

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Neuropathologie

Prof. Dr. med. Markus Glatzel

Messungen zum Ki-67-Index und zur nukleären p53- Immunoreaktivität von Hypophysenadenomen: Vergleiche von Experten-Schätzungen und computergestützter Morphometrie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Judith Klein
aus Schleiz / Thüringen

Hamburg 2023

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 21.12.2023**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Jörg Flitsch

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Wolfgang Saeger

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	6
1.1 Ki-67.....	7
1.2 p53.....	8
1.3 Arbeitshypothese und Fragestellungen.....	9
2 Material und Methoden.....	10
2.1 Untersuchungsmaterial.....	10
2.2 Bestimmungsmethoden.....	11
2.2.1 Konventionelle Bestimmung des Ki-67-Index und der p53-Expression.....	11
2.2.2 Digitale Analyse des Ki-67-Index und der p53-Expression.....	11
2.3 Statistische Verfahren.....	15
3 Ergebnisse.....	17
3.1 Ergebnisse der Ki-67-Bestimmung in tabellarischer Form.....	17
3.1.1 Ergebnisse der Ki-67-Bestimmung durch zwei Pathologen.....	21
3.1.2 Ki-67-Quantifier (Cognition Master Professional Suite).....	26
3.2 Ergebnisse der p53-Bestimmung in tabellarischer Form.....	31
3.2.1 Ergebnisse der p53-Bestimmung durch zwei Pathologen.....	35
3.2.2 Ergebnisse der p53-Bestimmung durch zwei Pathologen und durch den Quantifier (Cognition Master Profession Suite).....	39
3.3 Statistische Auswertung.....	43
3.3.1 Intraklassenkorrelationskoeffizienten für die Ki-67-Bestimmung.....	43
3.3.2 Intraklassenkorrelationskoeffizienten für die p53-Bestimmung.....	43
3.3.3 Verteilung der digital ermittelten Werte bei kleinen, manuellen Schätzwerten.....	43
3.3.4 Bland-Altman-Plots für die Ki-67-Schätzung.....	45
3.3.5 Bland-Altman-Plots für die p53-Schätzung.....	47
3.3.6 Kreuztabellen für die Ki-67-Schätzung.....	49
3.3.7 Kreuztabellen für die p53-Schätzung.....	53
3.3.8 Überprüfung des Zusammenhangs eines höheren Ki-67-Index und der p53-Expression.....	57
4 Diskussion.....	58
4.1 Allgemeines zu Hypophysenadenomen.....	58
4.2 Schwierigkeiten in der histologischen Bewertung von Adenomen.....	58
4.3 Bisherige Vergleiche der manuellen und digitalen Morphometrie.....	60
4.4 Diskussion der Untersuchungsergebnisse für Ki-67.....	61

4.5	Diskussion der Untersuchungsergebnisse zu p53	63
4.6	Kritische Einordnung der Untersuchungsergebnisse	63
4.7	Schlussfolgerung und Beantwortung der eingangs gestellten Fragen	64
5	Zusammenfassung	69
6	Abkürzungsverzeichnis	71
7	Literaturverzeichnis	72
8	Danksagung	77
9	Eidesstattliche Erklärung	78

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Alle Ergebnisse der Ki-67-Schätzung	17
Tabelle 2: Ki-67-Schätzungen der beiden Pathologen mit weniger als einem Punktwert Unterschied	21
Tabelle 3: Ki-67-Schätzungen der beiden Pathologen mit einem Punktwert Unterschied.....	24
Tabelle 4: Ki-67-Schätzungen der beiden Pathologen mit zwei Punktwerten Unterschied	24
Tabelle 5: Ki-67-Schätzungen beider Pathologen mit mehr als zwei Punktwerten Unterschied	25
Tabelle 6: Konventionelle und digitale Ki-67-Schätzungen mit weniger als einem Punktwert Unterschied.....	26
Tabelle 7: Konventionelle und digitale Ki-67-Schätzungen mit mehr als einem Punktwert Unterschied	28
Tabelle 8: Digitale Untersuchung weicht in Richtung eines Pathologen ab	29
Tabelle 9: Ergebnisse aller p53-Schätzungen.....	31
Tabelle 10: p53-Schätzungen beider Pathologen mit weniger als einem Punktwert Unterschied	35
Tabelle 11: p53-Schätzungen beider Pathologen mit einem Punktwert Unterschied	38
Tabelle 12: p53-Schätzungen beider Pathologen mit zwei Punktwerten Unterschied	38
Tabelle 13: p53-Schätzungen beider Pathologen mit mehr als zwei Punktwerten Unterschied	38
Tabelle 14: Konventionelle und digitale p53-Bestimmung mit einer Abweichung von weniger als einem Punktwert	39
Tabelle 15: Konventionelle und digitale p53-Bestimmung mit einer Abweichung von mehr als einem Punktwert.....	41
Tabelle 16: Konventionelle und digitale p53-Bestimmung mit Abweichungstendenzen	42
Tabelle 17: Kreuztabelle mit Vergleich der Ki-67-Schätzungen beider Pathologen, relative Häufigkeiten von JK.....	49
Tabelle 18: Kreuztabelle zur Ki-67-Schätzung beider Pathologen, relative Häufigkeiten von WS.....	50
Tabelle 19: Kreuztabelle zur Ki-67-Schätzung durch WS und die digitale Analyse, relative Häufigkeiten von WS	51
Tabelle 20: Kreuztabelle zur Ki-67-Schätzung durch WS und das digitale System, relative Häufigkeiten von VM.....	51
Tabelle 21: Kreuztabelle zur Ki-67-Schätzung der JK und das digitale System, relative Häufigkeiten von VM.....	52
Tabelle 22: Kreuztabelle für die Ki-67-Schätzung durch JK und das digitale System, relative Häufigkeiten JK.....	52

Tabelle 23: Kreuztabelle p53-Schätzung beider Pathologen, relative Häufigkeiten von WS	53
Tabelle 24: Kreuztabelle zur p53-Schätzung beider Pathologen, relative Häufigkeiten von JK	54
Tabelle 25: Kreuztabelle zur p53-Schätzung durch WS und das digitale System, relative Häufigkeiten von VM.....	55
Tabelle 26: Kreuztabelle zur p53-Schätzung durch WS und das digitale System, relative Häufigkeiten von WS	55
Tabelle 27: Kreuztabelle zur p53-Schätzung durch JK und das digitale System, relative Häufigkeiten von VM.....	56
Tabelle 28: Kreuztabelle zur p53-Schätzung durch JK und das digitale System, relative Häufigkeiten von JK.....	57

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: HE- gefärbtes Präparat I eines HVL-Adenoms (40 x).....	13
Abbildung 2: Immunhistologische Reaktion Ki-67 zu Präparat I (40 x).....	13
Abbildung 3: Immunhistologische Reaktion p53 zu Präparat I (40 x).....	13
Abbildung 4: HE- gefärbtes Präparat II eines HVL-Adenoms (40 x).....	13
Abbildung 5: Immunhistologische Reaktion Ki-67 zu Präparat II (40 x).....	13
Abbildung 6: Immunhistologische Reaktion p53 zu Präparat II (40 x).....	13
Abbildung 7: Immunhistologische Reaktion Ki-67 (40 x).....	14
Abbildung 8: Auswertung der Reaktion Ki-67 mit dem Quantifier (rot = positive Tumorzellen, grün = negative Tumorzellen).....	14
Abbildung 9: Immunhistologische Reaktion p53 (40 x).....	14
Abbildung 10: Auswertung der Reaktion p53 mit dem Quantifier (rot = positive Tumorzellen, grün = negative Tumorzellen).....	14
Abbildung 11: Streudiagramm zur konventionellen Ki-67-Schätzung durch beide Pathologen.....	21
Abbildung 12: Gegenüberstellung der Ki-67-Schätzung des Untersuchers WS mit dem digitalen System.....	30
Abbildung 13: Gegenüberstellung der Ki-67-Schätzung der Untersucherin JK mit dem digitalen System.....	30
Abbildung 14: Verteilung der digital ermittelten Ki-67-Indices bei Fällen, in den WS einen Index von $\leq 3\%$ schätzte.....	44
Abbildung 15: Verteilung der digital ermittelten Ki-67-Indices bei Fällen, in den JK einen Index von $\leq 3\%$ schätzte.....	44
Abbildung 16: Bland-Altman-Plot für die Ki-67-Schätzung durch beide Pathologen.....	45
Abbildung 17: Bland-Altman-Plot für die Ki-67-Schätzung durch den Pathologen WS und das digitale System VM.....	46
Abbildung 18: Bland-Altman-Plot für die Ki-67-Schätzung durch die Pathologin JK und das digitale System VM.....	46
Abbildung 19: Bland-Altman-Plot für die p53-Schätzung durch beide Pathologen.....	47
Abbildung 20: Bland-Altman-Plot für die p53-Schätzung des Pathologen WS und des digitalen Systems VM.....	48
Abbildung 21: Bland-Altman-Plot für die p53-Schätzung durch die Pathologin JK und das digitale System VM.....	48

1 Einleitung

Das Aufgabengebiet eines Pathologen umfasst zu einem großen Teil die Klassifikation einer Läsion in Patientenprobenmaterial anhand definierter mikroskopischer Merkmale. Aus dem histologischen Bild kann in der Regel ohne Probleme bestimmt werden, ob es sich um eine benigne oder maligne Erkrankung handelt. Im histopathologischen Befundbericht wird aufgrund klar festgelegter Kriterien angegeben, ob eine Entzündung oder ein Tumor vorliegt und wie die Prognose der Erkrankung einzuschätzen ist.

Probleme bei der Unterscheidung zwischen Gut- und Bösartigkeit im histologischen Probenmaterial existieren in nur wenigen Teilbereichen der Pathologie. Hierzu zählen im Besonderen die Tumore der endokrinen Organe, da hierbei nicht einfach aus dem histologischen Bild angegeben werden kann, ob ein Tumor des Patienten metastasiert oder nicht.

Zu den endokrinen Tumoren, die eine besondere Herausforderung für den (Neuro-)Pathologen darstellen, gehören die Neoplasien des Hypophysenvorderlappens. Es ist bisher trotz intensiver Forschung nicht gelungen, klare feingewebliche Kriterien, die eine Aussage zu deren biologischen Verhalten erlauben, zu definieren. Daher wurde und wird der Einsatz zahlreicher immunhistologischer Marker zur Dignitätsbewertung von Hypophysenvorderlappentumoren diskutiert. Gegenstand jahrelanger wissenschaftlicher Diskussionen sind u. a. der Proliferationsmarker Ki-67 und der Apoptosemarker p53.

1.1 Ki-67

Ki-67 ist als wesentlicher Zellzyklusmarker in der klinischen Tumorphathologie etabliert (Gerdes et al. 1983), insbesondere seitdem kommerziell der Paraffin-gängige Marker Mib-1 verfügbar ist (Cattoretti et al. 1992). Ki-67 demonstriert in epithelialen, aber auch mesenchymalen, neuronalen und lymphatischen Tumoren das Proliferationsausmaß durch nukleäre Expression. Diese kann von sehr geringen (1 % oder weniger) bis zu sehr hohen Werten (99 %) variieren, woraus sich ein Index, gemessen an der Prozentzahl der positiven Zellkerne, ergibt (Landolt et al. 1987). Ein niedriger Index korreliert dabei zumeist mit einem langsamerem Wachstum und einer besseren Prognose, ein hoher Index mit schnellerem Wachstum und schlechterer Prognose.

Eine Übertragung dieser Beobachtungen auf Tumoren des Hypophysenvorderlappens war bis dato wissenschaftlich nicht zweifelsfrei möglich. Die Graduierung von HVL-Tumoren, basierend auf dem Proliferationsindex (analog zu endokrinen Tumoren anderer Lokalisationen), wurde daher in die derzeit gültige, 5. Auflage der WHO-Klassifikation nicht aufgenommen. Dennoch wird, neben der klassifikationsrelevanten Bestimmung der Hormonexpression, die immunhistologische Bestimmung der Proliferationsfraktion von der WHO weiterhin empfohlen (Asa et al. 2022).

Der Ki-67-Index weist bei Hypophysentumoren meist sehr geringe Werte aus, er liegt zumeist unter 3 %. Üblicherweise werden Ki-67 Indizes in der täglichen Routine durch Schätzungen (sog. Eyeballing) ermittelt (Castaneda et al. 2017). Wenn dabei nur Unterscheidungen im 10-%-Bereich erforderlich sind, ist dieses durch mit in Schätzungen erfahrenen Pathologen ohne Gefahr größerer Fehler möglich. Im engen Bereich zwischen 1 und 3 % ist demgegenüber trotz aller Erfahrungen des einzelnen Untersuchers mit höheren Fehlerraten zu rechnen. In Studien wurde sowohl eine geringe Konkordanz zwischen verschiedenen Untersuchungen als auch eine moderate Intraobserver-Variabilität bei der Ki-67 Schätzung im Bereich zwischen 2 und 3 % verifiziert (Tang et al. 2012). Abhilfe wäre in diesem Rahmen durch das Vier-Augen-Prinzip (zwei erfahrene Pathologen befunden) möglich, was aber aufgrund der heutigen geringen Fachärztedensität kaum zu bewerkstelligen ist. Bei der Bestimmung des Ki-67-Index zur Graduierung neuroendokriner Tumoren des gastro-entero-pankreatischen Systems wird die Zählung von mindestens 500 bis 2000 Zellen mit Bestimmung der positiven Farbsignale in die-

ser Gruppe empfohlen (Assar Zadegan und Montgomery 2021). Dieses Verfahren ist jedoch sehr zeitaufwendig.

1.2 p53

TP53 gehört zur Gruppe der Tumorsuppressorgene und codiert ein 53 KD nukleäres Phosphorprotein (Baker et al. 1990). Das Protein p53 ist Bestandteil eines komplex regulierten, intrazellulären Mechanismus, der die Zellintegrität beeinflusst. Bei einwirkendem Stress steuert dieses System eine Zelle in Richtung Arrest oder programmierten Zelltod, die Apoptose. Eine Mutation im p53-Gen, die zu einem Ausfall dieser Zellreaktion führt, stellt einen grundlegenden Schritt in der Entstehung einer Vielzahl von Neoplasien dar (Hanahan und Weinberg 2011). Mutationen und der Verlust von Allelen sind mit vielen verschiedenen Malignomtypen assoziiert (Balint und Vousden 2001). Durch immunhistologische Untersuchungen können mutierte Formen des p53-Proteins durch eine nukleäre Farbreaktion visualisiert werden. Aufgrund der geringen Stabilität des Wildtypproteins ist bei fehlender Mutation keine nukleäre Farbreaktion erkennbar.

p53-Mutationen sind in Hypophysenadenomen sehr selten, in Karzinomen aber regelmäßig nachweisbar (Tanizaki et al. 2007, Uzilov et al. 2021). In einer Studie von Harvey im Jahr 1995 wurde bei Mäusen mit Mutationen in beiden Allelen des p53-Gens sowie einem weiteren Gen, das ein Tumorsuppressorprotein codiert, eine frühzeitige Entwicklung von Hypophysentumoren festgestellt (Harvey et al. 1995). Zhou et al. folgerten in einer Veröffentlichung im Jahr 2014, dass p53-Mutationen nicht bei der Initiation einer Hypophysenneoplasie (Sumi et al. 1993), sondern eine Rolle in der fortschreitenden Tumorentwicklung spielen (Zhou et al. 2014).

In einer Untersuchung von Tanizaki aus dem Jahr 2007 wurde festgestellt, dass ein hoher p53-Färbeindex (> 50 % der Tumorzellen) eher mit einer Mutation im p53-Gen assoziiert ist (Tanizaki et al. 2007). Unter Einbeziehung der Ergebnisse von Lopes et al. sei eine immunhistologische Untersuchung für p53 sei nur in Verbindung dann für die Identifikation prognostisch ungünstiger Hypophysenadenome sinnvoll (Lopes et al. 2005).

1.3 Arbeitshypothese und Fragestellungen

Als hilfreich bei der Auswertung immunhistologischer Reaktionen wird zunehmend in vielen Teilbereich der Pathologie die computergestützte, digitale Bildanalyse angesehen.

Der Einsatz der digitalen Bildanalyse zur Bestimmung des Proliferationsindex wurde zunächst an invasiven Mammakarzinomen evaluiert (Zhong et al. 2016). Sie findet zunehmend auch bei der Ermittlung der Ki-67-Rate neuroendokriner Neoplasien des gastro-entero-pankreatischen Systems Anwendung, bei denen speziell die präzise Detektion kleiner Werte von Relevanz ist (Luchini et al. 2022). Die Verwendung bei Tumoren des Hypophysenvorderlappens ist bislang noch nicht wissenschaftlich untersucht worden.

Mit der vorliegenden Arbeit sollen Methoden zur Ki-67- und p53-Bestimmung bei Hypophysentumoren durch Vergleich der Auswertung durch zwei erfahrene Pathologen mit einem digitalen Bildanalyzesystem gegenübergestellt werden. Es wird hierbei der Frage nachgegangen, ob die digitale Auswertung der konventionellen Bestimmung gegenüber eine potenzielle Verbesserung gewährleistet.

Speziell sollen damit folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Inwieweit unterscheiden sich die Schätzungsangaben der beiden erfahrenen Pathologen?
2. Ist daraus die Forderung abzuleiten, bei Hypophysentumoren das Urteil von zwei Pathologen einzufordern?
3. Besteht eine Korrelation zwischen den Ergebnissen der Ki-67-Expression und der p53-Positivität?
4. Führt der Einsatz einer Computergestützten Morphometrie zu einer signifikanten Verbesserung der prognostischen Aussage?

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial

Für die vorliegende Arbeit stand Untersuchungsmaterial des Deutschen Hypophysentumorregisters der Jahre 2013 bis 2015 zur Auswertung zur Verfügung.

Nach den Angaben auf der Webseite der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie ist das Hypophysentumorregister eine „nationale Einrichtung der AG Hypophyse“. Zu den primären Aufgaben gehören die konsiliarische Begutachtung von Läsionen im Bereich der Sellaregion, die Sammlung, Dokumentation und Auswertung der Einsendungen in einem nationalen Register, die Unterstützung und Initiierung wissenschaftlicher Projekte, die Weiterbildung in der Hypophysentumordiagnostik sowie Aktivitäten in der Qualitätssicherung (Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie 2016).

Das Register ist am Institut für Neuropathologie des UKE ; Direktor des Instituts: Prof. Dr. Markus Glatzel, Leiter des Registers: Prof. Dr. Wolfgang Saeger) angesiedelt.

Zur Referenzbegutachtung wird Untersuchungsmaterial, in der Regel in Form eines in formalinfixierten, in einen Paraffinblock eingebetteten Resektionsmaterials, übersandt. Das Gewebe wird häufig durch eine transsphenoidale Operation gewonnen; im Falle einer radikalen Entfernung des Tumorgewebes beinhaltet der Eingriff u. U. auch das Ausfräsen des umgebenden Knochengewebes sowie die Eröffnung des Sinus cavernosus.

Dem Hypophysentumor-Register wurde im betreffenden Zeitraum zur Referenzbegutachtung Material verschiedener Institute für Pathologie und Neuropathologie sowie Kliniken für Neurochirurgie aus ganz Deutschland eingesandt. Von den Kliniken für Neurochirurgie der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf und Erlangen-Nürnberg sowie der Klinik für Neurochirurgie in Minden wurden alle Hypophysenpräparate in das Register aufgenommen.

Von den, dem Hypophysentumorregister übersandten Paraffinblöcken wurden am Institut für Neuropathologie des UKE ca. 4µm dicke, HE- und PAS-gefärbte Schnittpräparate hergestellt. Immunhistologische Untersuchungen zur Darstellung der Expression der Hypophysenhormone STH, Prolaktin, TSH, ACTH, FSH, LH und der Alpha-Untereinheit der Gonadotropine wurden standardmäßig durchgeführt. Des Weiteren wurden die Ki-67- und die p53-Expression bestimmt. Tran-

skriptionsfaktoren wurden im damaligen Zeitraum nicht regelmäßig bestimmt, da diese noch nicht für die Klassifikation erforderlich waren. Auf der Basis dieser Untersuchungen wurden die Hypophysentumoren klassifiziert.

2.2 Bestimmungsmethoden

2.2.1 Konventionelle Bestimmung des Ki-67-Index und der p53-Expression

Die Bestimmung des prozentualen Anteils Ki-67-positiver und p53-positiver Zellen erfolgte an den oben beschriebenen Schnittpräparaten. Zur Auswertung wurden Lichtmikroskope der Firmen Carl Zeiss (Axio Scope.A1) und Olympus (BX-40) verwendet. Diese wurde von zwei Fachärzten für Pathologie unabhängig voneinander durchgeführt. Als positiv wurden braun gefärbte Kerne der Tumorzellen gewertet, angegeben sind jeweils die Prozentwerte der positiven Zellen in Bezug auf alle Zellen.

Die erste Schätzung erfolgte durch den Untersucher WS im Rahmen der Referenzbegutachtung, das Ergebnis wurde schriftlich im Befundbericht festgehalten.

Die zweite Schätzung der beiden Parameter wurde von der Untersucherin JK, ohne Kenntnis der oben genannten Ergebnisse, klinischer Daten oder der Referenzdiagnose durchgeführt.

2.2.2 Digitale Analyse des Ki-67-Index und der p53-Expression

Die Computergestützte Auswertung erfolgte mit dem Modul „Ki-67-Quantifier“ der Cognition Master Professional Suite der Firma VMscope (Berlin), im Folgenden mit VM bezeichnet. Es handelt sich um ein System, das kein vorheriges Training oder eine Kalibrierung bzw. eine sonstige Interaktion mit dem Anwender voraussetzt (Klauschen et al. 2015).

Grundlegendes Prinzip des Ki-67-Quantifiers ist eine objektbasierte Bildauswertung, bei der gleichartige Bildobjekte zusammengefasst werden. Das Objekt kann auf diese Weise vom digitalen Analysesystem als „Zellkern“, und damit letztlich als Zelle, identifiziert werden. Dieser Vorgang wird als Segmentierung bezeichnet. Wienert et al. beschreiben erstmalig in ihrer Arbeit eine Zellkernsegmentierung, die unabhängig von der Eingabe vorheriger Informationen (z. B. Kernform) in das

digitale System ist, da sich bei malignen Neoplasien charakteristische Kerngrößen-schwankungen und infiltrierende Immunzellen mit unterschiedlich großen Zellkernen ergeben (Wienert et al. 2012). Das hier angewandte System segmentiert die Kerne stattdessen aufgrund ihrer Kontur. In einem mehrstufigen Verfahren werden zunächst alle geschlossenen, konvexen Konturen erfasst. Nach einer Konturoptimierung und dem Ausschluss konkaver Konturen erfolgt die Identifikation als „Zellkern“ aufgrund der kernspezifischen Hämatoxylinfärbung, wobei der Abgleich zum Ausschluss anderer Objekte mithilfe eines berechneten Schwellenwerts erfolgt. Diese Art der Zellkernsegmentierung wurde an zahlreichen Zellen aus Hämatoxylin- und Eosin-gefärbten Normal- und Tumorgewebe evaluiert.

Die besagte Methode findet Anwendung im Kontext des Ki-67-Quantifiers und wurde im Jahr 2015 an Stanzbiopsien aus Mammakarzinomen im Rahmen der „GeparTrio Breast Cancer Study“ evaluiert. Die Segmentierung wurde dabei für Zellkerne von Mammakarzinomzellen optimiert. Die Anwendbarkeit immunhistologisch gefärbter Schnittpräparate, einschließlich der Unterscheidung zwischen Ki-67-positiven und -negativen Zellkernen, fußt auf einem Abgleich der immunhistologischen Reaktion und der Gegenfärbung, basierend auf einem daraus errechneten Grenzwert (Klauschen et al. 2015).

Im praktischen Einsatz des Ki-67-Quantifiers lassen sich neben gescannten histologischen Schnittpräparaten auch Fotografien der Präparate unkompliziert, zum Beispiel per Drag-and-Drop, einfügen. Die Auswertung erfolgt innerhalb weniger Sekunden (Klauschen et al. 2015). Sie kann gleichzeitig für jeweils für mehrere Fotografien bzw. Scans durchgeführt werden.

Für die vorliegende Studie wurde für jeden Fall mit der Mikroskopkamera „Jenoptik Gryphax“ ein repräsentatives Bild des HE-Schnitts (209 Bilder) und jeweils drei repräsentative Bilder der immunhistologischen Reaktionen für Ki-67 und p53 erstellt. Insgesamt entstanden 1254 Bilder immunhistologischer Präparate. In die Auswertung wurden alle Fälle mit mindestens 2 auswertbaren Bildern eingeschlossen. Fotografien von 61 Fällen waren aus technischen Gründen mit der digitalen Bildanalyse nicht auswertbar. Die Untersuchung umfasst daher 148 Fälle, bei der Reaktion für p53 waren aus technischen Gründen nur 84 Fälle durch die digitale Analyse auswertbar.

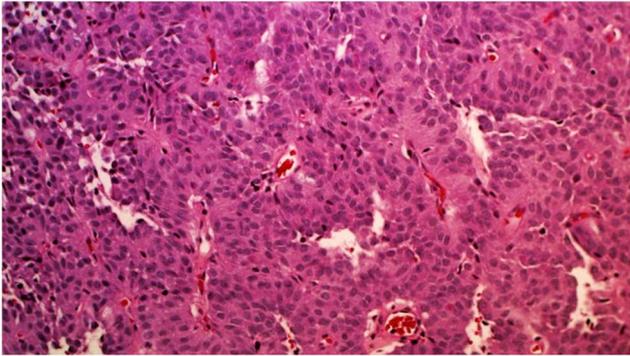


Abbildung 1: HE- gefärbtes Präparat I eines HVL-Adenoms (40 x)

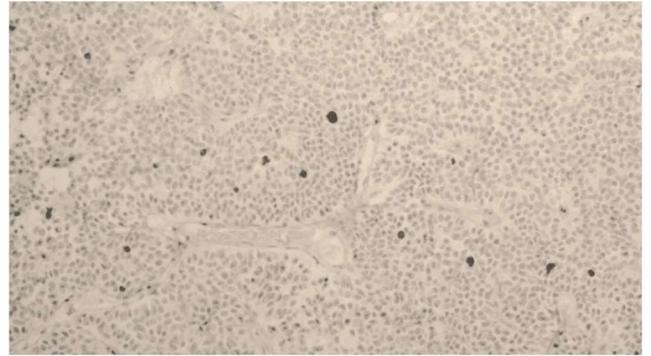


Abbildung 2: Immunhistologische Reaktion Ki-67 zu Präparat I (40 x)

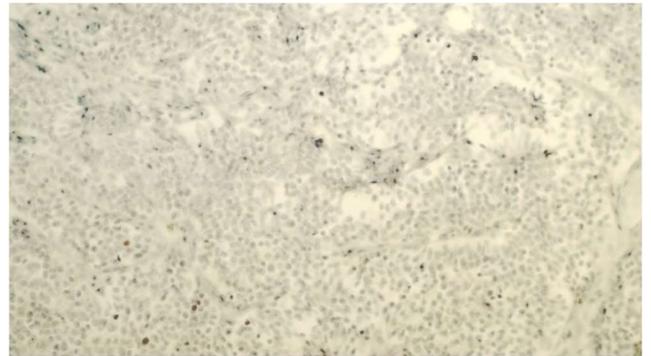


Abbildung 3: Immunhistologische Reaktion p53 zu Präparat I (40 x)

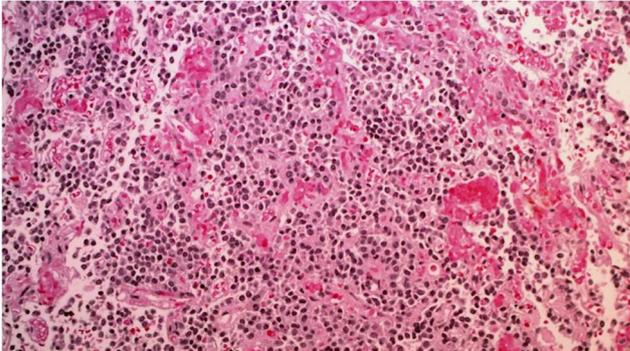


Abbildung 4: HE- gefärbtes Präparat II eines HVL-Adenoms (40 x)

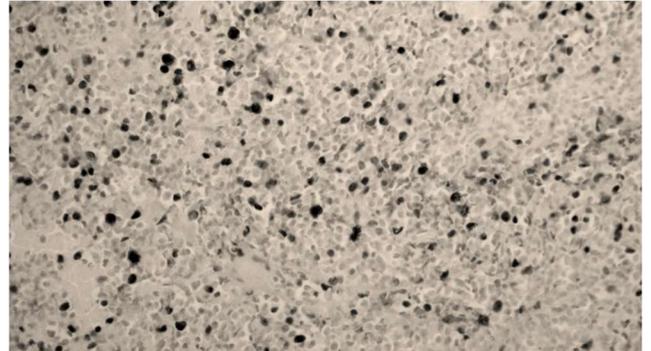


Abbildung 5: Immunhistologische Reaktion Ki-67 zu Präparat II (40 x)

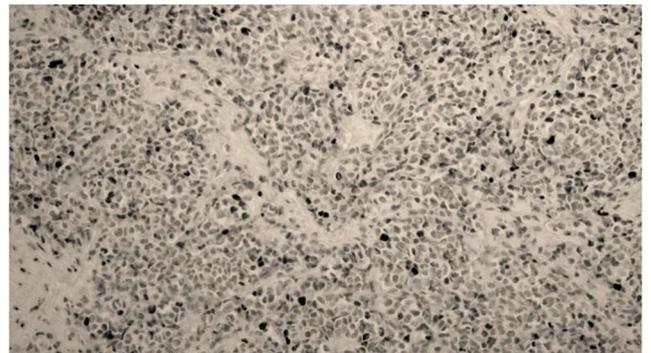


Abbildung 6: Immunhistologische Reaktion p53 zu Präparat II (40 x)

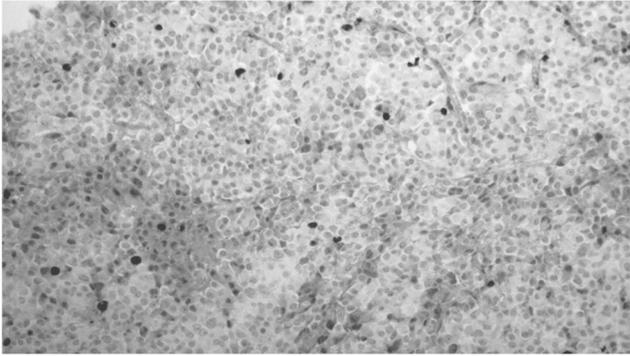


Abbildung 7: Immunhistologische Reaktion Ki-67 (40 x)

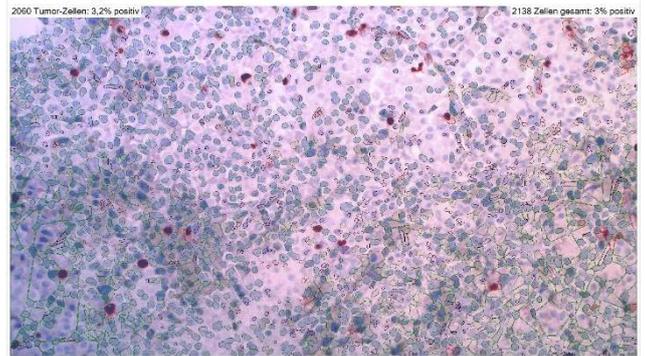


Abbildung 8: Auswertung der Reaktion Ki-67 mit dem Quantifier (rot = positive Tumorzellen, grün = negative Tumorzellen)

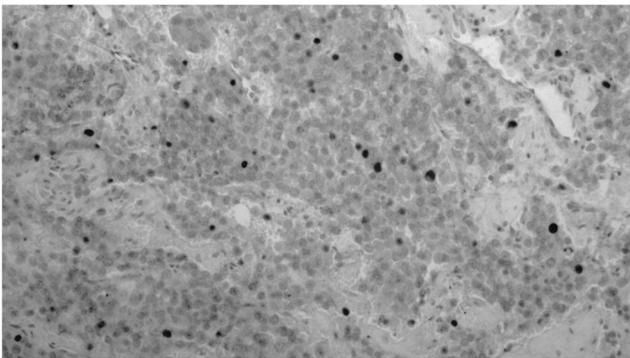


Abbildung 9: Immunhistologische Reaktion p53 (40 x)

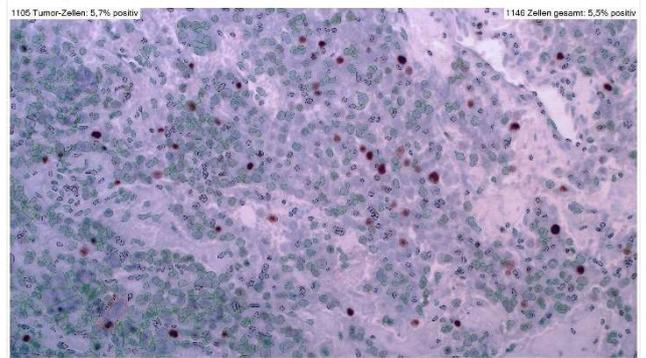


Abbildung 10: Auswertung der Reaktion p53 mit dem Quantifier (rot = positive Tumorzellen, grün = negative Tumorzellen)

2.3 Statistische Verfahren

Für die statistische Auswertung wurde das Programm SPSS (Firma IBM) in der Version 28.0.1.1 verwendet. Da es für die Bestimmung der Proliferationsrate und des p53-Wertes kein absolutes Richtigkeitskriterium gibt, an dem menschliche Schätzungen oder auch neue, computergestützte Bestimmungsmethoden abgeglichen werden könnten, wurden statistische Maße herangezogen, die den Übereinstimmungsgrad verschiedener Messmethoden bestimmen.

In Studien mit ähnlicher Fragestellung an Mammakarzinomen wurde die Aussagekraft der Computermessung am klinischen Verlauf (z. B. Auftreten von Rezidiven) abgeglichen. Prospektive Untersuchungen an HVL-Neoplasien sind jedoch aufgrund der großen Seltenheit von Hypophysenkarzinomen nur mit sehr geringer Probengröße und somit geringer Aussagekraft möglich.

Bei der vorliegenden Untersuchung wurde besonderes Augenmerk auf der Schätzung der Proliferationsfraktion bei geringen Werten ($\leq 3\%$), da ein Ki-67-Grenzwert von 3 % in früheren Auflagen der WHO-Klassifikation als aussagekräftig für das biologische Verhalten eingestuft wurde (Lloyd et al. 2004, Osamura et al. 2017).

Bei der statistischen Auswertung der hier erhobenen Daten musste zunächst eine einheitliche Skalierung der menschlichen Schätzung, die Originalwerte sind hier ordinal skaliert, und der computergestützten Ermittlung (metrisch skalierte Werte) erfolgen.

Wie aus den folgenden Tabellen mit den konventionellen Schätzungen ersichtlich, wird häufig ein Schätzwertbereich angegeben. Die Angabe eines Bereichs berücksichtigt die Tatsache, dass Neoplasien Antigene inhomogen exprimieren können (Castaneda et al. 2017). Diese Inhomogenitäten werden in der Auswertung bspw. des Ki-67-Index bei verschiedenen Tumorentitäten unterschiedlich berücksichtigt. Bei HVL-Adenomen werden sog. Ki-67-“Hot Spots“ nicht explizit ausgewertet, es erfolgt eine gedankliche Mittelung der Signale über den gesamten Schnitt hinweg. Bei Tumoren mit einer starken Expressionsinhomogenität ist es daher üblich, einen Prozentbereich der positiven Reaktionen anzugeben (bspw. 10 % bis 20 %). Das computergestützte Auswertesystem liefert demgegenüber Dezimalzahlen.

Einen Überblick über die Auswerteübereinstimmung gibt zunächst der Intraklassenkorrelationskoeffizient (ICC) nach Pearson (Koch und Spörl 2007).

Grundlage für die Ermittlung der Intraklassenkorrelation ist die Verwendung metrisch skalierten Daten. Die in dieser Studie von beiden Untersuchern vorgenommenen Schätzungen sind ordinal skaliert. Die Umwandlung in die metrische Skala erfolgte durch Bestimmung der Mittelwerte. So ersetzt bspw. ein Wert von 2,5 die Schätzung von „2 bis 3“. Die Angabe von < 1 wurde durch 0,5 ersetzt. Für die Bestimmung des ICC) wurde von einem doppelt gemischten Modell ausgegangen, da jeder der 148 Fälle berücksichtigt wurde und die Auswahl der Untersucher/Rater nicht zufällig erfolgte. Der Typ „absolute Übereinstimmung“ wurde für die Auswertung ausgewählt, da durch die Erstellung der Fotografien durch JK systematische Fehler nicht auszuschließen waren.

Der Bland-Altman-Plot ist eine weitere statistische Möglichkeit, die zum Vergleich zweier Untersuchungsverfahren geeignet ist und diesen grafisch darstellt.

Es werden zunächst die Differenzen beider, durch die zwei unterschiedlichen Verfahren erhaltenen, Messwerte bestimmt. Wesentlich für die grafische Darstellung ist der Mittelwert dieser Differenzen. Die obere und untere Schranke (Konfidenzintervalle) des Plots ergeben sich aus der Summe bzw. Differenz des Differenzmittels und der statistisch ermittelten Standardabweichung multipliziert mit 1,96. Der Mittelwert gibt den systematischen Messfehler beider Untersuchungen, um den diese durchschnittlich schwanken, an.

Der Bland-Altman-Plot stellt, abweichend vom Korrelationskoeffizienten, die Höhe des Unterschieds beider Untersuchungsmethoden.

Eine zusätzliche Möglichkeit des Untersuchungsvergleichs ist die Darstellung der Ergebnisse in Form von Kreuztabellen.

3 Ergebnisse

Der folgende Teil der Arbeit beinhaltet die Ergebnisse für die Schätzungen der Ki-67- und p53-Indizes durch zwei Pathologen (WS und JK) sowie deren Bestimmung durch digitale Bildanalyse (VM).

Die Werte der Untersuchungen werden dabei zunächst in tabellarischer Form gegenübergestellt, um einen Überblick über Übereinstimmungen und Abweichungen durch die verschiedenen Bestimmungsmethoden zu geben.

Es folgen anschließend verschiedene statistische Analysen, die die Grade einer kongruenten oder inkongruenten Indexbestimmung aus unterschiedlichen Blickwinkeln heraus beleuchten. Durch die Anwendung verschiedener statistischer Verfahren ist es möglich, zunächst nicht auffällige Abweichungen zwischen den Untersuchungsmethoden sichtbar zu machen und zu begründen.

3.1 Ergebnisse der Ki-67-Bestimmung in tabellarischer Form

In Tabelle 1 sind alle Ergebnisse der Ki-67-Schätzung an histologischen Schnitten von 148 Hypophysenadenomen, ausgeführt durch beide Pathologen (WS und JK) und durch die digitale Bildanalyse (CognitionMaster der Firma VMscope, VM) angegeben.

Tabelle 1: Alle Ergebnisse der Ki-67-Schätzung

Nummer	Ki-67 WS	Ki-67 JK	Ki-67 VM
1	20	20	16,5
2	1	1	2,1
3	2	1 bis 2	3,1
4	2	< 1	0,4
5	10	10	11,9
6	1	< 1	0,2
7	2	1	0,2
8	3 bis 5	1 bis 2	3,5
9	1 bis 2	1 bis 2	1,5
10	1	1	0,7
11	2 bis 3	2	2,2
12	2 bis 3	1	0,5
13	< 1	< 1	0,6
14	3	< 1	0,8
15	1 bis 2	3	1,3
16	1	< 1	0,5
17	1	1 bis 2	1

18	1	1	0,6
19	1	1	1,2
20	3 bis 5	2 bis 3	3,9
21	< 1	2	0,7
22	1 bis 2	1 bis 2	2,8
23	< 1	< 1	0,3
24	< 1	< 1	1,4
25	5	5	3,9
26	2	1 bis 2	1,3
27	1	< 1	0,6
28	< 1	1	5,4
29	5	1 bis 2	3,8
30	< 1	< 1	2,2
31	2	1	1,4
32	5	2 bis 3	5,9
33	< 1	< 1	0,8
34	1	< 1	1,2
35	1	< 1	0,7
36	< 1	0	3,3
37	1	< 1	0,9
38	3	1	1,8
39	< 1	< 1	2,4
40	< 1	< 1	1,2
41	5	1 bis 2	3,5
42	1	< 1	1,4
43	1	< 1	1,3
44	2 bis 3	1 bis 2	3,6
45	3	1	1,8
46	1	< 1	0,9
47	2	1	1,4
48	5	< 1	0,9
49	2	1	3,4
50	1	1	1,6
51	1	< 1	1
52	1	< 1	0,9
53	< 1	< 1	1,7
54	1	1 bis 2	1,6
55	1	1	1,7
56	< 1	1	1,4
57	1 bis 2	< 1	0,9
58	30	20	26
59	3 bis 4	3 bis 5	3,7
60	< 1	< 1	0,6
61	2	1 bis 2	0,9
62	1	1	1,2
63	1	< 1	0,7
64	5 bis 8	5	5,4
65	< 1	0	0,9

66	3 bis 4	1 bis 2	1,9
67	1	< 1	1,6
68	3	10	5,4
69	1	< 1	1,8
70	1	1	1,5
71	5	3 bis 5	2,9
72	2	1	1,2
73	1	1	0,9
74	1 bis 2	1	1,3
75	5	1 bis 2	3,7
76	1	< 1	0,9
77	1	< 1	0,6
78	3 bis 5	1	1,5
79	< 1	< 1	1,3
80	1	1	1,9
81	< 1	< 1	0,8
82	1	1 bis 2	3,6
83	1	1 bis 2	0,9
84	1	< 1	0,9
85	< 1	< 1	0,6
86	2	1	1,3
87	< 1	< 1	0,7
88	5	3	4,2
89	1	1	1,1
90	1	< 1	1,9
91	1	< 1	0,9
92	1	1	1,2
93	< 1	< 1	1,1
94	< 1	< 1	0,4
95	< 1	< 1	0,6
96	2 bis 3	1	3
97	2 bis 3	1	3,2
98	4	2	2,9
99	3 bis 4	2	2,9
100	6	2	3,7
101	1	< 1	1,2
102	2 bis 3	2	2,4
103	1	1	1,3
104	1	< 1	1,2
105	< 1	< 1	0,8
106	1	< 1	1,1
107	< 1	< 1	0,3
108	< 1	< 1	0,5
109	4	1 bis 2	2,7
110	1	< 1	1,1
111	1	< 1	0,9
112	1	< 1	0,5
113	2	< 1	2,1

114	1	< 1	0,8
115	1	1	1,2
116	3	1	3,5
117	3	1 bis 2	2,7
118	2	1	2,7
119	1	< 1	0,8
120	20 bis 40	20 bis 25	28,6
121	1	< 1	0,9
122	1 bis 2	1	1,4
123	1 bis 2	< 1	0,9
124	3	< 1	1,3
125	2 bis 3	1	0,9
126	1	1	1
127	< 1	< 1	2,3
128	3 bis 5	1 bis 2	2,9
129	1 bis 2	1	1,5
130	5	2 bis 3	3,2
131	< 1	< 1	2,4
132	< 1	< 1	0,3
133	1	0	0,4
134	3	10	12,2
135	1	1	0,7
136	1	< 1	1,7
137	1	< 1	0,1
138	1	< 1	1
139	1 bis 2	1 bis 2	1,6
140	1	1	1,3
141	1	1	2
142	< 1	< 1	1,5
143	1 bis 2	1	1,5
144	1	1	1,8
145	< 1	< 1	1,5
146	2	1 bis 2	2,6
147	1	1	2,1
148	< 1	2	1,7

3.1.1 Ergebnisse der Ki-67-Bestimmung durch zwei Pathologen

Einen Überblick über die konventionelle Ki-67-Schätzung durch WS und JK gibt das Streudiagramm in Abbildung 4.

Anschließend sind die Ergebnisse der manuellen Ki-67-Schätzung in Abhängigkeit vom Grad der Übereinstimmung in verschiedenen Tabellen aufgeführt.

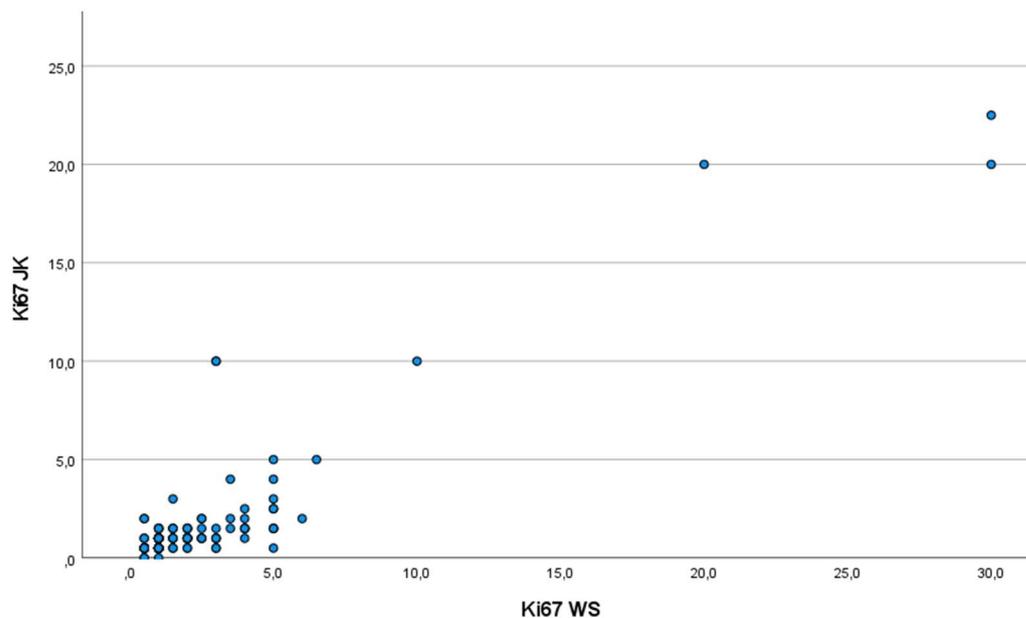


Abbildung 11: Streudiagramm zur konventionellen Ki-67-Schätzung durch beide Pathologen

In Tabelle 2 sind zunächst die Fälle zusammengestellt, bei denen die Ki-67-Schätzungen durch beide Pathologen um weniger als einen Punktwert auseinanderlagen.

Tabelle 2: Ki-67-Schätzungen der beiden Pathologen mit weniger als einem Punktwert Unterschied

Nummer	Ki-67 WS	Ki-67 JK
1	20	20
2	1	1
3	2	1 bis 2
4	10	10
5	1	< 1
6	1 bis 2	1 bis 2
7	1	1
8	2 bis 3	2

9	< 1	< 1
10	1	< 1
11	1 bis 2	1 bis 2
12	1	1
13	1 bis 2	1 bis 2
14	< 1	< 1
15	< 1	< 1
16	5	5
17	2	1 bis 2
18	1	< 1
19	< 1	1
20	< 1	< 1
21	< 1	< 1
22	1	< 1
23	1	< 1
24	< 1	0
25	1	< 1
26	< 1	< 1
27	< 1	< 1
28	1	< 1
29	1	< 1
30	1	< 1
31	1	1
32	1	< 1
33	1	< 1
34	< 1	< 1
35	1	1 bis 2
36	1	1
37	< 1	1
38	3 bis 4	3 bis 5
39	< 1	< 1
40	2	1 bis 2
41	1	1
42	1	< 1
43	5 bis 8	5
44	< 1	0
45	1	< 1
46	1	< 1
47	1	1
48	5	3 bis 5
49	1	1
50	1 bis 2	1
51	1	< 1
52	1	< 1
53	< 1	< 1
54	1	1
55	< 1	< 1
56	1	1 bis 2

57	1	1 bis 2
58	1	< 1
59	< 1	< 1
60	< 1	< 1
61	1	1
62	1	< 1
63	1	< 1
64	1	1
65	< 1	< 1
66	< 1	< 1
67	< 1	< 1
68	1	< 1
69	2 bis 3	2
70	1	1
71	1	< 1
72	< 1	< 1
73	1	< 1
74	< 1	< 1
75	< 1	< 1
76	1	< 1
77	1	< 1
78	1	< 1
79	1	< 1
80	1	1
81	1	< 1
82	20 bis 40	20 bis 25
83	1	< 1
84	1	1
85	< 1	< 1
86	1 bis 2	1
87	< 1	< 1
88	< 1	< 1
89	1	0
90	1	1
91	1	< 1
92	1	< 1
93	1	< 1
94	1 bis 2	1 bis 2
95	1	1
96	1	1
97	< 1	< 1
98	1 bis 2	1
99	1	1
100	< 1	< 1
101	2	1 bis 2
102	1	1

In den folgenden Tabellen (Nummer 4 bis 6) werden Schätzwerte mit einem Unterschied von einem Punktwert oder mehr erfasst: Tabelle 4 stellt Fälle mit einem Punkt Unterschied, Tabelle 5 mit zwei Punkten und Tabelle 6 mit mehr als zwei Punkten Differenz zusammen.

Tabelle 3: Ki-67-Schätzungen der beiden Pathologen mit einem Punktwert Unterschied

Nr.	Ki-67 WS	Ki-67 JK
1	2	< 1
2	2	1
3	2 bis 3	1
4	1 bis 2	3
5	< 1	2
6	2	1
7	2	1
8	2	1
9	2	< 1
10	3	1 bis 2
11	2	1
12	2 bis 3	1
13	< 1	2

Tabelle 4: Ki-67-Schätzungen der beiden Pathologen mit zwei Punktwerten Unterschied

Nummer	Ki-67 WS	Ki-67 JK
1	3 bis 5	1 bis 2
2	2 bis 3	1
3	3	< 1
4	1 bis 2	3
5	5	2 bis 3
6	3	1
7	2 bis 3	1 bis 2
8	3	1
9	3 bis 4	1 bis 2
10	5	3
11	4	2
12	3 bis 4	2
13	4	1 bis 2
14	3	< 1
15	2 bis 3	1
16	3 bis 5	1 bis 2

Tabelle 5: Ki-67-Schätzungen beider Pathologen mit mehr als zwei Punktwerten Unterschied

Nummer	Ki-67 WS	Ki-67 JK
1	5	2 bis 3
2	5	1 bis 2
3	30	20
4	3	10
5	6	2
6	4	1 bis 2
7	3	< 1
8	3 bis 5	1 bis 2
9	5	2 bis 3

In der Zusammenschau bestehen Abweichungen von weniger als einem Punktwert bei der Schätzung durch beide Pathologen in 102 Untersuchungen. Bei der Zusammenstellung werden Werte bspw. von < 1 % und 1 % gleichgesetzt, da bei einer Spanne von 0 % bis 100 % die Differenz von weniger als eins marginal ist.

Ein Unterschied von einem oder mehr Prozent ergab sich in 38 Fällen. In 13 Untersuchungen lag eine Abweichung von einem Punkt, in 16 Untersuchungen von zwei Punkten und in neun ein Unterschied von mehr als zwei Punkten vor.

Bei der Ki-67-Schätzung durch die beiden Pathologen stellte sich eine hohe Übereinstimmung der Bewertung heraus, eine geringe Tendenz zu größeren Differenzen zeigte sich bei hohen Proliferationsfraktionen.

3.1.2 Ki-67-Quantifier (Cognition Master Professional Suite)

Tabelle 6 stellt alle Ergebnisse der konventionellen und digitalen Ki-67-Bestimmung mit einem Unterschied von weniger als einem Punktwert gegenüber. Auch in dieser Übersicht wurden Fälle als annähernd gleichwertig betrachtet, die einen Schätzunterschied von weniger als einem Punktwert aufwiesen.

Tabelle 6: Konventionelle und digitale Ki-67-Schätzungen mit weniger als einem Punktwert Unterschied

Nummer	Ki-67 WS	Ki-67 JK	Ki-67 VM
1	1	< 1	0,2
2	1 bis 2	1 bis 2	1,5
3	1	1	0,7
4	2 bis 3	2	2,2
5	< 1	< 1	0,6
6	1	< 1	0,5
7	1 bis 2	1 bis 2	1
8	1	1	1,2
9	3 bis 5	2 bis 3	3,9
10	< 1	< 1	0,3
11	< 1	< 1	1,4
12	2	1 bis 2	1,3
13	1	< 1	0,6
14	< 1	< 1	0,8
15	1	< 1	1,2
16	1	< 1	0,7
17	1	< 1	0,9
18	< 1	< 1	1,2
19	1	< 1	1,4
20	1	< 1	1,3
21	2 bis 3	1 bis 2	3,6
22	1	< 1	0,9
23	1	1	1,6
24	1	< 1	1
25	1	< 1	0,9
26	1	1	1,7
27	< 1	1	1,4
28	3 bis 4	3 bis 5	3,7
29	< 1	< 1	0,6
30	1	1	1,2
31	1	< 1	0,7
32	5 bis 8	5	5,4
33	< 1	0	0,9
34	1	< 1	1,6
35	1	1	1,5
36	2	1	1,2

37	1	1	0,9
38	1 bis 2	1	1,3
39	1	< 1	0,9
40	1	< 1	0,6
41	< 1	< 1	1,3
42	< 1	< 1	0,8
43	1	1 bis 2	0,9
44	1	< 1	0,9
45	< 1	< 1	0,6
46	< 1	< 1	0,7
47	1	1	1,1
48	1	< 1	1,9
49	1	< 1	0,9
50	1	1	1,2
51	< 1	< 1	1,1
52	< 1	< 1	0,4
53	< 1	< 1	0,6
54	1	< 1	1,2
55	2 bis 3	2	2,4
56	1	1	1,3
57	1	< 1	1,2
58	< 1	< 1	0,8
59	1	< 1	1,1
60	< 1	< 1	0,3
61	< 1	< 1	0,5
62	1	< 1	1,1
63	1	< 1	0,9
64	1	< 1	0,5
65	1	< 1	0,8
66	1	1	1,2
67	1	< 1	0,8
68	20 bis 40	20 bis 25	28,6
69	1	< 1	0,9
70	1 bis 2	1	1,4
71	1	1	1
72	1 bis 2	1	1,5
73	< 1	< 1	0,3
74	1	0	0,4
75	1	1	0,7
76	1	< 1	1
77	1 bis 2	1 bis 2	1,6
78	1	1	1,3
79	< 1	< 1	1,5
80	1 bis 2	1	1,5
81	1	1	1,8
82	< 1	< 1	1,5

In Tabelle 7 sind die Ergebnisse der konventionellen und digitalen Ki-67-Schätzung mit mehr als einem Prozentwert Unterschied angegeben.

Tabelle 7: Konventionelle und digitale Ki-67-Schätzungen mit mehr als einem Punktwert Unterschied

Nummer	Ki-67 WS	Ki-67 JK	Ki-67 VM
1	20	20	16,5
2	1	1	2,1
3	2	1 bis 2	3,1
4	10	10	11,9
5	2	1	0,2
6	2 bis 3	1	0,5
7	5	5	3,9
8	5	1 bis 2	3,8
9	5	2 bis 3	5,9
10	3	1	1,8
11	< 1	< 1	2,4
12	5	1 bis 2	3,5
13	2 bis 3	1 bis 2	3,6
14	3	1	1,8
15	5	< 1	0,9
16	30	20	26
17	5	1 bis 2	3,7
18	1	< 1	0,9
19	3 bis 5 (4)	1	1,5
20	4	2	2,9
21	6	2	3,7
22	20 bis 40	20 bis 25	28,6
23	5	2 bis 3	3,2
24	3	10	12,2

Tabelle 8 gibt die Schätzungsergebnisse an, bei denen die digitale Auswertung in Richtung eines Untersuchers tendiert.

Tabelle 8: Digitale Untersuchung weicht in Richtung eines Pathologen ab

Nummer	Ki-67 WS	Ki-67 JK	Ki-67 VM
1	1 bis 2	3	1,3
2	2	1	1,4
3	5	2 bis 3	5,9
4	2	1	1,4
5	5	< 1	0,9
6	1	1 bis 2	1,6
7	1 bis 2	< 1	0,9
8	2	1 bis 2	0,9
9	3 bis 4	1 bis 2	1,9
10	1	< 1	1,8
11	2 bis 3	1	3
12	4	1 bis 2	2,7
13	2	< 1	2,1
14	3	1 bis 2	2,7
15	2	1	2,7
16	1 bis 2	< 1	0,9
17	3	< 1	1,3
18	2 bis 3	1	0,9
19	3 bis 5	1 bis 2	2,9
20	1	< 1	1,7
21	1	< 1	0,1
22	< 1	2	1,7

Die folgenden Streudiagramme illustrieren ein ähnliches Verhältnis beim Abgleich der Ki-67-Schätzung durch den Untersucher WS und dem digitalen System sowie der Ki-67-Schätzung durch die Untersucherin JK und dem digitalen System.

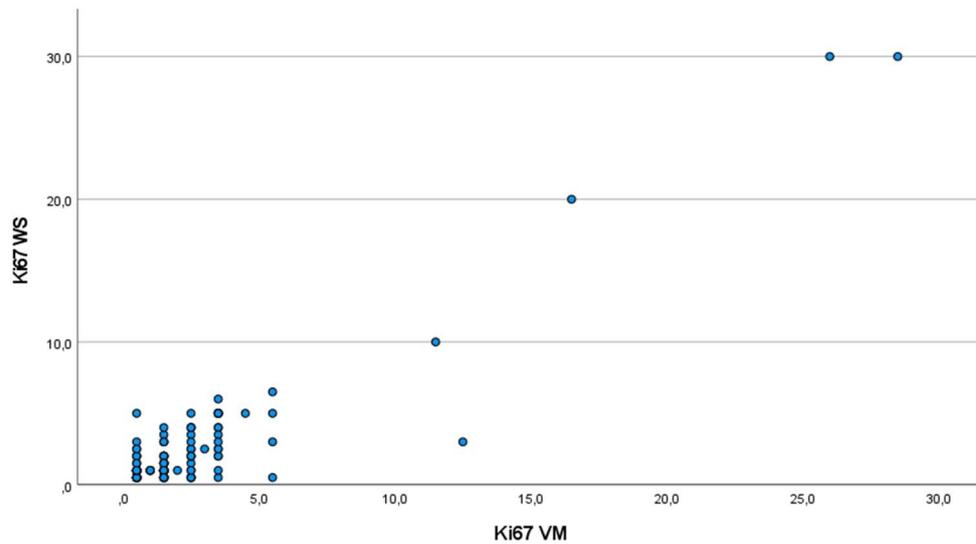


Abbildung 12: Gegenüberstellung der Ki-67-Schätzung des Untersuchers WS mit dem digitalen System

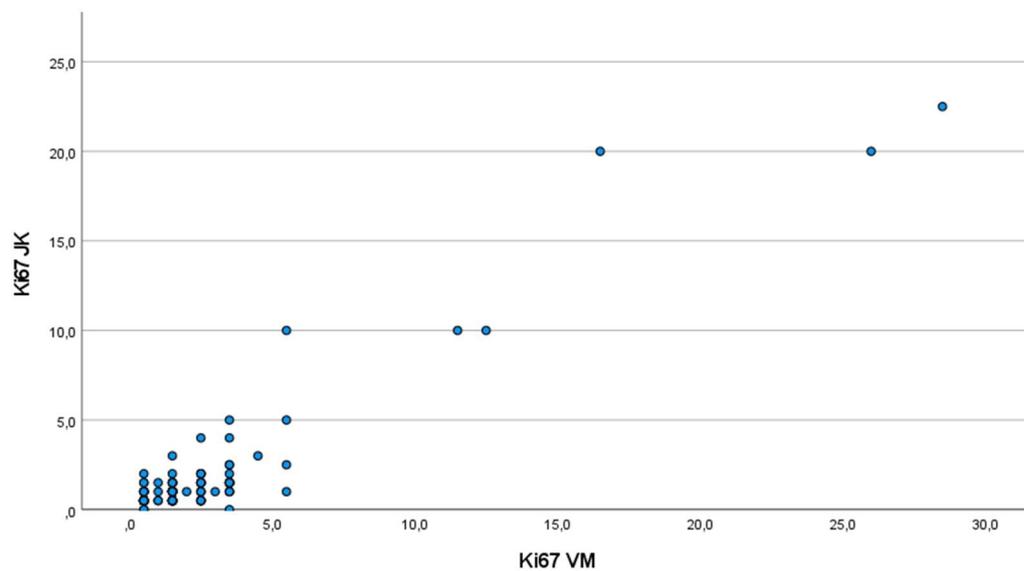


Abbildung 13: Gegenüberstellung der Ki-67-Schätzung der Untersucherin JK mit dem digitalen System

Bei Gegenüberstellung der konventionellen und digitalen Ki-67-Bestimmung kann festgestellt werden, dass eine nahezu übereinstimmende Beurteilung in 82 Untersuchungen, d. h. bei rund 64 %, erfolgte. Auch in dieser Übersicht wurden Fälle als annähernd gleichwertig betrachtet, die einen Schätzunterschied von weniger als einem Punktwert aufwiesen. In 24 Fällen konnten Differenzen von mehr als einem Punktwert ermittelt werden, eine Abweichung der digitalen Analyse in Richtung eines Untersuchers bestand in 22 Fällen. Eine Tendenz in den Abweichungen der digitalen von der konventionellen Bildanalyse war nicht erkennbar.

3.2 Ergebnisse der p53-Bestimmung in tabellarischer Form

Die immunhistologische Reaktion für p53 lag für alle 148 Fälle, an denen der Proliferationsindex Ki-67 bestimmt wurde, vor.

Bei beiden Reaktionen wird die nukleäre Reaktivität gewertet, bei p53 gilt eine kräftige Farbreaktion im Zellkern als positiv. Schwierigkeiten bei der p53-Auswertung ergeben sich durch einen weniger kräftigen Reaktionsausfall, der als negativ zu werten ist. Die Grenzziehung zwischen kräftiger (positiver) und noch mittelgradiger (negativer) Reaktion ist dabei in einigen Fällen subjektiv. Neben dem unterschiedlichen Ausfall der Kernfärbung kann die Auswertbarkeit der p53-Reaktion zusätzlich durch eine unspezifische, zytoplasmatische Anfärbung der Zellen erschwert werden.

Die Bestimmung des p53-Status erfolgte auf dem konventionellen Weg bei allen 148 Fällen, die digitale Bestimmung war aus technischen Gründen an nur 86 Proben möglich. Die nicht mit dem Computer analysierbaren Fälle sind in den Tabellen mit einem Stern gekennzeichnet.

Tabelle 9: Ergebnisse aller p53-Schätzungen

Nummer	p53 WS	p53 JK	p53 VM
1	80	95	95,9
2	2	< 1	*
3	0	0	*
4	5	1	*
5	5	3	*
6	0	0	0,2
7	< 1	0	3,5
8	0	0	0,4
9	0	0	*

10	0	< 1	*
11	2	0	*
12	0	< 1	*
13	0	0	*
14	0	0	*
15	< 1	0	2,6
16	< 1	< 1	1
17	0	0	0
18	< 1	< 1	0
19	< 1	< 1	1
20	0	0	*
21	0	< 1	*
22	1 bis 2	< 1	3,2
23	0	0	*
24	0	< 1	*
25	< 1	0	*
26	1	1	*
27	< 1	0	*
28	1	< 1	*
29	2	< 1	*
30	0	0	*
31	1	0	1,3
32	5 bis 10	2	*
33	< 1	0	*
34	0		1,2
35	0	0	*
36	1	0	3,7
37	0	0	33,2
38	0	< 1	*
39	0	0	2,4
40	0	< 1	4,2
41	3 bis 5	0	3,4
42	0	0	2
43	0	0	0,5
44	< 1	< 1	1
45	< 1	< 1	1,6
46	0	0	2,1
47	1	< 1	2
48	20	bis 10	3
49	0	< 1	2,4
50	< 1	< 1	4,9
51	0	0	2,3
52	0	0	*
53	0	0	2,7
54	< 1	1 bis 2	2,3
55	5	3 bis 5	4,7
56	0	< 1	1,6
57	5 bis 10	2	1,6

58	5	3	*
59	2	< 1	*
60	0	0	3,2
61	2	2	1,6
62	0	< 1	1,2
63	0	< 1	*
64	10	3	*
65	0	0	*
66	5 bis 8	< 1	3,3
67	0	< 1	1,1
68	< 1	3 bis 5	1,1
69	0	< 1	4,9
70	2	1	4,3
71	5 bis 10	2	1
72	3	2	2
73	1	< 1	1,5
74	1	2	1,5
75	3	2	1,3
76	0	0	0,8
77	1	< 1	0,7
78	1 bis 2	< 1	1,2
79	< 1	0	3,6
80	< 1	0	3,3
81	0	0	3,2
82	1	2 bis 3	4,1
83	3	2 bis 3	1
84	< 1	1	1,9
85	0	0	*
86	< 1	0	0,2
87	0	0	*
88	5	2	*
89	0	0	*
90	< 1	0	1,1
91	1	1	*
92	< 1	0	2,2
93	0	0	*
94	0	0	*
95	0	< 1	*
96	1 bis 2	< 1	3,9
97	< 1	1	*
98	8	3 bis 5	9,1
99	5	3 bis 5	5,7
100	3	1	*
101	1	0	*
102	2 bis 3	2	*
103	0	< 1	*
104	0	< 1	*
105	0	0	*

106	1	0	*
107	0	0	3
108	0	0	0,1
109	2	1	*
110	< 1	< 1	*
111	0	< 1	3,3
112	1	< 1	5,9
113	2	0	0,7
114	< 1	0	2,4
115	0	0	*
116	1	1	1,9
117	0	< 1	2
118	2 bis 3	2	*
119	0	0	*
120	10	15	33,8
121	1	< 1	3,2
122	1 bis 2	0	*
123	< 1	0	1,5
124	2	< 1	2
125	< 1	1	1,6
126	0	0	2,1
127	1	1 bis 2	2,9
128	2	0	0,1
129	1	< 1	1,5
130	5	2	4,1
131	0	0	*
132	< 1	< 1	7,1
133	0	0	*
134	0	< 1	*
135	< 1	< 1	*
136	1	1	4,8
137	0	0	*
138	0	0	2,7
139	< 1	1	4,8
140	< 1	< 1	4,3
141	0	0	*
142	0	< 1	*
143	1	1 bis 2	*
144	0	< 1	3,9
145	1	0	*
146	< 1	< 1	2,4
147	0	0	*
148	0	0	3,2

3.2.1 Ergebnisse der p53-Bestimmung durch zwei Pathologen

Wie im vorangegangenen Kapitel für Ki-67 finden sich im Anschluss die Schätzungen für p53 durch WS und JK, wobei auch hier die Fälle nach Abweichung von weniger als einem Punktwert, einem, zwei und mehr als zwei Punktwerten aufgeschlüsselt sind.

Eine starke Übereinstimmung in der Einschätzung der p53-Reaktivität wurde in 107 von 146 Fällen (etwa 73 %) festgestellt. Abweichungen von einem Punktwert waren in 16 Fällen (etwa 10 %) zu verzeichnen. Bei 23 Untersuchungen (etwa 16 %) lagen stärkere Abweichungen (zwei oder mehr Punktwerte) vor, diese traten eher bei relativ hohen p53-Werten auf (z. B. Fälle 3, 6 und 10 der Tabelle 13: Schätzung WS: 5 bis 10, Schätzung JK: 2).

Bei Fällen mit höherer Abweichung schätzt JK den p53-Index geringer ein als WS.

Tabelle 10: p53-Schätzungen beider Pathologen mit weniger als einem Punktwert Unterschied

Nummer	p53 WS	p53 JK
1	0	0
2	0	0
3	< 1	0
4	0	0
5	0	0
6	0	< 1
7	0	< 1
8	0	0
9	0	0
10	< 1	0
11	< 1	< 1
12	0	0
13	< 1	< 1
14	< 1	< 1
15	0	0
16	0	< 1
17	0	0
18	0	< 1
19	< 1	0
20	1	1
21	< 1	0
22	1	< 1
23	0	0
24	< 1	0
25	0	0
26	0	0

27	0	< 1
28	0	0
29	0	< 1
30	0	0
31	0	0
32	< 1	< 1
33	< 1	< 1
34	0	0
35	1	< 1
36	0	< 1
37	< 1	< 1
38	0	0
39	0	0
40	0	0
41	< 1	1 bis 2
42	0	< 1
43	0	0
44	2	2
45	0	< 1
46	0	< 1
47	0	< 1
48	0	< 1
49	0	0
50	1	< 1
51	< 1	0
52	< 1	0
53	0	0
54	3	2 bis 3
55	< 1	1
56	0	0
57	< 1	0
58	0	0
59	0	0
60	< 1	0
61	1	1
62	< 1	0
63	0	0
64	0	0
65	0	< 1
66	< 1	1
67	5	3 bis 5
68	1	0
69	2 bis 3	2
70	0	< 1
71	0	< 1
72	0	0
73	1	0
74	0	0

75	0	0
76	< 1	< 1
77	0	< 1
78	1	< 1
79	< 1	0
80	1	1
81	0	< 1
82	2 bis 3	2
82	0	0
83	1	< 1
84	1 bis 2	0
85	< 1	0
86	< 1	1
87	0	0
88	1	1 bis 2
89	1	< 1
90	0	0
91	< 1	< 1
92	0	0
93	0	< 1
94	< 1	< 1
95	1	1
96	0	0
97	0	0
98	< 1	1
99	< 1	< 1
100	0	0
101	0	< 1
102	1	1 bis 2
103	0	< 1
104	1	0
105	< 1	< 1
106	0	0
107	0	0

Tabelle 11: p53-Schätzungen beider Pathologen mit einem Punktwert Unterschied

Nr.	p53 WS	p53 JK
1	2	< 1
2	1 bis 2	< 1
3	2	< 1
4	1	0
5	1	0
6	< 1	1 bis 2
7	2	< 1
8	2	1
9	1	2
10	1 bis 2	< 1
11	1	2 bis 3
12	1	0
13	2	1
14	1 bis 2	0
15	2	< 1
16	1	0

Tabelle 12: p53-Schätzungen beider Pathologen mit zwei Punktwerten Unterschied

Nummer	p53 WS	p53 JK
1	5	3
2	2	0
3	2	< 1
4	5	3
5	2	< 1
6	1	2 bis 3
7	3	1
8	2	0
9	< 1	0
10	2	0

Tabelle 13: p53-Schätzungen beider Pathologen mit mehr als zwei Punktwerten Unterschied

Nummer	p53 WS	p53 JK
1	5	3
2	2	0
3	3	< 1
4	5	3
5	2	< 1
6	1	2 bis 3
7	3	1
8	2	0
9	< 1	0
10	2	0

3.2.2 Ergebnisse der p53-Bestimmung durch zwei Pathologen und durch den Quantifier (Cognition Master Profession Suite)

In den folgenden Tabellen ist die manuelle Bestimmung der p53-Expression der digitalen Untersuchung mit dem Modul Ki-67-Quantifier gegenübergestellt.

Da sowohl bei Ki-67- als auch bei der p53-Untersuchung eine nukleäre Reaktion mit Farbmarkierung erfolgt, sollte mit im Rahmen dieser Studie geprüft werden, ob das Ki-67-Modul auch zur Bestimmung des p53-Status eingesetzt werden kann.

Es wird aus den folgenden Tabellen deutlich, dass das digitale Bildanalyzesystem erheblich von der Einschätzung durch beide Pathologen abweicht: von den 86 digital auswertbaren Fällen zeigte nur ein Anteil von 18 eine annähernde Übereinstimmung zwischen der konventionellen und digitalen p53-Bestimmung (Abweichungen von weniger als einem Punktwert; Tabelle 14).

Abweichungen von mehr als einem Punktwert konnten in 43 Fällen festgestellt werden (siehe Tabelle 15). Die geringste Differenz lag bei 1,1 (2 Fälle), die größte Differenz betrug in einem Fall 33,2.

In 13 Fällen wich das digitale Bildanalyzesystem in Richtung der Bewertung eines Untersuchers ab. Aus Tabelle 16 wird deutlich, dass es häufiger Abweichungen in Richtung des Pathologen WS (in 10 Fällen) gab.

Tabelle 14: Konventionelle und digitale p53-Bestimmung mit einer Abweichung von weniger als einem Punktwert

Nr.	p53 WS	p53 JK	p53 VM
1	2	< 1	*
2	0	0	*
3	5	1	*
4	5	3	*
5	0	0	0,2
6	0	0	0,4
7	0	0	*
8	0	< 1	*
9	2	0	*
10	0	< 1	*
11	0	0	*
12	0	0	*
13	< 1	< 1	1
14	0	0	0
15	< 1	< 1	0
16	< 1	< 1	1
17	0	0	*

18	0	< 1	*
19	0	0	*
20	0	< 1	*
21	< 1	0	*
22	1	1	*
23	< 1	0	*
24	1	< 1	*
25	2	< 1	*
26	0	0	*
27	5 bis 10	2	*
28	< 1	0	*
29	0	0	*
30	0	< 1	*
31	0	0	0,5
32	< 1	< 1	1
33	0	0	*
34	5	3 bis 5	4,7
35	2	< 1	*
36	2	2	1,6
37	0	< 1	*
38	10	3	*
39	1	2	1,5
40	0	0	0,8
41	1	< 1	0,7
42	1 bis 2	< 1	1,2
43	< 1	0	0,2
44	0	0	*
45	5	2	*
46	0	0	*
47	1	1	*
48	0	0	*
49	0	0	*
50	0	< 1	*
51	< 1	1	*
52	5	3 bis 5 (4,5)	5,7
53	1	0	*
54	2 bis 3	2	*
55	0	< 1	*
56	0	< 1	*
57	0	0	*
58	1	0	*
59	0	0	0,1
60	< 1	< 1	*
61	1	1	1,9
62	2 bis 3	2	
63	0	0	*
64	1 bis 2	0	*
65	0	0	*

66	0	0	*
67	0	< 1	*
68	< 1	< 1	*
69	1	1	4,8
70	0	0	*
71	0	0	*
72	0	< 1	*
73	1	1 bis 2	*
74	1	0	*
75	1	0	*

Tabelle 15: Konventionelle und digitale p53-Bestimmung mit einer Abweichung von mehr als einem Punktwert

Nummer	p53 WS	p53 JK	p53 VM
1	< 1	0	2,6
2	1 bis 2	< 1	3,2
3	1	0	3,7
4	0	0	33,2
5	0	0	2,4
6	0	< 1	4,2
7	0	0	2
8	< 1	< 1	1,6
9	0	0	2,1
10	< 1	< 1	4,9
11	0	0	2,3
12	0	0	2,7
13	< 1	1 bis 2	2,3
14	0	< 1	1,6
15	0	0	3,2
16	2	1	4,3
17	5 bis 10	2	1
18	< 1	0	3,6
19	< 1	0	3,3
20	0	0	3,2
21	1	2 bis 3	4,1
22	3	2 bis 3	1
23	< 1	0	2,2
24	1 bis 2	< 1	3,9
25	0	0	3
26	0	< 1	3,3
27	1	< 1	5,9
28	< 1	0	2,4
29	1	1	4,8
30	0	< 1	2
31	10	15	33,8
32	1	< 1	3,2
33	0	0	2,1

34	1	1 bis 2	2,9
35	2	0	0,1
36	< 1	< 1	7,1
37	1	1	4,8
38	0	0	2,7
39	< 1	1	4,8
40	< 1	< 1	4,3
41	0	< 1	3,9
42	< 1	< 1	2,4
43	0	0	3,2

Tabelle 16: Konventionelle und digitale p53-Bestimmung mit Abweichungstendenzen

Nummer	p53 WS	p53 JK	p53 VM	Abweichung in Richtung
1	80	95	95,9	JK
2	1	0	1,3	WS
3	3 bis 5	0	3,4	WS
4	5 bis 8	< 1	3,3	WS
5	< 1	3 bis 5	1,1	WS
6	1	< 1	1,5	WS
7	8	3 bis 5	9,1	WS
8	2	0	0,7	JK
9	2	< 1	2	WS
10	< 1	1	1,6	JK
11	1	< 1	1,5	WS
12	5	2	4,1	WS

3.3 Statistische Auswertung

3.3.1 Intraklassenkorrelationskoeffizienten für die Ki-67-Bestimmung

Für den Proliferationsmarker Ki-67 wurde für alle drei Untersucher ein ICC von 0,967 ermittelt (95 % Konfidenzintervall 0,953 bis 0,976).

Bei 148 Fällen gab WS einen Proliferationsindex von 2,3 % im Mittel an, JK schätzte durchschnittlich 1,6 %. Das digitale System gab einen Ki-67-Wert von durchschnittlich 2,2 % an.

3.3.2 Intraklassenkorrelationskoeffizienten für die p53-Bestimmung

In den 86, durch alle Untersucher bezüglich p53 auswertbaren, Fällen ergab sich ein ICC von 0,966 (95 % Konfidenzintervall 0,946 bis 0,978).

WS schätzte im Mittel einen p53-Wert von 2,4, die Schätzungen von JK lagen durchschnittlich gering darunter (Mittelwert 2,0). Der Mittelwert der p53-Evaluation durch das digitale System betrug 4,3.

3.3.3 Verteilung der digital ermittelten Werte bei kleinen, manuellen Schätzwerten

Zur genaueren Analyse wurde die Verteilung der digitalen Analysewerte bei einem konventionell ermittelten Ki-67-Wert von ≤ 3 % untersucht.

Bei kleinen Schätzwerten des Untersuchers WS (124 Untersuchungen) ergibt sich eine links betonte und steile Kurve der digitalen Bildanalyse.

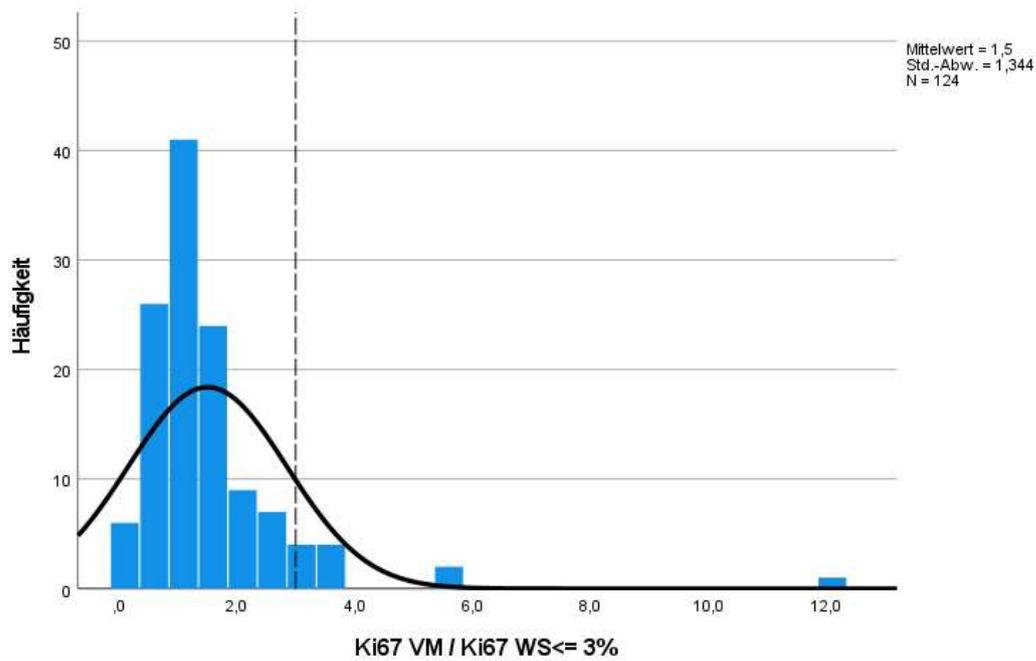


Abbildung 14: Verteilung der digital ermittelten Ki-67-Indices bei Fällen, in den WS einen Index von $\leq 3\%$ schätzte

Im Fall einer Schätzung auf sehr kleine Werte durch JK (138 Untersuchungen) ergab sich eine weniger links betonte und weniger steile Kurve.

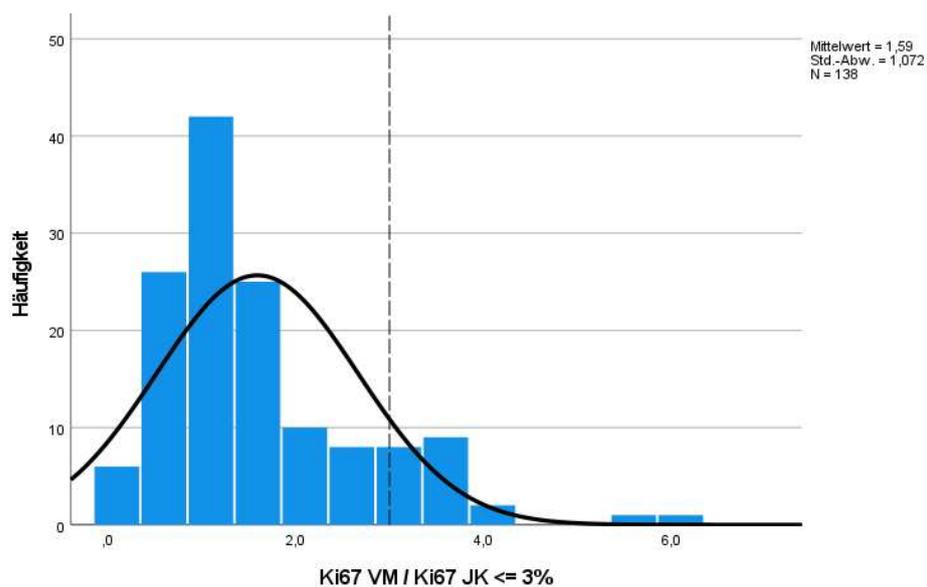


Abbildung 15: Verteilung der digital ermittelten Ki-67-Indices bei Fällen, in den JK einen Index von $\leq 3\%$ schätzte

3.3.4 Bland-Altman-Plots für die Ki-67-Schätzung

Die nachfolgenden Illustrationen verdeutlichen sowohl beim Vergleich der Ki-67-Schätzung durch beide Pathologen als auch bei der Gegenüberstellung der Pathologen mit dem digitalen System, dass die Abweichungen vom Differenzmittelwert, insbesondere bei geringer Proliferationsrate, innerhalb der oberen und unteren Grenze liegen. Die einzelnen, stark von den Grenzbereichen abweichenden Werte sind eher durch die Einbeziehung weniger, stark proliferativer Adenome als durch tatsächliche Messfehler zu erklären.

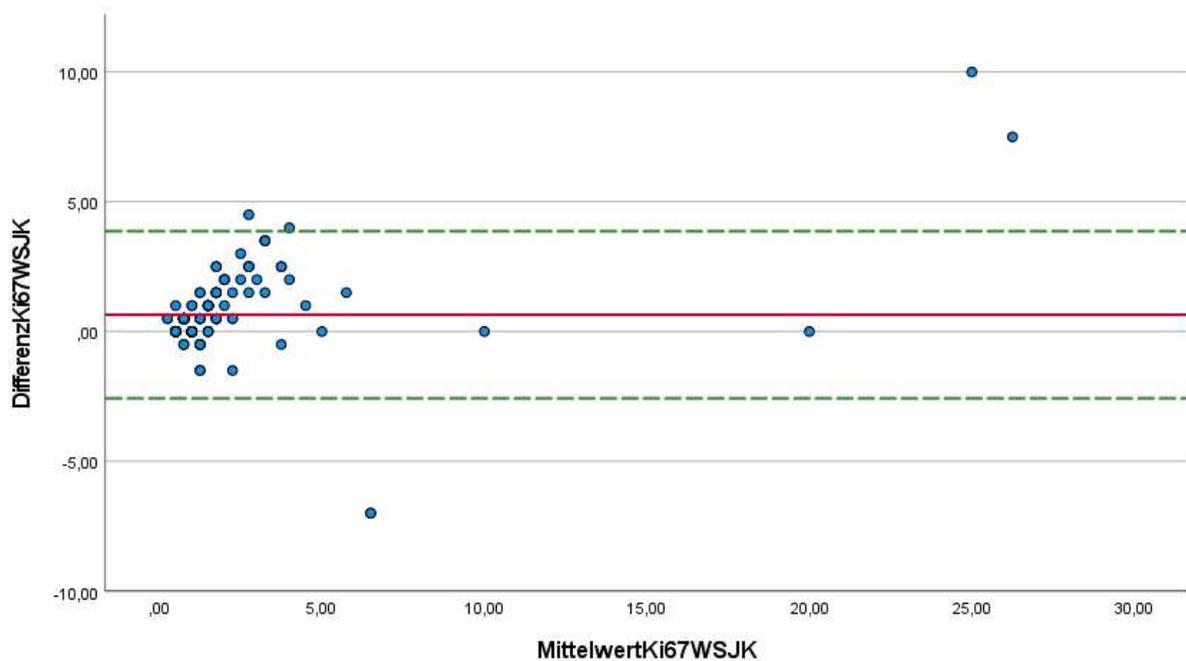


Abbildung 16: Bland-Altman-Plot für die Ki-67-Schätzung durch beide Pathologen

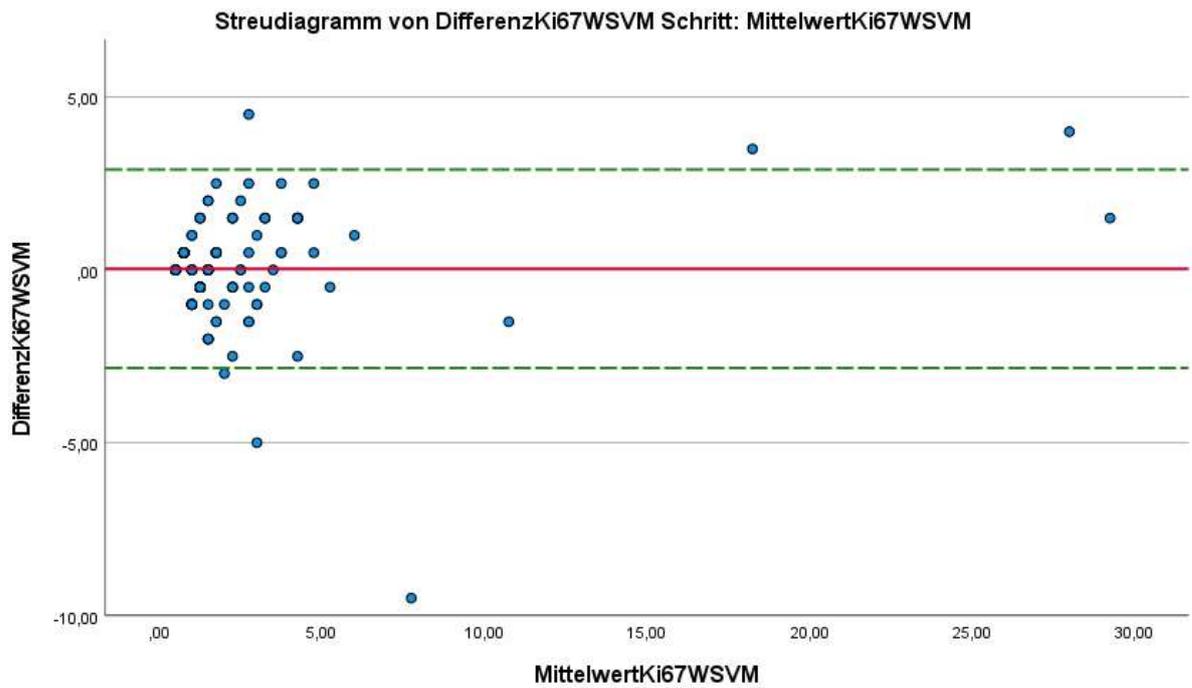


Abbildung 17: Bland-Altman-Plot für die Ki-67-Schätzung durch den Pathologen WS und das digitale System VM

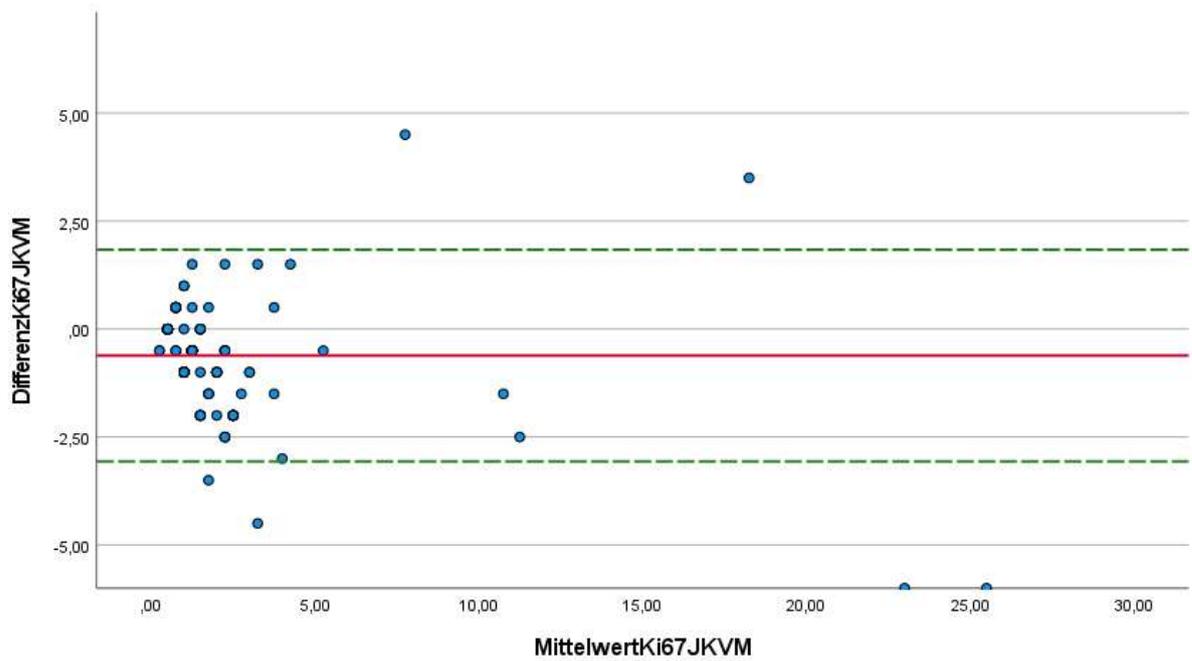


Abbildung 18: Bland-Altman-Plot für die Ki-67-Schätzung durch die Pathologin JK und das digitale System VM

3.3.5 Bland-Altman-Plots für die p53-Schätzung

Auch bei der p53-Schätzung liegen die Abweichungen der Differenzmittelwerte der beiden, jeweils verglichenen Untersuchungen innerhalb des oberen und unteren Grenzbereichs.

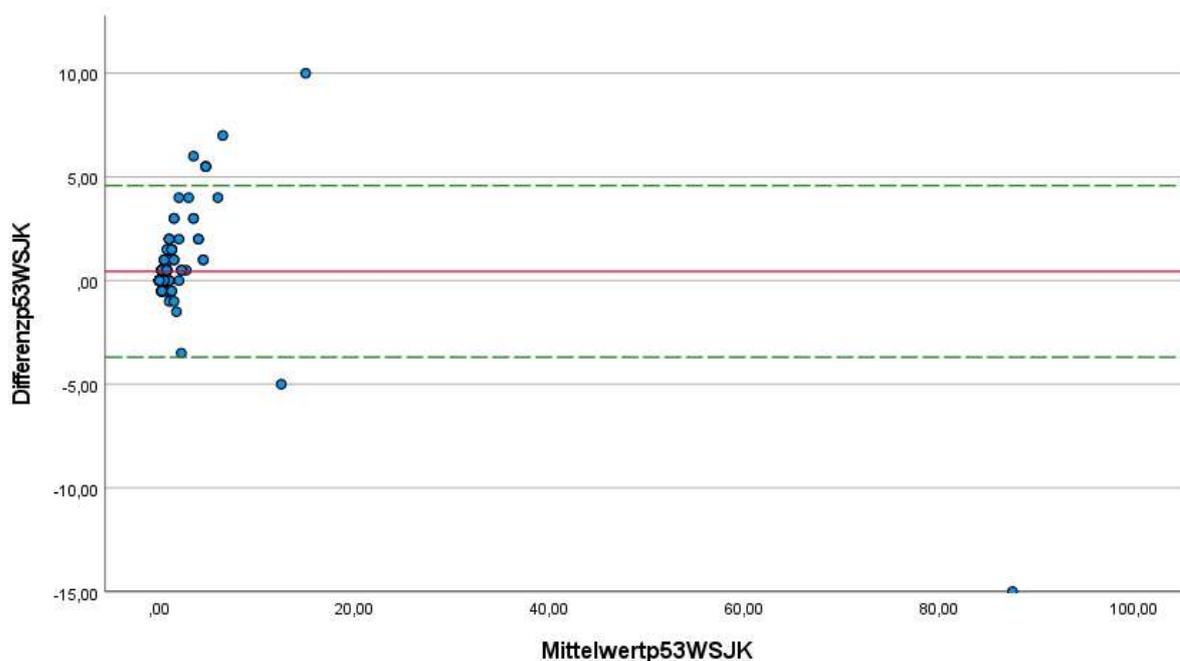


Abbildung 19: Bland-Altman-Plot für die p53-Schätzung durch beide Pathologen

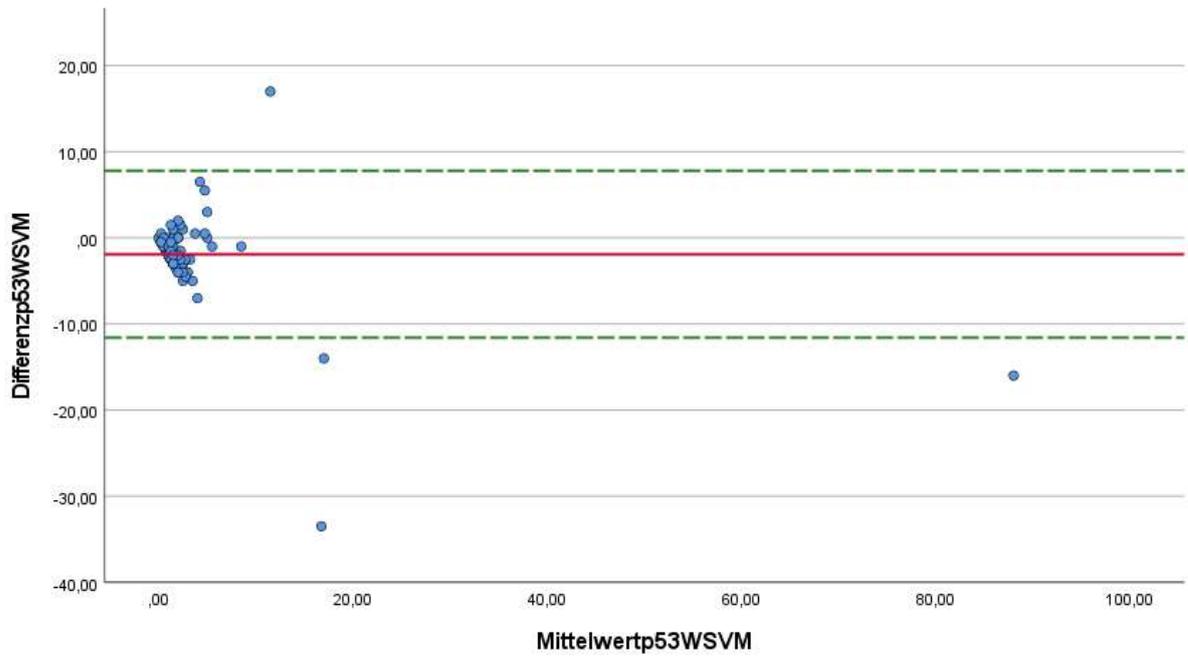


Abbildung 20: Bland-Altman-Plot für die p53-Schätzung des Pathologen WS und des digitalen Systems VM

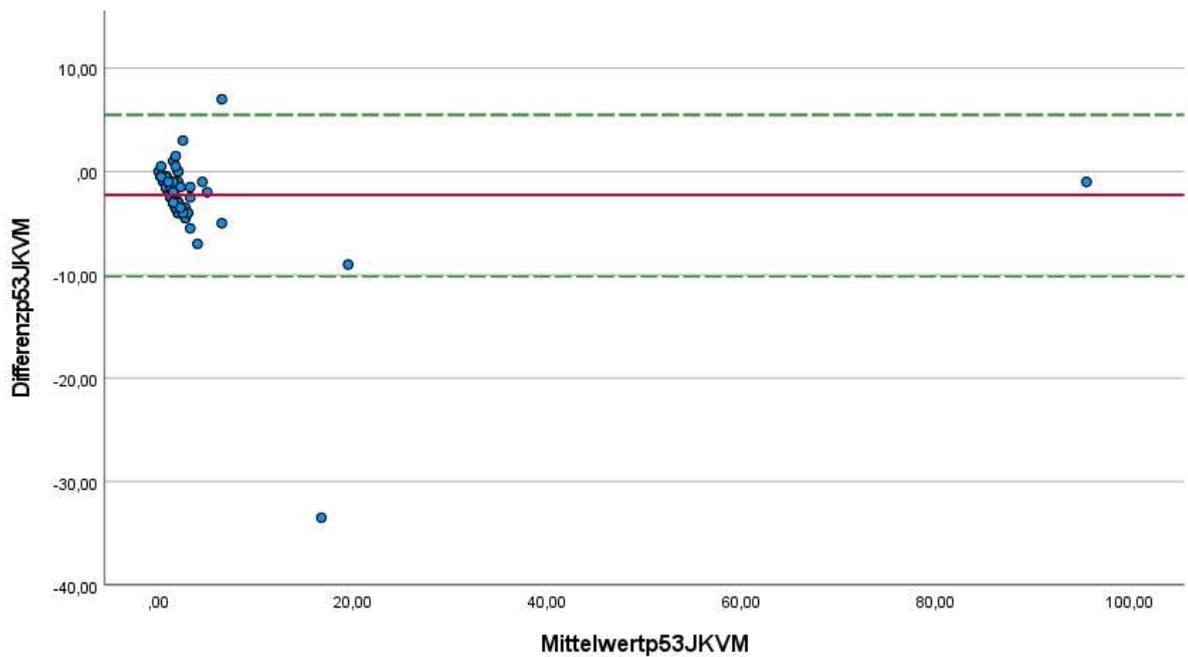


Abbildung 21: Bland-Altman-Plot für die p53-Schätzung durch die Pathologin JK und das digitale System VM

3.3.6 Kreuztabellen für die Ki-67-Schätzung

Bei der Gegenüberstellung der Ki-67-Schätzung durch die beiden Untersucher zeigt sich, dass bei einer Angabe des Proliferationswertes von weniger als 3 % durch WS auch in etwa 99 % durch JK eine gleiche Einschätzung erfolgt. Lediglich in 1 % dieser Fälle gab JK eine Proliferationsrate von mehr als 3 % an. Ein Ki-67-Wert von gleich oder größer 3 % wurde durch beide Untersucher in rund 34 % der Fälle angegeben. In rund 65 % dieser Fälle (bei 21 Patienten) schätzte JK die Proliferationsrate als weniger als 3 % ein. Grundsätzlich schätzt der Untersucher WS die Proliferationsrate gering höher ein: von insgesamt 148 Fällen wurden von ihm 116 mit einem Wert von weniger als 3 % und in 32 Fällen mit einem Wert von mindestens 3 % oder höher ausgewiesen. Die Accuracy der Ki-67-Schätzung durch WS und JK beträgt 0,85.

Tabelle 17: Kreuztabelle mit Vergleich der Ki-67-Schätzungen beider Pathologen, relative Häufigkeiten von JK

		Ki-67 JK		
		≤ 3 %	> 3 %	Gesamt
Ki-67 WS	Anzahl	122	2	124
≤ 3 %	% von Ki-67 WS	98,4 %	1,6 %	100,0 %
	Anzahl	16	8	24
> 3 %	% von Ki-67 WS	66,7 %	33,3 %	100,0 %
Gesamt	Anzahl	138	10	148
	% von Ki-67 WS	93,2 %	6,8 %	100,0 %

Tabelle 18: Kreuztabelle zur Ki-67-Schätzung beider Pathologen, relative Häufigkeiten von WS

		Ki-67 JK		
		≤ 3 %	> 3 %	Gesamt
Ki-67 WS	Anzahl	122	2	124
≤ 3 %	% von Ki-67 JK	88,4 %	20,0 %	83,8 %
	Anzahl	16	8	24
> 3 %	% von Ki-67 JK	11,6 %	80,0 %	16,2 %
Gesamt	Anzahl	138	10	148
	% von Ki-67 JK	100,0 %	100,0 %	100,0 %

Beim Vergleich der Ki-67-Schätzungen des Untersuchers WS mit dem digitalen System VM ist zu erkennen, dass in den von WS als kleiner 3 % eingeschätzten Fällen (bei 116 Proben) in 94 % die digitale Analyse einen ähnlichen Wertebereich auswies. In 6 % dieser Fälle ergab sich nach digitaler Analyse eine Proliferationsrate von mindestens 3 %. Eine stärkere Unterscheidung bestand bei durch WS höher geschätzten Proliferationsraten. In etwa 60 % der Fälle wies auch das digitale Analysesystem einen Wert von mindestens 3 % aus, in etwa 40 % der Fälle ermittelte das digitale System eine geringere Proliferationsrate. Die Accuracy bei der Ki-67-Schätzung durch den Untersucher WS und das digitale System beträgt 0,86.

Tabelle 19: Kreuztabelle zur Ki-67-Schätzung durch WS und die digitale Analyse, relative Häufigkeiten von WS

		Ki-67 VM		
		≤ 3 %	> 3 %	Gesamt
Ki-67 WS	Anzahl	114	10	124
≤ 3 %	% von Ki-67 VM	93,4 %	38,5 %	83,8 %
	Anzahl	8	16	24
> 3 %	% von Ki-67 VM	6,6 %	61,5 %	16,2 %
Gesamt	Anzahl	122	26	148
	% von Ki-67 VM	100,0 %	100,0 %	100,0 %

Tabelle 20: Kreuztabelle zur Ki-67-Schätzung durch WS und das digitale System, relative Häufigkeiten von VM

		Ki-67 VM		
		≤ 3 %	> 3 %	Gesamt
Ki-67 WS	Anzahl	114	10	124
≤ 3 %	% von Ki-67 WS	91,9 %	8,1 %	100,0 %
	Anzahl	8	16	24
> 3 %	% von Ki-67 WS	33,3 %	66,7 %	100,0 %
Gesamt	Anzahl	122	26	148
	% von Ki-67 WS	82,4 %	17,6 %	100,0 %

Wie oben angegeben, schätzte die Untersucherin JK in 136 von 148 Fällen den Prozentwert der Ki-67-Reaktion auf weniger als 3 % ein. In rund 88 % der Fälle gab das digitale Bildanalysesystem einen gleichartigen Bereich an. In 83 % der

Fälle werteten JK und VM die Ki-67-Rate auf 3 % oder höher, in etwa 17 % gab die Untersucherin JK in diesen Fällen eine geringere Proliferationsrate an. Die Genauigkeit der Ki-67-Schätzung durch JK und das digitale System beträgt 0,87.

Tabelle 21: Kreuztabelle zur Ki-67-Schätzung der JK und das digitale System, relative Häufigkeiten von VM

		Ki-67 VM		
		≤ 3 %	> 3 %	Gesamt
Ki-67 JK	Anzahl	121	17	138
≤ 3 %	% von Ki-67 JK	87,7 %	12,3 %	100,0 %
	Anzahl	1	9	24
> 3 %	% von Ki-67 JK	10,0 %	90,0 %	100,0 %
Gesamt	Anzahl	122	26	148
	% von Ki-67 JK	82,4 %	17,6 %	100,0 %

Tabelle 22: Kreuztabelle für die Ki-67-Schätzung durch JK und das digitale System, relative Häufigkeiten JK

		Ki-67 VM		
		≤ 3 %	> 3 %	Gesamt
Ki-67 JK	Anzahl	121	17	138
≤ 3 %	% von Ki-67 VM	99,18 %	65,4 %	93,2 %
	Anzahl	1	9	24
> 3 %	% von Ki-67 VM	0,82 %	34,6 %	6,8 %
Gesamt	Anzahl	122	26	148
	% von Ki-67 VM	100,0 %	100,0 %	100,0 %

3.3.7 Kreuztabellen für die p53-Schätzung

Ein klarer Grenzwert für p53 war in der WHO-Klassifikation von 2004 nicht vorgesehen, ein aggressiver Hypophysentumor sollte nach damaligen Angaben bei einer „kräftigen p53-Expression“ diagnostiziert werden (Lloyd et al. 2004). In einer Arbeit von Miermeister aus dem Jahr 2015 (Miermeister et al. 2015) wurde ein Grenzwert der p53-Expression von 2 % vorgeschlagen. Mithilfe dieser Schwelle wurden die folgenden Kreuztabellen erstellt.

Bei der p53-Schätzung durch beide Pathologen besteht eine gute Übereinstimmung bei einem Grenzwert der p53-Expression von 2 %. Der Untersucher WS schätzt in 77,9 % der 86 einbezogenen Fälle Werte von weniger als 2 %, die Untersucherin JK in 83,7 %. In den Situationen, in denen die Untersucherin JK eine geringe p53-Konzentration schätzte, konstatierte der Pathologe WS in etwa 89 % der Fälle eine ähnliche Einschätzung, während bei einer von WS ermittelten niedrigen p53-Konzentration eine Übereinstimmung mit JK in 95,5 % der Fälle festgestellt wurde. Größere Diskrepanzen zwischen beiden Pathologen treten bei p53-Werten von mindestens 2 % auf. Die größte Divergenz zwischen den beiden Pathologen ist bei höheren p53-Expressionen, die von WS geschätzt wurden - in etwa 42 % der Fälle schätzte JK einen Wert von unter 2 %.

Die Accuracy p53-Schätzung durch beide Pathologen beträgt 0,87.

Tabelle 23: Kreuztabelle p53-Schätzung beider Pathologen, relative Häufigkeiten von WS

		p53 JK		
		< 2 %	≥ 2 %	Gesamt
p53 WS	Anzahl	64	3	67
	% von p53 JK	88,9 %	21,4 %	77,9 %
< 2 %	Anzahl	8	11	19
	% von p53 JK	11,1 %	78,6 %	22,1 %
≥ 2 %	Anzahl	72	14	148
	% von p53 JK	100,0 %	100,0 %	100,0 %

Tabelle 24: Kreuztabelle zur p53-Schätzung beider Pathologen, relative Häufigkeiten von JK

		p53 JK		
		< 2 %	≥ 2 %	Gesamt
p53 WS	Anzahl	64	3	67
< 2 %	% von p53 WS	95,5 %	4,5 %	100,0 %
	Anzahl	8	11	19
≥ 2 %	% von p53 WS	42,1 %	57,9 %	100,0 %
Gesamt	Anzahl	72	14	148
	% von p53 WS	83,7 %	16,3 %	100,0 %

Bei der Gegenüberstellung der p53-Schätzungen der Pathologen mit dem digitalen System finden sich demgegenüber deutliche Abweichungen. Es ist dabei hervorzuheben, dass aufgrund technischer Limitationen nicht alle 148 Fälle, die in die digitale Ki-67-Auswertung einbezogen wurden, auch für eine digitale p53-Analyse berücksichtigt werden konnten.

In den folgenden beiden Tabellen werden die Werte des Untersuchers WS und VM verglichen. In den Fällen, in denen der Untersucher WS die p53-Expression auf unter 2 % schätzte, zeigte das digitale System einen gleichartigen Wertebereich an. Kam das digitale System auf einem Wert von mindestens 2 %, stimmte in nur 23,5 % der Fälle der Untersucher WS zu. In diesen Fällen gab der Untersucher WS in 76,5 % einen p53-Wert von weniger als 2 % an.

Die Accuracy der p53-Ermittlung durch den Untersucher WS und das digitale System beträgt 0,46.

Tabelle 25: Kreuztabelle zur p53-Schätzung durch WS und das digitale System, relative Häufigkeiten von VM

		p53 VM		
		< 2 %	≥ 2 %	Gesamt
p53 WS	Anzahl	28	39	67
< 2 %	% von p53 WS	41,8 %	58,2 %	100,0 %
	Anzahl	7	12	19
≥ 2 %	% von p53 WS	36,8 %	63,2 %	100,0 %
Gesamt	Anzahl	35	51	86
	% von p53 WS	40,7 %	59,3 %	100,0 %

Tabelle 26: Kreuztabelle zur p53-Schätzung durch WS und das digitale System, relative Häufigkeiten von WS

		p53 VM		
		< 2 %	≥ 2 %	Gesamt
p53 WS	Anzahl	28	39	67
< 2 %	% von p53 VM	80,0 %	76,5 %	77,9 %
	Anzahl	7	12	19
≥ 2 %	% von p53 VM	20,0 %	23,5 %	22,1 %
Gesamt	Anzahl	35	51	86
	% von p53 VM	100,0 %	100,0 %	100,0 %

Beim Vergleich der digitalen Bildanalyse mit der Untersucherin JK ergibt sich für die p53-Schätzung ein ähnlicher Befund. Wenn JK eine p53-Konzentration von weniger als 2 % oder mindestens 2 % schätzte, stimmte das digitale System in etwa der Hälfte der Fälle zu. Sehr deutlich Unterschiede bestehen in den Fällen, in denen VM einen p53-Wert von über 2 % schätzte. Zu einem gleichen Ergebnis kam JK hier in nur 15,7 % der Fälle.

Die Genauigkeit der p53-Schätzung durch die Pathologin JK und das digitale System beträgt 0,43, was geringer ist als bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse von WS und VM.

Tabelle 27: Kreuztabelle zur p53-Schätzung durch JK und das digitale System, relative Häufigkeiten von VM

		p53 VM		Gesamt
		< 2 %	≥ 2 %	
p53 JK	Anzahl	29	43	72
	< 2 %	% von p53 JK	40,3 %	59,7 %
≥ 2 %	Anzahl	6	8	14
	% von p53 JK	42,9 %	57,1 %	100,0 %
Gesamt	Anzahl	35	51	86
	% von p53 JK	40,7 %	59,3 %	100,0 %

Tabelle 28: Kreuztabelle zur p53-Schätzung durch JK und das digitale System, relative Häufigkeiten von JK

		p53 VM		
		< 2 %	≥ 2 %	Gesamt
p53 JK	Anzahl	29	43	72
< 2 %	% von p53 VM	82,9 %	84,3 %	83,7 %
	Anzahl	6	8	14
≥ 2 %	% von p53 VM	17,1 %	15,7 %	16,3 %
Gesamt	Anzahl	35	51	86
	% von p53 VM	100,0 %	100,0 %	100,0 %

3.3.8 Überprüfung des Zusammenhangs eines höheren Ki-67-Index und der p53-Expression

Ki-67-Werte von über 3 % lagen in 18 der 148 untersuchten Fälle vor.

Schätzten beide Untersucher (WS und JK) Ki-67 größer als 3 % zeigte sich ein mäßig ausgeprägter Zusammenhang zu einer gesteigerten p53-Expression. In 7 Fällen wurde eine nukleäre Färbbarkeit von p53 von über 4 % festgestellt, wobei in einem Fall bei einer Proliferationsrate von 26,25 % eine p53-Expression von 12,5 % vorlag. In einem weiteren dieser Fälle wurde bei einer Proliferationsrate von 20 % eine p53-Expression von 87,5 % geschätzt. Es ergab sich ein Korrelationskoeffizient von 0,484 (Konfidenzintervall -0,379 bis 0,807; 95 % Signifikanz 0,091).

4 Diskussion

4.1 Allgemeines zu Hypophysenadenomen

Neuroendokrine Neoplasien des Hypophysenvorderlappens gehören zu den häufigsten intrakraniellen Tumoren. Etwa 10 % aller Hypophysen in unselektierten Obduktionspräparaten enthalten Mikroadenome, die klinisch nicht evident waren und in der Regel keine biologische Relevanz aufweisen (Buurman und Saeger 2006). Symptomatische Hypophysentumoren sind demgegenüber sehr viel seltener (Daly und Beckers 2020). Diese werden in Deutschland in der Regel chirurgisch behandelt (jährlich etwa 1500 Eingriffe) (Jaurisch-Hancke et al. 2021), eine Ausnahme bilden die häufigen Prolaktinome, die gut auf Dopaminantagonisten ansprechen (Raverot et al. 2021).

4.2 Schwierigkeiten in der histologischen Bewertung von Adenomen

Innerhalb der Gruppe operierter Tumoren des Hypophysenvorderlappens konnten bisher nur wenige Kriterien, die prognostische Aussagen zum Verlauf der Erkrankung erlauben, identifiziert werden. Hierzu zählen einzelne Typen der Hypophysenadenome, bei denen ein klinisch aggressiverer Verlauf im Vergleich zu anderen WHO-definierten Adenomtypen bekannt ist (Trouillas et al. 2020).

Das lokal invasive Wachstum, das in der allgemeinen Pathologie als ein entscheidendes Malignitätsmerkmal von Neoplasien angesehen wird, erlaubt bei Hypophysentumoren keinen Rückschluss auf die Prognose der Erkrankung. Sautner und Saeger konnten im Operationsmaterial in etwa 41,9 % der Fälle ein lokal invasives Wachstum histologisch nachweisen (Sautner und Saeger 1991). Zudem spiegeln viele, der in der Pathologie allgemein angewandten Bewertungskriterien (bspw. die Zellpleomorphie) nicht das biologische Verhalten von Hypophysenadenomen wider (Scheithauer et al. 1986).

Der Nachweis von Metastasen ist der einzige Beweis eines malignen Hypophysentumors.

Um die prognostische Aussagekraft der histologischen Befundung von Hypophysentumoren zu erhöhen, wurden in der Vergangenheit zahlreiche immunhistologische Marker, darunter Ki-67 und p53, diskutiert.

Landolt et al. konnten in ihrer Untersuchung im Jahr 1987 erstmals einen signifikanten Unterschied der Höhe der Proliferationsraten nicht-invasiver und invasiver Adenome zeigen und folgerten daraus, dass der Marker Ki-67 eine prognostische Bedeutung bei HVL-Adenomen haben kann (Landolt et al. 1987). In den folgenden Jahren konnten weitere Autoren (Gejman et al., 2008, Das et al., 2019, Kontogeorgos, 2006, Lelotte et al., 2018) einen signifikanten Unterschied zwischen progredienten und nicht-progredienten Adenomen hinsichtlich der Proliferationsrate nachweisen. Sadeghipour et al. zeigten an ihrem Untersuchungsgut einen Zusammenhang des Ki-67-Index von Hypophysenadenomen mit der Invasivität, nicht aber mit der Häufigkeit von Rezidiven (Sadeghipour et al. 2017). Zaidi et al. fanden eine Tendenz, aber keine signifikant höheren Ki-67-Raten bei klinisch aggressiven Adenomen (Zaidi et al. 2016). In der Forschungsarbeit von Mete et al. aus dem Jahr 2018 konnte keine prognostische Signifikanz für Ki-67 festgestellt werden (Mete et al. 2018). Hadzhiyanev et al. demonstrierten 2014 an einer Kohorte von 91 HVL-Adenomen lediglich eine positive Korrelation des Proliferationsindex mit der Größe des Adenoms, nicht jedoch mit anderen klinischen Parametern wie der Rezidivrate (Hadzhiyanev et al. 2014). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Petry et al. in ihrer Untersuchung aus dem Jahr 2019 (Petry et al. 2019). Grimm et al. fanden keinen Zusammenhang zwischen der Proliferationsrate von Hypophysenadenomen und deren biologischem Verhalten (Grimm et al. 2019).

Zaidi et al. betonen in der oben genannten Arbeit aus dem Jahr 2016, dass die Entscheidung, ob klinisch ein aggressives Adenom vorliegt, sehr schwierig sein kann und daher auch unterschiedlich getroffen wird. Die beschriebenen widersprüchlichen Ergebnisse zur Bedeutung des Ki-67-Index können daher durch eine uneinheitliche klinische Bewertung der Erkrankung bedingt sein.

Noch stärker kontrovers sind die Forschungsergebnisse zur prognostischen Bedeutung des Zellzyklusregulatorproteins p53.

Im Jahr 2007 wurden von Tanizaki et al. erstmals p53-Mutationen in Karzinomen des Hypophysenvorderlappens gefunden (Tanizaki et al. 2007). Hierbei konnten in 2 von 6 untersuchten Karzinomen Mutationen in der DNA-Bindungsdomäne des p53-Gens (Exone 5 bis 8) nachgewiesen werden. Mutationen im p53-Gen in Adenomenzellen fanden sich nicht. Es wurde in dieser Untersuchung auch gezeigt, dass bei Tumoren mit einer sehr hohen, immunhistologischen p53-Expression die Wahrscheinlichkeit einer Mutation steigt. Kontogeorgos et al. hatten ein Jahr zuvor

in einer Studie eine prognostische Relevanz für die immunhistologische Untersuchung von p53 in HVL-Adenomen berichtet (Kontogeorgos 2006), die Autorengruppen um Gejman und auch Hadzhiyanev konnten dieses Ergebnis nicht bestätigen (Gejman et al. 2008, Hadzhiyanev et al. 2014). Eine Untersuchung aus dem Jahr 2015 berichtet, dass die immunhistologisch nachweisbare, nukleäre Akkumulation von p53 sehr spezifisch, aber mit geringer Sensitivität bei HVL-Karzinomen nachweisbar ist (Miermeister et al. 2015). Neben der schon bei Ki-67 angegebenen Problematik der klinischen Definition eines aggressiven HVL-Adenoms bestehen bei der Auswertung der immunhistologischen p53-Reaktion Schwierigkeiten aufgrund der Variabilität der Färbeintensität.

In der 3. Auflage der WHO-Klassifikation wurde eine „extensive nukleäre Färbung der immunhistologischen Reaktion für p53“ als Kriterium für die Diagnose aggressiver (atypischer) Adenome angegeben (Lloyd et al. 2004). Es findet seit der 4. Auflage der WHO-Klassifikation von 2017 keine Anwendung mehr (Osamura et al. 2017).

Bei sämtlichen exemplarisch angeführten Untersuchungen zur Bedeutung von Ki-67 und p53 erweist sich die Definition eines klinisch aggressiven Hypophysentumors als offenkundiges Problem für die Festlegung eines Referenzrahmens zur histologischen Beurteilung (Zaidi et al. 2016, Hentschel et al. 2003, Lelotte et al. 2018, Trouillas et al. 2020b). In der aktuell gültigen 5. Auflage der WHO-Klassifikation endokriner Tumoren wird daher davon ausgegangen, dass alle Hypophysenadenome potenziell metastasierungsfähig sind. Der Begriff des „Adenoms“ des Hypophysenvorderlappens wurde daher verlassen, die Neoplasien werden als „Pituitary neuroendocrine tumours (Pit-NET)“ bezeichnet (Asa et al. 2022).

4.3 Bisherige Vergleiche der manuellen und digitalen Morphometrie

Im Gegensatz zu neuroendokrinen Neoplasien des gastro-entero-pankreatischen Systems hat sich bei den PitNET eine Graduierung anhand der Ki-67-Indices nicht durchgesetzt, die Bestimmung der Proliferationsrate wird jedoch allgemein in der aktuellen WHO-Klassifikation empfohlen (Asa et al. 2022).

In der Praxis wird der Ki-67-Index durch prozentuale Abschätzung der nukleär positiv gefärbten Tumorzellen in Bezug auf alle sichtbaren Zellen der Neoplasie er-

mittelt (sog. „Eyeballing“). Dieses Vorgehen setzt u. a. ein entsprechendes, jahrelanges Training des Beurteilers voraus und geht bei Untersuchungswiederholung mit einer gewissen Intraobserver-Variabilität einher (Remes et al. 2012).

Zur Verbesserung der Untersuchungsreliabilität bei gleichzeitiger Zeiteffizienz wurden computergestützte Analysesysteme etabliert (Bera et al. 2019). Es existieren bereits zahlreiche Arbeiten, die zu positiven Ergebnissen beim Einsatz solcher Untersuchungssysteme bei der Graduierung von Mammakarzinomen kommen (Gudlaugsson et al. 2012, Alataki et al. 2021). Insbesondere bei mittleren Ki-67-Indizes konnte eine gute Übereinstimmung zwischen manueller und digitaler Bestimmung nachgewiesen werden (Alataki et al. 2021). Außerhalb dieses Untersuchungsguts wurden in neuerer Zeit auch digitale Analysen an neuroendokrinen Neoplasien des gastro-entero-pankreatischen Systems durchgeführt (Volynskaya et al. 2019, Blank et al. 2015, Owens et al. 2020). Hierbei konnte eine hohe Genauigkeit ohne die bekannte Intra- und Interobserver-Variabilität in der Ki-67-Bestimmung ermittelt werden. Eine zusätzliche Vergleichsstudie zweier manueller Methoden (durch Auszählung von Zellen anhand eines Ausdrucks eines histologischen Bildes und durch Eyeballing) mit der digitalen Bildanalyse wurde 2012 von Tang et al. publiziert (Tang et al. 2012). Die manuelle Ki-67-Bestimmung erfolgte dort durch 18 Pathologen mit unterschiedlicher Erfahrung in beiden Auswertemethoden. Bei der individuellen Ki-67-Schätzung zeigten sich sowohl eine hohe Intraobserver-Variabilität als auch eine schlechte Übereinstimmung der jeweiligen Schätzungswerte mit dem Ergebnis der digitalen Bildanalyse. Eine gute Übereinstimmung zwischen Eyeballing und digitaler Analyse konnte lediglich bei einer Mittelung der der manuellen Ergebnisse aller Untersuchung gefunden werden.

Die vorliegende Arbeit vergleicht nach meinem Kenntnisstand erstmals die konventionelle und die digitale Ki-67- und p53-Analyse bei HVL-Adenomen bzw. Pit-NET.

4.4 Diskussion der Untersuchungsergebnisse für Ki-67

In der vorliegenden Untersuchung zeigt sich eine hohe Übereinstimmung bei der Ki-67-Schätzung durch die beiden Pathologen und durch das digitale Bild-Analysesystem.

Der Intraklassenkorrelationskoeffizient nach Pearson für die Ki-67-Bewertung aller Untersucher beträgt 0,967. Da ein ICC von 1 einer vollständigen Übereinstimmung der Beurteiler entspricht, liegt hier eine hohe Kongruenz der Ki-67-Schätzung durch die Untersucher und die computergestützte Auswertung vor.

Im Bland-Altman-Plot für Ki-67 zeichnet sich bei Vergleich beider Pathologen eine durchschnittliche Abweichung von 0,65 vom Mittelwert beider Schätzungen ab. Im Unterschied dazu schwanken die Schätzungsergebnisse des Pathologen WS und des digitalen Systems nur um 0,34 um den Untersuchungsmittelwert. Bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse von JK und dem digitalen System zeigte sich, dass eine durchschnittliche Abweichung von 0,64 vom Untersuchungsmittelwert besteht.

Mithilfe der Kreuztabellen kann eine hohe Übereinstimmung der beiden menschlichen Untersucher in der Abschätzung der Proliferationsrate gezeigt werden, die Accuracy beträgt 0,85. JK tendiert eher zu geringeren und WS zu höheren Werten des Proliferationsindex. Im Vergleich der Schätzungen von WS mit der Gesamtschätzung von JK offenbart sich eine hohe Übereinstimmung bei Werten von mindestens 3 % (ungefähr 92 %), die bei Werten größer als 3 % geringer ist (85 %). In 15 % der Fälle, in denen JK eine geringe Proliferation schätzt, gibt WS einen Wert von mind. 3 % an.

Im Vergleich des digitalen Analysesystems mit dem Untersucher WS zeigt sich, dass in etwa 90 % der Fälle, in denen das System eine geringe Proliferationsrate auswies, auch der Untersucher WS einen Wert von weniger als 3 % angab. Bei einer digital ermittelten Proliferationsrate von über 3 % gab der Untersucher WS in 26 Fällen (rund 73 %) eine gleichartige Proliferationsrate an. Auffällig ist eine Abweichung in dieser Schätzkategorie des digitalen Systems, dass hier in rund 27 % eine geringere Proliferationsrate ermittelte. Die Accuracy der Untersucher WS und VM beträgt 0,79.

Zusammenfassend ergibt sich eine hohe Übereinstimmung bei Schätzung des Ki-67-Wertes mittels Eyeballing durch geübte Untersucher, besonders bei sehr geringen Ki-67-Werten. Eine übereinstimmende Beurteilung von Werten $\geq 3\%$ erfolgte durch Eyeballing deutlich seltener, hauptsächlich aufgrund eines niedrigeren Ansatzes des Ki-67-Wertes durch JK. Hohe Übereinstimmungen wurden auch bei geringen Proliferationsraten festgestellt, die von beiden Untersuchern geschätzt und durch das digitale System ausgewertet wurden. Die Übereinstimmung war bei

WS etwas höher als bei JK, erreichte jedoch nicht den Konkordanzgrad von 99 % zwischen den beiden Untersuchern. Deutliche Abweichungen zeigten sich bei Proliferationsraten von 3 % oder mehr. Bei einer Übereinstimmung in 83 % der Fälle zwischen der Untersucherin JK und dem digitalen Analysesystem bestand bei hohen Proliferationsraten nur in 60 % der Fälle eine Übereinstimmung zwischen dem Untersucher WS und dem digitalen Analysesystem.

Bei dieser Auswertung ist eine Verzerrung der Interpretation durch eine eher geringe Fallzahl hoher Ki-67-Werte zu berücksichtigen.

4.5 Diskussion der Untersuchungsergebnisse zu p53

Bei der Beurteilung der immunhistologischen Reaktion von p53 besteht in der vorliegenden Untersuchung ein hoher Grad an Übereinstimmung bei beiden Pathologen (Genauigkeit von 0,87). Der Intraklassenkorrelationskoeffizient für p53 ist für alle Beurteiler und über alle Untersuchungen gemittelt, ebenfalls als hoch (ICC 0,966). Diskrepanzen zwischen der menschlichen Schätzung und durch den Computer ergeben sich insbesondere bei ausgeprägter p53-Expression. Da letztgenannter Bereich speziell diagnostisch wertvoll ist, ist das digitale System ohne weitere Anpassung nicht für die p53-Auswertung geeignet ist.

4.6 Kritische Einordnung der Untersuchungsergebnisse

Das in der vorliegenden Studie eingesetzte digitale System wurde an Zellen des Mammakarzinoms validiert (Klauschen et al. 2015).

Unter „Material und Methoden“ wurden Grundzüge der Funktion der Cognition-Master Professional Suite beschrieben. Wichtig ist in diesem Zusammenhang, dass Objekte durch den Computer aufgrund ihrer Kernkontur als „Zellen“ erkannt und in benigne bzw. maligne unterschieden werden. Bei der Anwendung des digitalen Systems ist zu berücksichtigen, dass bei Neoplasien der Mamma Kernkriterien (unter anderem Kernpleomorphie) für die Malignitätsdiagnose und Graduierung relevant sind, während diese bei neuroendokrinen Neoplasien, einschließlich solcher der Hypophyse, irrelevant sind.

Bei der Durchführung der Untersuchung müssen zwingend Störgrößen bei der Untersuchung berücksichtigt werden. So wurden bei der Anwendung des Systems

62 Fälle als technisch nicht auswertbar eingeordnet. Eine wesentliche Fehlerquelle stellte hier eine ausgeprägte Hintergrundfärbung dar. Durch das digitale System wurden in diesen Fällen eine zu geringe Anzahl negativer Tumorzellen erkannt, wodurch eine fehlerhaft erhöhte Anzahl positiver Tumorzellen ausgegeben wurde. Da die Analyse auf Basis eines Graustufen-Bildes (durch Berechnung des Mittelwertes der Rot-, Grün- und Blauachse) erfolgt, ist zu vermuten, dass eine starke Hintergrundfärbung die Achsen verschieben und daher der Grad der Hämatoxylin-Gegenfärbung der Tumorzellkerne fehlerhaft ermittelt wird, was eine Identifizierung von Tumorzellkernen verhindert.

Eine zytoplasmatische Färbung und auch eine Braunfärbung von Gefäßen führten zur falschen Identifikation als positiv gefärbte Tumorzellen.

Knicke und Risse im Schnittpräparat führten ebenfalls zu einem falsch-positiven Ergebnis. Eine plausible Erklärung für das Auftreten von Artefakten könnte eine mangelhafte Entkalkung des Materials sein, welches gelegentlich knöcherne Komponenten enthalten kann, die im Zuge einer radikalen Tumorexstirpation mitentfernt wurden (Taqi et al. 2018). Zu beachten ist außerdem, dass möglichst unterschiedliche Tumorregionen ausgewertet werden, um den von Volynskaya 2019 beschriebenen Dilutionseffekt zu vermeiden (Volynskaya et al. 2019).

4.7 Schlussfolgerung und Beantwortung der eingangs gestellten Fragen

In der Untersuchung wurde eine Evaluation eines digitalen Bildanalyse-Systems an Tumoren des Hypophysenvorderlappens durchgeführt. Das Ergebnis wurde mit der quantitativen Schätzung zweier immunhistologischer Marker durch Pathologen abgeglichen. Der Einsatz der Marker ist nicht speziellen diagnostischen Fragestellungen vorbehalten, sondern erfolgt routinemäßig im Rahmen der täglichen Aufgabestellung in der Pathologie. Daher besteht auch bei Allgemeinpathologen Erfahrung im Umgang und in der Evaluierung dieser Antigene, aber auch ein Bewusstsein für die Möglichkeit einer inkorrekten Bewertung.

Die fortwährende Debatte bezüglich der Auswertequalität, ist, wie die regelmäßig von der QUIP angebotenen Ringversuche (Ki-67-Bewertung an neuroendokrinen Neoplasien) Ausdruck für die Bewusstheit der Problematik. Schwierig ist dabei eine zuverlässige Auswertung besonders um definierte Grenzbereiche herum und bei einem geringen prozentualen Anteil positiver Zellen. In Hinblick auf eine ge-

naue und gleichzeitig zeiteffektive Erhebung sollen daher die eingangs gestellten Fragen beantwortet werden.

1. Inwieweit unterscheiden sich die Schätzungsangaben der beiden erfahrenen Pathologen?

Die Schätzungsangaben der beiden Pathologen weisen eine hohe Übereinstimmung für Ki-67 und p53 auf. Der Bland-Altman-Plot zeigt sowohl für Ki-67 als auch für p53, dass die manuellen Schätzwerte innerhalb des tolerablen Grenzbereichs liegen. Mit Kreuztabellen kann eine hohe Übereinstimmung, besonders bei niedrigen Proliferationsraten dargestellt werden. Abweichende Ergebnisse fanden sich demgegenüber für p53. Diese beziehen sich eher auf eine hohe, diagnostisch bedeutsame p53-Expression.

2. Ist daraus die Forderung abzuleiten, bei Hypophysentumoren das Urteil von zwei Pathologen einzufordern?

Aufgrund der sehr hohen Übereinstimmung der Schätzungen beider Pathologen kann diese Forderung nicht abgeleitet werden. Voraussetzung für eine zuverlässige Ki-67- und p53-Schätzung ist jedoch ein ausreichendes Training / Berufserfahrung, die idealerweise durch externe Evaluation (regelmäßige Teilnahme an Ringversuchen) abgesichert wird.

3. Besteht eine Ähnlichkeit in den Ergebnissen der Ki-67-Expression und der p53-Positivität?

Bei Betrachtung aller Untersuchungsergebnisse der manuellen Ki-67- und p53-Schätzung besteht ein lediglich mäßiger Zusammenhang. Eine aus der Erfahrung heraus unterstellte Korrelation, dass hochproliferative Neoplasie gleichzeitig eine starke p53-Expression aufweist, kann nicht gezeigt werden. Das Untersuchungsgut ist für diese Fragestellung allerdings nur begrenzt geeignet, da in lediglich 16 von 148 Fällen ein hoher Ki-67-Index oder eine hohe p53-Expression vorlagen.

4. Führt der Einsatz der Computergestützten Morphometrie zu einer signifikanten Verbesserung der prognostischen Aussage?

Die Untersuchung offenbarte eine hohe Kongruenz zwischen der digitalen Bildanalyse und der manuellen Schätzung von Ki-67. Erhebliche Limitationen ergeben sich bei der Auswertung der p53-Reaktion. In 62 von 148 Fällen generierte das digitale System Fehlwerte, die in den statistischen Analysen ausgeschlossen wurden.

Die fünfte Auflage der WHO-Klassifikation endokriner Tumoren empfiehlt die regelmäßige Bestimmung des Ki-67-Indexes bei der Diagnostik von PitNET. Definierte Schwellenwerte sind im Gegensatz zu den vorherigen Auflagen der Klassifikation nicht vorgesehen. Die p53-Bestimmung wurde aktuell nicht in das diagnostische Markerprofil aufgenommen. Sehr wahrscheinliche Ursache hierfür ist, dass für beide Marker widersprüchliche Resultate für die prognostische Bedeutung gefunden wurden.

In einer Arbeit von Chiloiro et al. (Chiloiro et al. 2014) werden wahrscheinliche Gründe für die diskrepanten Studienergebnisse genannt. Die Limitationen der Studien sind primär im Studiendesign zu finden. Insbesondere ergeben sich Unschärfen durch den Vergleich divergenter Patientengruppen und Adenomtypen, durch unterschiedliche Definitionen des Vorhandenseins eines aggressiven Tumors, der vollständigen chirurgischen Entfernung und eines Rezidivtumors. Des Weiteren sind die Unterschiede durch die Stichprobengröße erklärbar. Volynskaya et al. konnten in ihrer Untersuchung im Jahr 2019 an neuroendokrinen Neoplasien unter anderem aufzeigen, dass bei einer Erhöhung der Zahl der evaluierten Zellen in der immunhistologischen Reaktion der Ki-67-Index eher in Richtung niedrigerer Werte tendiert. Dies trifft speziell auf Proliferationsindizes in unteren Bereichen zu (Volynskaya et al. 2019). In der gleichen Untersuchung wurde auch eine Auswirkung der Probenart auf die Höhe der Proliferationsfraktion gezeigt: Die Auswertung vieler kleiner Biopsien erhöht den Ki-67-Wert im Vergleich zu einem Resektat. Schließlich wird von Chiloiro et al. auch der Modus der Beurteilung als Grund für divergente Studienergebnisse angeführt. Neben den bekannten Unterschieden zwischen der „Hot-Spot“-Methode und der Betrachtung des Gesamtpräparats spielt es eine Rolle, ob konventionell oder digital ausgewertet wurde. Dem letztgenannten Punkt widmet sich die vorliegende Arbeit.

Für den zukünftigen Einsatz der hier genutzten digitalen Analyse sind Verbesserungen sowohl auf der digitalen Ebene als auch im Bereich der Materialgewinnung und des Umgangs mit der Probe von Relevanz.

Zunächst muss bedacht werden, dass der Ki-67-Quantifier an Stanzbiopsien aus Mammakarzinomen evaluiert wurde. Die Zellkernerkennung wurde durch Schätzung der Größen, speziell Zellkerne von Mammakarzinomzellen optimiert. Endokrine Tumoren weisen häufig eher rundliche, gleichförmige Zellkerne auf, regelmäßig sind Zellen mit ungewöhnlich großen, teils auch entrundeten Kernen eingeschlossen (Saeger et al. 2007). Diese unterscheiden sich damit deutlich von Zellen des Mammakarzinoms mit einer eher homogen ausgeprägten Kernvergrößerung und -pleomorphie. Um eine korrekte Zellerkennung mit dem digitalen System zu gewährleisten, wäre eine Berücksichtigung der Kerngrößenvarianz neuroendokriner Tumoren anzustreben. Diese Problematik wurde bereits in der Veröffentlichung der Validierungsstudie 2015 mit diskutiert (Klauschen et al. 2015).

Obwohl eine vorherige Schulung in der Anwendung des Quantifizierers nicht erforderlich ist, wird daraus deutlich, dass auch eine einfache Ki-67-Bestimmung nicht zuverlässig durch nicht-medizinisches Fachpersonal durchgeführt werden kann (Hacking et al. 2020).

Die digitale Unterscheidung Ki-67-positiver und -negativer Zellkerne beruht auf einem Abgleich der immunhistologischen Färbung und der Gegenfärbung mit einem daraus errechneten Grenzwert (Klauschen et al. 2015).

In Bezug auf die praktische Implementierung des digitalen Analysesystems lässt sich folgern, dass sämtliche Störfaktoren, die eine Auswirkung auf die immunhistologische Reaktion haben können (zum Beispiel Materialfixation), auf ein Minimum reduziert werden sollten (Start et al. 1990). Bei der Gewinnung von Mammastanzylindern gibt es präzise Vorgaben zur Extraktion und Fixation des Materials; beispielsweise ist auch die Dokumentation der Zeitpunkte der Materialentnahme und des Beginns der Fixation vorgesehen. Derartige Anweisungen existieren im Umgang mit Probenmaterial neuroendokriner Tumoren, auch des Hypophysenvorderlappens, nicht. Einfluss auf den Fixationsgrad hat selbstverständlich auch die Probenart (Resektat versus Biopsie).

Aus der vorliegenden Untersuchung ist abzuleiten, dass der Ki-67-Quantifier grundsätzlich für die Bestimmung der Proliferationsfraktion an endokrinen Neoplasien. Wesentlich sind klare Vorgaben zur Fixation, Durchführung der konventionellen Färbungen und immunhistologischen Untersuchungen sowie auch Vorgaben zur Auswertung.

Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, hat die EPPG im Jahr 2019 eine standardisierte Befundung vorgeschlagen (Villa et al. 2019). Sie sollte im klinischen Alltag berücksichtigt werden, insbesondere sollten stets klinische Angaben zum Hormonstatus, einer potenziellen präoperativen Vorbehandlung und den radiologischen Befunden gemacht werden (Asa 2021, Cai et al. 2021).

Asa und Evans formulierten 2020 in einem „Letter to the Editor“ in der Zeitschrift Archives of Pathology & Laboratory Medicine folgende Anforderungen an die Einführung eines digitalen Bildanalyse-Systems in die pathologische Routinediagnostik: Die Implementierung sollte so erfolgen, dass eine schnelle und genaue Morphometrie sichergestellt werden kann, darüber hinaus sollten Algorithmen entwickelt werden, die den Pathologen eine effizientere Arbeit mit reduziertem Risiko bedeutender Fehler ermöglichen (Asa und Evans 2020).

Nach Optimierung der oben genannten Punkte werden die aufgestellten Forderungen für die digitale Ki-67-Analyse erfüllt.

5 Zusammenfassung

Die immunhistologische Bestimmung des Proliferationsmarkers Ki-67 und des Proteins des Tumorsuppressorgens p53 sind bei zahlreichen Neoplasien für die Dignitätsbewertung wichtig. Der Proliferationsindex ist bei neuroendokrinen Tumoren im geringen einstelligen Prozentbereich relevant. Bei Untersuchungen zur Ermittlung des Ki-67-Index bei Neoplasien an anderen Lokalisationen wurde eine bemerkenswerte Intra- und Interobservervariabilität bei der Wertabschätzung durch menschliche Beurteiler sowie deren Reduktion durch den Einsatz digitaler Analysesysteme nachgewiesen. Die vorliegende Arbeit stellt die Bestimmung durch Pathologen und eine computergestützte Methode erstmals bei Hypophysenadenomen gegenüber. Es sollte überprüft werden, ob die Ki-67-Ermittlung bei Hypophysenadenomen durch ein digitales System effizienter als durch die konventionelle Bestimmung durch Pathologen ist. Da die immunhistologische Reaktion von p53, ähnlich wie bei Ki-67, ebenfalls eine Kernfärbung darstellt, sollte zusätzlich geprüft werden, ob das digitale System auch zur parallelen Auswertung des p53-Status geeignet ist. Es wurde Material des Deutschen Hypophysentumorregisters, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, von 148 Patienten untersucht. Dabei ergab sich eine hohe Übereinstimmung beider Pathologen für beide genannten Marker. Bei der Ermittlung der Ki-67-Indizes durch die digitale Analyse konnte ein hoher Konsens mit der menschlichen Einschätzung gezeigt werden. Starke Unstimmigkeiten bestanden bei Vergleich der digitalen und der menschlichen p53-Bestimmung. Aufgrund dieser Untersuchung ist das digitale Bildanalyse-System zur Bestimmung der Proliferationsrate bei Hypophysenadenomen geeignet, jedoch sollten technische Anpassungen vorgenommen werden, um den histologischen Besonderheiten endokriner Neoplasien gerecht zu werden. Eine Übertragung des Systems auf die p53-Bestimmung ist nicht ohne weiteres möglich. Trotz einer Reaktion beider Marker im Zellkern gelten für p53 andere Auswertrichtlinien, die das digitale System nicht kennt.

The immunohistological determination of the proliferation marker Ki-67 and the protein of the tumour suppressor gene p53 are important for dignity assessment in numerous neoplasms. The proliferation index is relevant in neuroendocrine tumours in the low single-digit percentage range. Studies on Ki-67 determination in neoplasms located elsewhere have shown a significant intra- and interobserver variability in value estimation by human examiners and its reduction using a digital analysis system. The present work compares the determination by pathologists and a computer-assisted method in pituitary adenomas for the first time. The aim was to test whether Ki-67 determination in pituitary adenomas by a digital system is more efficient than conventional determination by pathologists. In addition, since the immunohistological reaction of p53, like Ki-67, is also a nuclear staining, it should be tested whether the digital system is also suitable for the evaluation of the p53 status in parallel. Material from the German Pituitary Tumour Registry, University Hospital Hamburg-Eppendorf, from 148 patients was examined. A high level of agreement between the two pathologists was shown for both markers mentioned. In the determination of the Ki-67 indices by digital analysis, a high consensus with human estimation was shown. There was strong disagreement when comparing digital and human p53 determination. Based on this study, the digital image analysis system is suitable for determining the proliferation rate in pituitary adenomas, but technical adaptations to the histological specificities of endocrine neoplasms should be made. A transfer of the system to p53 determination is not readily possible. Despite a reaction of both markers in the cell nucleus, other evaluation guidelines apply to p53, which the digital system does not know.

6 Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropin
AG	Arbeitsgruppe
EPPG	European Pituitary Pathology Group
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
HE	Hämatoxylin und Eosin
HVL	Hypophysenvorderlappen
ICC	Intraklassenkorrelationskoeffizient
JK	Judith Klein
LH.....	Luteinisierendes Hormon
Mib-1	made in Borstel
PAS	periodic acid-Schiff
Pit-NET.....	Pituitary neuroendocrine tumour
QUIP	Qualitätssicherungsinitiative in der Pathologie
STH	Somatotropin
TSH	Thyreotropin
UKE.....	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
VM.....	„Ki-67-Quantifier“ der CognitionMaster Professional Suite
WHO	World Health Organisation
WS	Prof. Dr. med. Wolfgang Saeger

7 Literaturverzeichnis

- Alataki A, Zabaglo L, Tovey H, Dodson A, Dowsett M (2021) A simple digital image analysis system for automated Ki-67 assessment in primary breast cancer. *Histopathology*. 79(2):200-209.
- Asa SL (2021) Challenges in the Diagnosis of Pituitary Neuroendocrine Tumors. *Endocr Pathol*. 32(2):222-227.
- Asa SL, Evans A (2020) Issues to Consider When Implementing Digital Pathology for Primary Diagnosis. *Arch Pathol Lab Med*. 144(11):1297.
- Asa SL, Osamura RY, Mete O (2022) Pituitary tumours: Introduction. In: WHO Classification of Tumours. Endocrine and Neuroendocrine tumours (Internet). Editorial Board (Hrg.) 5. Auflage, IARC Press, Lyon.
- Assarzagdegan N, Montgomery E (2021) What is New in the 2019 World Health Organization (WHO) Classification of Tumors of the Digestive System: Review of Selected Updates on Neuroendocrine Neoplasms, Appendiceal Tumors, and Molecular Testing. *Arch Pathol Lab Med*. 145(6):664-677.
- Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK, Vogelstein B (1990) Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science*. 249(4971):912-915.
- Balint EE, Vousden KH (2001) Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein. *Br J Cancer*. 85(12):1813-1823.
- Bera K, Schalper KA, Rimm DL, Velcheti V, Madabhushi A (2019) Artificial intelligence in digital pathology - new tools for diagnosis and precision oncology. *Nat Rev Clin Oncol*. 16(11):703-715.
- Blank A, Wehweck L, Marinoni I, Boos LA, Bergmann F, Schmitt AM, Perren A (2015) Interlaboratory variability of MIB1 staining in well-differentiated pancreatic neuroendocrine tumors. *Virchows Arch*. 467(5):543-550.
- Buurman H, Saeger W (2006) Subclinical adenomas in postmortem pituitaries: classification and correlations to clinical data. *Eur J Endocrinol*. 154(5):753-758.
- Cai X, Zhu J, Yang J, Tang C, Yuan F, Cong Z, Ma C (2021) A Nomogram for Preoperatively Predicting the Ki-67 Index of a Pituitary Tumor: A Retrospective Cohort Study. *Front Oncol*. 11:687333.
- Castaneda CA, Castillo M, Sanchez J, Casavilca S, Gonzalez C, Flores C, Cano L, Belmar-Lopez C, Villa-Robles R, Rios-Martini G, Wu Y (2017) Factors influencing Ki-67 calculation in neuroendocrine neoplasia. *International Journal of Endocrine Oncology*. 4(1):23-30.
- Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J (1992) Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol*. 168(4):357-363.
- Chiloiro S, Bianchi A, Doglietto F, de Waure C, Giampietro A, Fusco A, Iacovazzo D, Tartaglione L, Di Nardo F, Signorelli F, Lauriola L, Anile C, Rindi G, Maira G, Pontecorvi A, De Marinis L (2014) Radically resected pituitary adenomas:

prognostic role of Ki 67 labeling index in a monocentric retrospective series and literature review. *Pituitary*. 17(3):267-276.

- Daly AF, Beckers A (2020) The Epidemiology of Pituitary Adenomas. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 49(3):347-355.
- Das C, Mondal P, Mukhopadhyay M, Mukhopadhyay S, Ghosh I, Handral A (2019) Evaluation of prognostic utility of Ki-67, P53, and O-6-methylguanine-DNA methyltransferase expression in pituitary tumors. *J Lab Physicians*. 11(4):323-329.
- Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie AHuH (2016) Hypophysentumor-Register [Online im Internet]. URL: <https://www.endokrinologie.net/ag-hypophyse-5.php> [Stand: 11.04.2023, 14.26 Uhr].
- Gejman R, Swearingen B, Hedley-Whyte ET (2008) Role of Ki-67 proliferation index and p53 expression in predicting progression of pituitary adenomas. *Hum Pathol*. 39(5):758-766.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H (1983) Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 31(1):13-20.
- Grimm F, Maurus R, Beschorner R, Naros G, Stanojevic M, Gugel I, Giese S, Bier G, Bender B, Honegger J (2019) Ki-67 labeling index and expression of p53 are non-predictive for invasiveness and tumor size in functional and nonfunctional pituitary adenomas. *Acta Neurochir (Wien)*. 161(6):1149-1156.
- Gudlaugsson E, Skaland I, Janssen EA, Smaaland R, Shao Z, Malpica A, Voorhorst F, Baak JP (2012) Comparison of the effect of different techniques for measurement of Ki-67 proliferation on reproducibility and prognosis prediction Accuracy in breast cancer. *Histopathology*. 61(6):1134-1144.
- Hacking SM, Sajjan S, Lee L, Ziemba Y, Angert M, Yang Y, Jin C, Chavarria H, Kataria N, Jain S, Nasim M (2020) Potential Pitfalls in Diagnostic Digital Image Analysis: Experience with Ki-67 and PHH3 in Gastrointestinal Neuroendocrine Tumors. *Pathol Res Pract*. 216(3):152753.
- Hadzhiyanev A, Ivanova R, Nachev E, Elenkova A, Yaneva M, Zaharieva S, Marinov M, Surchev J, Ivanova A (2014) Evaluation of prognostic utility of MIB-1 and p53 expression in pituitary adenomas: correlations with clinical behaviour and follow-up results. *Biotechnol Biotechnol Equip*. 28(3):502-507.
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144(5):646-674.
- Harvey MV, H, Lee E. Y-H. P, Bradley A, Donehower, A (1995) Mice deficient in both p53 and Rb develop tumors primarily of endocrine Origin. *Can Res*. 55:1146-1151.
- Hentschel SJ, McCutcheon I E, Moore W, Durity FA (2003) P53 and MIB-1 immunohistochemistry as predictors of the clinical behavior of nonfunctioning pituitary adenomas. *Can J Neurol Sci*. 30(3):215-219.
- Jaurisch-Hancke C, Deutschbein T, Knappe UJ, Saeger W, Flitsch J, Fassnacht M (2021) The Interdisciplinary Management of Newly Diagnosed Pituitary Tumors. *Dtsch Arztebl Int*. 118(14):237-243.
- Klauschen F, Wienert S, Schmitt WD, Loibl S, Gerber B, Blohmer JU, Huober J, Rudiger T, Erbstosser E, Mehta K, Lederer B, Dietel M, Denkert C, von

- Minckwitz G (2015) Standardized Ki67 Diagnostics Using Automated Scoring--Clinical Validation in the GeparTrio Breast Cancer Study. *Clin Cancer Res.* 21(16):3651-3657.
- Koch R, Sporl E (2007) Statistical methods for comparison of two measuring procedures and for calibration: analysis of concordance, correlation and regression in the case of measuring intraocular pressure. *Klin Monbl Augenheilkd.* 224(1):52-57.
- Kontogeorgos G (2006) Predictive markers of pituitary adenoma behavior. *Neuroendocrinology.* 83(3-4):179-188.
- Landolt AM, Shibata T, Kleihues P (1987) Growth rate of human pituitary adenomas. *J Neurosurg.* 67(6):803-806.
- Lelotte J, Mourin A, Fomekong E, Michotte A, Raftopoulos C, Maiter D (2018) Both invasiveness and proliferation criteria predict recurrence of non-functioning pituitary macroadenomas after surgery: a retrospective analysis of a monocentric cohort of 120 patients. *Eur J Endocrinol.* 178(3):237-246.
- Lloyd RV, Kovacs K, Young WF, Farrel WE, Asa SL, Trouillas J, Kontogeorgos G, Sano T, Scheithauer BW, Horvath E (2004) Pituitary Tumours: Introduction. In: *World Health Organisation Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs.* DeLellis, RA, Heitz, PU, Lloyd, RV, Eng, C (Hrg.) 3. Auflage, IARC Press, Lyon, 10-13.
- Lopes MB, Scheithauer BW, Schiff D (2005) Pituitary Carcinoma. *Endocrine.* 28(1):115 - 121.
- Luchini C, Pantanowitz L, Adsay V, Asa SL, Antonini P, Girolami I, Veronese N, Nottegar A, Cingarlini S, Landoni L, Brosens LA, Verschuur AV, Mattiolo P, Pea A, Mafficini A, Milella M, Niazi MK, Gurcan MN, Eccher A, Cree IA, Scarpa A (2022) Ki-67 assessment of pancreatic neuroendocrine neoplasms: Systematic review and meta-analysis of manual vs. digital pathology scoring. *Mod Pathol.* 35(6):712-720.
- Mete O, Cintosun A, Pressman I, Asa SL (2018) Epidemiology and biomarker profile of pituitary adenohypophysial tumors. *Mod Pathol.* 31(6):900-909.
- Miermeister CP, Petersenn S, Buchfelder M, Fahlbusch R, Ludecke DK, Holsken A, Bergmann M, Knappe HU, Hans VH, Flitsch J, Saeger W, Buslei R (2015) Histological criteria for atypical pituitary adenomas - data from the German pituitary adenoma registry suggests modifications. *Acta Neuropathol Commun.* 3:50-61.
- Osamura RY, Lopes MB, Grossman A, Kontogeorgos G, Trouillas J (2017) Tumours of the pituitary gland. In: *World Health Organisation Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs.* Lloyd, RV, Osamura, RY, Klöppel, G, Rosai, J (Hrg.) 4. Auflage, IARC Press, Lyon, 9-45.
- Owens R, Gilmore E, Bingham V, Cardwell C, McBride H, McQuaid S, Humphries M, Kelly P (2020) Comparison of different anti-Ki-67 antibody clones and hot-spot sizes for assessing proliferative index and grading in pancreatic neuroendocrine tumours using manual and image analysis. *Histopathology.* 77(4):646-658.
- Petry C, Poli JHZ, de Azevedo Dossin I, Rech C, Pereira Lima JFS, Ferreira NP, da Costa Oliveira M (2019) Evaluation of the potential of the Ki-67 index to

- predict tumor evolution in patients with pituitary adenoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 12(1):320-326.
- Raverot G, Ilie MD, Lasolle H, Amodru V, Trouillas J, Castinetti F, Brue T (2021) Aggressive pituitary tumours and pituitary carcinomas. *Nat Rev Endocrinol.* 17(11):671-684.
- Remes SM, Tuominen VJ, Helin H, Isola J, Arola J (2012) Grading of neuroendocrine tumors with Ki-67 requires high-quality assessment practices. *Am J Surg Pathol.* 36(9):1359-1363.
- Sadeghipour A, Mahouzi L, Salem MM, Ebrahim-Nejad S, Asadi-Lari M, Radfar A, Filip I, Babaheidarian P (2017) Ki-67 Labeling Correlated With Invasion But Not With Recurrence. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 25(5):341-345.
- Saeger W, Ludecke DK, Buchfelder M, Fahlbusch R, Quabbe HJ, Petersenn S (2007) Pathohistological classification of pituitary tumors: 10 years of experience with the German Pituitary Tumor Registry. *Eur J Endocrinol.* 156(2):203-16.
- Sautner D, Saeger W (1991) Invasiveness of Pituitary Adenomas. *Pathol Res Pract.* 187(5):632-636.
- Scheithauer BW, Kovacs, KT, Laws, E., Randall, RV (1986) Pathology of invasive pituitary tumors with special reference to functional classification. *J Neurosurg.* 65:733-744.
- Start RD, Cross SS, Smith JFH (1990) Effect of delayed fixation in the assessment of tumour cell proliferation. *Journ Pathol.* 161(2):183-184.
- Sumi T, Stefaneanu S, Kovacs K, Asa S, Rindi G (1993) Immunohistochemical Study of p53 Protein in Human and Animal Pituitary Tumors. *Endocr Pathol.* 4(2):95-99.
- Tang LH, Gonen M, Hedvat C, Modlin IM, Klimstra DS (2012) Objective quantification of the Ki-67 proliferative index in neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system: a comparison of digital image analysis with manual methods. *Am J Surg Pathol.* 36(12):1761-1770.
- Tanizaki Y, Jin L, Scheithauer BW, Kovacs K, Roncaroli F, Lloyd RV (2007) P53 gene mutations in pituitary carcinomas. *Endocr Pathol.* 18(4):217-222.
- Taqi SA, Sami SA, Sami LB, Zaki SA (2018) A review of artifacts in histopathology. *J Oral Maxillofac Pathol.* 22(2):279-287.
- Trouillas J, Jaffrain-Rea ML, Vasiljevic A, Dekkers O, Popovic V, Wierinckx A, McCormack A, Petersenn S, Burman P, Raverot G, Villa C (2020a) Are aggressive pituitary tumors and carcinomas two sides of the same coin? Pathologists reply to clinician's questions. *Rev Endocr Metab Disord.* 21(2): 243-251.
- Trouillas J, Jaffrain-Rea ML, Vasiljevic A, Raverot G, Roncaroli F, Villa C (2020b) How to Classify the Pituitary Neuroendocrine Tumors (PitNET)s in 2020. *Cancers (Basel).* 12(2):514-531.
- Uzilov AV, Taik P, Cheesman KC, Javanmard P, Ying K, Roehnelt A, Wang H, Fink MY, Lau CY, Moe AS, Villar J, Bederson JB, Stewart AF, Donovan MJ, Mahajan M, Sebra R, Post KD, Chen R, Geer EB (2021) USP8 and TP53 Drivers are Associated with CNV in a Corticotroph Adenoma Cohort Enriched for Aggressive Tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 106(3):826-842.

- Villa C, Vasiljevic A, Jaffrain-Rea ML, Ansorge O, Asioli S, Barresi V, Chinezu L, Gardiman MP, Lania A, Lapshina AM, Poliani L, Reiniger L, Righi A, Saeger W, Soukup J, Theodoropoulou M, Uccella S, Trouillas J, Roncaroli F (2019) A standardised diagnostic approach to pituitary neuroendocrine tumours (PitNETs): a European Pituitary Pathology Group (EPPG) proposal. *Virchows Arch.* 475(6):687-692.
- Volynskaya Z, Mete O, Pakbaz S, Al-Ghamdi D, Asa SL (2019) Ki67 Quantitative Interpretation: Insights using Image Analysis. *J Pathol Inform.* 10:8-13.
- Wienert S, Heim D, Saeger K, Stenzinger A, Beil M, Hufnagl P, Dietel M, Denkert C, Klauschen F (2012) Detection and segmentation of cell nuclei in virtual microscopy images: a minimum-model approach. *Sci Rep.* 2:503-510.
- Zaidi HA, Cote DJ, Dunn IF, Laws ER, Jr. (2016) Predictors of aggressive clinical phenotype among immunohistochemically confirmed atypical adenomas. *J Clin Neurosci.* 34:246-251.
- Zhong F, Bi R, Yu B, Yang F, Yang W, Shui R (2016) A Comparison of Visual Assessment and Automated Digital Image Analysis of Ki67 Labeling Index in Breast Cancer. *PLoS One.* 11(2): e0150505.
- Zhou Y, Zhang X, Klibanski A (2014) Genetic and epigenetic mutations of tumor suppressive genes in sporadic pituitary adenoma. *Mol Cell Endocrinol.* 386(1-2):16-33.

8 Danksagung

Ich möchte mich in erster Linie ganz herzlich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Saeger, für die umfassende Unterstützung und Beratung während der gesamten Arbeitszeit an der Dissertation bedanken.

Herrn Prof. Dr. Markus Glatzel, Direktor des Instituts für Neuropathologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, möchte ich für die Möglichkeit der Erstellung dieser Promotionsarbeit unter Verwendung archivierten Schnittmaterials des Instituts danken.

Ich danke Herrn Dipl.-Ing. Kai Saeger, Geschäftsführer der Firma VMscope GmbH Berlin, für die freundliche und prompte Beratung zu allen Fragen, die sich im Umgang mit dem Ki-67 Quantifier der CognitionMaster Professional Suite im Rahmen dieser Arbeit ergeben haben.

Bei Frau Dr. rer. nat. Linda Krause, Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, möchte ich mich freundlich für Unterstützung bei der statistischen Auswertung der erhobenen Daten bedanken.

Der Firma 1a Studi danke ich für das Lektorat der vorliegenden Arbeit.

9 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: