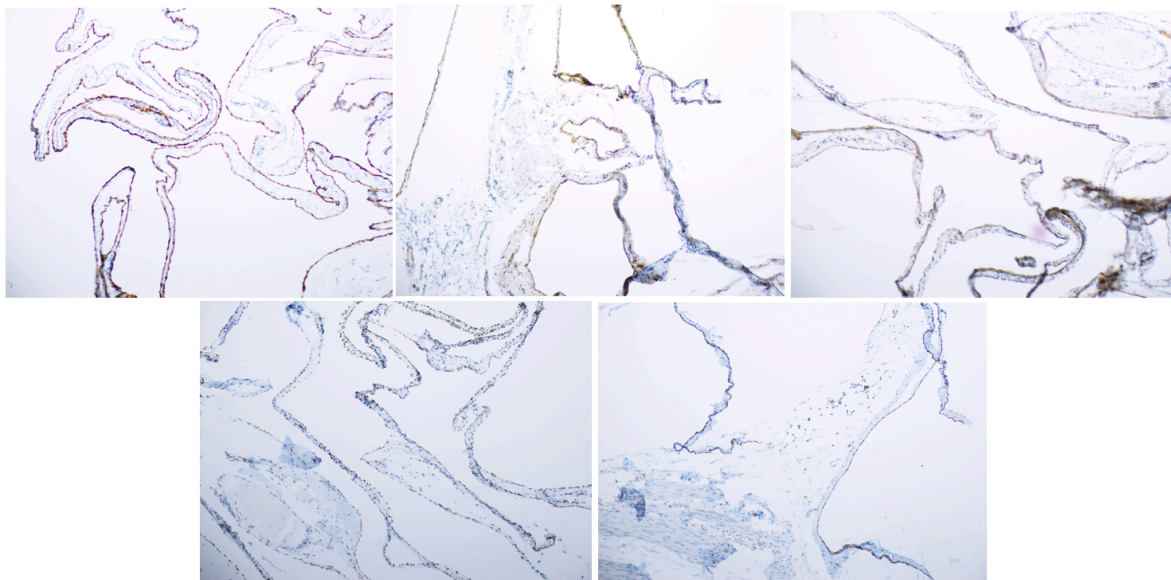
MTAP				
	MPM	BMPM	HDPMT	Totalt n(%)
Positiv	15	5	3	23 (77)
Delvis positiv	5	1	1	7 (23)

Tabell 9: De immunhistokjemiske resultatene for de ulike markørene inndelt etter histologisk diagnose.

MPM= malignt peritonealt mesoteliom, BMPM = benignt multicystisk peritonealt mesoteliom, HDPMT = høyt differensiert papillær mesotelial tumor. EMA = epithelial membrane antigen, BAP1 = BRCA associated protein 1, MTAP = Methylthioadenosine phosphorylase.

I HDPMT-gruppen var det samme pasient som hadde tap av BAP1 og delvis tap av MTAP (Tabell 8). I BMPM-gruppen var det tre pasienter med henholdsvis tap av BAP1 og delvis tap av MTAP. To av disse BMPM-pasientene (én med BAP1 tap og én med delvis tap av MTAP) fikk residiv av sykdommen. Fire av fem (80%) MPM-pasienter med residiv hadde tapt BAP1. Av de døde pasientene i MPM-gruppen hadde 8 av 9 (89%) tapt BAP1, mens det var 6 av 11 (55%) av de som fortsatt lever som har tap av BAP1. For MTAP var det få pasienter med delvis tap. Hos de pasientene som er døde var det delvis tap i 3 av 9 (33%) tilfeller og de som fortsatt lever var det delvis tap i 2 av 11 (18%) tilfeller.

### IHC-bilder



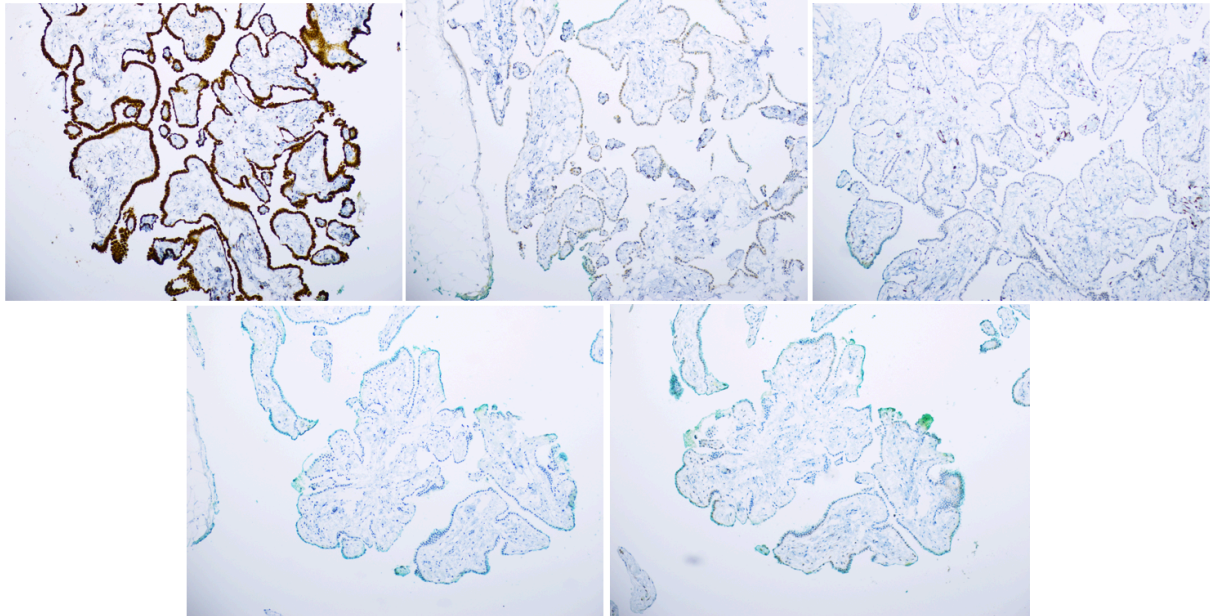
*Figur 10: IHC-fargede snitt av benignt multicystisk peritonealt mesoteliom.*

*Øverst fra venstre: calretinin (+), EMA (+), desmin (delvis +)*

*Nederst fra venstre: BAP1 (-), MTAP (+). Bildene er tatt av patolog, Ben Davidson.*

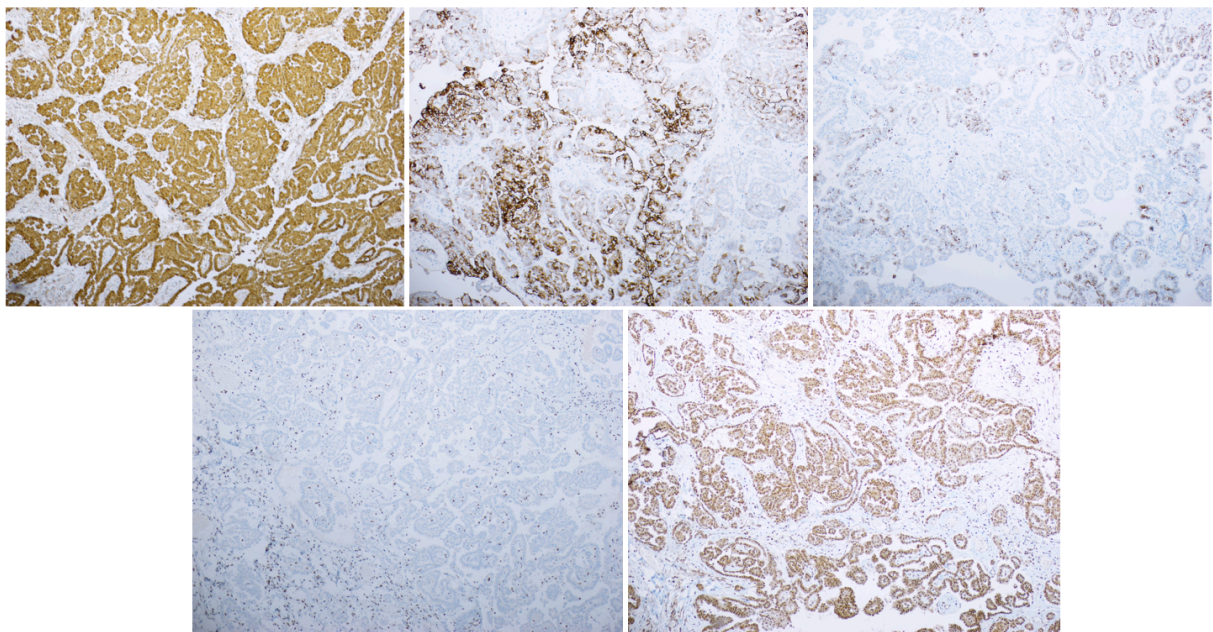
*EMA = epithelial membrane antigen, BAP1 = BRCA associated protein 1, MTAP = Methylthioadenosine phosphorylase.*





*Figur 11: IHC-fargede snitt av høyt differensiert papillær mesotelial tumor. Øverst fra venstre: calretinin (+), EMA (-, cytoplasmafarging), desmin (-). Nederst fra venstre: BAP1 (-), MTAP (delvis +). Bildene er tatt av patolog, Ben Davidson.*

*EMA = epithelial membrane antigen, BAP1 = BRCA associated protein 1, MTAP = Methylthioadenosine phosphorylase.*



*Figur 12: IHC-fargede snitt av malignt peritonealt mesoteliom (epitelioid type). Øverst fra venstre: calretinin (+), EMA (+), desmin (delvis +). Nederst fra venstre: BAP1 (-), MTAP (+). Bildene er tatt av patolog, Ben Davidson.*

*EMA = epithelial membrane antigen, BAP1 = BRCA associated protein 1, MTAP = Methylthioadenosine phosphorylase.*

## 4 Diskusjon

Denne studien er den eneste i Norge på peritonealt mesoteliom som tar utgangspunkt i både kliniske og immunhistokjemiske data. Peritonealt mesoteliom er en sjelden sykdom og derfor har denne studien en liten pasientkohort på 30 pasienter. Disse pasientene er igjen delt inn i mindre grupper på 20 MPM, 6 BMPM og 4 HDPMT som kan føre til at resultatene i denne studien blir usikre. Få pasienter gir også få signifikante funn på de statistiske analysene og derfor har jeg valgt å beskrive funnene der det ikke var mulig å gjøre statistiske analyser. I tillegg er det kort oppfølgingstid på noen av pasientene som igjen gjør resultatene mer usikre. For å oppnå sikrere resultater kunne man inkludert flere pasienter ved å innhente flere pasienters samtykke, eller ventet i flere år for å oppnå en større kohort og lenger oppfølgingstid. Ved sjeldne sykdommer som denne, er også samarbeid om forskningen med andre land og institusjoner viktig for å oppnå større kohorter.

I denne kohorten var kjønnsfordelingen omtrent lik blant MPM-pasientene, men det kun var kvinner med BMPM og HDPMT. Ifølge review-artikkelen til Kim et al. (2017) (4) var også prevalensen av MPM lik mellom kvinner og menn, mens det var flest kvinner som blir diagnostisert med BMPM (83%) (57) og HDPMT (77%) (8) i andre studier. Alderen til pasientene i denne kohorten varierte fra 19-72 år med en median alder for MPM på 57 år, BMPM på 54 år og HDPMT på 42 år. Andre studier viste en median alder for MPM på 50 år (23), BMPM på 45 år (57) og HDPMT på 40 år (8). Disse tallene viser at kjønnsfordeling og alder er omtrent likt som i tidligere studier, men man ser også få tilfeller av menn med BMPM og HDPMT i andre studier og denne studien viser noe høyere median alder for MPM og BMPM.

Resultatene i denne studien viste at sykdomsutbredelsen var større for MPM enn for BMPM og HDPMT, noe man kan forvente ettersom MPM er den maligne subtypen. Median PCI for MPM pasientene var 29 i denne studien og det var ingen signifikant forskjell i overlevelse for MPM med PCI over eller under medianen i denne studien. Det var heller ingen sammenheng mellom høy PCI og residiv. I studien til Yan et al. (23) var median PCI på 20, noe lavere enn i denne studien. PCI under medianen var i tillegg en prognostisk faktor for økt overlevelse (23), noe man ikke ser i denne studien. Dette kan skyldes at det var en høyere median PCI i denne studien og en liten kohort med få pasienter over og under medianen som gjør det vanskelig å sammenligne. Kepenekian et al. (57) viste i sin studie fra 2021 på 60 BMPM-pasienter en

median PCI på 10 (min-maks 4-14). Deraco et al. (58) viste en median PCI på 9 (min-maks 5-16) hos 45 HDPMT-pasienter. I tillegg var en høy PCI (over medianen på 9) en prognostisk faktor for kortere sykdomsfri overlevelse for HDPMT (58). Dette viser omtrent like tall som fra denne studien med median PCI på 12 for BMPM og 6 for HDPMT. Både denne og tidligere studier har vist at sykdomsutbredelsen var større for MPM og tidligere studier fant i tillegg at PCI-score var en prognostisk faktor for sykdomsfri og total overlevelse.

Vi fant en signifikant assosiasjon mellom PCI og CC-score i denne studien. Dette kan man forvente da det er vanskeligere for kirurgene å fjerne større tumormasser som er utbredt over store deler av bukhinnen. I denne studien var det ikke signifikant forskjell i overlevelse på MPM-pasientene med CC-0/1 og CC-2/3, da det var få pasienter med CC-2/3. Tallene viste dog en større andel dødsfall blant pasienter med CC-2/3, noe som er naturlig da det fremdeles er tumormasser igjen i bukhinnen etter kirurgi og dette regnes som en palliativ behandling. Ifølge Yan et al. (23) var CC-0/1 en prognostisk faktor assosiert med økt overlevelse. Dette viser at lavere PCI gir økt sannsynlighet for maksimal cytoreduktiv kirurgi (CC-0/1), og dermed økt overlevelse.

De fleste pasientene i denne studien fikk en kombinasjon av cisplatin og doxorubicin som HIPEC-medikament. Kun to pasienter (8%) fikk Mitomycin C. En studie av Blackham et al. (59) fra 2010 viste en signifikant forskjell i 1-, 2- og 3- års overlevelse hos pasientene som fikk Mitomycin C vs. Cisplatin som HIPEC-medikament. Median overlevelse var 40,8 vs. 10,8 mnd for Cisplatin vs. Mitomycin C ( $p = 0.22$ ). Disse tallene kan ha vært medvirkende til at MPM-pasienten som fikk Mitomycin C grunnet allergisk reaksjon på Cisplatin, også fikk immunterapi i adjuvant setting, da det var presisert i off-label søknaden at pasienten fikk Mitomycin C som HIPEC-medikament.

Ifølge den store multi-institusjonale studien til Yan et al. (23) var lymfeknutemetastaser og ekstraabdominale metastaser en prognostisk faktor assosiert med kortere total overlevelse for pasienter behandlet med CRS-HIPEC. Før CRS-HIPEC hadde 6% lymfeknutemetastaser og 3% hadde ekstraabdominale metastaser (23). Dette viser at det er få pasienter som får metastaser og at de som får det har en mye dårligere prognose. I denne studien hadde kun to pasienter lymfeknutemetastaser og ekstraabdominale metastaser før CRS-HIPEC. Tre pasienter med ekstraabdominale metastaser ble vurdert som inoperable. Dårlig prognose ved

metastaser kan derfor både skyldes at noen blir vurdert som inoperable og at de som likevel blir behandlet med CRS-HIPEC har en kortere total overlevelse enn de uten metastaser.

CRS-HIPEC er en operasjon med høy morbiditet, og det har blitt diskutert i litteraturen hvorvidt nytten av denne behandlingen overveier risikoen for BMPM og HDPMT. I denne studien så man ingen assosiasjon mellom PCI og accordion og halvparten av pasientene med BMPM fikk alvorlige komplikasjoner som krevde reoperasjon (accordion 4). Pasientene med HDPMT fikk kun milde og moderate komplikasjoner. I studien til Kepenekian et al. (57) fikk 22% av pasientene med BMPM alvorlige postoperative komplikasjoner. Deraco et al. (58) viste at 24% av pasientene med HDPMT fikk alvorlige komplikasjoner, der én pasient døde postoperativt. Dette viser at de lavgradige maligne typene som har en betydelig bedre prognose enn MPM, også får alvorlige komplikasjoner, og dette er grunnen til at kirurgene ved Radiumhospitalet de siste årene har vært mer tilbakeholdne med å operere disse pasientene.

Det var 7 pasienter som fikk residiv i denne studien, 5 (45%) i MPM-gruppen og 2 (33%) i BMPM-gruppen. I studien til Heller et al. (60) fikk 42% av 113 MPM-pasienter residiv, med en median sykdomsfri overlevelse på 38,5 mnd. Sammenlignet med denne studien var det omtrent like stor andel av pasientene som fikk residiv, men median sykdomsfri overlevelse var lavere i denne studien (14 mnd) som kan skyldes få pasienter og kort oppfølgingstid. I studien til Kepenekian et al. (57) fikk 12 BMPM-pasienter (20%) residiv med en median sykdomsfri overlevelse på 9,1 år. Fire av disse pasientene fikk ikke HIPEC, kun CRS. Dette bekrefter at det er en langsomt progredierende sykdom og at man eventuelt kan vente og observere utviklingen før CRS-HIPEC. Da skal man være klar over muligheten for malign transformasjon som tidligere har blitt beskrevet (61). I denne studien fikk BMPM-pasientene tidlig residiv (etter 3 og 16 mnd), lesjonene ble fjernet og pasientene har siden vært sykdomsfrie i 10 år og 7,5 år. Dette viser muligheten for at kun CRS kan være et behandlingsalternativ for BMPM. Ingen av de 4 pasientene med HDPMT fikk residiv i denne kohorten. I studien til Sun et al. (8) fikk heller ingen HDPMT-pasienter residiv. Én pasient fikk dog malign transformasjon etter 15 år fra diagnostidspunkt. Ifølge Deraco et al. (58) fikk 8 HDPMT-pasienter (18%) residiv innen fem år etter CRS-HIPEC. Disse tallene viser at det ikke er uvanlig at BMPM og HDPMT får residiv, men det er en større andel MPM-pasienter som får residiv og MPM har en mye kortere sykdomsfri overlevelse.



Fem års total overlevelse fra CRS-HIPEC var på 51% for MPM-pasientene i denne studien. Ifølge Yan et al. (23) var 5-års overlevelse på 47%, og en median overlevelse på 53 mnd for MPM behandlet med CRS-HIPEC. Dette viser en liten forskjell i fem-års overlevelse, selv om det var kort oppfølgingstid på noen av pasientene i denne studien. Median total overlevelse for alle pasientene med MPM i denne studien var litt lavere (45 mnd), men dette var forventet da vi inkluderte de inoperable for å få ett tall på median overlevelse i denne kohorten. I en norsk kreftregister-studie var median overlevelse blant epitelioide MPM 43,3 mnd uavhengig av behandling (10) og det er veldig likt median overlevelse i denne studien. For de pasientene i denne studien som ikke fikk CRS-HIPEC varierer overlevelsen fra 17-70 mnd. Dette viser en stor spredning i overlevelse blant de inoperable pasientene og understreker den individuelle forskjellen i respons på systemisk kjemoterapi. I denne studien var det én pasient med BMPM som døde, men mest sannsynlig av en annen dødsårsak. I to ulike studier på til sammen 100 pasienter med BMPM var det heller ingen som døde i oppfølgingsperioden (57, 62). Det var heller ingen dødsfall blant HDPMT i denne studien, men studien til Deraco et al. (58) fastslo 4 dødsfall blant 44 pasienter. Sun et al. (8) derimot beskriver ingen dødsfall som var forårsaket av HDPMT. Dette bekrefter at MPM har en mye dårligere overlevelse og at BMPM og HDPMT har en god prognose med svært få dødsfall.

### **Immunterapi**

Det er gjort lite forskning på behandling med immunterapi hos pasienter med MPM, og derfor er det svært interessant å se at to pasienter i denne kohorten som har blitt behandlet med Nivolumab har hatt god effekt. På grunn av kort oppfølging er det ikke mulig å si noe om effekten av immunterapi hos de to pasientene som fikk immunterapi i en adjuvant og i en palliativ setting, men det blir interessant å følge med på disse pasientene videre. For pasienten som får immunterapi i adjuvant setting blir det vanskelig å avgjøre om effekten skyldes behandlingen med CRS-HIPEC eller immunterapi. Pasienten med bifasisk type fikk residiv allerede 3mnd etter operasjon, og denne typen av har i tidligere studier vist en dårligere prognose med en median overlevelse på 13 mnd (18). Pasienten har hatt en svært god effekt av Nivolumab og lever fortsatt 66 mnd etter CRS-HIPEC og 57 mnd etter oppstart med immunterapi. Pasienten har hatt stabil tumor to år etter avsluttet behandling med immunterapi og det tyder også på at behandlingen har hatt god effekt. Den andre pasienten hadde også god respons på Nivolumab med størrelsesreduksjon av levermetastase, stabil tumor i to år på behandling, og progresjon etter 6 mnd behandlingspause. En tidligere studie der Nivolumab ble gitt til 4 pasienter med langtkommen, behandlingsrefraktær MPM viste en median

overlevelse på 6,6 mnd etter oppstart med immunterapi (33). Den beskjedne effekten i den studien kan komme av at immunterapi ble startet ved langtkommen sykdom. De to pasientene i denne studien fikk immunterapi kort tid etter påvist residiv. En nylig publisert studie fikk 20 MPM-pasienter en kombinasjon av VEGF-hemmer (vascular endothelial growth factor) og PD-L1 hemmer og 40% av pasientene hadde respons på behandlingen med en median responstid på 12,8 mnd (63). Dette viser at MPM har variabel respons på immunterapi og at mer forskning er nødvendig for å identifisere hvilke pasienter som kan ha nytte av denne behandlingen.

MSI-H (microsatellite-instability-high) tumores har vist god effekt av PD-L1 hemmer ved kolorektal cancer (64), men i denne studien hadde 3 av pasientene MSS tumores. Det er derfor usikkert om MSI kan brukes som prediktiv faktor for immunterapi hos MPM-pasienter. Man kan tenke seg at PD-L1 uttrykk i cellene kan predikere effekt av PD-L1 hemmer, og en av pasientene hadde PD-L1 uttrykk i > 50% av tumorcellene. Det var dog ikke signifikant forskjell i respons på immunterapi hos MPM-pasienter med ulik PD-L1-uttrykk ifølge Raghav et al. (63), men det var kun 8 pasienter med respons i studien. En studie av Chapel et al. (65) viste at det var høyere ekspresjon av PD-L1 i peritoneale mesoteliomer enn pleurale. Det har blitt forsket mest på effekt av immunterapi hos pleurale mesoteliomer, men dette viser at resultatene muligens ikke er overførbare til peritonealt mesoteliom og at det kreves mer forskning på immunterapi med større MPM-kohorter.

### **Immunhistokjemi**

Immunhistokjemi metoden gir pålitelige resultater grunnet flere måter å oppdage uspesifikk farging på, som pos kontroll, negativ kontroll og intern kontroll i selve snittet. Ulike resultater ved immunhistokjemi kan skyldes ulik subjektiv tolkning fra patolog til patolog, og ulik avgrensning for positive og negative resultater. I denne studien skal antistoffene påvise det proteinet vi er ute etter for calretinin, EMA, desmin og BAP1, men for MTAP er vi ute etter en co-delesjon av CDKN2A. MTAP antistoffet hadde en sensitivitet på 59% og en spesifisitet på 100% for CDKN2A delesjon (38). Dette vil si at MTAP antistoffet ikke vil fange opp alle tumores med CDKN2A delesjon, men at alle tumores med MTAP delesjon også har CDKN2A delesjon. Dette gjør MTAP resultatene noe usikre, og for å få sikrere resultater kunne vi i tillegg analysert tumorvevet med andre molekylære analyser.

Calretinin, EMA og desmin er etablerte markører for mesoteliomer og jeg vil derfor fokusere på BAP1 og MTAP videre i diskusjonen. Av MPM hadde 75% tapt BAP1 i denne studien sammenlignet med 79% tap for MPM og 87% tap for alle maligne mesoteliomer i Davidson et al. (16). HDPMT har vanligvis ikke tap av BAP1 (17), men i denne studien var det én HDPMT med tap av BAP1. Studien til Chapel et al. (38) viste IHC-tap av MTAP i 40% av pleurale mesoteliomer. Til sammenligning hadde kun 23% delvis tap av MTAP i denne studien og vi hadde derfor forventet flere vevsprøver med tap av MTAP. Det er dog ikke sikkert at MTAP-resultatene er like for pleurale og peritoneale mesoteliomer. For å undersøke dette nærmere har vi utvidet kohorten og MTAP-resultatene på flere pleurale og peritoneale mesoteliomer ved Radiumhospitalet blir nå analysert og det blir spennende å se resultatene.

BAP1 og CDKN2A er tumorsuppressorgener og pasienter med kimbane-mutasjon i disse genene har økt risiko for å utvikle ulike kreftformer, som mesoteliom og melanom (66). Det er derfor interessant å se om tap av disse vil gi en dårligere prognose for MPM og undersøke om BAP1 og MTAP kan regnes som prognostiske markører. Resultatene fra denne studien viste at få tilfeller av BMPM og HDPMT, som har vanligvis bedre prognose, hadde tap av BAP1 og MTAP. Fire av fem MPM med residiv hadde tap av BAP1. I tillegg hadde en større andel av de pasientene med MPM som døde, tap av BAP1. Statistiske analyser ga ikke sikre resultater på at tap av BAP1 gir dårligere prognose. Singhi et al. (67) fant heller ingen dårligere progresjonsfri eller total overlevelse for MPM med tap av BAP1, men fant derimot en signifikant forskjell i progresjonsfri overlevelse og total overlevelse for de pasientene med både homozygot CDKN2A delesjon og hemizygot NF2 delesjon. Krasinkas et al. (68) fant også en dårligere overlevelse hos MPM-pasienter med CDKN2A-MTAP delesjon. I denne studien var det veldig liten forskjell i tap av MTAP hos de pasientene som var døde og de som fortsatt lever. Dette kan skyldes at ikke alle med CDKN2A delesjon har tap av MTAP (sensitivitet på 59%), få pasienter eller kort oppfølgingstid hos noen av pasientene. BAP1 har også blitt diskutert som mulig prediktiv markør for immunterapi ved MPM, da tap av BAP1 var assosiert med økt inflammatorisk mikromiljø rundt tumor (69). Dette var dog en liten studie, og større studier og mer forskning kreves for å utelukke eventuelle konfunderende faktorer, som tap av PBRM1 (70).

## 5 Konklusjon

Denne oppgaven er den første som har gitt en god klinisk oversikt over pasienter med peritonealt mesoteliom i Norge. Vi har undersøkt ulike kliniske opplysninger som kjønn, alder, accordion, PCI, CC-score, sykdomsfri overlevelse og total overlevelse på 30 pasienter med peritonealt mesoteliom. Selv om kohorten var liten, var likevel de fleste resultatene i denne studien omtrent like som i større studier. Denne studien har også vist at immunterapi (PD-L1 – hemmer) kan være et mulig nytt behandlingsalternativ ved residiv etter CRS-HIPEC, da to pasienter hadde god effekt av denne behandlingen. Det er nødvendig med mer forskning på større kohorter for å se effekten av immunterapi og undersøke nærmere hvilke pasienter som har god effekt. I tillegg har vi i denne oppgaven sett på resultatene fra immunhistokjemiske analyser med calretinin, EMA, desmin, BAP1 og MTAP. MTAP som markør for CDKN2A-delesjon har blitt lite undersøkt tidligere og denne studien er til nå den eneste med MTAP-analyser på peritoneale mesoteliomer. Vi fikk noe lavere tap av MTAP enn tidligere studier på pleurale mesoteliomer og vi har allerede utvidet kohorten og analysert flere peritoneale og pleurale mesoteliomer med MTAP. Denne oppgaven og disse utvidede analysene vil dermed gi økt kunnskap om hvilke molekylære og genetiske forandringer disse pasientene har og denne nye kunnskapen kan forhåpentligvis bidra til å finne mer målrettede behandlingsformer.

## 6 Referanseliste:

1. Roald B, Sauer T, Klepp O. Kreft [Internett]. Store medisinske leksikon; [updated 14. des 2020; cited 26.mai 2021]. Available from: <https://sml.snl.no/kreft>.
2. Hofslie E. Karsinomatose [Internett]. Store medisinske leksikon; [updated 15. des 2020; cited 12. mai 2021]. Available from: <https://sml.snl.no/karsinomatose>.
3. Hiriart E, Deepe R, Wessels A. Mesothelium and Malignant Mesothelioma. *J Dev Biol.* 2019;7(2).
4. Kim J, Bhagwandin S, Labow DM. Malignant peritoneal mesothelioma: a review. *Ann Transl Med.* 2017;5(11):236.
5. Attanoos RL, Gibbs AR. Pathology of malignant mesothelioma. *Histopathology.* 1997;30(5):403-18.
6. Bridda A, Padoan I, Mencarelli R, Frego M. Peritoneal mesothelioma: a review. *MedGenMed.* 2007;9(2):32.
7. Lee M, Alexander HR, Burke A. Diffuse mesothelioma of the peritoneum: a pathological study of 64 tumours treated with cytoreductive therapy. *Pathology.* 2013;45(5):464-73.
8. Sun M, Zhao L, Weng Lao I, Yu L, Wang J. Well-differentiated papillary mesothelioma: A 17-year single institution experience with a series of 75 cases. *Ann Diagn Pathol.* 2019;38:43-50.
9. Elbouhaddouti H, Bouassria A, Mouaqit O, Benjelloun el B, Ousadden A, Mazaz K, et al. Benign cystic mesothelioma of the peritoneum: a case report and literature review. *World J Emerg Surg.* 2013;8(1):43.
10. Brustugun OT, Nilssen Y, Eide IJZ. Epidemiology and outcome of peritoneal and pleural mesothelioma subtypes in Norway. A 20 year nation-wide study. *Acta Oncol.* 2021;60(10):1250-6.
11. Acherman YI, Welch LS, Bromley CM, Sugarbaker PH. Clinical presentation of peritoneal mesothelioma. *Tumori.* 2003;89(3):269-73.
12. Chand MT, Edens J, Lin T, Anderson I, Berri R. Benign multicystic peritoneal mesothelioma: literature review and update. *Autops Case Rep.* 2020;10(3):e2020159.
13. Sugarbaker PH, Yan H, Grazi RV, Shmookler BM. Early localized peritoneal mesothelioma as an incidental finding at laparoscopy. Report of a case and implications regarding natural history of the disease. *Cancer.* 2000;89(6):1279-84.

14. Hjerpe A, Ascoli V, Bedrossian C, Boon M, Creaney J, Davidson B, et al. Guidelines for cytopathologic diagnosis of epithelioid and mixed type malignant mesothelioma. Complementary statement from the International Mesothelioma Interest Group, also endorsed by the International Academy of Cytology and the Papanicolaou Society of Cytopathology. *Cytojournal*. 2015;12:26.
15. Davidson B, Zhang Z, Kleinberg L, Li M, Florenes VA, Wang TL, et al. Gene expression signatures differentiate ovarian/peritoneal serous carcinoma from diffuse malignant peritoneal mesothelioma. *Clin Cancer Res*. 2006;12(20 Pt 1):5944-50.
16. Davidson B, Totsch M, Wohlschlaeger J, Hager T, Pinamonti M. The diagnostic role of BAP1 in serous effusions. *Hum Pathol*. 2018;79:122-6.
17. WHO Classification of Tumors Editorial Board. *Female Genital Tumors*. Fifth ed. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2020.
18. Sugarbaker PH, Welch LS, Mohamed F, Glehen O. A review of peritoneal mesothelioma at the Washington Cancer Institute. *Surg Oncol Clin N Am*. 2003;12(3):605-21, xi.
19. Casper ES, Kelsen DP, Alcock NW, Lewis JL, Jr. Ip cisplatin in patients with malignant ascites: pharmacokinetic evaluation and comparison with the iv route. *Cancer Treat Rep*. 1983;67(3):235-8.
20. El-Kareh AW, Secomb TW. A theoretical model for intraperitoneal delivery of cisplatin and the effect of hyperthermia on drug penetration distance. *Neoplasia*. 2004;6(2):117-27.
21. Jacquet P, Sugarbaker PH. Clinical research methodologies in diagnosis and staging of patients with peritoneal carcinomatosis. *Cancer Treat Res*. 1996;82:359-74.
22. Sugarbaker PH. Successful management of microscopic residual disease in large bowel cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1999;43 Suppl:S15-25.
23. Yan TD, Deraco M, Baratti D, Kusamura S, Elias D, Glehen O, et al. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for malignant peritoneal mesothelioma: multi-institutional experience. *J Clin Oncol*. 2009;27(36):6237-42.
24. Janne PA, Wozniak AJ, Belani CP, Keohan ML, Ross HJ, Polikoff JA, et al. Open-label study of pemetrexed alone or in combination with cisplatin for the treatment of patients with peritoneal mesothelioma: outcomes of an expanded access program. *Clin Lung Cancer*. 2005;7(1):40-6.
25. Cashin PH, Jansson Palmer G, Asplund D, Graf W, Syk I. Peritoneal mesothelioma in Sweden: A population-based study. *Cancer Med*. 2019;8(14):6468-75.

26. Magge D, Zenati MS, Austin F, Mavanur A, Sathaiah M, Ramalingam L, et al. Malignant peritoneal mesothelioma: prognostic factors and oncologic outcome analysis. *Ann Surg Oncol*. 2014;21(4):1159-65.
27. Vogelzang NJ, Rusthoven JJ, Symanowski J, Denham C, Kaukel E, Ruffie P, et al. Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol*. 2003;21(14):2636-44.
28. Carteni G, Manegold C, Garcia GM, Siena S, Zielinski CC, Amadori D, et al. Malignant peritoneal mesothelioma-Results from the International Expanded Access Program using pemetrexed alone or in combination with a platinum agent. *Lung Cancer*. 2009;64(2):211-8.
29. Belfiore A, Busico A, Bozzi F, Brich S, Dalleria E, Conca E, et al. Molecular Signatures for Combined Targeted Treatments in Diffuse Malignant Peritoneal Mesothelioma. *Int J Mol Sci*. 2019;20(22).
30. Dolly SO, Migali C, Tunariu N, Della-Pepa C, Khakoo S, Hazell S, et al. Indolent peritoneal mesothelioma: PI3K-mTOR inhibitors as a novel therapeutic strategy. *ESMO Open*. 2017;2(1):e000101.
31. Lund-Andersen C, Nakken S, Nygard S, Fromm B, Aasheim LB, Davidson B, et al. Integrative genomic analysis of peritoneal malignant mesothelioma: understanding a case with extraordinary chemotherapy response. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*. 2019;5(2).
32. Baas P, Scherpereel A, Nowak AK, Fujimoto N, Peters S, Tsao AS, et al. First-line nivolumab plus ipilimumab in unresectable malignant pleural mesothelioma (CheckMate 743): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2021;397(10272):375-86.
33. Becker O, Beaulaton C, Masliah-Planchon J, Servois V, Watson S. Nivolumab activity in advanced refractory malignant peritoneal mesothelioma. *Eur J Cancer*. 2021;144:386-8.
34. Tanaka T, Miyamoto Y, Sakai A, Fujimoto N. Nivolumab for malignant peritoneal mesothelioma. *BMJ Case Rep*. 2020;13(11).
35. Coons AH, Creech, H.J. , Jones, R.N. Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. *Experimental Biology and Medicine*. 1941;47(2):200-2.
36. Biomarkers Definitions Working G. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69(3):89-95.
37. Oldenhuis CN, Oosting SF, Gietema JA, de Vries EG. Prognostic versus predictive value of biomarkers in oncology. *Eur J Cancer*. 2008;44(7):946-53.

38. Chapel DB, Dubuc AM, Hornick JL, Sholl LM. Correlation of MTAP Protein Expression with MTAP and CDKN2A Copy Number in Malignant Pleural Mesothelioma. *Histopathology*. 2021.
39. Wieczorek TJ, Krane JF. Diagnostic utility of calretinin immunohistochemistry in cytologic cell block preparations. *Cancer*. 2000;90(5):312-9.
40. Kawai T, Tominaga S, Hiroi S, Ogata S, Nakanishi K, Kawahara K, et al. Peritoneal malignant mesothelioma (PMM), and primary peritoneal serous carcinoma (PPSC) and reactive mesothelial hyperplasia (RMH) of the peritoneum. Immunohistochemical and fluorescence in situ hybridisation (FISH) analyses. *J Clin Pathol*. 2016;69(8):706-12.
41. Davidson B, Nielsen S, Christensen J, Asschenfeldt P, Berner A, Risberg B, et al. The role of desmin and N-cadherin in effusion cytology: a comparative study using established markers of mesothelial and epithelial cells. *Am J Surg Pathol*. 2001;25(11):1405-12.
42. Yu H, Pak H, Hammond-Martel I, Ghram M, Rodrigue A, Daou S, et al. Tumor suppressor and deubiquitinase BAP1 promotes DNA double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(1):285-90.
43. Bononi A, Yang H, Giorgi C, Patergnani S, Pellegrini L, Su M, et al. Germline BAP1 mutations induce a Warburg effect. *Cell Death Differ*. 2017;24(10):1694-704.
44. Bononi A, Giorgi C, Patergnani S, Larson D, Verbruggen K, Tanji M, et al. BAP1 regulates IP3R3-mediated Ca(2+) flux to mitochondria suppressing cell transformation. *Nature*. 2017;546(7659):549-53.
45. Affar EB, Carbone M. BAP1 regulates different mechanisms of cell death. *Cell Death Dis*. 2018;9(12):1151.
46. Paul Baas RH, Anna K. Nowak, David Rice. *IASLC Thoracic Oncology*: Elsevier; 2018 [cited 6. des 2021]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323523578000536>
47. Larsen S. Nasjonal behandlingstjeneste for hyperterm intraperitoneal kjemoterapi (HIPEC) ved kolorektal kreft, pseudomyksoma peritoneii og peritonealt mesoteliom. Oslo: Oslo universitetssykehus; 2017 [cited 11. mai 2021]. Available from: <https://forskningsprosjekter.ihelse.net/senter/rapport/L-OUS-33/2017>
48. Davidson B. Expression of cancer-associated molecules in malignant mesothelioma. *Biomark Insights*. 2007;2:173-84.
49. Yuan Y, Nymo DA, Stavnes HT, Rosnes AK, Bjorang O, Wu C, et al. Tenascin-X is a novel diagnostic marker of malignant mesothelioma. *Am J Surg Pathol*. 2009;33(11):1673-82.



50. Vintman L, Nielsen S, Berner A, Reich R, Davidson B. Mitogen-activated protein kinase expression and activation does not differentiate benign from malignant mesothelial cells. *Cancer*. 2005;103(11):2427-33.
51. Strasberg SM, Linehan DC, Hawkins WG. The accordion severity grading system of surgical complications. *Ann Surg*. 2009;250(2):177-86.
52. Nielsen O. Immunhistokemisk teknik. In: M. V, editor. *Anvendt immunhistokemi*. 6. ed. Denmark: Bioanalytikeruddannelsen København; 2005. p. 11-46.
53. Buchwalow IB, Böcker W. *Immunohistochemistry: Basics and Methods* [Internet]. Berlin/Heidelberg: Springer; 2010 [cited 11. apr 2021]. Available from: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-642-04609-4>.
54. Kalyuzhny AE. *Immunohistochemistry. Essential elements and Beyond* [Internet]. Switzerland: Springer, Cham; 2016 [cited 10. mai 2021]. Available from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-30893-7\\_5](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-30893-7_5).
55. Dako Denmark A/S. *Dako EnVision FLEX+*. In: *FLEX+ protocol*. Dako Denmark; 2011 [downloaded 11. jan 2022]. Available from: <https://kanidis.gr/wp-content/uploads/EnVision-FLEX-Systems-FLEX.pdf>
56. *General Instructions For Immunohistochemical Staining* [Internet]. Dako; 2009 [cited 16.apr 2021]. Available from: <https://www.agilent.com/cs/library/packageinsert/public/108007002.PDF>.
57. Kepenekian V, Peron J, Goere D, Sgarbura O, Delhorme JB, Eveno C, et al. Multicystic peritoneal mesothelioma treated with cytoreductive surgery followed or not by hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: results from a large multicentric cohort. *Int J Hyperthermia*. 2021;38(1):805-14.
58. Deraco M, Nizri E, Glehen O, Baratti D, Tuech JJ, Bereder JM, et al. Well differentiated papillary peritoneal mesothelioma treated by cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy-the experience of the PSOGI registry. *Eur J Surg Oncol*. 2019;45(3):371-5.
59. Blackham AU, Shen P, Stewart JH, Russell GB, Levine EA. Cytoreductive surgery with intraperitoneal hyperthermic chemotherapy for malignant peritoneal mesothelioma: mitomycin versus cisplatin. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(10):2720-7.
60. Heller DR, Chiuzan C, Taub RN, Leinwand JC, Greene AM, Bates GE, et al. Recurrence of Optimally Treated Malignant Peritoneal Mesothelioma with Cytoreduction and Heated Intraperitoneal Chemotherapy. *Ann Surg Oncol*. 2017;24(13):3818-24.

61. Gonzalez-Moreno S, Yan H, Alcorn KW, Sugarbaker PH. Malignant transformation of "benign" cystic mesothelioma of the peritoneum. *J Surg Oncol*. 2002;79(4):243-51.
62. Zahid A, Clarke L, Carr N, Chandrakumaran K, Tzivanakis A, Dayal S, et al. Outcomes of multicystic peritoneal mesothelioma treatment with cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *BJS Open*. 2021;5(2).
63. Raghav K, Liu S, Overman MJ, Willett AF, Knafl M, Fu SC, et al. Efficacy, Safety, and Biomarker Analysis of Combined PD-L1 (Atezolizumab) and VEGF (Bevacizumab) Blockade in Advanced Malignant Peritoneal Mesothelioma. *Cancer Discov*. 2021;11(11):2738-47.
64. Andre T, Shiu KK, Kim TW, Jensen BV, Jensen LH, Punt C, et al. Pembrolizumab in Microsatellite-Instability-High Advanced Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2020;383(23):2207-18.
65. Chapel DB, Stewart R, Furtado LV, Husain AN, Krausz T, Deftereos G. Tumor PD-L1 expression in malignant pleural and peritoneal mesothelioma by Dako PD-L1 22C3 pharmDx and Dako PD-L1 28-8 pharmDx assays. *Hum Pathol*. 2019;87:11-7.
66. Betti M, Aspesi A, Biasi A, Casalone E, Ferrante D, Ogliara P, et al. CDKN2A and BAP1 germline mutations predispose to melanoma and mesothelioma. *Cancer Lett*. 2016;378(2):120-30.
67. Singhi AD, Krasinskas AM, Choudry HA, Bartlett DL, Pingpank JF, Zeh HJ, et al. The prognostic significance of BAP1, NF2, and CDKN2A in malignant peritoneal mesothelioma. *Mod Pathol*. 2016;29(1):14-24.
68. Krasinskas AM, Bartlett DL, Cieply K, Dacic S. CDKN2A and MTAP deletions in peritoneal mesotheliomas are correlated with loss of p16 protein expression and poor survival. *Mod Pathol*. 2010;23(4):531-8.
69. Shrestha R, Nabavi N, Lin YY, Mo F, Anderson S, Volik S, et al. BAP1 haploinsufficiency predicts a distinct immunogenic class of malignant peritoneal mesothelioma. *Genome Med*. 2019;11(1):8.
70. Ladanyi M, Sanchez Vega F, Zauderer M. Loss of BAP1 as a candidate predictive biomarker for immunotherapy of mesothelioma. *Genome Med*. 2019;11(1):18.