

Aus dem Institut für Pathologie  
der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

KI-basierte Analyse von Ki-67-positiven Zellen in der therapierefraktären rheumatoiden  
Arthritis

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Lara Katharina Margarethe Blümke  
aus Kiel

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. H. Schild

1. Gutachter: Prof. Dr. med. T. Hansen

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. A. Schwarting

Tag der Promotion: 19.03.2025

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	i
Abbildungsverzeichnis .....	iv
Tabellenverzeichnis .....	vi
Abstrakt .....	vii
1 Einleitung / Ziel der Dissertation .....	1
1.1 Hintergrund .....	1
1.2 Materialien und Methoden .....	2
1.3 Ziel der Dissertation .....	2
2 Literaturdiskussion .....	3
2.1 Synovialis Aufbau und Funktion .....	3
2.2 Synovialitis .....	5
2.2.1 Definition .....	5
2.2.2 Synovialitis-Score (SC) .....	5
2.2.3 Immunhistochemischer Synovialitis-Score (IMSYC) .....	8
2.2.4 Genereller Synovialitis-Score (GSS) .....	9
2.3 Rheumatoide Arthritis .....	9
2.3.1 Krankheitsbild .....	9
2.3.2 Epidemiologie .....	10
2.3.3 Ätiologie und Pathogenese .....	10
2.3.4 Diagnostik .....	12
2.3.5 2010 Rheumatoid Arthritis Classification .....	13
2.3.6 Histopathologie .....	15
2.3.6.1 Proliferierende Zellen der rheumatoiden Synovialis .....	15
2.3.6.2 Gelenkmanifestation .....	16
2.3.6.3 Histopathologischer Gelenk-Pathologie-Algorithmus .....	17
2.3.7 Synovialitis-Scores .....	18
2.3.8 Extraartikuläre Erkrankung .....	19
2.3.8.1 Kutane Manifestationen .....	19
2.3.9 Therapie .....	20
2.3.10 Therapierefraktäre rheumatoide Arthritis .....	21
2.4 Ki-67 .....	25
2.4.1 Überblick .....	25
2.4.2 Molekulare Struktur und Funktion .....	26
2.4.3 Definition des histologischen Expressionsprofils bezüglich des Zellzyklus .....	28
2.4.4 Proliferationsmarker und Marker zur Risikostratifizierung von neoplastischen Erkrankungen .....	29
2.4.4.1 Analytische Interpretation des Ki-67-Index .....	30
2.4.4.2 Ki-67 in der Therapieentscheidung bei Mammakarzinom .....	30
2.4.4.3 Ki-67 bei der Stratifizierung neuroendokriner Tumoren .....	31

2.4.5	Proliferationsmarker entzündlicher Arthropathien .....	31
2.4.6	Quantifizierung von Ki-67 .....	33
2.5	KI-basierte Analyse .....	35
2.5.1	KI-basierte Bildanalyse .....	36
2.5.2	KI-Anwendung in der Medizin .....	39
2.5.3	KI-basierte Analyse Ki-67-positiver Zellen .....	41
2.5.4	KI-basierte Analyse der Gesamtzelldichte .....	42
2.5.5	Einsatz von KI-basierten-Quantifizierungssystemen in der Histopathologie von muskuloskelettalen Erkrankungen.....	43
2.5.6	MindPeak Breast, Ki-67 Rol.....	44
3	Material und Methoden .....	45
3.1	Diagnostische Kooperationsstruktur des MVZ-HZMD-Trier-GmbH.....	45
3.2	Patientendaten .....	46
3.2.1	Datenmanagement.....	46
3.3	Untersuchtes Gewebe .....	47
3.3.1	Klinische Datenbeschreibung der Arthritis-/Arthrose-Fälle .....	47
3.3.2	Untersuchte Gelenke.....	48
3.3.3	Therapie .....	48
3.4	Zuschnitt des Gewebes .....	49
3.5	Prozessierung des Gewebes.....	49
3.5.1	Fixierung.....	50
3.5.2	Entwässerung.....	50
3.5.3	Einblocken in Paraffin.....	50
3.5.4	Anfertigen der Schnittpräparate .....	50
3.6	Histologische Färbeverfahren.....	50
3.6.1	Hämatoxylin/Eosin-Färbung.....	50
3.6.2	Immunhistochemische Färbung.....	51
3.7	Anwendung des Synovialitis-Scores und der klinischen Einteilung.....	52
3.8	Quantitätsbestimmung von Ki-67-positiven Zellen .....	53
3.8.1	Visuelle computergestützte Ki-67-Quantifizierung.....	54
3.8.2	KI-gestützte Ki-67-Quantifizierung .....	54
3.8.3	Exemplarische Zeiterfassung.....	56
3.9	Anmerkung zu den Originalbildvergrößerungen.....	57
3.10	Statistische Auswertung .....	57
3.11	Ethikvotum .....	57
4	Ergebnisse .....	57
4.1	Deskriptive Statistik .....	58
4.1.1	Anteil Ki-67-positiver Zellen .....	58
4.1.2	Gesamtzellzahl .....	61
4.1.3	Reduktion des Work Load .....	61
4.2	Analytische Statistik.....	64

4.2.1	Tests auf Normalverteilung.....	64
4.2.2	Signifikanzprüfung.....	68
5	Diskussion.....	71
5.1	Ki-67-Quantität und high-grade Synovialitis.....	71
5.2	Gesamtzeldichte und high-grade Synovialitis.....	72
5.3	Ki-67-Quantität bei therapierefraktärer vs nicht-therapierefraktärer high-grade Synovialitis.....	74
5.4	Gesamtzeldichte bei therapierefraktärer vs nicht-therapierefraktärer high-grade Synovialitis.....	75
5.5	Work Load-Reduktion durch Anwendung einer KI .....	78
6	Zusammenfassung.....	79
6.1	Ki-67-Quantität .....	80
6.2	Gesamtzeldichte.....	80
6.3	Bedeutung der KI und Reduktion des Work Load .....	81
7	Literaturverzeichnis .....	82
8	Anhang .....	101
9	Danksagung.....	113
10	Tabellarischer Lebenslauf .....	114

## Abkürzungsverzeichnis

AAM	Assessment with AI-empowered microscope
ACPA	Anti citrullinated protein antibodies
ACR	American College of Rheumatology
ADA	Anti-drug-mediated non-response
AI	Artificial intelligence
APC/C-Cdh1	Anaphase Promoting Complex/Cyclosome-cdc20 Homolog1
ARC	Assessment with reference cards
AUC	Area under the curve
bDMARDs	Biological disease-modifying anti-rheumatic-drugs
BRISQ	Biospecimen Reporting for Improved Study Quality
BSG	Blutsenkung
CCP	Zyklisches zitruilliniertes Peptid
CD	Cluster of differentiation
CDAI	Clinical disease activity index
cdc20	Cell Division Cycle 20
CI	Konfidenzintervall
CNN	Convolved/convolutional neural network
CRP	C-reaktives-Protein
CSA	Chronisch septische Arthritis
csDMARDs	Conventional synthetic disease-modifying anti-rheumatic-drugs
D2T	Difficult-to-treat
DAB	Diaminobenzidin
DAS-28	Disease Activity Score 28
DAS28-ESR	Disease Activity Score 28 using erythrocyte sedimentation rate
DGORh	Deutsche Gesellschaft für Orthopädische Rheumatologie e.V.
DIA	Digital image analysis
DL	Deep learning
DMARDs	Disease-modifying anti-rheumatic-drugs
DNA	Desoxyribonucleic acid
DNN	Deep neural network
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Östrogenrezeptor
EULAR	European Alliance of Associations for Rheumatology
Fc	Fragment crystallizable
FDA	US Food and Drug Administration

FDC	Follikuläre dendritische Zellen
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin-Embedded
FHA	Forkhead-associated
Ggf.	Gegebenenfalls
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GSS	Genereller Synovialitis-Score
HE	Hämatoxylin/Eosin
Her2	Human epidermal growth factor receptor 2
HLA	Humane Leukozyten-Antigene
HLA-DRB1	Major histocompatibility complex, class II, DR beta 1
HPF	High power field
ICAM	Intercellular Cell Adhesion Molecule
ICC	Intraclass correlation coefficient
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IKWG	International Ki67 in Breast Cancer Working Group
IL	Interleukin
IMSYC	Immunhistochemischer Synovialitis-Score
IoU	Intersection over Union
JAK	Januskinase
k.A.	Keine Angabe
KI	Künstliche Intelligenz
LR	Leucin/arginine-rich
m	Männlich
MCP	Metacarpophalangealgelenk
min	Minuten
MKI67	Marker Of Proliferation Ki-67
ML	Maschinelles Lernen
mm	Millimeter
mRNA	Mitochondrial ribonucleic acid
MTP	Metatarsophalangealgelenk
MTX	Methotrexat
MVZ-HZMD	Medizinisches Versorgungszentrum für Histologie, Zytologie und molekulare Diagnostik
n	Anzahl
NET	neuroendokriner Tumor
NK	Natürliche Killer

OA	Osteoarthritis
p	P-Wert/Signifikanzwert
PDE	Phosphodiesterase
PIP	Proximales Interphalangealgelenk
PMID	PubMed Identifier
PP1	Phosphatase 1
PSA	Psoriasisarthritis
r	Korrelationskoeffizient
RA	Rheumatoide Arthritis
RANK	Receptor Activator of NF- $\kappa$ B
RANKL	Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand
ReLU	Rectified Linear Unit
REMARK	Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies
RF	Rheumafaktor
RGB	Rot-Grün-Blau
RNA	Ribonucleic acid
rRER	Raues endoplasmatisches Retikulum
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
rs	Spearman's rank correlation coefficient
s	Sekunden
SC	Synovialitis Score
SDAI	Simplified disease activity index
TC	Zytotoxische T-Zelle
TH	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
tsDMARDs	Targeted synthetic disease-modifying anti-rheumatic-drugs
u	Unbekannt
VA	Visuelle Analyse
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
vs	Versus
w	Weiblich
WHO	World Health Organisation
z.B.	Zum Beispiel
z.T.	Zum Teil
$\alpha$	Alphasignifikanzniveau

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: low-grade vs high-grade Synovialitis.....	7
Abbildung 2: Gelenk-Pathologie-Algorithmus .....	17
Abbildung 3: Stratifizierung der "Difficult-to-treat-RA" (Tan und Buch 2022) .....	22
Abbildung 4: EULAR definition of difficult-to-treat rheumatoid arthritis (D2T-RA) .....	23
Abbildung 5: The MKI67 mRNA and protein. ....	27
Abbildung 6: Beispiel einer CNN-Architektur für Bildklassifikation .....	39
Abbildung 7: high-grade Synovialitis, etwa 100fache Originalvergrößerung.....	52
Abbildung 8: high-grade Synovialitis, etwa 200fache Originalvergrößerung, HE, digitalisierter Bildausschnitt. Eigene Darstellung.....	54
Abbildung 9: high-grade Synovialitis, etwa 200fache Originalvergrößerung, Ki-67 - KI- basierte Analyse. Eigene Darstellung. ....	56
Abbildung 10: therapierefraktäre rheumatoide Arthritis, high-grade, etwa 200fache Originalvergrößerung.....	59
Abbildung 11: nicht-therapierefraktäre rheumatoide Arthritis, high-grade, etwa 200fache Originalvergrößerung.....	60
Abbildung 12: Osteoarthritis, low-grade, etwa 200fache Originalvergrößerung .....	60
Abbildung 13: Vergleich Zeitaufwand mit KI vs visuell nach Gruppen. Eigene Darstellung. ....	63
Abbildung 14: Zeitersparnis durch KI bei high-grade vs low-grade Synovialitis.....	64
Abbildung 15: Prüfung auf Normalverteilung der Ki-67-Positivität bei therapierefraktärer high-grade Synovialitis. ....	65
Abbildung 16: Prüfung auf Normalverteilung der Ki-67-Positivität bei nicht- therapierefraktärer high-grade Synovialitis. ....	65
Abbildung 17: Prüfung auf Normalverteilung der Ki-67-Positivität bei low-grade Osteoarthritis. ....	66
Abbildung 18: Prüfung auf Normalverteilung der Gesamtzellzahl/HPF bei therapierefraktärer high-grade Synovialitis. ....	66
Abbildung 19: Prüfung auf Normalverteilung der Gesamtzellzahl/HPF bei nicht- therapierefraktärer high-grade Synovialitis. ....	67
Abbildung 20: Prüfung auf Normalverteilung der Gesamtzellzahl/HPF bei low-grade Osteoarthritis. ....	67
Abbildung 21: Proliferationsfraktion (% Ki-67) nach Gruppen. ....	69
Abbildung 22: Gesamtzellzahl/HPF nach Gruppen.....	70
Abbildung 23: Gruppenverteilung. ....	104
Abbildung 24: Prüfung auf Normalverteilung von Ki-67 in % - therapierefraktäre high- grade Synovialitis. ....	106

Abbildung 25: Prüfung auf Normalverteilung von Ki-67 in % - nicht-therapier refraktäre high-grade Synovialitis. ....	106
Abbildung 26: Prüfung auf Normalverteilung von Ki-67 in % - low-grade Osteoarthritis. ....	107
Abbildung 27: Prüfung auf Normalverteilung von Ki-67 in % - therapier refraktäre high-grade Synovialitis. ....	107
Abbildung 28: Prüfung auf Normalverteilung von Ki-67 in % - nicht-therapier refraktäre high-grade Synovialitis. ....	108
Abbildung 29: Prüfung auf Normalverteilung von Ki-67 in % - nicht-therapier refraktäre high-grade Synovialitis. ....	108
Abbildung 30: Prüfung auf Normalverteilung von Gesamtzellzahl/HPF - therapier refraktäre high-grade Synovialitis.....	109
Abbildung 31: Prüfung auf Normalverteilung von Gesamtzellzahl/HPF - nicht-therapier refraktäre high-grade Synovialitis.....	109
Abbildung 32: Prüfung auf Normalverteilung von Gesamtzellzahl/HPF - low-grade Osteoarthritis. ....	110
Abbildung 33: Prüfung auf Normalverteilung von Gesamtzellzahl/HPF - therapier refraktäre high-grade Synovialitis.....	110
Abbildung 34: Prüfung auf Normalverteilung von Gesamtzellzahl/HPF - nicht-therapier refraktäre high-grade Synovialitis.....	111
Abbildung 35: Prüfung auf Normalverteilung von Gesamtzellzahl/HPF - low-grade Osteoarthritis. ....	111

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Histopathologischer Synovialitis-Score .....	6
Tabelle 2: Immunhistochemischer Synovialitis-Score – semiquantitative Erfassung der Biomarker: CD68, CD3, CD20, CD31 und Ki-67 .....	8
Tabelle 3: Klassifikationskriterien der 2010 Rheumatoid Arthritis Classification .....	14
Tabelle 4: klinische Patientendaten .....	49
Tabelle 5: Deskriptive Statistik – Ki-67-Positivität in % .....	59
Tabelle 6: Deskriptive Statistik - Gesamtzellzahl/HPF .....	61
Tabelle 7: Zeiterfassung - therapierefraktäre high-grade Synovialitis.....	62
Tabelle 8: Zeiterfassung - low-grade Osteoarthritis .....	62
Tabelle 9: statistische Auswertung Proliferationsfraktion (% Ki-67) mittels Kruskal-Wallis-Test.....	68
Tabelle 10: statistische Auswertung Gesamtzellzahl/HPF mittels Kruskal-Wallis-Test.....	70
Tabelle 11: Deskriptive Statistik - Ki-67-Positivität in %, Gesamtzellzahl/HPF .....	103
Tabelle 12: Zeiterfassung - therapierefraktäre high-grade Synovialitis.....	105
Tabelle 13: Zeiterfassung - low-grade Osteoarthritis.....	105
Tabelle 14: Prüfung auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test und mittels Shapiro-Wilk-Test.....	105
Tabelle 15: Kruskal-Wallis-Test Hypothesentestübersicht. ....	112
Tabelle 16: Zusammenfassung des Kruskal-Wallis-Tests bei unabhängigen Stichproben – Ki-67 in %.....	112
Tabelle 17: Zusammenfassung des Kruskal-Wallis-Tests bei unabhängigen Stichproben - Gesamtzellzahl/HPF.....	112

## Abstrakt

**Hintergrund und Ziel der Arbeit** - Definitionsgemäß stellt das „rebellische Gelenk“ pathogenetisch eine sogenannte therapierefraktäre Synovialitis bei rheumatoider Arthritis in einem oder einzelnen Gelenken dar. Die Pathomechanismen der lokalen Therapierefraktärität sind jedoch noch weitestgehend ungeklärt. In der Literatur wird Ki-67 als „synovialer Biomarker“ für die Synovialitis-Diagnostik verwendet. Es wurden Ki-67-exprimierende Zellen sowie die Gesamtzelldichte in insgesamt 81 Synovialitiden KI-gestützt quantifiziert. Daneben wurde die Zeitersparnis in der Quantifizierung durch Anwendung von KI exemplarisch erfasst.

**Patienten und Methoden** - Die Synovialitisfälle wurden nach dem Synovialitis-Score, dem Immunhistochemischen Synovialitis-Score und dem Generellen Synovialitis-Score in high- und low-grade Synovialitiden klassifiziert, sowie nach der klinischen Angabe „Therapierefraktärität“ bzw. „rebellisches Gelenk“. Die Ki-67-Positivität wurde immunhistochemisch analysiert und ebenso wie die Gesamtzelldichte KI-gestützt quantifiziert. Je fünf high- bzw. low-grade Fälle wurden zudem einmal visuell und einmal mit KI-Unterstützung auf Ki-67-Positivität ausgezählt und die Zeiten miteinander verglichen.

**Ergebnisse** - Die höchste Ki-67-Quantität zeigte sich in high-grade Synovialitiden (Mittelwert 21,5% nicht-therapierefraktäre bzw. 19,4% therapierefraktäre high-grade Synovialitiden), mit signifikant geringerer Quantität in low-grade Synovialitiden (Mittelwert 4,2%,  $p < 0,0001$ ). Die höchste Gesamtzelldichte zeigte sich in therapierefraktären high-grade Synovialitiden (Mittelwert 2293 Zellen/HPF), mit signifikant geringerer Gesamtzelldichte in nicht-therapierefraktären high-grade Synovialitiden (Mittelwert 1446 Zellen/HPF,  $p = 0,025$ ), sowie in low-grade Synovialitiden (Mittelwert 1313 Zellen/HPF,  $p = 0,011$ ). Die Zeitersparnis in der Quantifizierung von Ki-67 anhand von je 5 Messungen (high-grade und low-grade Synovialitis) betrug im Mittel 79,6 s (high-grade), mit einem p-Wert von 0,001, bzw. 3,8 s (low-grade), mit einem p-Wert von 0,079.

**Interpretation** - Die hohe Gesamtzelldichte und Ki-67-Quantität in high-grade Synovialitiden kann als Substrat für das Maß der lokalen Entzündung gewertet werden, mit deutlich höherer Ki-67-Fraktion bei high- im Vergleich zu low-grade Synovialitiden und deutlich höherer Gesamtzelldichte bei therapierefraktären high-grade Synovialitiden im Vergleich zu low-grade Synovialitiden. Ebenso kann ein signifikanter Unterschied der Gesamtzelldichte zwischen therapierefraktären und nicht-therapierefraktären high-grade Synovialitiden festgestellt werden. Diese kann damit ggf. als Marker zur Risikostratifizierung für die Entwicklung einer Therapierefraktärität angewendet werden. Daneben ist eine Reduktion des histopathologischen Work Load durch signifikante Zeitersparnis bei der Quantifizierung von Ki-67 zu erwarten.

# 1 Einleitung / Ziel der Dissertation

## 1.1 Hintergrund

Die Bezeichnung „rebellisches Gelenk“ wird im deutschen Sprachraum im Kontext der rheumatoiden Arthritis zum einen für die Beschreibung einer Therapierefraktärität bei der Anwendung von Standardtherapien wie disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) verwendet (Beil 2022). Daneben wird der Begriff im weiteren Sinne auch eingesetzt, wenn die Funktion eines Gelenkes im Rahmen einer rheumatoiden Arthritis nur mittels eines chirurgischen Eingriffes wie Synovektomie, Arthrodesse oder Endoprothetik verbessert werden kann (Bause 2018). Bei der Suche nach dem Begriff mit der Datenbank PubMed (National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information) findet man je eine deutschsprachige Publikation aus dem Bereich der Rheumatologie (Beil 2022) und aus dem Bereich der Orthopädie (Bause 2018) (Stand 07.08.2024). Das „rebellische Gelenk“ beschreibt dabei eine sogenannte therapierefraktäre Arthritis/Synovialitis (im Folgenden wird überwiegend der Begriff „Synovialitis“ stellvertretend für „Arthritis/Synovialitis“ verwendet) bei rheumatoider Arthritis in einem oder einzelnen Gelenken. Bei der Suche nach „Therapierefraktärität“ oder „therapierefraktäre Synovialitis“ im Kontext der rheumatoiden Arthritis findet man bei PubMed dagegen 1488 Resultate (Stand 07.08.2024), welche sich mit den verschiedenen Aspekten dieser Ausprägung einer rheumatoiden Arthritis beschäftigen. Im Folgenden werden für das „rebellische Gelenk“ daher die Begriffe „Therapierefraktärität“ oder „therapierefraktäre Synovialitis“ verwendet.

Ungeklärt ist bisher die Frage, welche Mechanismen zu einer lokalen Therapierefraktärität eines oder einzelner Gelenke führen. Erkennbar ist bereits, dass es sich um eine multikausale Pathogenese handelt. Für die histopathologische Klassifikation und Diagnostik wurden semi-quantitative Scores der Synovialitis entwickelt: Der Synovialitis-Score (SC), der Immunhistochemische Synovialitis-Score (IMSYC), der Generelle Synovialitis-Score (GSS) sowie die Quantifizierung von Ki-67 (Krenn et al. 2006; Najm et al. 2019; Cai et al. 2021), welche unter anderem bestimmte Zellpopulationen mit pathogenetischer Schlüsselstellung für die progressive und therapierefraktäre Synovialitis im Sinne einer Therapierefraktärität identifizieren. In der histopathologischen Befunderstellung des IMSYC wird auf die wesentlichen Leukozytenpopulationen eingegangen. Diese Zellen umfassen die Expression von Molekülen des sog. cluster of differentiation (CD)3, CD20, CD38, CD68 und Ki-67. Hierdurch werden die T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen semiquantitativ erfasst, zusätzlich wird die Proliferationsfraktion sämtlicher synovialer Zellen mit Ki-67 ermittelt.

Eine Analyse aus dem Jahr 2008 hatte den Marker Ki-67 (immunhistochemischer Marker für die Proliferation) als sogenannten „Synovialen Biomarker“ in der rheumatoiden Synovialitis

bewertet (Pessler et al. 2008b). Eine hohe positive Korrelation der Ki-67-Expression mit dem GSS konnte hier nachgewiesen werden.

Als weiterer Faktor zur histologischen Unterscheidung von high- und low-grade Synovialitiden wurde im Jahr 2023 die synoviale Gesamtzelldichte vorgeschlagen. In einer Studie konnte eine signifikant geringere Gesamtzelldichte in Osteoarthritis (OA) mit einem Mittelwert von 2900 Zellen pro Millimeter (mm)<sup>2</sup> Gewebe im Vergleich zu rheumatoider Arthritis (RA) mit einem Mittelwert von 4196 Zellen pro mm<sup>2</sup> Gewebe festgestellt werden (p-Wert (p) < 0,001) (Mehta et al. 2023). Im Rahmen der Routinediagnostik stellt sich zudem die Frage der Work Load-Reduktion (Zeitersparnis) durch Anwendung einer Künstlichen Intelligenz (KI)-Software zur Unterstützung bei der Quantifizierung Ki-67-positiver Zellen.

## 1.2 Materialien und Methoden

Insgesamt wurden 81 Fälle von Synovialitis untersucht. 23 Fälle von therapierefraktärer high-grade Synovialitis bei rheumatoider Arthritis („rebellisches Gelenk“) wurden analysiert und mit 22 Fällen von arthroseassoziierten low-grade Synovialitiden und 36 Fällen von rheumatoiden arthritissassoziierten high-grade Synovialitiden verglichen. Sämtliche Gewebeproben wurden im Rahmen der histopathologischen Routinediagnostik gewonnen und stellen einen integralen Bestandteil der Diagnostik für die Rheumatologie, orthopädische Rheumatologie und Orthopädie dar. Die Gruppeneinteilung erfolgte nach dem Synovialitis-Score (Krenn et al. 2006), dem immunhistochemischen Synovialitis-Score (Najm et al. 2019), dem Generellen Synovialitis-Score (Schmidt et al. 2019) sowie nach der klinischen Klassifikation als therapierefraktäre Synovialitis.

Die in drei Gruppen (high-grade therapierefraktäre rheumatoide Arthritis, high-grade nicht-therapierefraktäre rheumatoide Arthritis, arthroseassoziierte low-grade Synovialitis bzw. Osteoarthritis) eingeteilten Proben wurden KI-gestützt mittels eines Worst Area-Gradings auf Gesamtzelldichte und Ki-67-Positivität quantifiziert.

Zur Erfassung der Zeitersparnis wurde exemplarisch die Ki-67-Fraktion in fünf high-grade Synovialitiden sowie fünf low-grade Synovialitiden je einmal manuell und einmal KI-gestützt quantifiziert und die Bearbeitungszeiten miteinander verglichen.

## 1.3 Ziel der Dissertation

Die Arbeit hat die Beantwortung folgender sich aus den bisher vorliegenden Daten ergebender Fragen zum Ziel:

1. Stellt eine hohe Proliferationsfraktion (Ki-67-Expression) ein pathogenetisches Substrat einer lokalen Therapierefraktärität dar?

2. Stellt eine hohe Gesamtzelldichte ein pathogenetisches Substrat einer lokalen Therapierefraktärität dar?
3. Stellt die Verwendung einer künstlichen Intelligenz-Software zur Erfassung von Ki-67-positiven Zellen in der histopathologischen Diagnostik eine Reduktion des Quantifizierungsaufwandes (Work Load) in zeitlicher Hinsicht dar?

Diese Daten könnten einen Beitrag zum Pathogenese-Verständnis der therapierefraktären Synovialitis leisten und Anhaltspunkte für Erleichterung in der histopathologischen Diagnostik (Reduktion des Work Load) zur Risikostratifizierung von Synovialitiden liefern.

## **2 Literaturdiskussion**

In diesem Kapitel werden die für diese Studie relevanten Themenbereiche erläutert und der aktuelle Stand der Literatur dargelegt. Zunächst wird das in dieser Studie untersuchte Gewebe, die Synovialis, in ihrem Aufbau und ihrer Funktion beschrieben. Anschließend werden die Mechanismen der Synovialitis im Allgemeinen sowie der rheumatoiden Arthritis im Besonderen dargestellt. Es wird zudem auf die Therapie der RA sowie die Definition und Diagnostik der therapierefraktären RA eingegangen. Ein weiterer Abschnitt beschäftigt sich mit dem Proliferationsmarker Ki-67 und seiner Verwendung in der mikroskopischen Diagnostik mit besonderem Augenmerk auf die orthopädische und rheumatologische Histopathologie. Schlussendlich werden die Grundsätze der künstlichen Intelligenz, spezifisch in der Bildanalyse, und ihre Anwendung in der Medizin wiederum mit besonderem Augenmerk auf Ki-67 sowie die in dieser Studie ebenfalls erhobene Gesamtzelldichte beschrieben.

### **2.1 Synovialis Aufbau und Funktion**

Die Synovialis oder Synovialmembran bezeichnet das Weichgewebe, das die Räume der Diarthrodialgelenke, Sehnenscheiden und Schleimbeutel auskleidet. Sie leitet sich aus dem Mesoderm ab und ist aus zwei Strukturen aufgebaut. In einer Publikation aus dem Jahr 2011 wird die normale Synovialis beschrieben (Smith 2011): An der Oberfläche befindet sich eine Lage synovialer Deckzellen (Synoviozyten), welche in der Regel einreihig bis maximal dreireihig epitheloid angeordnet sind. Die Synoviozyten lassen sich weiter unterteilen in zwei Zellpopulationen: Makrophagenartige Synoviozyten (Typ A), welche morphologisch und funktionell dem Monozyten-Makrophagen-System zuzuordnen sind, und fibroblastenartige Synoviozyten (Typ B), welche unter anderem Hyaluronsäure, Proteoglykane, Zytokine, Arachidonsäuremetaboliten und Matrixmetalloproteinasen sezernieren (Li et al. 2019). Gemeinsam bilden diese die synoviale Intima.

Untersuchungen der Typ A-Zellen aus dem Jahr 1991 zeigten die Expression mehrerer Makrophagen-assoziiierter Antigene wie CD11b, CD16, CD14, CD163 und CD68 mit einer

Betonung auf CD163 und CD68 (Athanasou und Quinn 1991; Smith 2011; Zhao et al. 2023). Die fibroblastenartigen Typ B-Zellen exprimieren Oberflächenantigene wie Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM)-1, Intercellular Adhesion Molecule (ICAM)-1, CD44, CD55 und  $\beta 1$  Integrine (Smith 2011; Li et al. 2019). CD68 (Typ A Synoviozyten) und CD55 (Typ B Synoviozyten) werden häufig zur Differenzierung der beiden Zellpopulationen herangezogen (Stevens et al. 1990).

Darunterliegend befindet sich die synoviale Subintima, eine bindegewebige Schicht mit einer mittleren Kapillardichte, Lymphgefäßen, residenten Fibroblasten und Adipozyten, sowie einzelnen lokalen Immunzellen wie Makrophagen und Mastzellen in einer kollagenen extrazellulären Matrix. In dieser zweiten Schicht wird die hyaluronsäurereiche Synovia, die Gelenkflüssigkeit, gebildet und resorbiert (Smith et al. 2003; Morawietz et al. 2008a; Smith 2011; Scherer et al. 2020).

Der Aufbau der intimalen Matrix wird in der Arbeit von Smith 2011 ebenfalls detailliert beschrieben: Die intimale Matrix ist aus einer amorphen oder fein fibrillären Ultrastruktur bestehend aus Kollagen III, IV, V und VI mit einem geringen Anteil von Typ I Kollagen aufgebaut. Basalmembranbildende Moleküle wie Laminin, Fibronectin und Chondroitin-6-sulfat-reiches Proteoglykan sind in der intimalen Matrix zu finden, bilden aber in der gesunden Synovialis keine Basalmembran. Hyaluronsäure findet sich in großer Menge hauptsächlich in der Intima und den oberflächlichen Schichten der Subintima, während zur Tiefe zunehmend weniger Hyaluronsäure nachgewiesen werden kann.

Die Funktion der Synovialis in den Gelenken ist im Wesentlichen die Bereitstellung einer nicht adhären, verformbaren viskoelastischen Oberfläche zwischen verschiedenartigen, relativ formstabilen Geweben, die Produktion und Volumenkontrolle der Synovia als Schmierflüssigkeit für Knorpeloberflächen, sowie die Ernährung von Chondrozyten.

Daneben ist die Synovialis auch Teil des angeborenen Immunsystems. Genauer beschrieben wird dies von Bartok und Firestein 2010 sowie Nygaard und Firestein 2020. Über die Erkennung von pathogenassoziierten molekularen Mustern z.B. durch Toll-like Rezeptoren der Synoviozyten wird eine Immunantwort mit Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 und Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  und Chemokine ausgelöst. Neben diesen proinflammatorischen Mechanismen beteiligen sich die Synoviozyten auch an der antiinflammatorischen Immunregulation, indem sie entzündungshemmende Zytokine wie IL-10 und Transforming growth factor- $\beta$  produzieren. Die makrophagenartigen Typ A-Synoviozyten können zudem phagozytisch agieren und Zelltrümmer und Mikroorganismen abbauen. Im nächsten Kapitel wird die Entzündung der Synovialmembran, die Synovialitis, und die Entwicklung histologischer Scores für die Beurteilung und Stratifizierung der Synovialitis beschrieben.

## 2.2 Synovialitis

### 2.2.1 Definition

Bei der Synovialitis handelt es sich um eine entzündliche Veränderung der Synovialmembran mit Aktivierung der residenten Fibroblasten und Makrophagen (Firestein und McInnes 2017). Initial wandern hauptsächlich neutrophile Granulozyten, im Verlauf mit zunehmender Vaskularisierung verstärkt Lymphozyten in die Synovialis ein (Smolen et al. 2016). Die zunächst diffuse Verteilung der Immunzellen kann sich bei fortschreitender Entzündung zu einem Lymphgewebe mit Ausbildung von Follikeln organisieren (Firestein und McInnes 2017). In diesen können aus Antigen-aktivierten B-Lymphozyten Antikörper-sezernierende Plasmazellen entstehen, welche die Entzündung durch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren aufrechterhalten und intensivieren (Wu et al. 2021b).

Histologisch ist die chronische entzündliche Arthritis charakterisiert durch eine ausgeprägte intimale Hyperplasie und Infiltration der Subintima durch angeborene und adaptive Immunzellen (Ambarus et al. 2012). Im Verlauf kommt es durch diese zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren, Neoangiogenese und die Zerstörung von angrenzendem Knorpel und Knochen (Tak et al. 1997).

Bei der Synovialitis lassen sich histologisch drei Kompartimente unterscheiden und beurteilen: Synoviale Deckzellschicht, synoviales Stroma und entzündliches Infiltrat (Krenn et al. 2006). Anhand der Beurteilung dieser drei Kompartimente wurde von Krenn et al. 2006 ein Score für die Stratifizierung der Synovialitis in low- und high-grade Synovialitis entwickelt. In den anschließenden Jahren wurden auf dieser Basis zwei weitere Scores aufgebaut. Im Folgenden werden diese drei Synovialitis-Scores beschrieben.

### 2.2.2 Synovialitis-Score (SC)

Mittels des histopathologischen Synovialitis-Scores (Krenn et al. 2006) lassen sich semiquantitativ die immunologischen und entzündlichen Gewebsveränderungen der Synovialis darstellen. Hierbei werden die histopathologischen Veränderungen der drei Synovialis-Kompartimente (synoviale Deckzellschicht, Zelldichte des synovialen Stromas, entzündliches Infiltrat) mittels einer 4-stufigen Skala (nicht vorhanden, leichtgradig, mäßiggradig und schwergradig) semiquantitativ beurteilt (Krenn et al. 2006). Durch die Addition der erreichten Punkte ergibt sich ein Scorewert zwischen 0 und 9, s. Tabelle 1.

<b>Synoviale Deckzellschicht (Verbreiterung)</b>	
<b>0 Punkte</b>	Synoviale Deckzellschicht mit 1 – 2 Zelllagen
<b>1 Punkt</b>	Synoviale Deckzellschicht mit 2 – 3 Zelllagen
<b>2 Punkte</b>	Synoviale Deckzellschicht mit 4 – 5 Zelllagen
<b>3 Punkte</b>	Synoviale Deckzellschicht mit > 5 Zelllagen oder Deckzellschicht-Ulzerationen

<b>Synoviales Stroma (Zellularität)</b>	
<b>0 Punkte</b>	normale Zellularität des synovialen Stromas
<b>1 Punkt</b>	Das Synovialstroma zeigt eine geringgradig erhöhte Zelldichte
<b>2 Punkte</b>	Das Synovialstroma zeigt eine mäßiggradig erhöhte Zelldichte mit vereinzelt Nachweis multinukleärer Riesenzellen
<b>3 Punkte</b>	Das Synovialstroma zeigt eine hohe Zelldichte mit zahlreichen multinukleären Riesenzellen. fakultativ: rheumatoide (Hemi-)Granulome = 9 Punkte im Synovialitis-Score
<b>Leukozytäres Infiltrat (Muster der leukozytären entzündlichen Infiltration)</b>	
<b>0 Punkte</b>	keine entzündliche Infiltration
<b>1 Punkt</b>	geringgradige, perivaskulär akzentuierte lymphozytäre entzündliche Infiltration mit kleinsten Lymphozytenaggregaten
<b>2 Punkte</b>	größere Lymphozytenaggregate
<b>3 Punkte</b>	dichtes konfluentes plasmazellreiches entzündliches Infiltrat oder lymphatische Fokli mit erkennbaren Keimzentren

Tabelle 1: Histopathologischer Synovialitis-Score, Modifiziert nach: Krenn und Rütter 2012.

Der Score wurde anhand der Auswertung von 559 Synovialektomiepräparaten und 59 Biopsaten (insgesamt 618 Patienten mit einem mittleren Alter von 61,6 Jahren) durch zwei unabhängige Befunder mit einer hohen Interobserverkorrelation, Korrelationskoeffizient ( $r$ ) = 0,941,  $p < 0,001$ , validiert (Krenn et al. 2006). Dabei setzten sich die Proben wie folgt zusammen:

- Osteoarthritis:  $n = 212$
- Posttraumatische Arthritis:  $n = 22$
- Rheumatoide Arthritis:  $n = 246$
- Psoriasisarthritis:  $n = 22$
- Reaktive Arthritis:  $n = 9$
- Kontrollen (Autopsiepräparate):  $n = 49$

Der SC stratifiziert die Synovialitiden in sogenannte „low-grade Synovialitiden“ und „high-grade Synovialitiden“. Bei den low-grade Synovialitiden handelt es sich zumeist um degenerative oder posttraumatische Läsionen, während die high-grade Synovialitiden mit einer Sensitivität von 61,7 % und einer Spezifität von 96,1 % rheumatische Erkrankungen abbilden (Krenn et al. 2006). „Ein Synovialitis-Score von  $\leq 4$  wird als „low-grade Synovialitis“, ein Score von  $\geq 5$  als „high-grade Synovialitis“ bezeichnet.“ (Krenn und Rütter 2012)

Beispiel: In einer Hämatoxylin/Eosin (HE)-gefärbten Synovialis-Probe zeigt sich histopathologisch eine mäßiggradige Deckzellschichtverbreiterung (2 Punkte), eine mäßiggradige Zunahme der synovialen Stroma-Zellularität/Zelldichte (2 Punkte) und eine hochgradige Infiltration durch Lymphozyten und Plasmazellen, z.T. mit Ausbildung von Lymphfollikeln (3 Punkte).

Die Probe erhält einen Synovialitis-Score von 7/9 und ist damit einer high-grade Synovialitis zuzurechnen.

Zu erwähnen sei hier, dass die Komponenten Stromadichte und Intimahyperplasie ( $r = 0,91$  bzw.  $0,94$ ) einen größeren Einfluss auf die Trennschärfe des Scores haben als die Entzündungszellinfiltration ( $r = 0,60$ ) (Slansky et al. 2010). Die allgemeine diagnostische Wertigkeit des Scores wird jedoch durch die Vereinigung aller Einzelkomponenten synergistisch deutlich gesteigert (Pessler et al. 2008a; Slansky et al. 2010).

Abbildung 1 zeigt lichtmikroskopische Bilder einer low-grade Synovialitis in HE-Färbung und nach Ki-67-Reaktion (linke Seite) und einer high-grade Synovialitis mit denselben Färbungen (rechte Seite).

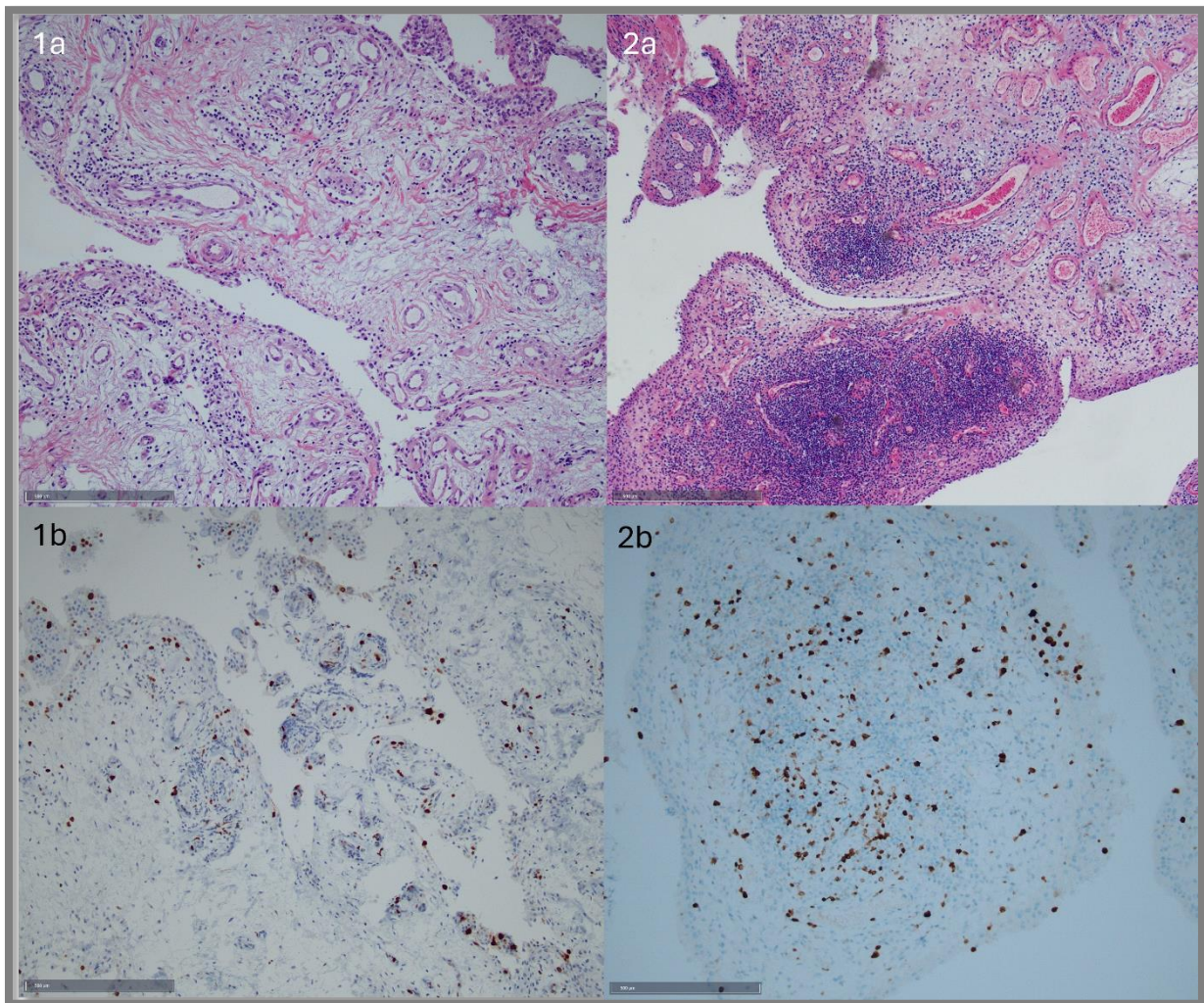


Abbildung 1: low-grade vs high-grade Synovialitis – low-grade Synovialitis, etwa 100fache Originalvergrößerung, HE (1a), Ki-67 (1b); high-grade Synovialitis, etwa 100fache Originalvergrößerung, HE (2a), Ki-67 (2b): Dichte lymphozytäre Aggregate in der high-grade Synovialitis (entspr. 2 Punkten für das Muster der leukozytären entzündlichen Infiltration im Synovialitis-Score), Bild 2a. Eigene Darstellung.

### 2.2.3 Immunhistochemischer Synovialitis-Score (IMSYC)

Der immunhistochemische Synovialitis Score ist ein 2019 von Najm et al. um fünf immunhistochemische Komponenten erweiterter Score, welcher auf dem SC basiert. Er hat zum Ziel eine verbesserte Vorhersage von Prognose und Therapieansprechen.

Als immunhistochemische Marker werden „CD68 (Makrophagen), CD3 (T-Lymphozyten), CD20 (B-Lymphozyten), CD31 (Endothelzellen) und Ki-67 (proliferierende Zellen)“ (Najm et al. 2019) verwendet, um die entsprechenden Zellpopulationen semiquantitativ zu erfassen (CD68, CD3, CD20, CD31) bzw. die Proliferationsfraktion sämtlicher synovialer und leukozytärer Zellen (Ki-67) zu ermitteln.

Jeder Marker wird individuell semiquantitativ erfasst, es werden 0 (kein Infiltrat), 1 (geringes Infiltrat), 2 (mäßiges Infiltrat) oder 3 (starkes Infiltrat) Punkte vergeben. Diese werden zu einem Score von maximal 15 Punkten addiert (s. Tabelle 2) (Najm et al. 2019).

<b>CD68</b>	
<b>0 Punkte</b>	Kein Infiltrat
<b>1 Punkt</b>	Geringes Infiltrat
<b>2 Punkte</b>	Mäßiges Infiltrat
<b>3 Punkte</b>	Starkes Infiltrat
<b>CD3</b>	
<b>0 Punkte</b>	Kein Infiltrat
<b>1 Punkt</b>	Geringes Infiltrat
<b>2 Punkte</b>	Mäßiges Infiltrat
<b>3 Punkte</b>	Starkes Infiltrat
<b>CD20</b>	
<b>0 Punkte</b>	Kein Infiltrat
<b>1 Punkt</b>	Geringes Infiltrat
<b>2 Punkte</b>	Mäßiges Infiltrat
<b>3 Punkte</b>	Starkes Infiltrat
<b>CD31</b>	
<b>0 Punkte</b>	Kein Infiltrat
<b>1 Punkt</b>	Geringes Infiltrat
<b>2 Punkte</b>	Mäßiges Infiltrat
<b>3 Punkte</b>	Starkes Infiltrat
<b>Ki-67</b>	
<b>0 Punkte</b>	Kein Infiltrat
<b>1 Punkt</b>	Geringes Infiltrat
<b>2 Punkte</b>	Mäßiges Infiltrat
<b>3 Punkte</b>	Starkes Infiltrat

Tabelle 2: Immunhistochemischer Synovialitis-Score – semiquantitative Erfassung der Biomarker: CD68, CD3, CD20, CD31 und Ki-67, Eigene Darstellung basierend auf Najm et al. 2019.

## 2.2.4 Genereller Synovialitis-Score (GSS)

Bei dem von Schmidt et al. 2019 formulierten Generellen Synovialitis-Score handelt es sich um eine Zusammenführung der beiden zuvor aufgeführten Scores (SC und IMSYC). Die Punktzahl des SC (0-9 Punkte) und die Punktzahl des IMSYC (0-15 Punkte) werden addiert und zu einem neuen Score, dem Generellen Synovialitis-Score, mit maximal 24 Punkten zusammengefasst.

Allen drei oben erläuterten Scores ist gemeinsam, dass sie eine Stratifizierung von Synovialitiden in low- und high-grade Synovialitis vornehmen und hierdurch eine Unterscheidung von rheumatischen und nicht-rheumatischen Krankheitsbildern ermöglichen. In dieser Studie wird genauer auf die rheumatoide Arthritis eingegangen, welche im folgenden Kapitel beschrieben wird.

## 2.3 Rheumatoide Arthritis

### 2.3.1 Krankheitsbild

Bei der rheumatoiden Arthritis, auch chronische Polyarthritis oder primäre chronische Polyarthritis genannt, handelt es sich um eine chronische Gelenkentzündung (Synovialitis), welche eine Destruktion und Verformung der Gelenke zur Folge haben kann. Einen guten Überblick über die Erkrankung bietet eine 2018 veröffentlichte Publikation von van der Woude und van der Helm-van Mil. Primär betroffen sind die Extremitätengelenke. Die Verteilung ist häufig symmetrisch, zudem sind meist mehrere Gelenke gleichzeitig betroffen. Der variable schubweise Verlauf lässt sich in drei Phasen einteilen: Proliferative Phase, destruktive und degenerative Phase, ausgebrannte und terminale Phase.

Wasserman 2011 beschreibt die Symptomatik der RA: Klinisch präsentiert sich die Gelenkmanifestation der rheumatoiden Arthritis durch eine schmerzhafte Gelenksteife sowie Schwellung und Rötung von in der Regel mehreren Gelenken und Weichteilen. Am häufigsten betroffen sind die Handgelenke, Metacarpophalangealgelenke (MCP) und proximalen Interphalangealgelenke (PIP). Typisch für die Erkrankung ist eine morgendliche Gelenksteife von über einer Stunde.

Neben der Gelenkmanifestation werden bei 30 – 40 % der Patienten extraartikuläre Manifestationen mit Rheumaknoten, Vaskulitiden, Perikarditis, Splenomegalie, Lymphknotenhyperplasie, normozytärer hyperchromer Anämie (durch IL-1-inhibierte Erythropoese), Pleuritis, interstitielle Pneumonie und Fibrose und in 10 % eine Hepatomegalie mit Steatose und portaler Entzündung festgestellt (Smolen et al. 2016; Scott et al. 2018). Daneben präsentiert sich die aktive rheumatoide Arthritis zum Teil mit allgemeinsystemischen Symptomen wie „Erschöpfung, Gewichtsverlust and niedriggradige[m] Fieber“ (Wasserman 2011).

Histologisch handelt es sich um eine proliferative Synovialitis mit hyperplastischer Synovialzellschicht und anfangs sowie im akuten Schub mit einer Infiltration der Synovialmembran durch neutrophile Granulozyten, welche im weiteren Krankheitsverlauf zunehmend durch Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen, Mastzellen und Lymphfollikel mit Keimzentren ersetzt werden. Auch fokale Fibrinablagerungen und eine fibrinoide Nekrose in der Synovialis kommen vor. Es kommt in der Folge zu einer granulierenden Entzündung mit Verdickung der Synovialmembran und „[...] der Ausbildung ödematöser, gefäßreicher Zotten“ (Böcker et al. 2012, S. 883).

Smolen et al. 2016 beschreibt die Konsequenzen der lokalen Entzündung auf die Gelenke. Die Schädigung und Destruktion von Gelenkknorpel und Knochen ist zum einen durch freiwerdende Enzyme und Zytokine, zum anderen durch die Beeinträchtigung der Knorpelernährung bedingt. Durch aktivierte Osteoklasten kommt es zunehmend zu einer Resorption des subchondralen Knochens. Durch die entzündliche Infiltration von periartikulärem Gewebe, Sehnen und Muskeln kommt es im fortgeschrittenen Krankheitsstadium zu einer fibrösen oder knöchernen Gelenkversteifung (Ankylose) mit Gelenkdeformationen.

Bis zu 2 cm große Rheumaknoten mit zentraler fibrinoider Nekrose und umgebenden palisadenartig angeordneten Epitheloidzellen (Histiozyten) mit peripher anschließenden Lymphozyten, Plasmazellen, Fibroblasten und Makrophagen finden sich in 25 – 35 % der Patienten (Turesson und Jacobsson 2004; Ljung et al. 2024).

### 2.3.2 Epidemiologie

Die weltweite Prävalenz der Erkrankung liegt bei ca. 0,5 – 1 % (Silman und Pearson 2002; Schmidt et al. 2019). Frauen sind zwei- bis dreimal häufiger betroffen als Männer, mit einem kumulativen Lebenszeit-Risiko für Frauen von 3,6 % und für Männer von 1,7 % (van der Woude und van der Helm-van Mil 2018; Jang et al. 2022). Die höchste Prävalenz bezogen auf das Lebensalter hat die RA zwischen dem 50. und 80. Lebensjahr (Weinblatt et al. 1985; Alamanos und Drosos 2005).

Genetik und Vererbung spielen dabei eine wichtige Rolle. In Zwillingsstudien wurde die erbliche Komponente anti citrullinated protein antibodies (ACPA)-positiver Patienten auf etwa 60% geschätzt (MacGregor et al. 2000).

### 2.3.3 Ätiologie und Pathogenese

Die primäre Ursache der rheumatoiden Arthritis ist noch ungeklärt. Durch humorale und zelluläre immunologische Mechanismen wird eine einmal ausgelöste Entzündung (z.B. durch bakterielle Erreger) aufrechterhalten. Autoantikörper kommen in 50 – 80 % aller RA-Patienten vor, die Werte steigen mit zunehmender Krankheitsdauer, da es bei seropositiver RA seltener zu einer Remission kommt (Scott et al. 2010; Smolen et al. 2016). Der bekannteste

Autoantikörper im Zusammenhang mit der rheumatoiden Arthritis ist der sogenannte Rheumafaktor (RF), welcher gegen den fragment crystallizable (Fc)-Teil von Immunglobulin (Ig)G gerichtet ist (Carubbi et al. 2019). Zuerst beschrieben wurde der RF bereits 1939 (Waalers 2007) bei Patienten mit RA. Rheumafaktoren lassen sich bei ca. 80 % der Patienten im Serum und in der Synovia nachweisen. Sie sind nicht spezifisch für die RA, sind aber mit schwereren und komplizierteren Verlaufsformen der rheumatoiden Arthritis assoziiert (Wu et al. 2021a). Daneben sind die meistuntersuchten Autoantikörper die Gruppe der zuerst 1964 beschriebenen (Nienhuis und Mandema 1964) ACPA, welche in seltenen Fällen bis zu zehn Jahre vor dem Auftreten einer RA detektiert werden können (Nielen et al. 2004). Sie besitzen eine dem RF vergleichbare Sensitivität von 60 – 70 % (Nell et al. 2005) sowie eine für RA hohe Spezifität von etwa 95 – 98 % (van der Helm-van Mil et al. 2005; Chang et al. 2016; van der Woude und van der Helm-van Mil 2018).

Smolen et al. 2016 beschreibt detailliert die Pathogenese der rheumatischen Gelenkentzündung: Zunächst ist die Entzündung auf das vaskularisierte Stratum synoviale beschränkt. Die sich hier befindlichen Lymphozyten und Plasmazellen produzieren Immunglobuline, vor allem vom Typ IgG. Immunkomplexe, aufgebaut aus Rheumafaktoren (vorwiegend IgM-, aber auch IgA- und IgG- Antikörper gegen den Fc-Teil des körpereigenen IgG) und IgG-Antikörpern finden sich in der Synovialis, in der Synovia und in extraartikulären Geweben. Antigene Peptide wie zyklisches zitruelliniertes Peptid (CCP) werden durch Humane Leukozyten-Antigene (HLA)-II-Moleküle an CD4-T-Zellen präsentiert. Es kommt daraufhin zu einer Aktivierung von Monozyten, Makrophagen und synovialen Fibroblasten, welche die Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  produzieren und Matrixmetalloproteinasen sezernieren. Hierdurch, sowie durch die aktivierten T-Zellen, werden B-Zellen zur Produktion von Immunglobulinen angeregt. Die Freisetzung angiogenetischer Faktoren wie des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) führt zur Neubildung von Blutgefäßen und zur Rekrutierung weiterer Entzündungszellen (Szekanecz und Koch 2007). Durch die Stimulation des Rezeptor-Aktivator-NF $\kappa$ B-Osteoprotegerin-Systems (RANK/RANKL-Osteoprotegerin-System) kommt es zur Ausbildung und Aktivierung von Osteoklasten, welche den subchondralen Knochen resorbieren und schlussendlich zu einer schweren periartikulären Osteoporose beitragen. Der Nachweis aktivierter T-Lymphozyten (T-Helfer (TH)- und zytotoxische T(TH)-Zellen) in der Synovialis gibt zudem einen Hinweis auf die Beteiligung zellulärer Immunreaktionen.

Die RA-Synovialis präsentiert einige Charakteristika neoplastischer Gewebe, wie von Firestein 2003 dargestellt. Zu diesen gehört das Wachstum von Synoviozyten unabhängig von der Anhaftung an einer festen Oberfläche, Defekte in der Kontaktinhibition und Oligoklonalität. Letztere lässt sich in rheumatoider Synovialis, nicht aber in der Synovialis bei OA nachweisen. Synoviale Dedifferenzierung und somatische Mutationen, z.B. im Tumorsuppressorgen p53,

sind ebenfalls beschrieben. Hierdurch entwickelt sich eine Resistenz der Synoviozyten gegen die Apoptose.

Familienuntersuchungen, sowie die Assoziation insbesondere der ACPA-positiven Erkrankung mit major histocompatibility complex, class II, DR beta 1 (HLA-DRB1) (Huizinga et al. 2005), suggerieren eine wichtige Rolle genetischer Faktoren für die Entwicklung einer RA (van der Woude und van der Helm-van Mil 2018). So geht eine positive Familienanamnese mit einem drei- bis neunfach erhöhten Risiko für RA einher (Hemminki et al. 2009). Zwillingsstudien zeigen zudem, dass die genetischen Risikofaktoren 50 – 60 % des Gesamtrisikos einer Erkrankung an RA ausmachen (Frisell et al. 2016). Zahlreiche Genloci, die mit einer erhöhten Anfälligkeit für die Entwicklung einer RA einhergehen, wurden ferner inzwischen identifiziert (Suzuki et al. 2003; Rieck et al. 2007; Viatte et al. 2013). In vielen Fällen bleibt jedoch unklar, in welchem Ausmaß und über welche pathogenetischen Mechanismen diese Loci zur Entwicklung einer RA beitragen (van der Woude und van der Helm-van Mil 2018).

Daneben werden auch epigenetische und Umweltfaktoren, wie z.B. Zigarettenrauch, Staub- und Silikonexposition, periodontale Erkrankungen und das Mikrobiom, als ätiopathogenetisch relevant in Betracht gezogen (Criswell et al. 2002; Stolt et al. 2005; Sugiyama et al. 2010; Hajishengallis 2015; Scherer et al. 2020). Der stärkste und am besten reproduzierbare umweltbasierte Risikofaktor unter diesen ist das Zigarettenrauchen mit einer eindeutigen Korrelation zwischen Dosis und Auftreten und Schwere einer RA (Criswell et al. 2002; Costenbader et al. 2006; Mikuls et al. 2010). Schätzungen ergeben, dass 25 % aller Fälle von RA und 35 % aller Fälle von seropositiver RA einen Zusammenhang mit dem Konsum von Zigaretten aufweisen (Costenbader et al. 2006; Källberg et al. 2011). Wie schon die genetischen, so sind auch die Umweltfaktoren in höherem Maße mit der seropositiven RA assoziiert (van der Woude und van der Helm-van Mil 2018). Eine Studie aus dem Jahr 2015 fand Abweichungen im intestinalen Mikrobiom von RA-Patienten im Vergleich mit gesunden Kontrollen, z.B. in Bezug auf die Verteilung von Clostridium, Lactobacillus und Bifidobacterium (Zhang et al. 2015).

#### 2.3.4 Diagnostik

Die Diagnosestellung erfolgt in erster Linie aufgrund klinischer Symptome sowie labordiagnostisch, mittels Untersuchung auf Antikörper gegen CCP (ACPA) oder RF (Aletaha et al. 2010). Hierbei ist ACPA der spezifischere Marker (Spezifität bis zu 100 %, Sensitivität bis zu 93 %), während RF bei RA zwar häufig vorkommt (75 – 90 %), nicht selten aber auch in Patienten mit anderen Erkrankungen wie z.B. Hepatitis C, Kollagenose, Infektionen oder auch gesunden, v.a. älteren, Menschen (bis zu 18 %) vorkommt und für die RA nur eine Spezifität von maximal 70 % erreicht (Nishimura et al. 2007; Iyengar et al. 2022). Der Nachweis von RF, ACPA oder beider Marker gelingt in 50 – 80 % der Patienten (Wasserman 2011). Bei aktiver RA lässt sich zudem meist eine Erhöhung der Blutsenkung (BSG) sowie des C-reaktiven-Proteins (CRP)

feststellen (Scott et al. 2010; Smolen et al. 2016). Beides kann zur Einschätzung der Krankheitsaktivität und des Ansprechens auf die Medikation herangezogen werden (van Leeuwen et al. 1993; Smolen et al. 2016).

Ein allgemeingültiger und reproduzierbarer klinisch-diagnostischer Algorithmus existiert bisher nicht. Die European Alliance of Associations for Rheumatology (EULAR) definiert daher sieben klinische Kriterien für Arthralgie mit hohem Verdacht auf die Entwicklung einer rheumatoiden Arthritis (van Steenberghe et al. 2017):

Anamnestische Parameter:

- Symptombdauer < 1 Jahr
- Symptome im Bereich der MCP
- Morgensteifigkeit > 60 Minuten (min)
- Mindestens ein erstgradiger Verwandter mit RA

Klinische Untersuchung

- Schwerste Symptome am Morgen
- Erschwerter Faustschluss
- Positiver Squeeze-Test der MCP-Gelenke

Sind drei der Kriterien erfüllt, kann von einem sensitiven Test (Sensitivität > 80 %), bei mindestens vier erfüllten Kriterien von einem spezifischen Test ausgegangen werden (Burgers et al. 2017).

Prognostische Faktoren sind entscheidend für die Auswahl der medikamentösen Therapie. Eine ausführliche Auflistung findet man in der Arbeit von Wasserman 2011. Zu den negativen prognostischen Faktoren gehören eine hohe Krankheitsaktivität mit vielen schmerzhaften und geschwollenen Gelenken, radiografische Gelenkerosionen, hoher RF und/oder ACPA, eine hohe BSG und/oder erhöhtes CRP sowie extraartikuläre Manifestationen. Epidemiologisch zählen zu den negativen prognostischen Faktoren höheres Alter, weibliches Geschlecht, Zigarettenkonsum, bestimmte Genotypen und insgesamt schlechtere physische Voraussetzungen, gemessen z.B. am Health-Assessment-Questionnaire-Score.

### 2.3.5 2010 Rheumatoid Arthritis Classification

Vielfach verwendete Klassifikationskriterien sind die 2010 American College of Rheumatology (ACR)-EULAR Indikationskriterien für rheumatoide Arthritis (Score-basiert: Die Scores der Kategorien A bis D werden addiert, ein Score von  $\geq 6/10$  ist für eine Klassifikation einer definitiven rheumatoiden Arthritis notwendig) (Kay und Upchurch 2012), s. Tabelle 3.

Domain	Category	Point score
A	Joint involvement (0–5 points) <sup>a</sup>	
	1 large joint	0
	2–10 large joints	1
	1–3 small joints (large joints not counted)	2
	4–10 small joints (large joints not counted)	3
	>10 joints including at least one small joint	5
B	Serology (at least one test needed for classification; 0–3 points) <sup>b</sup>	
	Negative RF and negative ACPA	0
	Low positive RF or low positive ACPA	2
C	Acute-phase reactants (at least one test needed for classification; 0–1 point) <sup>c</sup>	
	Normal CRP and normal ESR	0
	Abnormal CRP or abnormal ESR	1
D	Duration of symptoms <sup>d</sup>	
	<6 weeks	0
	≥6 weeks	1

Tabelle 3: Klassifikationskriterien der 2010 Rheumatoid Arthritis Classification, modifiziert nach Kay und Upchurch 2012; Nutzung unter Creative Commons License (CC BY-NC).

Die Punkte jeder Kategorie A bis D werden addiert und die Summe wird als Gesamt-Score gewertet. Ein Gesamt-Score von  $\geq 6$  wird benötigt, um einen Patienten als definitiv an RA erkrankt zu klassifizieren.

a Gelenkbeteiligung schließt jedes geschwollene oder schmerzhafte Gelenk während der Untersuchung ein, dies kann mittels bildgebenden Nachweises einer Synovialitis bestätigt werden. DIP-Gelenke, die ersten Carpometacarpalgelenke und die ersten Metatarsophalangealgelenke (MTP) werden aus dem Assessment ausgeschlossen. Große Gelenke bezieht sich auf die Schultern, Ellbogen, Hüften, Knie und Sprunggelenke. Kleine Gelenke bezieht sich auf Metacarpophalangealgelenke, PIP-Gelenke, die zweiten bis fünften MTP-Gelenke, Daumen-Interphalangealgelenke und Handgelenke.

b Negativ bedeutet weniger als oder gleich der oberen Grenze zum Normalbefund (upper limit of normal, ULN); niedrig positiv bedeutet  $> ULN$ ; hoch positiv bedeutet  $> 3x ULN$ .

c Normal und abnormal werden durch die lokalen Laborstandards festgelegt.

d Symptombdauer nach Selbstbericht des Patienten.

Die Tabelle wurde adaptiert von Aletaha et al. 2010 mit Erlaubnis von John Wiley and Sons Ltd..

„Die Krankheitsaktivität wird mittels verschiedener standardisierter Scores, wie z.B. dem Disease Activity Score 28 (DAS-28), dem clinical disease activity index (CDAI) und dem simplified disease activity index (SDAI) überwacht“ (übersetzt aus Schmidt et al. 2019). Aufgrund der hohen Korrelation dieser drei Scores kann für Studien einer als repräsentativer Vertreter zum Vergleich ausgewählt werden (Schmidt et al. 2019).

### 2.3.6 Histopathologie

#### 2.3.6.1 Proliferierende Zellen der rheumatoiden Synovialis

In der Synovialis finden sich lokale Zellpopulationen (Smith 2011): Erstens Typ A-Synoviozyten, welche dem Monozyten-Makrophagen-System und damit dem angeborenen Immunsystem zuzuordnen sind, und typische Antigene wie CD68 exprimieren. Zweitens fibroblastenartige Typ B-Synoviozyten, welche keine Monozyten-typischen Antigene exprimieren. Daneben finden sich aus dem Blut rekrutierte Immunzellen wie T- und B-Lymphozyten und dendritische Zellen (DC) (Tak et al. 1997). Welche dieser Zellen für die Zelldichte und die Aufrechterhaltung der lokalen Entzündungsreaktion verantwortlich sind, wurde von Krenn et al. 1996 analysiert. Dabei wurden 21 Kryo-Synovialisproben von Patienten mit seropositiver RA mittels Doppelfärbung gegen CD68 und Ki-67 auf proliferierende Typ A- und Typ B-Synoviozyten untersucht. Hier zeigte sich eine etwa gleichmäßige Verteilung Ki-67-positiver Typ A- und Typ B-Synoviozyten bei insgesamt sehr geringer Proliferationsfraktion dieser lokalen Zellpopulation. T-lymphozytäre Proliferation wurde mittels Doppelfärbung gegen CD3 und Ki-67 verteilt auf drei spezifische Kompartimente identifiziert: Follikelartige Lymphozyten-Aggregate, perivaskuläre Räume und die synoviale Intima mit angrenzendem Gewebe. Eine ähnliche Verteilung wie die T-Lymphozyten zeigten interdigitierende Retikulumzellen ( $r = 0,913$ ). Acht der insgesamt 21 Proben wiesen einen hohen bzw. sehr hohen Anteil proliferierender T-Lymphozyten auf. B-lymphozytäre Proliferation, detektiert mittels CD22 und Ki-67, konnte hauptsächlich in Follikeln mit assoziierten follikulären dendritischen Zellen (FDC), sowie in der Nähe der verbreiterten synovialen Intima in Assoziation mit einzelnen FDC nachgewiesen werden ( $r = 0,8727$ ). Dabei bildeten die FDC in den meisten Fällen keine für Sekundärfollikel typische Architektur aus. Fünf Proben wiesen einen hohen bzw. sehr hohen Anteil proliferierender B-Lymphozyten auf, wobei diffuse, subsynoviale B-Lymphozyteninfiltrate ohne assoziierte FDC keine Proliferation

zeigten. Es konnte ein signifikant höherer Anteil proliferierender, DC-assoziiierter Lymphozyten bei hoher lokaler Entzündungsaktivität im Vergleich zu niedriger lokaler Entzündungsaktivität nachgewiesen werden ( $p \leq 0,01$ ).

#### 2.3.6.2 Gelenkmanifestation

Bereits makroskopisch fällt entzündete Synovialis durch Hyperplasie und Hypervaskularisation auf (Orr et al. 2017). Histopathologisch präsentiert sich die rheumatoide Arthritis bei hoher Entzündungsaktivität als insgesamt zeldichte high-grade Synovialitis (Krenn et al. 1996). Dabei liegt der primäre Fokus auf der leukozytären entzündlichen Infiltration durch T- und B-Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen, Neutrophile Granulozyten, Mastzellen, Natürliche Killer (NK-)-Zellen und DC (Tak et al. 1997). Zudem kommt es z.T. „[zu] Ausbildung sekundärer lymphatischer Follikel bzw. konfluierender, plasmazellreicher, entzündlicher Infiltrate“ (Krenn und Rütter 2012) bei in der Regel mäßiggradiger Deckzellschichtverbreiterung und mäßiggradiger synovialer Zelldichte. Die Verbreiterung der Synovialis wird im Wesentlichen auf die Zunahme CD68-positiver Makrophagen in der Intima und eine ausgeprägte Infiltration der Subintima durch T- und B-Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen in Kombination mit Stromaödem und einer Gefäßproliferation, typischerweise (in ca. 80 % der RA-Fälle) gerade verlaufender, sich verzweigender, unreifer Gefäße (Reece et al. 1999; Kennedy et al. 2010), zurückgeführt. Makrophagen können dabei in der rheumatoiden Arthritis bis zu 80 % der Intima ausmachen (Smith 2011). Ein typisches histopathologisches Bild für die RA ist die Ausbildung von synovialem Pannus-Gewebe mit Invasion in den angrenzenden Knorpel und Knochen sowie daraus resultierender Erosion (Orr et al. 2017). Durch die reaktiven Veränderungen der Synovialis mit Hyperplasie, leukozytärem Infiltrat und Neovaskularisation kommt es zu einer Änderung der Gewebsdurchlässigkeit (Levick 1981). Die Durchlässigkeit für große Moleküle steigt, während kleine Moleküle wie Harnsäure und Glukose schlechter die Gewebsbarriere passieren können. Dies resultiert in einem höheren Proteinanteil in der Synovia (Orr et al. 2017). Die Zusammensetzung der artikulären Hyaluronsäure verschiebt sich in Richtung eines geringeren durchschnittlichen Molekulargewichts, einhergehend mit zunehmendem Verlust und infolgedessen einer geringeren durchschnittlichen Konzentration von Hyaluronsäure bei OA und RA (Decker et al. 1959; Swann et al. 1974; Bowman et al. 2018).

Auch bei geringer Entzündungsaktivität oder gar Remission weisen einige Patienten histologische Merkmale für eine high-grade Synovialitis auf. Dies wird als subklinische Synovialitis bezeichnet. Eine Studie von 2019 zeigte, dass 27 % der untersuchten Patienten mit rheumatoider Arthritis in Remission und 31 % der untersuchten Patienten mit geringer Krankheitsaktivität eine subklinische Synovialitis aufwiesen (Orange et al. 2019).

### 2.3.6.3 Histopathologischer Gelenk-Pathologie-Algorithmus

Für eine systematische Herangehensweise an die histopathologische Untersuchung von Synovialisproben wurde von Krenn et al. 2017 der Gelenk-Pathologie-Algorithmus entwickelt. Dieser umschließt nicht nur die entzündlichen Differentialdiagnosen bei synovialitisartigen Symptomen, sondern auch infektiöse, metabolische, kristalline, autoimmune, tumorähnliche und neoplastische Differentialdiagnosen (s. Abbildung 2).

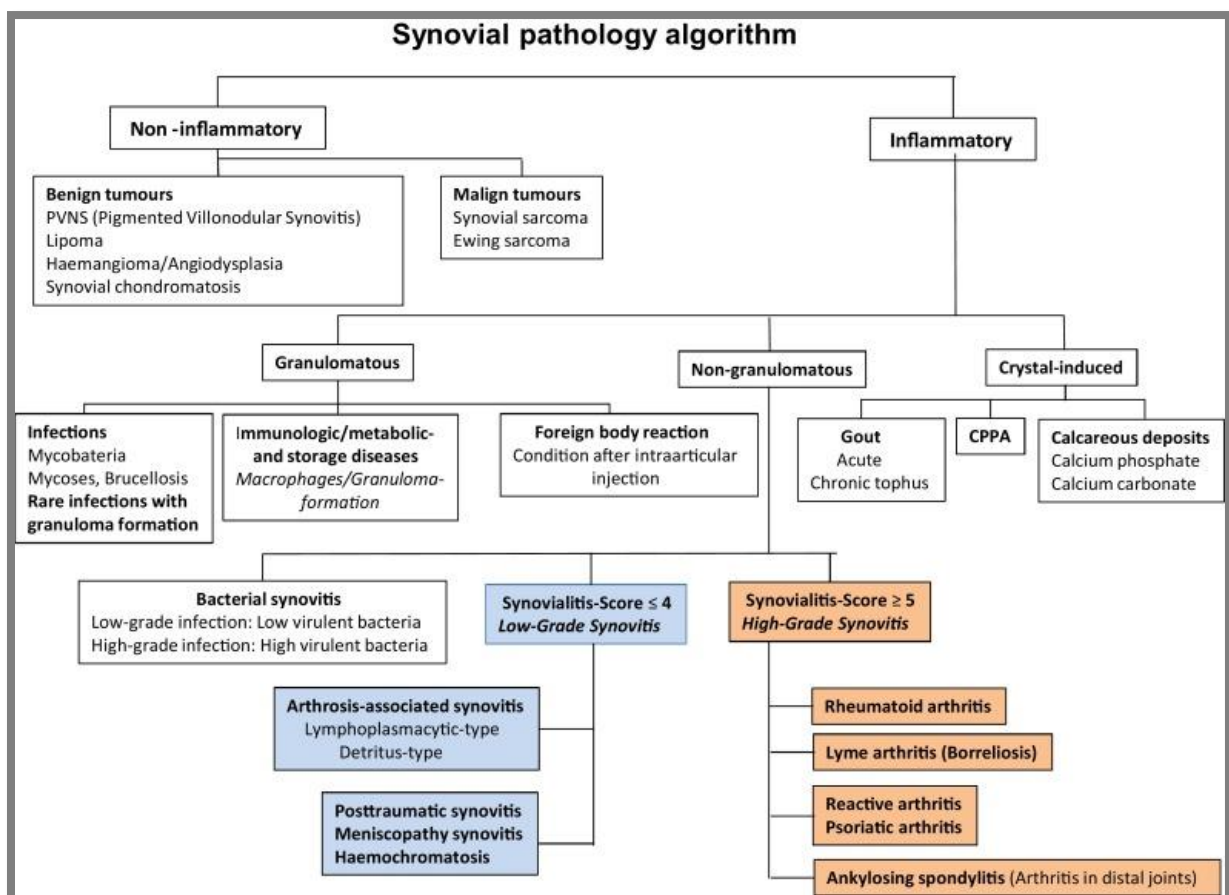


Abbildung 2: Gelenk-Pathologie-Algorithmus mit Integration von low-grade (Blau) und high-grade Synovialitis (Orange); Beschreibung übersetzt aus dem Englischen, übernommen von Krenn et al. 2017; lizenzierte Nutzung unter Lizenznummer: 5830780687309.

Bezogen auf die RA kann dem Algorithmus folgendermaßen nachgegangen werden:

- Es handelt sich um eine inflammatorisch veränderte Synovialis.
- Die Inflammation ist nicht-granulomatös.
- Der Synovialitis-Score ist  $\geq 5/9$  (high-grade Synovialitis).

Die Differentialdiagnosen umfassen: Rheumatoide Arthritis, Lyme Arthritis (Borreliose), Reaktive/Psoriasis-Arthritis und Ankylosierende Spondylitis.

### 2.3.7 Synovialitis-Scores

Definitionsgemäß handelt es sich bei der aktiven Gelenkmanifestation einer RA um eine high-grade Synovialitis mit einem SC von mindestens 5/9. Für rheumatoide Granulome (fokale Fibrinablagerungen und fibrinoide Nekrose umgeben von palisadenartig angeordneten Epitheloidzellen) werden automatisch 9 Punkte im SC vergeben (Krenn et al. 2006).

Die klinische Krankheitsaktivität der rheumatoiden Arthritis, gemessen z.B. am CDAI, korreliert signifikant sowohl mit dem GSS ( $r = 0,65$ ,  $p < 0,001$ ) als auch dem IMSYC, wobei letzterer eine höhere Korrelation aufweist ( $r = 0,68$ ,  $p < 0,001$ ) (Schmidt et al. 2019).

Die Korrelation der Synovialitis-Scores mit dem klinischen Score (CDAI) wurde von Schmidt et al. 2019 genauer untersucht. In Bezug auf die Therapie unterscheidet sich die Korrelation der Synovialitis-Scores mit dem klinischen Score (CDAI). So ist sie bei Patienten unter Methotrexat (MTX)-Therapie stärker als bei Patienten mit Anti-TNF- $\alpha$ -Therapie (signifikant bezogen auf den GSS  $r = 0,86$  (MTX),  $r = 0,55$  (Anti-TNF- $\alpha$ ), nicht signifikant bezogen auf den IMSYC mit  $r = 0,81$  (MTX),  $r = 0,61$  (Anti-TNF- $\alpha$ )) und signifikant stärker bei arthroplastischen Eingriffen als bei Synovektomie (IMSYC:  $r = 0,81$  (Arthroplastik),  $r = 0,54$  (Synovektomie)). Zudem ist die Korrelation bei großen Gelenken etwas stärker als bei kleinen Gelenken (GSS:  $r = 0,72$  (große Gelenk),  $r = 0,61$  (kleine Gelenke); IMSYC:  $r = 0,76$  (große Gelenke),  $r = 0,69$  (kleine Gelenke)). Keine signifikanten Unterschiede zeigen sich zwischen seropositiven und seronegativen Patienten sowie bei präoperativer Prednisolon-Therapie. Bei einer Unterteilung in Bezug auf die Krankheitsaktivität („Remission, geringe Aktivität, mäßige Aktivität und hohe Aktivität nach CDAI“ (Schmidt et al. 2019)) sind sowohl der GSS als auch IMSYC erwartungsgemäß bei Remission und geringer Aktivität signifikant niedriger ( $p < 0,05$ ). Eine Differenzierung zwischen mäßiger und hoher Krankheitsaktivität ist jedoch anhand dieser Scores nicht möglich.

Während die histopathologische Begutachtung in der Primärdiagnostik der RA eine untergeordnete Rolle spielt und in den internationalen Klassifikationskriterien (Kay und Upchurch 2012) nicht vorkommt, ist die Synovialisbiopsie oder -entnahme im Rahmen von z.B. endoprothetischer Versorgung großer Gelenke, in der Differentialdiagnostik bei unklarer Arthritis (Hügler et al. 2015) oder Therapierefraktärität ein wichtiges Instrument (Krenn et al. 2017). Die Analyse von Synovialisbiopsien konnte als repräsentativ für den Gelenkstatus kleiner Gelenke bei RA-Patienten etabliert werden (Scirè et al. 2007). Unter Anwendung des „Gelenk-Pathologie-Algorithmus“ (s. Abbildung 2), welcher unter anderem den SC beinhaltet, kann mit der histopathologischen Synovialisdiagnostik eine Stratifizierung unklarer Arthritiden erfolgen und so die weitere Diagnostik gelenkt werden (Krenn et al. 2017). Zudem kann für die Kontrolle des Therapieerfolges das histopathologisch identifizierte Ausmaß der Entzündungszellinfiltration von entscheidender Bedeutung sein. In Abwesenheit einer effektiven Therapie,

unabhängig von klinischen Scores, weist die entzündliche Infiltration keine signifikanten Änderungen auf (Baeten et al. 2006).

In der experimentellen Rheumatologie bzw. der rheumatologischen Forschung wird der SC von zahlreichen Autoren angewendet. Die Originalveröffentlichung aus dem Jahr 2006 (Krenn et al. 2006) wird von 37 PubMed-gelisteten (National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information) Publikationen der Rubriken „Clinical Trial, Randomized Controlled Trial, Review und Systematic Review“ und insgesamt von 280 Publikationen zitiert (anhand von PubMed Identifier (PMID): 16978198, Stand 17.07.2024). Die Originalveröffentlichung zum IMSYC (Najm et al. 2019) wird gleichermaßen von 14 Publikationen zitiert (anhand von PMID: 29709696, Stand 17.07.2024).

### 2.3.8 Extraartikuläre Erkrankung

Eine Studie zu extraartikulären Manifestationen mit 83 RA-Patienten mit einer durchschnittlichen Krankheitsdauer vor Therapiebeginn mit DMARDs von acht Monaten wurde im Jahr 2022 veröffentlicht (Díaz Cuña et al. 2022). 38 % der Patienten wiesen extraartikuläre Manifestationen auf. Darunter die häufigste war eine interstitielle Lungenerkrankung (34,4 % der extraartikulären Erkrankungen), gefolgt von Neuropathie (18,8 %), inflammatorischer Anämie (15,6 %), Serositis oder Perikard-/Pleuraerguss (12,5 %) und Rheumaknoten (12,5 %). Daneben traten Felty-Syndrom, Bronchiektasien, rheumatoide Vaskulitis, Thrombozytopenie, Pneumothorax und unklares Fieber auf. Dabei konnten die Forscher eine nicht signifikant höhere Assoziation extraartikulärer Manifestationen mit seropositiver im Vergleich zu seronegativer RA feststellen (RF 90,5 % gegen 81,8 %, ACPA 82,4 % gegen 75 %). Eine höhere Anfälligkeit für Infektionskrankungen, in dieser Studie 55 %, passte zu ähnlichen Ergebnissen anderer internationaler Untersuchungen (Winthrop KL 2012; Marcucci et al. 2018). Am Häufigsten treten dabei Harnwegsinfekte auf, gefolgt von Atemwegsinfekten, Haut- und Weichgewebsinfektionen sowie Infektionen des Verdauungstraktes (Díaz Cuña et al. 2022).

#### 2.3.8.1 *Kutane Manifestationen*

Zu den extraartikulären Manifestationen der rheumatoiden Arthritis zählen auch die kutanen Ausprägungen der Erkrankung, wie z.B. von Sayah und English 2005 aufgeführt. Unspezifische Hautveränderungen sind z.B. Atrophie und Empfindlichkeit sowie Blässe bis hin zu durchscheinender Haut im Bereich der Finger und Zehen mit sklerodermiformer Ausprägung über geschwollenen Interphalangealgelenken. Gefäßveränderungen zeigen sich im Bereich der Hände durch palmares Erythem und Raynaud-artige bläuliche Verfärbung der Fingerspitzen.

Klassische rheumatoide Knoten finden sich in ca. 25 % der RA-Patienten und sind die häufigste extraartikuläre Manifestation der RA (Gordon et al. 1973; Ziff 1990; Guo et al. 2018). Diese treten üblicherweise im späteren Verlauf der Erkrankung auf (Ziff 1990). Gleichwohl kann es in Ausnahmefällen zur Bildung von Rheumaknoten vor der Gelenksymptomatik

kommen (Lowney und Simons 1963; Guo et al. 2018). Außer in der Haut können Rheumaknoten auch in den „Lungen, der Pleura, dem Perikard, Sehnen, Synovialis, Knochen, Stimmbänder, Peritoneum, Dura, Sklera, der Nase, den Ohren und dem Herz“ (übersetzt aus Bernhard G. 1985) auftreten. Histologisch sind diese Knoten aufgebaut aus Granulomen und narbigem Gewebe mit unregelmäßig angeordneten kleinen Gefäßinseln mit Infiltraten durch Lymphozyten, Plasmazellen und Histiocyten (Schumacher 1988; Bang et al. 2019). Typisch ist der dreischichtige Aufbau aus zentraler fibrinoider Nekrose, angrenzenden palisadierenden Makrophagen mit Expression des HLA-DR-Antigens und einer umgebenden Schicht perivaskulären Granulationsgewebes mit chronischer Entzündungszellinfiltration (Palmer et al. 1987; Miyasaka et al. 1989; Ziff 1990; Sayah und English 2005). Die rheumatoide Vaskulitis tritt mit einer jährlichen Inzidenz von < 1 % auf (Panush et al. 1983; Bang et al. 2019) und betrifft meistens seropositive Patienten (Scott D.G., Bacon P.A., Tribe C.R. 1981; Ntatsaki et al. 2014).

### 2.3.9 Therapie

Ziel der Therapie der rheumatoiden Arthritis ist eine Remissionsinduktion oder das Aufrechterhalten einer niedrigen Krankheitsaktivität. Hierfür werden konventionelle synthetische (cs)DMARDs wie MTX, Leflunomid, Sulfasalazin und Hydroxychloroquin, zielgerichtete synthetische (ts)DMARDs wie Januskinase (JAK)-Inhibitoren (Tofacitinib, Baricitinib, Filgotinib, Upadacitinib) und Phosphodiesterase (PDE)-4-Hemmer (Apremilast) oder biologische (b)DMARDs wie monoklonale Antikörper (TNF $\alpha$ -Inhibitoren) und rekombinante Rezeptoren mit dem Ziel der Blockade von Zytokinen, welche für die Entzündungskaskade in der RA verantwortlich sind, eingesetzt (Wasserman 2011; Schmidt et al. 2019; Smolen et al. 2020; Hollstein 2022).

Als Erstlinientherapeutikum zur Monotherapie bei relevanter Krankheitsaktivität und/oder dem Vorliegen negativer prognostischer Faktoren wird in aller Regel, ohne Vorliegen von Kontraindikationen wie Schwangerschaft oder Unverträglichkeit, MTX eingesetzt (Wasserman 2011). Eine häufige Alternative ist Leflunomid (Saag et al. 2008; Wasserman 2011). Bei Vorliegen positiver prognostischer Faktoren wie Seronegativität oder nicht-erosiver RA kommen als Monotherapie z.B. Sulfasalazine (bei hoher Krankheitsaktivität) oder Hydroxychloroquin (bei geringer bis mäßiger Krankheitsaktivität) zum Einsatz (Saag et al. 2008; Wasserman 2011).

Die Kombinationstherapie mit mindestens zwei nicht biologischen DMARDs ist effektiver als die Monotherapie ( $p = 0,00001$ ) und wird bei persistierender Krankheitsaktivität eingesetzt (Choy et al. 2005). Die empfohlenen Kombinationsmöglichkeiten nicht biologischer DMARDs umfassen z.B. MTX plus Hydroxychloroquin bei mäßiger bis hoher Krankheitsaktivität oder längerer Krankheitsdauer und geringer -aktivität, unabhängig von prognostischen Faktoren; MTX plus Leflunomid bei mittlerer oder längerer Krankheitsdauer von sechs oder mehr

Monaten bei hoher Krankheitsaktivität, unabhängig von prognostischen Faktoren; MTX plus Sulfasalazin bei hoher Krankheitsaktivität und negativen prognostischen Faktoren, unabhängig von der Krankheitsdauer; und Hydroxychloroquin plus Sulfasalazin bei einer Krankheitsdauer von 6 – 24 Monaten bei hoher Krankheitsaktivität und fehlenden negativen prognostischen Faktoren (Saag et al. 2008). Bei negativen prognostischen Faktoren, mäßiger bis hoher Krankheitsaktivität und längerer Krankheitsdauer kommt auch die Kombination von drei DMARDs (MTX, Hydroxychloroquin und Sulfasalazin) in Frage (Saag et al. 2008).

Der Einsatz biologischer DMARDs (TNF- $\alpha$ -Inhibitoren) in Kombination mit MTX im Rahmen der Erstlinientherapie in der Frühphase der RA (< 3 Monate) ist nur bei hoher Krankheitsaktivität und dem Vorliegen negativer prognostischer Faktoren empfohlen (Wasserman 2011). Bei mittlerer und längerer Krankheitsdauer und Versagen oder Kontraindikationen einer MTX-Monotherapie, einer MTX-Kombinationstherapie oder einer sequenziellen Therapie mit anderen nicht biologischen DMARDs wird der zusätzliche Einsatz von bDMARDs bei zumindest mäßiger residualer Krankheitsaktivität empfohlen (Saag et al. 2008). Eine Kombination mehrerer bDMARDs ist nicht empfohlen (Saag et al. 2008).

Trotz der Entwicklung zahlreicher Therapieansätze und der Anwendung verschiedener Therapiekombinationen kommt es bei einem nicht unerheblichen Anteil der Patienten mit RA aus verschiedenen Gründen zu einem Therapieversagen. Im folgenden Kapitel werden die potenziellen Mechanismen und der aktuelle Stand der Literatur in Bezug auf die in dieser Arbeit untersuchte therapierefraktäre RA dargelegt.

#### 2.3.10 Therapierefraktäre rheumatoide Arthritis

Vor der Entwicklung effektiver Therapien und der zunehmend frühzeitigen Erkennung von RA präsentierte sich die therapierefraktäre RA als „klobige Synovialitis, chronisch-progrediente Behinderung, vollständige Arbeitsunfähigkeit und Verlust der Unabhängigkeit, beschleunigte Atherosklerose, Tumorgenese und frühzeitiger Tod“ (übersetzt aus Buch et al. 2021). Heutzutage ist der Phänotyp meist weniger aggressiv. Die Therapierefraktärität kann sich langsam nach initialem Ansprechen auf verschiedene Therapeutika entwickeln oder frühzeitig und offensichtlich auftreten (Buch et al. 2021).

Zum Teil wird auch der Begriff „difficult-to-treat rheumatoid arthritis“ (D2T RA) synonym mit der therapierefraktären RA verwendet, wie durch Buch et al. 2021 übersichtlich dargelegt. Dabei kann es sich aber neben der „echten“ (intrinsischen) Therapierefraktärität („persistent inflammatory refractory RA“) auch um fehlendes oder schlechtes Therapieansprechen aufgrund von Medikamentenunverträglichkeiten, Komorbiditäten und Complianceproblemen handeln („non-inflammatory refractory RA“) (s. Abbildung 3). Im Gegensatz dazu ist die inflammatorische therapierefraktäre RA definiert durch die Ineffizienz mehrerer Behandlungsansätze und die Ausschöpfung sämtlicher potenzieller Therapieoptionen mit persistierenden Symptomen

und objektivierbarer systemischer und/oder Gelenk-Entzündung. Diese beiden Unterformen der D2T RA können bei einem Patienten unter Umständen konsekutiv oder konkordant auftreten und schließen sich nicht gegenseitig aus.

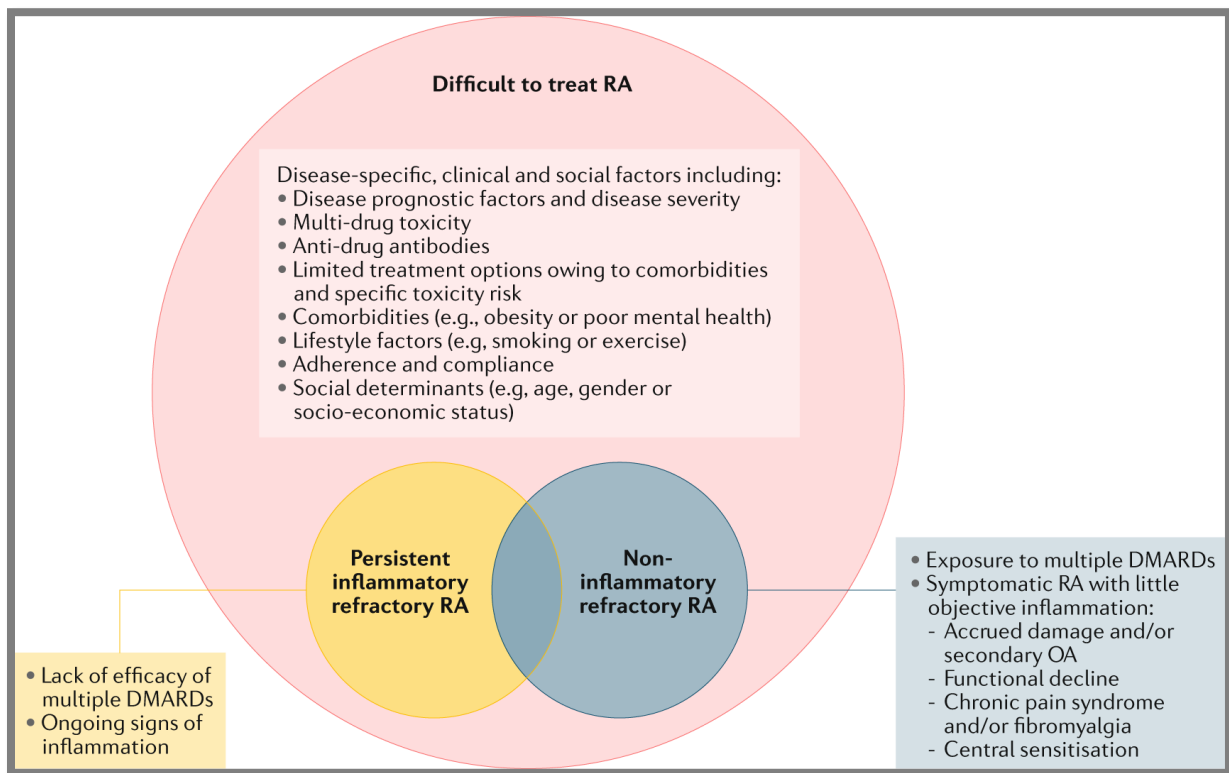


Abbildung 3: Stratifizierung der "Difficult-to-treat-RA" (Tan und Buch 2022), Nutzung unter Lizenznummer 5831751057614.

Für die Diagnose einer therapierefraktären rheumatoiden Arthritis müssen mindestens drei Kriterien erfüllt sein (Tan und Buch 2022) (s. Abbildung 4):

1. Erfolgte Behandlung nach EULAR-Kriterien und Versagen von zwei oder mehr b/tsDMARDs nach bereits eingetretenem Therapieversagen mit csDMARDs.
2. Eins oder mehr der folgenden Kriterien:
  - a. Mindestens mäßige Krankheitsaktivität (CDAI > 10).
  - b. Symptome oder laborchemische bzw. radiographische Zeichen einer aktiven Erkrankung.
  - c. Unmöglichkeit des Ausschleichens der Glukokortikoidtherapie (unter 7,5 mg Prednisolon oder Prednisolon-Äquivalent pro Tag).
  - d. Rasches radiografisches Fortschreiten der Erkrankung (mit oder ohne Zeichen aktiver Erkrankung).
  - e. Symptome der rheumatoiden Arthritis mit einer Einschränkung der Lebensqualität trotz objektiv gut kontrollierter Erkrankung nach den oben genannten Standards.

3. Das Management der Erkrankung bzw. der Symptome wird vom Rheumatologen und/oder dem Patienten als problematisch eingeschätzt.

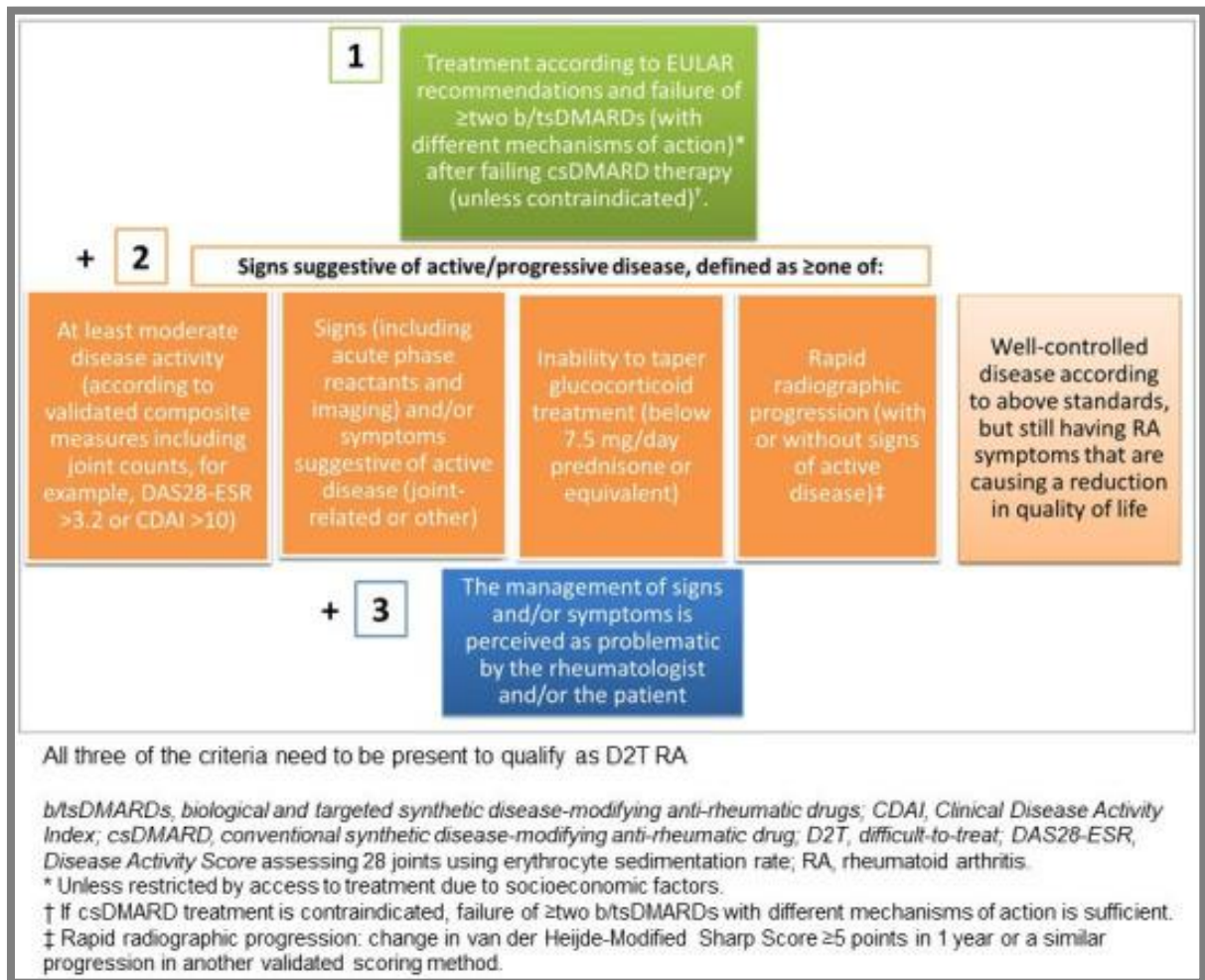


Abbildung 4: EULAR definition of difficult-to-treat rheumatoid arthritis (D2T-RA) (Tan und Buch 2022); Nutzung unter Creative Commons License (CC BY-NC 4.0).

Zudem gilt es die echte therapierefraktäre rheumatoide Arthritis von der Anti-drug-mediated non-response (ADA) abzugrenzen. Auch dies gelingt mittels der oben angegebenen Kriterien.

Buch 2018 verfasste einen Überblick über die Epidemiologie der Therapierefraktarität: 20 bis 30 % der rheumatoiden Arthritis-Patienten gelten bei Einsatz von TNF- $\alpha$ -Inhibitoren als Non-responder. Diese zeichnen sich durch eine persistierende Synovialitis mit Schwellung mehrerer Gelenke und Sehnenscheiden aus (Schmidt et al. 2019). Etwa 40 % der Patienten erleben ein Therapieversagen einer bDMARD, weitere 40 % ein Therapieversagen einer zweiten bDMARD. Hieraus lässt sich eine Entwicklung einer D2T RA mit Versagen von mindestens zwei bDMARDs bei ca. 16 % der Patienten ableiten. Bei 5 % der Patienten versagen mindestens drei bDMARDs-Klassen aufgrund von Ineffizienz oder Toxizität. Andere Studien fanden eine Prävalenz von 6 – 17 % therapierefraktärer RA (Kearsley-Fleet et al. 2018; Bécède et al.

2019). Aufgrund der inkonsistenten Anwendung verschiedener Definitionen kann aber davon ausgegangen werden, dass der Anteil „echter“ inflammatorischer Therapierefraktärität deutlich niedriger anzusetzen ist (Buch et al. 2021). In dieser Arbeit ist im Folgenden, wenn der Begriff therapierefraktäre RA oder Therapierefraktärität verwendet wird, stets die „echte“ inflammatorische Variante gemeint.

Risikofaktoren für die Entwicklung einer therapierefraktären rheumatoiden Arthritis können laut Hair et al. 2018 in zwei Kategorien eingeteilt werden: Erstens Rauchen, Übergewicht, genetische und immunologische Faktoren, welche Medikamentenunverträglichkeit und -ineffektivität zur Folge haben. Zweitens Begleiterkrankungen und systemische Krankheitsmanifestationen wie interstitielle Pneumonie und sekundäre Fibromyalgie.

Histopathologisch präsentiert sich die Therapierefraktärität definitionsgemäß als eine high-grade Synovialitis. Eine histopathologische oder immunhistochemische Differenzierung zwischen therapierefraktärer und nicht-therapierefraktärer high-grade Synovialitis bei rheumatoider Arthritis ist bislang nicht ausreichend untersucht bzw. beschrieben. Spekulative Ansätze wurden von Buch et al. 2021 in ihrer Arbeit zu persistierenden inflammatorischen und nicht-inflammatorischen Mechanismen der therapierefraktären RA erwähnt. Diese beschäftigen sich mit der Rolle synovialer Stromazellen, spezifisch Typ B-Synoviozyten oder synoviale Fibroblasten, in der Entwicklung einer Therapierefraktärität. Als Antigen-präsentierende synoviale Stromazellen, welche zudem aktiv mit dem lokalen Immunsystem interagieren (Buckley 2011; Yoshitomi 2019) und IL-6, Prostaglandine und Matrixmetalloproteinasen sezernieren (Bartok und Firestein 2010), spielen diese Zellen besonders in den frühen Phasen der RA eine aktive Rolle (Buch et al. 2021). Aktuell in der RA-Therapie angewendete DMARDs sprechen dagegen oft lediglich verschiedene Aspekte des Immunsystems an, während die Fibroblasten-assoziierten Krankheitsprozesse unter Umständen nicht miteingefasst werden. Hierin sehen Buch et al. 2021 einen potenziellen Erklärungsansatz für den Progress zur therapierefraktären RA über eine überwiegend durch fibroblastäre Stromazellen aufrechterhaltene Krankheitsaktivität. Tatsächlich wurde bereits eine Studie zu Zyklin-abhängiger Kinase-Inhibition angedacht, die davon ausgeht, dass nicht-immunologische Stroma-Pathologie eine Ursache für das Therapieversagen von bDMARDs ist (BioMed Central. 2020). Es wurden bislang aber keine Ergebnisse veröffentlicht (Stand 27.06.2024). Ein Faktor, der unter Umständen gegen die Rolle einer Fibroblasten-vermittelten Therapierefraktärität spricht, ist die überwiegend polyarthritische Symptomatik (Buch et al. 2021). Ursächlich dafür können jedoch auch migrierende aktivierte synoviale Fibroblasten sein (Lefèvre et al. 2009; Orange et al. 2020).

Folgendes Beispiel für eine histopathologisch und immunhistochemisch untermauerte Therapierefraktärität beschreibt die Anwendung der Synovialitis-Scores und die histopathologischen Schlussfolgerungen in Zusammenschau mit den klinischen Angaben zur medikamentösen

Therapie: Zugewandt wird eine Synovialisprobe aus dem Kniegelenk eines 34-jährigen, männlichen Patienten mit bekannter, klinisch hoch aktiver RA und non-Response auf zwei verschiedene JAK-Kinase-Hemmer. Anhand der HE-Färbung wird ein SC von 7/9 erhoben. Die Immunhistochemie ergibt folgendes Profil: CD3: Mäßige Infiltration, etwa 300 Zellen. CD20: Mäßige Infiltration, etwa 300 Zellen. CD38: Mäßige Infiltration, etwa 200 Zellen. CD68: Mäßige Infiltration, etwa 150 Zellen. Ki-67: Fokal hohe Proliferation, bis zu etwa 38% (KI-basierte Morphometrie, artificial intelligence (AI)-image analysis). Es ergibt sich somit ein IMSYC von 11/15 und ein GSS von 18/24. Die histopathologische Diagnose lautet: „Entzündlich hochgradig aktive RA-Synovialitis im Sinne einer high-grade Synovialitis mit ungewöhnlich hoher Proliferationsfraktion. Dieser Befund kann möglicherweise ein Äquivalent der klinisch mitgeteilten hoch aktiven und medikamentös nicht ansprechbaren rheumatoiden Arthritis sein.“ Dieses Beispiel zeigt deutlich die Wichtigkeit des Zusammenspiels von Klinik und Histopathologie für die Erarbeitung der Diagnose Therapierefraktärität. Von besonderem Interesse für unsere Arbeit ist hierbei die ungewöhnlich hohe Proliferationsfraktion (Ki-67). Die Arbeitshypothese, dass eine hohe Ki-67-Rate ein pathogenetisches Substrat der lokalen Therapierefraktärität darstellen kann, ergibt sich aus der Vielzahl ähnlich gelagerter Fälle in der histopathologischen Routine.

## 2.4 Ki-67

### 2.4.1 Überblick

Das Antigen Ki-67 wurde zuerst von Gerdes et al. 1983 in den Kernen von Hodgkin-Lymphom-Zellen identifiziert. Hier konnte eine starke Expression in proliferierenden Zellen (G1-, S-, G2- und M-Phase) festgestellt werden, während ruhende Zellen in der G0 Phase kein detektierbares Ki-67 exprimierten (Gerdes et al. 1984; Pessler et al. 2008b). Die Korrelation zwischen Zellzyklusphase und Ki-67-Expression, mit einer starken Expression in der G1- und G2-Phase (proliferierende Zellen) und einer starken Herabregulation in der G0-Phase (ruhende Zellen), konnte in weiteren Studien belegt werden (Ishida et al. 2001; Sobecki et al. 2016; Sobecki et al. 2017).

Tatsächlich scheint Ki-67 eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklus zu spielen, indem es zusammen mit anderen Proteinen während der Mitose eine perichromosomale Schicht bildet (Booth et al. 2014; Booth et al. 2016; Booth und Earnshaw 2017). Diese verhindert das Zusammenkleben von Chromosomen, unterstützt die Nukleoli und ermöglicht somit das Fortschreiten der Zellteilung (Schmidt et al. 2003; Cuylen et al. 2016; Takagi et al. 2017).

Das Antigen wurde in der Folgezeit seiner Entdeckung zu einem klinisch relevanten Proliferationsmarker zahlreicher Malignome (Gerdes et al. 1987; Dowsett et al. 2011), dessen prognostischer Wert durch mehrere Studien belegt werden konnte (Luo et al. 2015; Pezzilli et al. 2016; Pyo et al. 2016; Richards-Taylor et al. 2016; Tao et al. 2023). Des Weiteren ist auch die Verwendung des Markers in der Synovialitisdiagnostik zur Charakterisierung proliferierender

Zellen in der hyperplastischen synovialen Deckzellschicht und den darunter infiltrierenden Leukozytenpopulationen bereits gut etabliert (Krenn et al. 1996; Helmchen et al. 2005; Pessler et al. 2008b).

#### 2.4.2 Molekulare Struktur und Funktion

Das von proliferierenden Säuge- und anderen Wirbeltierzellen (Gerdes et al. 1983; Sobecki et al. 2016) exprimierte nukleäre, desoxyribonucleic acid (DNA)-bindende Protein (MacCallum und Hall 2000) Ki-67 ist beim Menschen und anderen Säugetieren durch das Gen Marker Of Proliferation Ki-67 (MKI67) codiert und liegt in zwei Isoformen vor (Gerdes et al. 1991).

Eine Schlüsselpublikation zum Thema Ki-67 als zellproliferationsassoziiertes Antigen stammt aus dem Jahr 1993 (Schlüter et al. 1993) und stellt den Aufbau des MKI67 Proteins detailliert dar: Funktionell relevante Regionen des Proteins beinhalten eine N-terminal forkhead associated (FHA) domain, welche DNA und phosphorylierte Epitope bindet. Des Weiteren enthält das Gen eine Phosphatase 1 (PP1) binding domain sowie 16 tandem repeats in der großen zentralen Region („Ki-67 domain“) und eine 31 Aminosäuren lange conserved domain von bislang unbekannter Funktion. Außerdem findet sich ein leucine/arginine-rich (LR) C-Terminus, welcher an DNA binden kann und bei Überexpression zu einer Chromatin-Verdichtung beiträgt (Schlüter et al. 1993; Takagi et al. 1999; Scholzen et al. 2002; Booth et al. 2014; Sobecki et al. 2016; Sun und Kaufman 2018). Abbildung 5 zeigt eine Repräsentation der zwei verschiedenen im Menschen beobachteten mitochondrial ribonucleic acid (mRNA)-Subtypen, long type mit vorhandenem Exon 7 und short type ohne Exon 7, sowie des MKI67-Proteins.

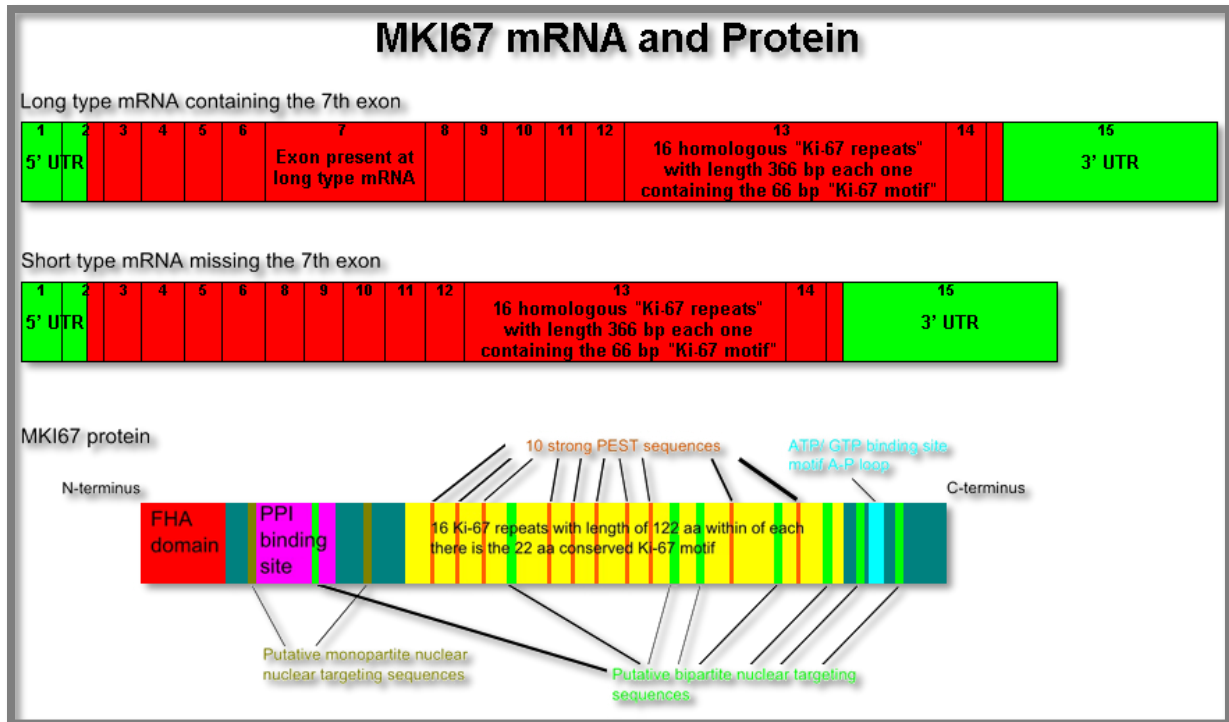


Abbildung 5: The MKI67 mRNA and protein. Die beiden Arten von mRNA-Transkripten, von welchen die Übersetzung in Protein gezeigt werden konnte, sind im ersten Teil der Abbildung dargestellt. Die „long type“ mRNA unterscheidet sich von der „short type“ mRNA durch das Vorhandensein des 7. Exons, das bei der kurzen Form alternativ gespleißt wird. Die UTRs sind grün gefärbt und die codierenden Regionen rot. Im zweiten Teil der Abbildung ist das Proteinprodukt der „long type“ mRNA dargestellt, welches alle mutmaßlichen Domänen dieses Proteins enthält. Die Hauptproteindomänen sind die FHA-Domäne, die rot gefärbt ist, die PPI-Bindungsstelle, die lila gefärbt ist, die Ki-67-Wiederholungen, die gelb gefärbt sind, und das ATP/GTP-Bindungsmotiv A-P-Schleife, die blau gefärbt ist. Es gibt weitere mutmaßlich funktionelle Regionen innerhalb dieser Hauptdomänen, die in verschiedenen Farben hervorgehoben sind. Beschreibung übersetzt aus dem Englischen (Konstantinos Ntzeros et al. 2014). Nutzung unter Creative Commons License (CC-BY).

Während lange Zeit davon ausgegangen wurde, dass Ki-67 für den Vorgang der Zellproliferation an sich essentiell ist (Schlüter et al. 1993; Starborg et al. 1996; Kausch et al. 2003; Zheng et al. 2006; Rahmanzadeh et al. 2007; Zheng et al. 2009), ergaben aktuellere Studien ein abweichendes Bild. Sobecki et al. 2016 konnten anhand diverser Ki-67-knockdown-Ansätze an Mäusen und Stammzelllinien keinen Nachweis erbringen, dass die Zellproliferation durch Down-Regulation oder Elimination von Ki-67 signifikant eingeschränkt wurde. Sowohl der Beginn als auch das Ende des Zellzyklus waren Ki-67-unabhängig funktional. Folglich wuchsen Mäuse mit homozygoten Deletionen im MKI67-Gen ebenso wie ihre heterozygoten und Wildtyp-Geschwister normal heran und waren fortpflanzungsfähig. Monoklonale humane Zelllinien mit MKI67-Deletionen zeigten ebenfalls eine effiziente Proliferation. Um die Wirkung residueller Ki-67-Expression durch Heraufregulation von Ki-67-mRNA, welche unter anderem in intestinalen Epithelzellen beobachtet wurde, als Ursache hierfür auszuschließen, wurden Zelllinien mit vollständig eliminiertes Ki-67-Expression etabliert. Diese Ki-67-negativen Zellen proliferierten uneingeschränkt mit von Kontrollen nicht unterscheidbaren Wachstumskurven. Auch ein beobachteter Ki-67-defizienter Klon mit aberrant strukturierter chromosomaler Peripherie in

mitotischen Zellen zeigte eine effiziente Zellteilung. Ein ähnlicher Phänotyp mit alterierter chromosomaler Peripherie konnte bereits in Ki-67-knockdown HeLa-Zellen (Booth et al. 2014) beobachtet werden.

Die Funktion von Ki-67 im Zyklus der Zellteilung wurde von Sobecki et al. 2016 daher in Bezug auf die Formation der perichromosomalen Region während der Zellkernbildung näher untersucht. Schon 2007 wurde Ki-67 in Zusammenhang mit der Biogenese von Ribosomen untersucht und dem Protein eine wesentliche Rolle in der Synthese RNA Polymerase I-abhängiger nukleolärer ribosomaler (r)RNA zugeschrieben (Rahmanzadeh et al. 2007). Die Biogenese von Ribosomen ist notwendig für die Formation von Nukleolen und somit essenziell für die Zellteilung (Hernandez-Verdun et al. 2010). Ki-67 interagiert mit zahlreichen Regulatoren der Chromatin-Formation und bildet eine Trennschicht zwischen perinukleolärem Heterochromatin und nukleolären Pars granulosa-Anteilen. Die Depletion des Proteins hatte in der Arbeit von Sobecki et al. 2016 zwar initial keine nachweisbare Änderung der nukleolären Struktur zur Folge, unterband aber die Formation der perichromosomalen Region. Bei dieser handelt es sich um einen nukleolären Proteinmantel, welcher die Oberfläche mitotischer Chromosomen während der Neubildung des Nukleolus umgibt (Booth et al. 2014).

Die Schlussfolgerung aus der Arbeit von Sobecki et al. ist daher die folgende: „[...] statt die Zellproliferation zu fördern, ist die Rolle von Ki-67 die Organisation von Heterochromatin“ (übersetzt aus Sobecki et al. 2016). Ki-67 ist notwendig für die Heterochromatinverdichtung und die Vermittlung von Interaktionen zwischen weit auseinanderliegenden Regionen des Genoms zu diesem Zweck. Diese essenzielle Funktion von Ki-67 ist auch in entfernt verwandten Ki-67-Homologen wie Xenopus-Ki-67 zu finden (Sobecki et al. 2016).

Die Verwendung von Ki-67 als Proliferationsmarker ist aufgrund seiner vielfach erwiesenen Assoziation zur mitotischen Aktivität proliferierender Zellen legitim. Seine Rolle als Ziel inhibitorischer Medikamente in der Therapie neoplastischer oder entzündlicher Erkrankungen muss hingegen in zukünftigen Studien weiter untersucht werden.

#### 2.4.3 Definition des histologischen Expressionsprofils bezüglich des Zellzyklus

Während Ki-67 in allen Zellzyklusphasen (G1-, S-, G2- und M-Phase) bis auf die G0-Phase (ruhende Zellen) exprimiert wird, ändern sich die Lokalisation und Expression von Ki-67 zellzyklusabhängig. Das MKI67-Gen wird zellzyklusabhängig reguliert und enthält Bindungsstellen für die G1-regulatorische E2F Familie von Transkriptionsfaktoren (Ishida et al. 2001). Die Konzentration von Ki-67-mRNA steigt während der G1-Phase (Sobecki et al. 2016; Sobecki et al. 2017) und es kommt zu stärkster Expression und Hyperphosphorylierung während der G2- oder Mitose-Phase (Endl und Gerdes 2000). In der G1-Phase wird Ki-67 nicht nur heraufreguliert, sondern durch einen entgegengesetzten Prozess mittels Ubiquitin Proteasom-Komplex Anaphase Promoting Complex/Cyclosome-Cell Division Cycle 20 (cdc20) Homolog 1 (APC/C-

Cdh1) gleichzeitig auch abgebaut (Chierico et al. 2017; Sobecki et al. 2017). In der G0-Phase zeigen sich Zellen negativ für Ki-67 (Gerdes et al. 1984). Längerfristig ruhende oder senescente Zellen exprimieren kein Ki-67. Zellen in frühen Phasen des Zellzyklus-Stillstandes weisen hingegen niedrige Ki-67-Level auf, welche bei Wiedereintritt in den Zellzyklus in die G1-Phase übertragen werden können und unter Umständen für Abweichungen in der beobachteten Ki-67-Intensität in dieser Phase in verschiedenen Studien verantwortlich sind (Gerdes et al. 1984; Lopez et al. 1991; Sobecki et al. 2017). In der G2-Phase tritt das Protein in Assoziation mit verdichteten Chromosomen auf, bevor es sich nach abgeschlossener Mitose in die Peripherie der Chromosomen bzw. des Nukleolus bewegt (Verheijen et al. 1989a). Hier ist es in der Interphase in faserartiger Struktur zu finden (Verheijen et al. 1989b; Kill 1996; Cheutin et al. 2003; Sobecki et al. 2016; Sun und Kaufman 2018). Die Bindung an das Chromatin ist am stärksten in der Interphase und am schwächsten während der Mitose (Saiwaki et al. 2005).

#### 2.4.4 Proliferationsmarker und Marker zur Risikostratifizierung von neoplastischen Erkrankungen

Als Biomarker werden Charakteristika bezeichnet, welche als Indikator für die objektive Messung normaler biologischer Vorgänge, pathologischer Vorgänge oder Therapieansprechen (Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework 2001), sowie zur Vorhersage von Inzidenz oder Outcome einer Krankheit (Burke 2016) verwendet werden. Biomarker können in diverse Kategorien unterteilt werden. So werden diagnostische Biomarker für die Unterscheidung zwischen gesunden und erkrankten Individuen herangezogen, während prädiktive, prognostische und therapeutische Biomarker einen Einfluss auf die Therapieentscheidung haben können, sowie für die Bemessung des Therapieerfolges genutzt werden (Mayeux 2004; Carlomagno et al. 2017; Echle et al. 2020).

In der Diagnostik des Luminal-Typ Mammakarzinoms ist die Verwendung von Ki-67 als Biomarker bereits gut etabliert und der Proliferationsindex wird auch für Therapieentscheidungen sowie zur Bemessung des Therapieerfolges herangezogen (Davey et al. 2021). Es sind allerdings Einschränkungen in Bezug auf die analytische Validität des Markers festzuhalten, welche in einer Publikation von Nielsen et al. 2021 identifiziert wurden. Aktuell beschränkt sich der klinische Nutzen auf die Prognostik des Mammakarzinoms in den klinischen Stadien I und II. Die Konsensusmeinung der International Ki67 in Breast Cancer Working Group (IKWG) besagt, dass eine Ki-67-Positivität von  $\leq 5\%$  bzw. von  $\geq 30\%$  für die Prognoseeinschätzung verwertbar ist, mit einer Assoziation von schlechteren Langzeit-Überlebens-Raten mit hohen Proliferationsraten (Faragalla et al. 2023). Einer der Gründe für die eingeschränkte analytische Verwertbarkeit des Proteins ist in der Präanalytik zu finden. So ist Ki-67 vergleichsweise empfindlich gegenüber Schwankungen in der Fixationsqualität des untersuchten Gewebes (verglichen z.B. mit Östrogenrezeptor (ER) oder human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)). Zu kurze (unter 3 Stunden) oder zu lange (über 14 Tage) Fixationszeiten, zu lange

Zeitverzögerung bis zur Fixation (über 16 Stunden) oder die Verwendung von anderen Fixationsagenzien als neutral gepuffertem Formalin können die Validität der Ki-67-Analyse einschränken. Auch die Evaluation von Ki-67 nach langen Lagerungszeiten in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE)-Gewebe (über fünf Jahre) sollte kritisch bewertet werden, da das Antigen empfindlich gegenüber Verfall ist (Combs et al. 2016).

#### 2.4.4.1 Analytische Interpretation des Ki-67-Index

Ein weiterer kritischer Faktor für die Reliabilität von Ki-67 in der diagnostischen Anwendung ist die analytische Interpretation des Ki-67-Index. Die IKWG hat hierfür fünf Kriterien des Scorings aufgestellt, die erfüllt werden sollten, um eine hohe Qualität und Reproduzierbarkeit der Analyse zu erreichen (Nielsen et al. 2021):

1. „Studien sollten eine ausreichend große Anzahl teilnehmender Scorer einschließen, um die in einem breiten Querschnitt pathologischer Interpretationen inhärente Variabilität zu repräsentieren.“
2. „Beobachter, welche das Scoring in Test-Validierungsstudien durchführen, müssen zuvor festgelegten Trainingsmethoden folgen und unabhängig und gegenüber den Scores anderer Teilnehmer verblindet ihr Scoring durchführen.“
3. „Eine ausreichende Anzahl von Proben sollte eingeschlossen sein, um eine adäquate statistische Potenz zu erreichen und die Proben sollten die gesamte dynamische Bandbreite des Tests abdecken (im Fall von Ki-67 IHC, 0 – 100 %).“
4. „Obwohl die erwartete Anwendung von Tests häufig kategorial ist, basierend auf einem oder mehr Cut-Off-Punkten, sind die meisten Tumor-Biomarker (einschließlich Ki-67) kontinuierliche Variablen und die Daten zur Beurteilung der analytischen Validität sollten dementsprechend erfasst werden. Dies erlaubt parametrische Tests, welche Information maximieren, und ermöglicht es Resultaten, auf alternative Cut-Off-Punkte von klinischer Relevanz übertragen zu werden. [...]“
5. „Studien, welche biologische Proben verwenden oder Verbindung zur Prognose aufbauen, sollten sich an Biospecimen Reporting for Improved Study Quality (BRISQ) (Moore et al. 2011) und Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK) (McShane und Hayes 2012; Sauerbrei et al. 2018) Richtlinien halten, einschließlich solcher wichtiger Merkmale wie transparente und detaillierte Veröffentlichung von Scoring-Methoden, sodass andere das System exakt anwenden können, und zuvor festgelegte Erfolgskriterien, idealerweise mit unabhängiger statistischer Analyse.“

#### 2.4.4.2 Ki-67 in der Therapieentscheidung bei Mammakarzinom

Bezüglich der Verwendung für Therapieentscheidung und -kontrolle wird Ki-67 wie durch Ács et al. 2017 dargestellt beim Mammakarzinom in der Neoadjuvanz angewendet. Hier korreliert ein höherer Ki-67-Proliferationsindex mit einem besseren Ansprechen auf neoadjuvante

Chemotherapie. Der relevanteste Cut-Off-Punkt zur prognostischen Unterscheidung zwischen pathologischer Komplettremission und No-response sind 20 % Ki-67-positive Tumorzellen ( $p = 0,002$ ). Die neoadjuvante Chemotherapie ist also effizienter bei Tumoren mit mindestens 20 % Proliferationsrate. Für das Gesamtüberleben stellt sich 15 % Ki-67-Positivität als optimaler Cut-Off-Punkt heraus ( $p = 0,006$ ). In der Patientenpopulation mit partieller Remission nach neoadjuvanter Chemotherapie zeigt sich ein signifikanter Cut-Off-Punkt von Ki-67 von 30 % für die Prognose des Gesamtüberlebens ( $p = 0,001$ ). Für die Prognosestratifizierung des Gesamtüberlebens aller Gruppen eignet sich der Cut-Off-Punkt von 30 % Ki-67-positive Tumorzellen zur Separation in gute und schlechte Prognosegruppen ( $p = 0,04$ ). Bei non-Responder-Tumoren kann Ki-67 zudem als unabhängiger prognostischer Marker angewendet werden, mit schlechterer Prognose bei höherer Proliferation.

#### 2.4.4.3 *Ki-67 bei der Stratifizierung neuroendokriner Tumoren*

In einer Meta-Studie von Tao et al. 2023 wurde der Nutzen von Ki-67 als prognostischer Marker in der Risikostratifizierung von gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren (NETs) analysiert. Hier konnte anhand von 15 Studien die Wichtigkeit von Ki-67 als prognostischer Marker bestätigt werden, indem die kumulative 5-Jahres-Überlebensrate von G1 (Ki-67  $\leq 2\%$ ), G2 (Ki-67 2–20%) and G3 (Ki-67  $>20\%$ ) Tumoren erhoben wurde. Bei G1 Tumoren zeigte die Metaanalyse eine 5-Jahres-Überlebensrate von 86%, bei G2 Tumoren von 65 % und bei G3 Tumoren von 25 %. Auch in der Rezidiv-Prognostik neuroendokriner Tumore nach kurativer Tumorsektion wird Ki-67 verwendet. In einer Studie von 2018 konnte eine signifikant höhere Rezidivrate pankreatischer NETs von 41 % nach im Mittel 16 Monaten bei Patienten mit einer Ki-67-Fraktion von 6 bis 20 % im Vergleich zu Patienten mit einer Ki-67-Fraktion von 0 bis 5 % mit einer Rezidivrate von 14 % ( $p < 0,001$ ) nach im Mittel 34 Monaten festgestellt werden (Genç et al. 2018).

Zusammenfassend lässt sich folgendes festhalten: Ki-67 ist als Biomarker für die Risikostratifizierung diverser neoplastischer Erkrankungen und in eingeschränktem Maße für Therapieentscheidung und -kontrolle geeignet. In der Analytik von Ki-67 ist die Objektivierung und Etablierung reproduzierbarer Scoring-Methoden und signifikanter Cut-Off-Werte jedoch grundlegend für die sinnvolle Anwendung im klinischen Setting.

Neben diversen neoplastischen Erkrankungen kommt Ki-67 als Biomarker auch in der histopathologischen Beurteilung entzündlicher Arthropathien zum Einsatz. Dieses Anwendungsfeld ist Gegenstand dieser Studie und soll daher im Folgenden näher erläutert werden.

#### 2.4.5 Proliferationsmarker entzündlicher Arthropathien

Der Biomarker Ki-67 wird in den Kernen sich teilender Zellen exprimiert und kann zur Analyse der Proliferation synovialer Entzündungs- und Stromazellen verwendet werden. Eine Besonderheit im Vergleich zu anderen synovialen Biomarkern ist hierbei die Eigenschaft von Ki-67,

von allen sich teilenden Zellen, d.h. sowohl proliferierenden Stromazellen als auch subintimal infiltrierenden Entzündungszellen (Krenn et al. 1996; Schaser et al. 1996; Ceponis et al. 1998; Helmchen et al. 2005), exprimiert zu werden. Daher kann die generelle Entzündungsaktivität des untersuchten Gewebes als Gesamtprozess optimal erfasst werden. Die nukleäre Expression des Antigens ist ein weiterer Vorteil bei der Analyse zellichten Untersuchungsmaterials (Pessler et al. 2008b). Die Zelldichte ist ein relevanter diagnostischer Faktor in der Synovialitis-Diagnostik, wobei erhöhte Entzündungsaktivität insbesondere im Rahmen der rheumatoiden Arthritis mit einer signifikant höheren Zelldichte einhergeht (Mehta et al. 2023).

Pessler et al. 2008b untersuchten subintimales Ki-67 auf seine Eignung als synovialer Biomarker für inflammatorische Arthropathien. Das Antigen ist in entzündlichen Arthropathien deutlich überexprimiert. Insbesondere können im Vergleich zu nicht entzündlichen synovialen Kontrollgeweben Ki-67-exprimierende Zellen deutlich vermehrt auch im Bereich der Deckzellschicht nachgewiesen werden. Es kann zudem zwischen rheumatoider Arthritis, chronisch septischer Arthritis (CSA) und Osteoarthritis, sowie orthopädischen Arthropathien differenziert werden. Im Vergleich zu histologisch unauffälligen Kontrollgeweben zeigte sich in der Studie von Pessler et al. 2008b bei RA eine 26,6-fache Überexpression von Ki-67, bei CSA eine 55-fache Überexpression und eine leichte Überexpression bei OA (3,9-fach) und orthopädischen Arthropathien (2,1-fach). Für die Unterscheidung zwischen RA und OA eignen sich Ki-67 und der etablierte synoviale Biomarker der RA CD68 gleichermaßen (Area under the Curve (AUC): Ki-67 = 0,91, CD68 = 0,94). Insbesondere in der Differenzierung zwischen chronisch septischer Arthritis und rheumatoider Arthritis ist Ki-67 hierbei dem Biomarker CD68 überlegen (AUC: Ki-67 = 0,79; CD68 = 0,49), während CD68 besser zur Unterscheidung zwischen OA und Kontrollen geeignet ist (AUC: Ki-67 = 0,78; CD68 = 0,87). Ki-67 ist nahezu vollständig negativ in der synovialen Intima histologisch unauffälliger Kontrollgewebe und nur vereinzelt positiv bei OA. Auch in der RA zeigen sich Ki-67-positive Zellen, wenn auch im Vergleich zu den zuvor genannten vermehrt, in der Intima nur vereinzelt. Hohe Proliferationsaktivitäten anhand von Ki-67 können hingegen in der subintimalen Schicht chronisch-entzündlicher Arthritiden wie RA oder CSA nachgewiesen werden, insbesondere in und angrenzend an Lymphozytenaggregate(n), welche am häufigsten in RA zu finden sind. In vaskularisierten Pannus-Geweben bei RA mit Invasion und Destruktion des angrenzenden Knorpels und des subchondralen Knorpels kann Ki-67 ebenfalls nachgewiesen werden. Eine positive Korrelation von Ki-67 mit dem histologischen Synovialitis-Score ist mit einem Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) von 0,80 dem etablierten Biomarker CD68 ( $r = 0,79$ ) ebenbürtig. Hierdurch wird die enge Assoziation subintimaler Ki-67 Expression und damit der Zellproliferation mit entzündlichen Arthropathien noch einmal bestätigt. Ki-67 zeigt damit ein hohes Potenzial in der Klassifikation von synovialen Gewebe sowie als synovialer Marker der Entzündungsaktivität von entzündlichen Arthropathien.

Sowohl in der Diagnostik und Therapieentscheidung neoplastischer Erkrankungen, als auch entzündlicher Arthropathien spielt Ki-67 also eine entscheidende Rolle. Umso wichtiger ist es daher, objektive und reproduzierbare Quantifizierungsmethoden für diesen Biomarker anzuwenden. Auf diese soll im folgenden Kapitel eingegangen werden.

#### 2.4.6 Quantifizierung von Ki-67

Während die molekularpathologische Auswertung der Proliferationsfraktion über die Quantifizierung von Ki-67 in der Theorie eine hohe diagnostische Sicherheit aufweist, ist im klinischen Alltag überwiegend die immunhistochemische Auswertung des Markers etabliert. Dies hat den Vorteil wesentlich geringerer Kosten, eines geringeren Zeitaufwandes und die Möglichkeit der Integration des Markers in histopathologische Routinepanels (Pathmanathan und Balleine 2013). Insbesondere im Bereich der Tumordiagnostik erleichtert diese Methode zudem die Differenzierung von proliferierenden Tumor- und anderen proliferierenden Zellen (z.B. Entzündungszellen) durch den auswertenden Pathologen (van den Berg et al. 2021).

Am Beispiel des Mammakarzinoms (Diagnostik bzw. Prognostik und Therapiekontrolle) sollen drei verschiedene Quantifizierungsansätze dargelegt werden. Es besteht bislang keine Einigkeit über die idealen Cut-Off-Werte von Ki-67. Dies ist u.a. der hohen Interobserver- und Interlaborvariabilität geschuldet, welche durch die zunehmende Objektivierung von Quantifizierungsmethoden reduziert werden soll (Pons et al. 2022). Bislang besteht die Empfehlung der Etablierung eines laborinternen Cut-Off-Wertes zur Reduktion der Interobservervariabilität innerhalb eines Labors (Pathmanathan und Balleine 2013).

Eine Studie von van den Berg et al. 2021 untersuchte drei verschiedene Auswertungsmethoden von Ki-67-Positivität bei Mammakarzinom: „Eyeballing“ (Abschätzung der Ki-67-Fraktion per Augenmaß durch einen erfahrenen Pathologen), genaues Auszählen der Ki-67-positiven Zellen durch zwei erfahrene Pathologen und computergestützte Bildanalysemethoden. Die schnellste und subjektivste Methode ist dabei das „Eyeballing“, bei welchem die Proliferationsfraktion in der Regel auf 10 Punkte gerundet wird. Der wesentliche Vorteil in der klinischen Praxis ist hier die Geschwindigkeit des Abschätzens der Proliferationsfraktion durch einen erfahrenen Pathologen. Daneben wird das Argument angebracht, dass das „Eyeballing“ trotz der potenziellen Rundungsfehler und Subjektivität eine hohe Genauigkeit aufweist, da das gesamte Bildfeld in die Auswertung miteinbezogen werden kann, während andere Methoden auf das nicht standardisierte Festlegen mehrerer auszuwertender Unterbereiche des gesamten Schnittes angewiesen sind (Varga et al. 2012). Das Auszählen der positiven Zellen ist die bislang meist-empfohlene Methode, wobei ein diagnostischer „Goldstandard“ jedoch nicht festgelegt ist. Die Methode weist eine hohe Genauigkeit auf, ist jedoch zeitaufwändig und anfällig für Ablenkungen. Zudem können die Ergebnisse durch intratumorale Heterogenität (weniger problematisch bei Stanzbiopsien) und Schnitt- oder Färbequalität beeinflusst werden. Zudem

können unterschiedliche Beobachter in der Interpretation positiver Zellen variieren, indem schwache, fleckige oder überlagerte Kerne je nach Befunder gezählt oder nicht gezählt werden. Es wird daher empfohlen, alle angefärbten Tumorzellkerne, unabhängig von der Färbintensität als positiv zu bewerten, da unterschiedliche Intensitäten den unterschiedlichen Zellzyklusphasen der proliferierenden Zellen zu schulden sind und die Festlegung eines Schwellenwertes der Färbintensität für die Interpretation als positiv keine verbesserte Interobservervariabilität zur Folge hat (Urruticoechea et al. 2005; Varga et al. 2012). Im Vergleich der Methoden „Eyeballing“ und Auszählung durch einen erfahrenen Pathologen fand die Studie einen Lin's Konkordanz-Korrelationskoeffizienten (Lin 1989) von 0,698, mit einem Cohen's Kappa-Koeffizienten (Cohen 1960) von  $\kappa = 0,387$  ( $p < 0,001$ , fair agreement (Landis und Koch 1977)) bei einem Cut-Off von 20 %. Der Vergleich der Methoden computergestützte Bildanalyse und Auszählen durch einen erfahrenen Pathologen bei Ki-67-Cut-Off von 20% ergab einen Lin's Konkordanz-Korrelationskoeffizienten von 0,79, mit einem Cohen's Kappa-Koeffizienten von  $\kappa = 0,560$  ( $p < 0,01$ , moderate agreement). „Eyeballing“ und computergestützte Bildanalyse ergaben einen Lin's Konkordanz-Korrelationskoeffizienten von 0,716 mit Cohen's Kappa-Koeffizient von  $\kappa = 0,402$  ( $p < 0,001$ , fair agreement). Mit einem Lin's Konkordanz-Korrelationskoeffizienten von 0,965 und Cohen's Kappa-Koeffizient von  $\kappa = 0,814$  ( $p < 0,001$ , almost perfect agreement) zeigte sich der Vergleich des genauen Auszählens durch zwei Pathologen als die Methode mit der geringsten Variabilität der Ergebnisse.

Die Methode mit der geringsten Anfälligkeit für Intra- und Interobservervariabilität ist dennoch die computergestützte Auswertung (Zabaglo et al. 2010; Cai et al. 2021). Auch bei dieser Methode können jedoch Messungenauigkeiten auftreten. In der 2021 durchgeführten Studie von van den Berg et al. erwies sich beispielsweise die Intensität der Gegenfärbung als problematisch, wobei insbesondere bei älteren Schnittpräparaten eine schwache Gegenfärbung die Erkennung negativer Zellen durch den Computer erschwerte, was zu falsch hohen Werten der Proliferationsfraktion führen kann und in diesem Falle auch durch Anpassen des Bildkontrastes nicht eliminiert werden konnte. Zudem muss gewährleistet sein, dass nicht-Tumorzellen aus der Wertung ausgeschlossen werden, z.B. über die Zellgröße, Kernglättung, -verschmelzen, -trimming, -abrundung, -kompaktierung und -elongation (Wang et al. 2019).

Die Quantifizierung von Ki-67-positiven Zellen in der histologischen Routinediagnostik von Synovialitiden erfolgt bisher z.B. im Rahmen der Anwendung der Stratifizierung (s. IMSYC, GSS) mittels Immunhistochemie semiquantitativ per Augenmaß. Dabei wird die Proliferationsrate als gering, mäßig oder hoch eingestuft und geht als einer von fünf unabhängigen Faktoren in den diagnostischen Score ein (Najm et al. 2019). Die quantitative Auszählung Ki-67-positiver Zellen hat dabei u.a. aufgrund des deutlich höheren Zeitaufwandes und höherer Kosten einen geringeren Stellenwert, wird aber im Rahmen von Studien regelmäßig verwendet (Diaz-Torne et al. 2007; Pessler et al. 2008b). Hierbei werden nach Festlegung aller auswertbaren Bereiche

(Vorhandensein von Intima und vaskularisierter Subintima) des immunhistochemisch gefärbten Schnittes alle Gesichtsfelder ausgezählt und ein Durchschnitt Ki-67 positiver Zellen pro High Power Field (HPF) errechnet und mit der Gesamtzelldichte in Relation gesetzt (Diaz-Torne et al. 2007). Ein Ausschluss eines Anteils der positiv gefärbten Zellen muss dabei nicht erfolgen, da die Gesamtproliferation aller vorhandenen Zellgruppen gewertet wird (Diaz-Torne et al. 2007; Pessler et al. 2008b; Najm et al. 2019).

Hier bietet sich ein ideales Feld für die Anwendung einer künstlichen Intelligenz. Zum einen kann diese in deutlich höherer Geschwindigkeit und mit optimierter Intra- und Interobservervariabilität die Quantität Ki-67-positiver Zellen erfassen (Stålhammar et al. 2016; Dessauvagie et al. 2019; Wang et al. 2019). Zum anderen hat sie in diesem Rahmen auch einen erheblichen Vorteil insbesondere bei der Analyse zellreicher Gewebe (Mehta et al. 2023). Im folgenden Kapitel wird auf die Funktionsweise von KI mit besonderem Fokus auf die Bildverarbeitung eingegangen und die zuvor angesprochenen Vorteile in der Synovialitis-Analyse näher erläutert.

## 2.5 KI-basierte Analyse

Grundsätzlich kann der Begriff „künstliche Intelligenz“ als die Fähigkeit von Computern, Aufgaben zu bewältigen, welche üblicherweise menschliche Intelligenz erfordern, definiert werden (Lake et al. 2017; Sagar und Syrovatskyi 2023). Die ersten theoretischen Überlegungen zu diesem Thema wurden bereits in den 1940er Jahren angestellt (McCulloch und Pitts 1943). In den 2010er Jahren kam es durch die Entwicklung von Deep Learning (DL)-Algorithmen zu einem Durchbruch im Bereich der künstlichen Intelligenz, insbesondere ab 2012 im Nachgang der ImageNet-Competition (Krizhevsky et al. 2017). Bei dieser wurde bewiesen, dass die Verwendung großer Datenmengen die Funktion neuraler Netzwerke wesentlich verbessern kann (Krizhevsky et al. 2017).

Ahmad et al. 2021 beschreiben die Grundsätze des Maschinlernens (ML): Die wesentliche Besonderheit der künstlichen Intelligenz ist die Kapazität für das sogenannte Maschinlernen, welches mithilfe von Algorithmen und statistischen Methoden automatisch anhand großer Datenmengen und eigener Erfahrungen lernt, ohne explizite menschliche Anweisungen zu benötigen. Eine Sonderform hiervon ist das sogenannte Deep Learning, auch bezeichnet als Deep Neural Learning, Deep Neural Network (DNN) oder Convolved/Convolutional Neural Network (CNN), welches aus multiplen Datenschichten, wie z.B. in der Bildverarbeitung, Schlussfolgerungen extrapolieren kann. Inspiriert ist diese Unterform des ML durch die Neuronen des menschlichen Gehirns und wie diese kann auch es Daten mithilfe von Mustererkennung verarbeiten und diese für Entscheidungen nutzen. Auf diese Weise ist es der KI möglich, ohne dezidierte Anweisungen oder menschliche Überwachung zu lernen.

Laut Ahmad et al. 2021 werden zahlreiche Aspekte unseres Alltags bereits durch die Anwendung von KI unterstützt, wie z.B. im Finanzsektor, in der Produktion, bei selbstfahrenden Autos oder auch in den Rechtswissenschaften. Auch in der Medizin setzt sich die Anwendung von KI insbesondere im Bereich der Diagnostik zunehmend durch, angeführt durch Felder wie die Radiologie, aber zunehmend auch in der Pathologie. Im Jahr 2014 wurde der Wert von KI-Startups im Bereich der Gesundheitsversorgung auf 600 Millionen Dollar geschätzt, während eine Prognose für das Jahr 2021 bereits 6,6 Milliarden Dollar voraussah.

In dieser Arbeit wird eine KI-basierte Bildanalyse verwendet. Spezifisch kommt dabei die Quantifizierung von Ki-67-positiven Zellen sowie der Gesamtzellichte in Synovialisproben zum Einsatz. In den nachfolgenden Kapiteln wird daher die KI-basierte Bildanalyse im Allgemeinen, sowie der bisherige Stand der Forschung zum Einsatz von KI bei der Analyse von Ki-67-Positivität und Gesamtzellichte von Geweben näher erläutert.

### 2.5.1 KI-basierte Bildanalyse

Grundsätzlich kann KI-basierte Bildanalyse auf zwei unterschiedlichen Ansätzen aufbauen (Goodfellow et al. 2016):

1. „Knowledge-driven approach“ (wissensbasierte Herangehensweise): Auch bekannt als symbolische oder regelbasierte Herangehensweise, stützt sich diese Form der künstlichen Intelligenz auf direkte Integration menschlicher Expertise durch die Festlegung expliziter Regeln und vorprogrammierter Logik.
2. „Data-driven approach“ (datenbasierte Herangehensweise): Auch bekannt als Maschinelles Lernen oder statistisches Lernen, nutzt diese Form der künstlichen Intelligenz große Datenmengen, um automatisch und ohne zuvor definierte Regeln Muster, Korrelationen und Schlussfolgerungen zu erlernen. Dafür nutzt die KI statistische und probabilistische Modelle, um die Daten zu analysieren.

Neural Networks (neurale Netzwerke) sind eine Untergruppe des Maschinellernens und bilden den Kern der sogenannten Deep Learning-Algorithmen (Alzubaidi et al. 2021). Sie sind inspiriert durch biologische neurale Netzwerke (Sultan et al. 2020) und setzen sich aus netzartig miteinander verbundenen sogenannten Node Layers zusammen (Ahmad et al. 2021). Der Aufbau eines CNN wird von Ahmad et al. 2021 und Abele et al. 2023 beschrieben: Die Node Layers unterteilen sich hierarchisch in eine Input-Layer, eine Output-Layer, sowie eine oder mehrere Hidden Layers. Die Input-Layer beinhaltet die Input-Daten, wie z.B. ein bestimmtes Bild. Die Output-Layer hingegen beinhaltet die Voraussagen des Netzwerkes, z.B. ob das Bild eine bestimmte Zellart enthält. In den Hidden Layers findet ein Großteil der Rechenleistung, die Transformation und Interpretation von Input-Daten, statt. Mittels der Anwendung von Aktivierungsfunktionen wird in der Hidden Layer entschieden, ob ein Neuron aktiviert wird oder nicht. Neuronale Netzwerke, die mehrere Hidden Layers besitzen, werden auch als „Deep Neural

Networks“ bezeichnet (Konnaris et al. 2022). Jeder Node ist mit einem anderen verbunden und besitzt ein zugeteiltes Gewicht und einen Schwellenwert. Die einzelnen Nodes werden aktiviert, sobald ihr jeweiliges Output den definierten Schwellenwert übersteigt. Nur in diesem Moment werden Daten an die nächste Schicht des Netzwerkes weitergeleitet. Ein Beispiel für eine Hidden Layer in einem DNN ist die sogenannte ReLU-Layer, bei welcher die Aktivierungsfunktion die Rectified Linear Unit (ReLU) ist (Krizhevsky et al. 2017). Mit dieser kann das Training von DNNs beschleunigt werden (Krizhevsky et al. 2017).

Für die Anwendung von KI z.B. in der Bildanalyse, wie in dieser Arbeit, muss die KI zunächst in der „Lernphase“ darauf trainiert werden, Bilder richtig zu erkennen und zu interpretieren. Dieser Vorgang wird von Saeidmehr et al. 2024 beschrieben. Die Lernphase unterteilt sich in drei Unterphasen:

1. Trainingsphase: Hier wird die KI anhand von Beispielen trainiert. Der KI werden große Mengen an Bildern gezeigt. Anhand dieser erlernt sie mittels Mustererkennung zunehmend die Unterscheidung von Merkmalen und deren Einordnung in verschiedene Kategorien. Anschließend kann sie Rückschlüsse darauf ziehen, was in den Bildern zu sehen ist. Insbesondere beim „Data-driven approach“ kommt es dabei auf möglichst große Datenmengen und eine hohe Qualität der Daten an.
2. Validierungsphase: Hier werden der KI neue Bilder gezeigt, die sie noch nicht aus der Trainingsphase kennt. Es wird überprüft, wie gut sie die zuvor erlernten Regeln anwenden kann, um die gezeigten Bilder richtig zu erkennen. Bei zu großer Ungenauigkeit in den Vorhersagen kann sich eine erneute Trainingsphase anschließen, um die Ergebnisse zu verbessern.
3. Testphase: Nun folgt der erneute Einsatz neuer, der KI unbekannter Bilder, der den Einsatz in der realen Welt simuliert. Die Qualität der Vorhersagen und die Leistungsfähigkeit der KI wird überprüft, bevor sie tatsächlich angewendet wird.

Eine weitere Untergruppe des ML in der Bildanalyse ist das sogenannte überwachte Lernen. Überwacht bedeutet in diesem Zusammenhang, dass der Benutzer die KI durch Anmerkungen unterstützt, während die KI lernt, durch das Anlegen von Schwellenwerten und Filteralgorithmen Objekte zu klassifizieren (Kastenschmidt et al. 2019). Zudem gibt es die Möglichkeit der KI auch während der Anwendung in der „realen“ Welt fortlaufend neue Daten zu sammeln und weiter zu lernen, dies erfordert aber eine sorgfältige Überwachung und komplexe Algorithmen (Kurmish und Ianunzio 2022).

Für optische Analyse und Klassifikation werden insbesondere CNNs eingesetzt. LeCun et al. 2015 gehen genauer auf die Funktionsweise und Anwendung von CNNs in der Bildanalyse ein. In der Lernphase wird das CNN mit positiven und negativen Proben konfrontiert und die verschiedenen „Neuronen“ lernen zunehmend miteinander zu kooperieren, um schlussendlich

den erwünschten Output zu erzeugen (Sultan et al. 2020). Der Großteil der Rechnerarbeit findet dabei auf der Ebene der sogenannten Convolutional Layers statt. Convolutional Layers erkennen räumliche Hierarchien in Bilddaten (Daten-Input), indem sie durch Filter (auch als Kerne bezeichnet) Merkmale wie Ecken, Kanten, Texturen und komplexe Muster extrahieren. Der Filter gleitet dabei über das Bild und führt punktweise Multiplikationen und Summationen aus. Dieser Prozess wird als Convolution bezeichnet. Das so erhobene Punktprodukt zwischen den Pixeln des Inputs und dem Filter wird dann als Output ausgegeben. Hieraus entsteht eine nicht-lineare Ansammlung von Zahlen, welche anzeigen, wo im Bild bestimmte Merkmale erkannt wurden. Diese Ansammlung wird als Feature Map bezeichnet. Dabei lernt das Netzwerk räumliche Beziehungen der verschiedenen gescannten Pixel zueinander. Dieser Prozess wird wiederholt bis der Filter das gesamte Bild gescannt hat. Das endgültige Ergebnis ist eine Anzahl von Feature Maps (auch als Activation Maps oder Convolved Features bezeichnet). Nach jeder Convolution wird durch das CNN die Feature Map in eine gleichgerichtete Lineareinheit (Rectified Linear Unit, ReLU) umgewandelt. Hierfür werden die erstellten Feature Maps linear nebeneinandergelegt („gleichgerichtet“) und in eine Zahlenreihe („Lineareinheit“) transformiert. Dieser Prozess wird auch als „Flattening“ bezeichnet. Diese Zahlenreihe kann dann durch das Netzwerk ausgewertet werden und es kann eine Entscheidung getroffen werden, was auf dem analysierten Bild zu sehen ist. Wenn mehrere Convolutional Layers aufeinander aufgebaut werden, erhält das CNN eine hinreichende Struktur, um immer komplexere und abstraktere Merkmale zu extrahieren, da die späteren Layers auf den Ergebnissen der vorherigen aufbauen. Durch das Verwenden von sogenannten Pooling Layers wird die Größe des Netzwerkes soweit wie möglich minimiert und das System auf einem Schwellenwert stabil gehalten (Sultan et al. 2020). Pooling Layers reduzieren die Größe der Feature Maps. Indem so die Datenmenge reduziert wird, werden Überanpassungen vermieden, sowie der Speicherbedarf und die notwendige Rechenleistung verringert. Durch diese Reduktion der Größe und Komplexität des Netzwerkes bleibt dieses stabil, wobei mit dem Schwellenwert die optimale Komplexität für ein leistungsfähiges Netzwerk beschrieben wird. Am Ende der CNN-Architektur stehen eine oder mehrere Fully Connected Layers. In diesen wird jedes Neuron einer Schicht mit jedem Neuron der nächsten Schicht verbunden. Durch die Kombination der in den vorherigen Schichten extrahierten Merkmale lernt das Netzwerk, welche Merkmale für die Klassifizierung der Bilddaten wichtig sind und kann schlussendlich eine Entscheidung treffen.

Ein einfaches Beispiel für die Anwendung eines CNN ist die Erkennung eines Hundes in einem Bild. Das ursprüngliche Bild (Input Image) wird in das Netzwerk eingespeist. In der Convolution Layer extrahieren Filter die lokalen Merkmale des Bildes. Die Hidden Layer (in unserem Beispiel eine ReLU-Layer) transformiert die extrahierten Merkmale in eine nichtlineare Funktion. Die Pooling Layer reduziert die Dimensionen der Bilddaten und abstrahiert die erfassten

Merkmale. In der Fully Connected Layer werden die Merkmale kombiniert, um das Bild zu klassifizieren. Die Output Classes sind in diesem Fall entweder „Hund“ oder „nicht Hund“. Für jede dieser Klassen errechnet das Netzwerk in der Kombination der Merkmale eine Wahrscheinlichkeit und entscheidet anhand dieser, ob das Bild einen Hund zeigt (s. Abbildung 6).

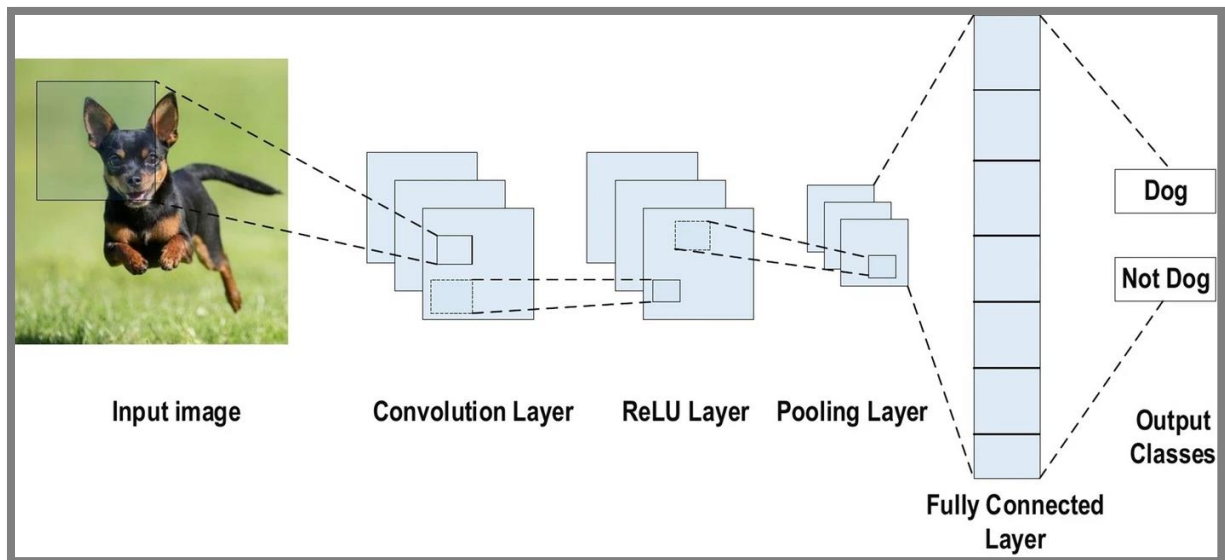


Abbildung 6: Beispiel einer CNN-Architektur für Bildklassifikation (Alzubaidi et al. 2021); Nutzung unter Creative Commons License (CC-BY).

## 2.5.2 KI-Anwendung in der Medizin

In der Medizin werden seit langer Zeit große Mengen von Daten generiert (Golden 2017), welche für das Training von ML-Algorithmen genutzt werden können. KI-basierte Unterstützungssysteme zur Entscheidungsfindung in der Medizin haben das Potenzial diagnostische Genauigkeit, Therapieentscheidungen, individualisierte Medizin und im Allgemeinen die Effizienz im medizinischen Arbeitsalltag entscheidend positiv zu beeinflussen (Goldenberg et al. 2019). Im Folgenden werden einige Beispiele von potenziell in der Routinediagnostik verwendbaren KI-Systemen vorgestellt:

- Für die Unterscheidung der meisten weitverbreiteten Hautkrebsarten, einschließlich des malignen Melanoms, entwickelten Esteva et al. 2017 einen CNN-basierten Algorithmus. Dieser analysierte im Vergleich mit 21 qualifizierten Dermatologen klinische Bilder, welche bioptisch gesichert worden waren, und erzielte dabei mindestens vergleichbare, wenn nicht bessere, Ergebnisse als die menschliche Beurteilung.
- Für die endoskopische Erkennung von Plattenepithelkarzinom und Adenokarzinom im Bereich des Ösophagus entwickelten Horie et al. 2019 ein CNN. Dieses lernte anhand 8428 retrospektiv gesammelter Bilddaten von 384 Patienten mit bekanntem Ösophaguskarzinom Karzinomareale von nicht-karzinominfiltrierter Schleimhaut zu unterscheiden.

Anschließend konnte die KI Innerhalb von 27 Sekunden mit einer Sensitivität von 98 % 1118 Testbilder von 47 Patienten mit und 50 Patienten ohne Ösophaguskarzinom unterscheiden und erkannte dabei alle kanzerösen Läsionen von unter 10 mm Größe.

- Für die Analyse durch künstliche Intelligenz prädestiniert ist die Radiologie, mit ihren seit über 25 Jahren überwiegend bereits vollständig digitalisierten und zentral archivierten Bilddaten. 2019 testete eine Studie von Liu X., Zhou H, Hu Z, Jin Q, Wang J, Ye B die Anwendung von KI in der automatischen Identifikation von malignen Lungentumoren (1 mm und 5 mm Größe) anhand von CT-Bildern von Patienten mit Lungenkrebs im T1-Stadium. Anhand von 5000 Lernfällen gelang es der KI anschließend, 500 Thorax-CTs zu evaluieren und mit einer den Radiologen vergleichbaren Rate Tumorherde korrekt zu identifizieren.

In dieser Arbeit wird eine KI für die histopathologische Analyse von Synovialisgewebe verwendet. Bereits vor ca. 15 Jahren begann die Veröffentlichung von Artikeln, welche die Möglichkeiten der KI-Anwendung in der Histopathologie und die dafür notwendigen Schritte im Detail beschrieben. Diese umfassen die Etablierung „virtueller Schnitte“ (vollständig digital erfasste mikroskopische Bilder), die Beurteilung und gegebenenfalls Korrektur der individuellen Bildqualität, die Entwicklung auf Pixeln basierender diagnostischer Algorithmen, automatisierte Bildklassifikation und das Erkennen und Interpretieren relevanter Bildinformation. Durch Umsetzung all dieser Möglichkeiten wäre die Aufgabe der Pathologen in der Zukunft überwiegend eine supervisorische und es würden Kapazitäten für die intensive Beschäftigung mit atypischen und komplexen Patientenfällen frei (Kayser et al. 2009). Aufgrund der weitaus größeren Datenmengen bei vollständiger Digitalisierung histopathologischer Präparate im Vergleich z.B. zur Radiologie, sowie der weiterhin bestehenden Notwendigkeit der Anfertigung von auf Objektträgern fixierten Schnittpräparaten, ist laut Ahmad et al. 2021 davon auszugehen, dass es durch die zunehmende Anwendung von KI in der Histopathologie zu einer Steigerung der Kosten kommt. Dies muss für die erfolgreiche Umsetzung notwendigerweise durch verbesserte diagnostische Qualität und Optimierung des alltäglichen Workflows ausgeglichen werden.

Im nächsten Kapitel wird spezifisch auf die KI-basierte Analyse Ki-67-positiver Zellen eingegangen. Beispielhaft wird dabei auf das Mammakarzinom zurückgegriffen, welches für die Untersuchung von Ki-67-Analysen im Zusammenhang mit künstlicher Intelligenz häufig herangezogen wird. So ergibt z.B. die Suche nach den Begriffen „artificial intelligence“, „Ki-67“ und „breast cancer“ 78 Resultate auf PubMed (National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information), während die Suche nach „artificial intelligence“, „Ki-67“ und „synovia“ keine Publikationen findet (Stand 11.08.2024). Zudem wird die in dieser Studie angewandte CNN-basierte Software Mindpeak Solutions/ Mindpeak Breast Ki-67 Rol für die Ki-67-Analyse des Mammakarzinoms verwendet (Abele et al. 2023).

### 2.5.3 KI-basierte Analyse Ki-67-positiver Zellen

Studien, in denen die immunhistochemische Analyse Ki-67-positiver Zellen mittels Augenmaß mit KI-assistierter Analyse verglichen wurden, zeigen eine signifikant verbesserte Reproduzierbarkeit und diagnostische Sicherheit der KI-assistierten Analyse im Vergleich zum Augenmaß (Stålhammar et al. 2016; Dessauvagie et al. 2019; Wang et al. 2019). Auffällig und bemerkenswert ist hierbei die relative Angleichung der Qualität zwischen erfahrenen und unerfahrenen Pathologen durch die Unterstützung durch KI. Im Jahr 2021 wurden beispielsweise durch Cai et al. im Rahmen einer aus drei diagnostischen Runden bestehenden Ringstudie des invasiven duktalen Mammakarzinoms ohne neoadjuvante Chemotherapie drei Quantifizierungsmethoden miteinander verglichen: Visuelle Analyse nach Augenmaß (VA), visuelle Analyse mit Unterstützung durch Referenzkarten (Assessment with reference cards, ARC) und Analyse mit einem KI-augmentierten Lichtmikroskop (Assessment with AI-empowered microscope, AAM). Bei der visuellen Analyse nach Augenmaß wird die Quantifikation der immunhistochemisch reagierenden Zellen durch die Befunder ohne externe Hilfestellung anhand ihrer Erfahrung durchgeführt. Die Unterstützung durch Referenzkarten ermöglicht dem Befunder den Vergleich der zu analysierenden Schnitte mit durch einen unabhängigen Pathologen zuvor annotierten Beispielschnitten. Hierbei werden repräsentative Areale von Tumorschnitten, die nicht Teil der Ringstudie waren, mit Ki-67-Positivität von 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 70 % und über 90 % zum Vergleich vorgelegt. Das angewendete KI-augmentierte Lichtmikroskop wurde von Cai et al. 2021 entwickelt. Ein reguläres Lichtmikroskop wurde mit einem Augmented Reality (AR)-Modul und einem KI-Algorithmus für die Analyse immunhistochemischer Reaktionen versehen. Die KI detektiert Tumorzellen und unterscheidet zwischen positiver und negativer nukleärer Ki-67-Reaktion. Das Ergebnis wird dem Befunder über das AR-Modul in der Live-Ansicht direkt im Okular bei der Durchsicht des Schnittes angezeigt. Die 30 beteiligten Pathologen wurden in 15 erfahrene Befunder mit mehr als 5 Jahren Erfahrung in der Quantifizierung von Ki-67 und 15 unerfahrene Befunder mit 2 bis 5 Jahren Erfahrung in der Quantifizierung von Ki-67 unterteilt. Die Auswertung der Ki-67-Positivität fand über eine Ringstudie statt. Dies bedeutet, dass mehrere (in diesem Fall fünf) unabhängige Institutionen Befunder zur Verfügung stellen, welche die gleichen Tumorschnitte anhand der gleichen Kriterien und mit den gleichen Methoden bewerten. Für die Auswertung wurden bei homogenen Tumoren drei zufällig ausgewählte Areale und bei heterogenen Tumoren drei Hotspot-Areale für die Analyse ausgewählt und mit etwa 200-facher Vergrößerung ausgewertet. Nach Abschluss der drei Analyserunden mit einem jeweiligen Abstand von zwei Wochen wurden sowohl die drei Methoden miteinander als auch die Intra- und Interobservervariabilität der Begutachter in Abhängigkeit von der verwendeten Methode verglichen und mittels intraclass correlation coefficient (ICC) (Liljequist et al. 2019) mit einem Konfidenzintervall (CI) von 95% die Reproduzierbarkeit quantifiziert. Die Gruppe der erfahrenen Pathologen (Gruppe I) zeigte bei VA eine bessere Performance mit einem ICC von 0,864 (95 % CI 0,79 –

0,87, mean error = 8,25 %) als die unerfahrenen Pathologen (Gruppe II) mit einem ICC von 0,807 (95 % CI 0,76 – 0,85, mean error = 11 %),  $p < 0,001$ . Die Ergebnisse beider Gruppen verbesserten sich durch die Anwendung von Referenzkarten (Gruppe I mit ICC = 0,875 (95% CI 0,84 – 0,90), mean error = 7,56 %; Gruppe II mit ICC = 0,836 (95 % CI 0,79 – 0,87), mean error = 10,7 %),  $p < 0,001$ . Noch einmal akkuratere und besser reproduzierbare Ergebnisse erzielten beide Gruppen unter Anwendung einer KI (Gruppe I: ICC = 0,937 (95 % CI 0,91 – 0,95), mean error = 4,36 %; Gruppe II: ICC = 0,923 (95 % CI 0,90 – 0,94), mean error = 4,07 %). Es konnte zudem eine Angleichung in der Reproduzierbarkeit der beiden Gruppen festgestellt werden: Mit einer Differenz der ICC zwischen erfahrenen und unerfahrenen Pathologen bei VA von 0,057, bei ARC von 0,039 und bei AAM von 0,014.

Für das lobuläre Mammakarzinom wurde die Anwendbarkeit digitaler Bildanalyse (digital image analysis, DIA) für die automatisierte Evaluation des Ki-67-Biomarkers von Dessauvagie et al. 2019 untersucht. Hier konnte eine signifikante Korrelation von DIA mit dem visuellen Zählen von Mitosen an HE-Schnitten (Spearman's rank correlation coefficient (Spearman 1904) ( $r_s$ ) = 0,63;  $p < 0,05$ ), rein visueller Auswertung von Ki-67 ( $r_s$  = 0,78;  $p < 0,05$ ) und mehreren klinisch-pathologischen Variablen etabliert werden.

Neben der Ki-67-Positivität wurde in dieser Studie auch die Gesamtzelldichte der untersuchten Synovialisproben erfasst. Im nächsten Kapitel wird auf die Qualität dieses Parameters für die Unterscheidung zwischen OA und RA und die besondere Eignung für die KI-basierte Analyse eingegangen.

#### 2.5.4 KI-basierte Analyse der Gesamtzelldichte

Eine Studie zur Identifikation von Schwellenwerten für die KI-basierte Analyse von Synovialitiden durch Mehta et al. 2023 stellte fest, dass eine hohe Gesamtzelldichte zur Diskriminierung zwischen RA und OA ein gut geeigneter Parameter ist. Für die Analyse von Geweben mit hoher Zelldichte hat KI im Vergleich zur rein visuellen Analyse einen erheblichen Vorteil, da die Auszählung vieler Zellen nicht nur viel Zeit in Anspruch nimmt, sondern auch anfällig für Ablenkungen ist (Cai et al. 2021).

Insgesamt 147 OA-Patienten und 60 RA-Patienten wurden untersucht. Bei der OA wurde eine signifikant geringere Gesamtzelldichte von durchschnittlich 2900 Zellen/mm<sup>2</sup> im Vergleich zu 4196 Zellen/mm<sup>2</sup> bei RA gefunden ( $p < 0,001$ ). Der Parameter wurde mit einer Makro-AUC von 0,88 als bestgeeignet für die Unterscheidung zwischen OA und RA durch die KI identifiziert. Als Schwellenwert zeigte sich 3400 Zellen/mm<sup>2</sup> mit einer Sensitivität und Spezifität von je 0,82 als optimal.

### 2.5.5 Einsatz von KI-basierten-Quantifizierungssystemen in der Histopathologie von muskuloskelettalen Erkrankungen

Im Dezember 2021 waren in den USA durch die US Food and Drug Administration (FDA) 120 ML-basierte medizinische Bildanalysetechnologien zugelassen (Muehlematter et al. 2021). Dagegen erhielten bisher nur einige wenige ML-Modelle für die histopathologische Anwendung (z.B. im zytologischen Screening oder in der Zellklassifikation) eine Zulassung (Harrison et al. 2021). In der Forschung wurde ML bereits erfolgreich für die Untersuchung von z.B. Chromatinverteilung (Yang et al. 2021), subzellulären Organellen (Radhakrishnan et al. 2017), zur Identifikation von Zellkernen im Allgemeinen (Graham et al. 2019) oder mitotischen Zellkernen im Speziellen (Ehteshami Bejnordi et al. 2017; Steiner et al. 2018), sowie für die Klassifikationen und Unterscheidung verschiedener Malignome in Zusammenhang mit dem klinischen Outcome (Coudray et al. 2018; Campanella et al. 2019; Pantanowitz et al. 2020; Pei et al. 2020) angewendet.

Die semiquantitative und quantitative Analyse mikroskopischer Bilder in der orthopädischen und rheumatologischen Histopathologie ist bereits seit über 20 Jahren etabliert und nimmt immer weiter zu (Konnaris et al. 2022). Im Nachfolgenden werden von Forschungsgruppen entwickelte und zum Teil in der Diagnostik adaptierte Methoden zur Untersuchung von Synovialis, Skelettmuskelfasern, und Knorpel Eigenschaften beschrieben.

In der histopathologischen Beurteilung der Synovia wird die Computer-assistierte Quantifikation verschiedener synovialer Eigenschaften, z.B. CD3- oder CD68-Positivität, mithilfe der Festlegung von Schwellenwerten der Rot-Grün-Blau (RGB)-Werte sowohl anhand von HE- als auch Diaminobenzidin (DAB)-gefärbten Schnitten angewendet (Kraan et al. 2000; Haringman et al. 2005; Rooney et al. 2007) und korreliert hoch mit den konventionellen Auswertungsmethoden (Kraan et al. 2000). Mit ähnlichen Verfahren gelingt auch die Abgrenzung von Lymphozytenkernen und die Quantifizierung der Synovialisdicke an HE-gefärbten Biopsaten von Patienten mit RA, OA und Psoriasisarthritis (PSA), bei guter Korrelation mit den entsprechenden klinischen Scores (Morawietz et al. 2008b). Diese Anwendung von Schwellenwerten kann zwar eine zuverlässige Methode der Messung von Gewebeeigenschaften sein (Rivellese et al. 2020), ist aber auch anfällig z.B. für Variationen in der Färbeintensität (Konnaris et al. 2022). Eine der ersten Anwendungen eines CNN (Resnet34) unternahmen Venerito et al. 2021. Sie trainierten ein Klassifizierungsprogramm darauf, anhand von Mikrofotografien zwischen low- und high-grade Synovialitis zu unterscheiden. Dies gelang zuverlässig an allen 30 analysierten Bildern.

Die Struktur von Skelettmuskelfasern und die hohe diagnostische Potenz der Fasergeometrie prädestiniert den Skelettmuskel für die Entwicklung und Anwendung von Bilderkennungssoftware (Konnaris et al. 2022). In der Tat werden bereits seit 1998 zahlreiche Modelle basierend auf Edge Detection (Kantenerkennung) mit besonderem Augenmerk auf Fasergeometrie

entwickelt (Klemencic et al. 1998; Kim et al. 2007; Sertel et al. 2011; Liu et al. 2013; Mula et al. 2013; Konstantinos Ntzeros et al. 2014; Smith und Barton 2014; Miazaki et al. 2015). Ein überwachter DL-Ansatz wurde von Kastenschmidt et al. 2019 eingesetzt, um die binäre Klassifikation von Faser bzw. nicht-Faser durch KI zu ermöglichen. Eine CNN-basierte Variante zur Klassifikation von Muskelfasern wurde zudem von Encarnacion-Rivera et al. 2020 entwickelt.

Ein erster DL-Ansatz bei der Erforschung von Knorpel-eigenschaften wurde von Yang et al. 2019 anhand von Safranin-O-gefärbten Chondrozyten aus einem Kaninchenmodell (vorderes Kreuzband) entwickelt. 235 Trainings- und 25 Validierungsbilder wurden von einem Experten mit Anmerkungen versehen und eine U-NET-Architektur (eine primär für biomedizinische Bilderkennung entwickelte, auf Pixel-Segmentierung und -Klassifikation basierende DL-Architektur (Ronneberger et al. 2015)) wurde auf die Erkennung von Chondrozyten trainiert. Fünf unabhängige Untersucher bearbeiteten 35 weitere Bilder als externen Test. Während das DL-Modell eine hohe interne Konsistenz aufwies (Intersection over Union (IoU) = 0,82), erkannte es im Vergleich mit den unabhängigen Untersuchern stets weniger Chondrozyten, was auf den Mangel an ausreichenden Trainingsdaten oder ein zu komplexes Modell zurückgeführt werden kann (Konnaris et al. 2022).

#### 2.5.6 MindPeak Breast, Ki-67 Rol

Die in dieser Arbeit verwendete KI-gestützte Bildanalyse (MindPeak Breast, Ki-67 Rol) basiert auf einem Deep Learning-Algorithmus mit CNNs („data-driven“) (Litjens et al. 2017). Das Vorgehen der KI wurde von Abele et al. 2023 beschrieben und besteht in der Identifikation von individuellen Zellen in einem festgelegten Bildausschnitt einer Gewebeprobe. Die erkannten Zellen werden in Tumor- und nicht-Tumorzellen eingeteilt und die Ki-67-positiven Zellen ausgezählt. Anschließend wird durch die Software der Anteil Ki-67-positiver Zellen an der Gesamtzahl der Tumorzellen errechnet und ausgegeben. Hierfür wird eine neurale Netzwerkarchitektur, bestehend aus „21 convolutional layer blocks with a rectified linear unit activation function and batch normalization and separate branches for cell detection and classification“ (Abele et al. 2023) verwendet. Mittels der Zellerkennungszweiges sagt das neurale Netzwerk für jeden Pixel eines ausgewählten Bildausschnittes voraus, ob dieser zu einer Zelle gehört. Nach der Erkennung von Zellen werden diese mit derselben Methode der Klassifikation einzelner Pixel als zu Zellen zugehörig einer Zellart (Tumor oder nicht-Tumor) zugeteilt, hierfür verwendet die KI den Zellklassifikationszweig. Der Zellerkennungszweig ist also für die Identifikation von Zellen in digitalisierten Bildern der Gewebeproben im Allgemeinen verantwortlich, während der Zellklassifikationszweig die Zellen basierend auf zuvor erlernten Merkmalen als neoplastisch oder nicht-neoplastisch einordnet. Abhängig von der jeweiligen Intensität der immunhistochemischen Färbung wird jede einzelne Zelle als entweder positiv oder negativ gewertet. „Das KI-Tool schlägt einen globalen Intensitätsschwellenwert für Braun (3,3'-

Diaminobenzidin-Färbung) pro Fall vor, der auf einem Zweikomponenten-Gaußschen Mischungsmodell basiert“ (übersetzt nach Abele et al. 2023). Dieser Schwellenwert kann durch den Anwender für die jeweiligen Bedürfnisse angepasst werden.

Für die Anwendung dieser KI in der Analyse von Synovialitiden sind einige adaptive Arbeitsschritte erforderlich, da in diesen Geweben die Identifikation von Tumorzellen keine Rolle spielt, sondern alle proliferierenden Zellen erfasst werden sollen. Im folgenden Kapitel Material und Methoden wird auf diese weiteren Arbeitsschritte eingegangen (3.8.2).

### **3 Material und Methoden**

Die in dieser Studie untersuchten Fälle stammen aus der histopathologischen Routinediagnostik des medizinischen Versorgungszentrums für Histologie, Zytologie und Molekulare Diagnostik (MVZ-HZMD)-Trier GmbH. Die von zahlreichen orthopädischen Facharzt-Praxen und -Kliniken eingesendeten Synovialisproben wurden im Diagnostiklabor des MVZ-HZMD-Trier verarbeitet und befundet. In diesem Rahmen wurden sowohl histochemische Standardfärbungen als auch immunhistochemische Verfahren, für diese Arbeit relevant die Ki-67-Färbung, angewandt. In der Befundung wurde zudem der Synovialitis-Score vergeben und in vielen Fällen in Hinblick auf die klinische Fragestellung eine Bewertung bzgl. der möglichen Therapierefraktärität abgegeben. Im Folgenden werden die verschiedenen Arbeitsschritte vom Empfang der Proben im Labor bis zur histopathologischen Befundung durch den Facharzt dargelegt. Außerdem wird der Auswahlprozess der in dieser Studie eingeschlossenen Fälle kurz erläutert. Anschließend werden die weiterführenden Verfahren für die visuelle und KI-basierte Analyse und die Differenzierung zwischen therapierefraktärer und nicht-therapierefraktärer RA für die Beantwortung der spezifischen Fragestellungen dieser Studie erklärt.

#### **3.1 Diagnostische Kooperationsstruktur des MVZ-HZMD-Trier-GmbH**

Die histopathologische Diagnostik basiert auf der fachärztlichen Begutachtung von formalinfixierten und paraffineingebetten Gewebeproben (sog. FFPE-Gewebe) in einem histopathologischen Diagnose-Zentrum, dem MVZ-HZMD-Trier-GmbH, mit einem diagnostischen Schwerpunkt für orthopädische Pathologie. Dieses ist Bestandteil einer Kooperationsstruktur mit etwa 190 teilweise zertifizierten Orthopädischen Facharzt-Praxen, Orthopädischen Kliniken und Gelenkendoprothesen-Zentren in allen 16 deutschen Bundesländern. Der gesamte diagnostische Prozess erfolgt S1-Leitliniengerecht (DIN EN ISO/IEC 17020:2012, Registriernummer: D-IS-21311-01-00) unter standardisierten und akkreditierten Bedingungen. Die histopathologische Diagnostik, die Klassifikation und Typisierung wird von erfahrenen Fachärzten für Pathologie mit orthopädisch-pathologischer Spezialisierung durchgeführt. Fälle mit durch einen Facharzt nicht eindeutig festzulegender Typisierung werden zwischen den Fachärzten diskutiert und anschließend eine kompromissbasierte Diagnose festgelegt (Interobserver-Validierung). Bei

weiterhin unklaren diagnostischen Konstellationen werden zur Absicherung der Primärdiagnose Konsultationen in verschiedenen Zentren veranlasst.

## 3.2 Patientendaten

Mithilfe der Software Nexus (Nexus-AG, Version 1.25.11.24064) wurden retrospektiv mittels der Suchoberfläche „Beauskunftung“ in der Datenbank des MVZ-HZMD Trier GmbH die in die Studie einzuschließenden Fälle herausgesucht. Es handelt sich um rheumatoide Arthritis-Fälle mit der klinischen Angabe „rebellisches Gelenk“ bzw. „Therapieresistenz“, „Therapierefraktärität“, „therapieresistente Arthritis“ oder „therapierefraktäre Arthritis“ und der ICD-10-Klassifikation M05 oder M06 im Zeitraum von 01.01.2020 bis 31.12.2023 (Gesamtzahl 125), sowie um respektive Kontrollfälle von nicht-therapierefraktären high-grade Synovialitiden und low-grade Osteoarthritis mit den ICD-10-Klassifikationen M05/M06 (Gesamtzahl 298), M12 (Gesamtzahl 192).

Vor der Aufnahme der Fälle in das Untersuchungskollektiv wurden Fälle mit größerem Anteil an knöchernem Gewebe und erfolgter Trichloressigsäure- oder Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Entkalkung ausgeschlossen, da in diesen Fällen eine Verfälschung der immunhistochemischen Reaktionen nicht ausgeschlossen werden konnte. Zudem wurden Fälle ausgeschlossen, die keine ausreichende Menge an repräsentativem Synovialisgewebe oder histologisch eine floride entzündliche Komponente aufwiesen. In dieser Studie wird die Definition der „echten“ inflammatorischen Therapierefraktärität bei RA (Buch et al. 2021) verwendet. Fälle, welche klinischerseits als therapierefraktär und/oder histopathologisch als mit einer Therapierefraktärität vereinbar eingestuft wurden, aber keine high-grade Synovialitis aufwiesen, wurden daher nicht in die Studienkohorte eingeschlossen. Ein weiteres Einschlusskriterium war die bereits erfolgte Ki-67-Reaktion, welche insbesondere bei low-grade RA nicht in allen Fällen vorlag. Auf diese Weise konnte schlussendlich eine verwertbare Fallkohorte von insgesamt 81 Synovialitisfällen gewonnen werden. Bei unklaren Typisierungen erfolgte eine Re-Evaluation. Es schloss sich die statistische Auswertung an.

Die insgesamt 81 in die Studie eingeschlossenen Patientenfälle setzen sich aus 26 männlichen (m), 44 weiblichen (w) und einem Patienten unbekanntes Geschlechts (u) im Alter von 2 – 82 Jahren zusammen. Die Materialentnahme erfolgte teils im Rahmen von arthroskopischen Eingriffen, teils im Rahmen der endoprothetischen Versorgung.

### 3.2.1 Datenmanagement

Der komplette Zyklus des Datenmanagements, welcher 1. Datenerhebung, 2. Dokumentation, 3. Analyse, 4. Publikation, 5. Archivierung und 6. generelle wissenschaftliche Nutzung (z.B.: Vorträge, Promotions-Arbeit) umfasst, wurde vollständig anonymisiert. Sämtliche histopathologischen Diagnosen sind zugleich die histopathologischen Daten und Diagnosen des

zertifizierten und akkreditierten MVZ-HZMD-Trier GmbH (Deutsche Akkreditierungsstelle: D-IS-21311-01-00) und unterliegen den spezifischen auditierten Normen und Auflagen.

### 3.3 Untersuchtes Gewebe

Es wurde eine Patientenkohorte von  $n = 81$  untersucht. Dafür wurden 23 Fälle von therapierefraktärer high-grade Synovialitis bei rheumatoider Arthritis („rebellisches Gelenk“) analysiert und mit 36 Fällen von rheumatoiden arthritissassoziierten high-grade Synovialitiden und 22 Fällen von arthroseassoziierten low-grade Synovialitiden verglichen. Sämtliche Gewebeproben wurden im Rahmen der histopathologischen Routinediagnostik gewonnen und stellen einen integralen Bestandteil der Diagnostik für die Rheumatologie, orthopädische Rheumatologie und Orthopädie dar. Die Auswahl der Stichproben erfolgte zufällig aus dem Kontingent der vorhandenen, den oben beschriebenen Anforderungen (s. Kapitel 3.2) entsprechenden, Synovialisproben.

Die verwendeten Gewebeproben sind zudem Bestandteil des Datensatzes des Histopathologischen Arthritis-Registers der Deutschen Gesellschaft für Orthopädische Rheumatologie e.V. (DGORh). Dieses hat die Etablierung einer Datenbank von histopathologischen/gelenkpathologischen Daten zum Ziel, basierend mehrheitlich auf der Klassifikation mittels des Synovialitis-Scores und des Gelenkpathologie-Algorithmus. Die klinisch-basierte Interpretation der Daten wird in Kooperation mit den Mitgliedern der DGORh erstellt (Gaulke).

#### 3.3.1 Klinische Datenbeschreibung der Arthritis-/Arthrose-Fälle

Die Erfassung und Aufbewahrung der für diese Studie verwendeten Daten erfolgte in der diagnostischen Datenbank des MVZ-HZMD Trier GmbH bzw. des histopathologischen Arthritisregisters der DGORh. Untersucht wurden 23 Synovialisproben mit der klinischen Angabe therapierefraktäre rheumatoide Arthritis/„rebellisches Gelenk“ und high-grade Synovialitis im Vergleich mit 36 Synovialisproben von Patienten mit high-grade rheumatoider Arthritis ohne die Angabe einer Therapierefraktärität. Diese insgesamt 59 Proben stellen einen Gesamtanteil von 13,95 % (59 untersuchte Fälle/423 Gesamtkollektiv) aller eingesendeten rheumatoiden Arthritis-Proben im Zeitraum vom 01.01.2020 bis 31.12.2023 dar. Die Kontrollgruppe setzte sich zusammen aus 22 Fällen arthroseassoziiertes low-grade Synovialitis, diese stellen einen Gesamtanteil von 11,46 % (22 untersuchte Fälle/192 Gesamtkollektiv) aller eingesendeten arthroseassoziierten low-grade Synovialitiden im Zeitraum vom 01.01.2020 bis 31.12.2023 dar. Die erhobenen Variablen wurden in einem Tabellenkalkulationsprogramm ((Microsoft® Excel® 2021 MSO (Version 2401 Build 16.0.17231.20236) 32 Bit)) aufgelistet. Die Präparate wurden histopathologisch mittels HE-Färbung und Ki-67-Färbung beurteilt.

### 3.3.2 Untersuchte Gelenke

Die untersuchten Proben der therapierefraktären high-grade rheumatoiden Synovialitiden stammten in 20/23 Fällen aus großen Gelenken (18 Knie, einmal Hüfte, einmal oberes Sprunggelenk), in 1/23 Fällen von kleinen Gelenken (einmal MTP). In zwei Fällen fehlte die entsprechende klinische Angabe.

Die Proben der nicht-therapierefraktären rheumatoiden Synovialitiden setzten sich folgendermaßen zusammen: 20/36 Fälle aus großen Gelenken (zwölfmal Knie, einmal Hüfte, dreimal Schulter, viermal Ellbogen), 8/36 Fälle aus kleinen Gelenken (einmal Großzehe, siebenmal Hand), in acht Fällen fehlte die entsprechende klinische Angabe.

In der Kontrollgruppe der low-grade Osteoarthritiden fanden sich 18/22 Proben aus großen Gelenken (14-mal Knie, dreimal Hüfte, einmal Schulter). In vier Fällen fehlte die entsprechende klinische Angabe.

### 3.3.3 Therapie

Von den Patienten mit therapierefraktärer rheumatoider Synovialitis, high-grade, erhielten zum Einsendezeitpunkt insgesamt zehn Patienten eine Basistherapie mit DMARDs, davon einer eine Methotrexat-Therapie in Kombination mit einem nicht näher spezifizierten TNF- $\alpha$ -Inhibitor. Zwei Patienten erhielten Leflunomid und je ein Patient Adalimumab, Certolizumab, Tofacitinib und Retuximab, ein Patient einen nicht näher spezifizierten JAK-Inhibitor und zwei Patienten „multiple Biologika“. Bei 13 Patienten fehlten die entsprechenden klinischen Daten.

Unter den Patienten mit nicht-therapierefraktärer rheumatoider Synovialitis erhielten neun eine Basistherapie mit Methotrexat, davon einer in Kombination mit Leflunomid und einer in Kombination mit „weiteren Mitteln“. Je ein Patient erhielt Tofacitinib, Tocilizumab, Baricitinib, Secunimab und einen nicht näher spezifizierten Alpha-IL-17-Antikörper. Ein Patient wurde mittels einer Kombination aus Baricitinib und Quensyl therapiert. Zwei Patienten erhielten Upadacitinib.

19 der Patienten aus der Kontrollgruppe der low-grade Osteoarthritiden erhielten keine Basistherapie bzw. die entsprechenden klinischen Angaben fehlten. Drei weitere wurden zum Einsendezeitpunkt mit Methotrexat therapiert.

Tabelle 4 zeigt im Überblick die Variablen der erhobenen klinischen Patientendaten.

Klinische Daten	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Alter Mittelwert (Jahre)	44	52	59
Alter Median (Jahre)	51	51	61
Geschlecht (m/w/u)	11/12/0	9/27/0	7/14/1

Gelenk (groß/klein/k.A.)	19/2/2	24/7/5	16/0/6
Therapie (Mono/Kombi/k.A.)	7/2/13	14/3/19	3/0/19

Tabelle 4: klinische Patientendaten (Gruppe 1 = therapierefraktäre high-grade Synovialitis; Gruppe 2 = nicht-therapierefraktäre high-grade Synovialitis; Gruppe 3 = low-grade Synovialitis bei Osteoarthritis). Eigene Darstellung.

### 3.4 Zuschnitt des Gewebes

Die im Rahmen der histopathologischen Routinediagnostik gewonnenen Gewebeproben wurden üblicherweise in 4% gepuffertem Formalin vorfixiert eingeschickt. Anschließend wurde das Gewebe nach dem institutsinternen vom Qualitätsmanagement freigegebenen Zuschnitthandbuch präpariert und in Plastik-Kapseln eingekapselt. Diese wurden mit QR-Code, Fallnummer und Gefäßnummer gelabelt. Dabei wurden Proben von weniger als 28 x 20 x 4 mm vollständig eingebettet und von größeren Proben repräsentative Schnitte im Abstand von 10 bis 20 mm angefertigt. Eventuelles Knochengewebe oder kalkharte Gewebeabschnitte wurden in Abhängigkeit der Fragestellung mittels Trichloressigsäure oder in EDTA entkalkt.

### 3.5 Prozessierung des Gewebes

Die makroskopische Diagnostik, der Material-Zuschnitt und die histopathologische Aufbereitung sowie histopathologische Diagnostik erfolgten unter standardisierten und akkreditierten Bedingungen S1-Leitliniengerecht (DINEN ISO/IEC 17020:2012, Registriernummer: D-IS-21311-01-00) und speziell für Gewebe des Bewegungsapparates auch unter Berücksichtigung des Protokolls des histopathologischen Arthritisregisters der Deutschen Gesellschaft für Orthopädische Rheumatologie e.V. (DGORh). Die Gewebeaufarbeitung wurde mittels apparativer, semiautomativer, automatischer, trackingbasierter Gewebe-Prozessierungen und auch manueller Verfahren durchgeführt. Die Gewebeproben wurden in einer 4 % gepufferten Formalinlösung zwischen etwa 24 und 72 Stunden fixiert. Im MVZ-HZMD-Trier GmbH wurde das übermittelte Material mit einem QR-Code-basierten Labortracking-System (VENTANA, VANTAGE workflow solution®, Roche, Basel, Schweiz) bestehend aus QR-Code mit Eingangsnummer, Eingangs-Datum, Patienten-Daten, Daten zu den Gewebe-Proben, Daten der überweisenden Praxis/Klinik und den klinischen Daten (inklusive diagnostische Zusatzbefunde) erfasst und in das Pathologie-Informationssystem (Nexus/dis GmbH, Version 1.25.4.23339) eingepflegt. Die Rückverfolgbarkeit von Gewebeproben war durch das Labortracking-System in allen Prozessstadien möglich. Vor dem Zuschnitt erfolgte eine makroskopisch-pathologische Begutachtung der Proben: Die übersandte Materialprobe wurde auf dreidimensionale Größe, Gewicht und Materialeigenschaften beschrieben, zugeschnitten und somit qualitativ und quantitativ begutachtet. Diese Daten wurden mittels Spracherkennung (Dragon Medical Practice Edition, Nuance Communications Inc., Version 4.3, Revision 15.50.200.033) in das

Pathologie-Informationssystem (Nexus-AG, Version 1.25.11.24064) integriert. In Abhängigkeit vom Gewebevolumen wurden die Gewebeproben entweder in einzelne oder mehrere Einbettkapseln eingebettet.

### 3.5.1 Fixierung

Bis zur Entwässerung (maximal 8 Stunden nach der ersten Bearbeitung im Zuschnitt) wurden die Proben weiter in 4% gepuffertem Formalin inkubiert.

### 3.5.2 Entwässerung

Im Entwässerungslabor wurden die Proben in mehreren Phasen entwässert (Tissue-Tek VIP 6® Sakura®, Xpress x120® Sakura®, Leica- PELORIS®, LOGOS® Menarini®). Die korrekte Programmdurchführung (Start und Ende) wurde von den Mitarbeitern des Labors überprüft.

### 3.5.3 Einblocken in Paraffin

Im Regelfall erfolgte das Einblocken des Gewebes in Paraffin automatisiert. Nach der Entwässerung erfolgte in diesem Zusammenhang eine Einbettung der Probe in flüssiges, heißes Paraffin mit einer automatisierten Herstellung von Paraffinblöcken (Tissue-Tek AutoTEC® a120 Sakura®).

In Ausnahmefällen erfolgte das Einblocken des Gewebes manuell. In diesen Fällen wurden die Paraffinblöcke im Paraffinlabor an der an das Vantage System angebundene Gießstation gegossen. Das Gewebe wurde mit einer beheizten Heidelberger Pinzette in flüssiges Paraffin in eine abhängig von der Größe des Gewebes ausgewählte Metallform gelegt und die zugehörige Kapsel darübergestülpt. Dann wurde die Form mit flüssigem Paraffin aus der Gießstation aufgefüllt und anschließend auf eine Kühlplatte gesetzt.

Nach dem Abkühlen und Erhärten wurden die fertigen, automatisch oder manuell angefertigten, Paraffinblöcke zum Schneiden in die Mikrotomie weitergeleitet.

### 3.5.4 Anfertigen der Schnittpräparate

Die abgekühlten, ausgehärteten Paraffinblöcke wurden mit Hilfe eines manuellen Mikrotoms (Rotationsmikrotom Hyrax M40, Zeiss, Oberkochen; Messer A35, Feather, Osaka, Japan) in 2-5 µm dicke Scheiben geschnitten. Anschließend wurden die Schnittpräparate in ein Heißwasserbad von 37°C eingebracht und dann auf einen Glas-Objektträger aufgezogen.

## 3.6 Histologische Färbeverfahren

### 3.6.1 Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Die Färbung der Gewebeschnitte erfolgte unter standardisierten und akkreditierten Bedingungen. Bei der dabei angewandten HE-Färbung handelt es sich um eine Standardfärbemethode zur histopathologischen Diagnostik von Geweben. Die Färbung und das Eindecken wurden vollautomatisch durchgeführt (Tissue-Tek Prisma® Plus & Tissue-Tek Film® Germany GmbH,

Freiburg, Germany; Leica ST5020). Die Präparate wurden zunächst mit Xylol vorbehandelt, anschließend mit einer absteigenden Ethanolreihe (100 %, 100 %, 96 %, 70 %) deparaffiniert und unter fließendem Wasser gespült. Mittels der 4-minütigen Hämatoxylin-Färbung (Harris, Surgipath, Richmond, Illinois, USA) kommt es zur Blaufärbung basophiler Strukturen (Zellkerne, Ribosomen, raues endoplasmatisches Retikulum (rER) und DNA). Das Material wurde dann erneut mit Wasser gespült. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung mit Eosin (Eosin Y, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) für 1,5 min. Eosinophile Zellbestandteile (Zytoplasma, Kollagen, Mitochondrien und Proteine) werden rosa oder rosa-rot eingefärbt. Durch eine aufsteigende Ethanolreihe (70 %, 96 %, 100 %, 100 %) und Eintauchen der Schnitte in Xylol wurde die Färbung beendet. Anschließend wurde eine Eindeckung des gefärbten Glasobjektträgers mit einer Harz-beschichteten Kunststoffolie mit Xylol als Flüssigkeitsmedium (Tissue-Tek Film® Sakura®) durchgeführt.

### 3.6.2 Immunhistochemische Färbung

Mittels der immunhistochemischen Färbung, welche auf dem hochspezifischen Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion beruht, können mehrheitlich Oberflächenantigene wie CD-Antigene visuell nachgewiesen werden. Die immunhistochemischen Färbungen erfolgten mittels eines vollautomatischen Färbesystems (BenchmarkXT, IHC Slide Stainer, Roche, Basel, Switzerland). Bei der Durchführung der immunhistochemischen Ki-67-Färbung wurden die Präparate erst mit Xylol vorbehandelt und dann mit einer absteigenden Ethanolreihe (100 %, 100 %, 96 %, 70 %) deparaffiniert. Nach der standardisierten Zellkonditionierung (95 °C für 8 min) erfolgte eine weitere milde und längere Konditionierung (30 min). Die Schnitte wurden mit einem unkonjugierten Primärantikörper (CONFIRM™ anti-Ki-67 (30-9), Rabbit Monoclonal Primary Antibody, Katalog-Nr. 790-4286, Roche Ventana Medical Solutions, Basel, Switzerland) und einem Sekundärantikörper (I-View BIOTIN Ig, Roche Ventana Medical Solutions, Basel, Switzerland) inkubiert. Der Primärantikörper bindet an das nachzuweisende Antigen, der Sekundärantikörper bindet sowohl an den Primärantikörper als auch an einen Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex. Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (I-VIEW SA-HRP, Roche, Basel, Switzerland) mit DAB-Substrat (DAKO Denmark, Glostrup, Denmark) bedingt den braunen Farbumschlag. Die braune Färbung der Ki-67-positiven Zellkerne ist dann unter dem Lichtmikroskop zu erkennen. Zur Vermeidung von Hintergrundfärbungen wurde die endogene Peroxidase mit Wasserstoffperoxid unterdrückt. Mit Hämatoxylin (nach Harris, Surgipath, Richmond, Illinois, USA) wurde gegengefärbt.

Abbildung 7 zeigt exemplarisch eine Synovialisprobe mit high-grade Synovialitis in HE-Färbung bzw. mit Ki-67-Reaktion.

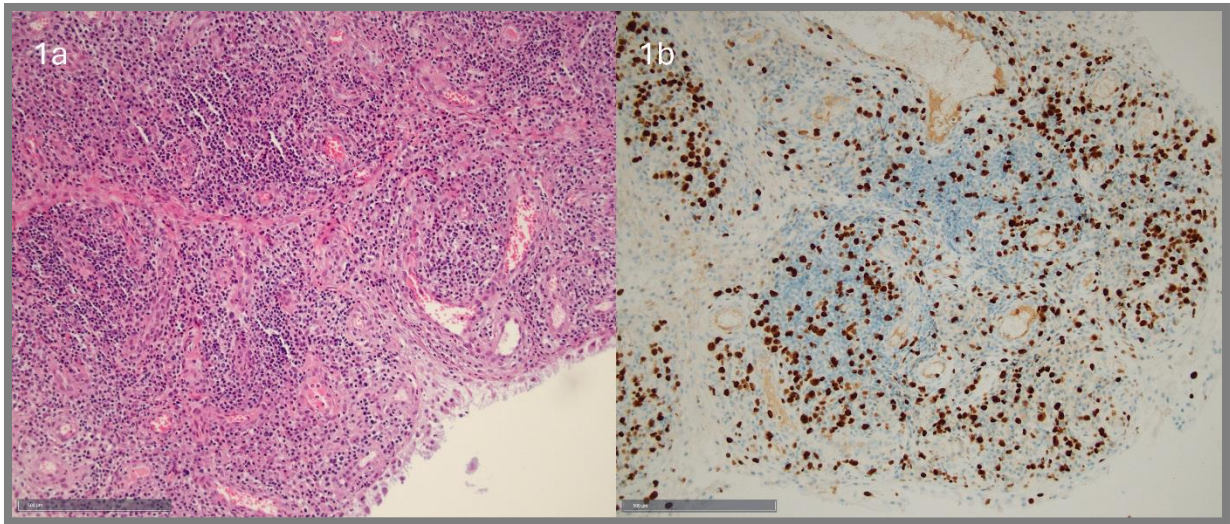


Abbildung 7: high-grade Synovialitis, etwa 100fache Originalvergrößerung, HE (1a), Ki-67 (1b). Eigene Darstellung.

Die Qualität der immunhistochemischen Färbungen wurde durch onslide-Kontrollen und ein hausinternes digitales, maskenbasiertes Kontrollsystem gemäß den Akkreditierungs-Erfordernissen gewährleistet.

### 3.7 Anwendung des Synovialitis-Scores und der klinischen Einteilung

Untersucht wurden Synovialisproben von Patienten mit chronischer Synovialitis nach Ausschluss einer akuten Infektion. Die vorliegenden Fälle wurden nach dem Synovialitis-Score nach Krenn et al. in high- und low-grade Synovialitiden eingeteilt. Der Synovialitis-Score nach Krenn et al. ist ein international anerkannter semiquantitativer Score zur histologischen Diagnostik von Synovialitiden. Er bietet ein standardisiertes Verfahren zur Bewertung der Entzündungsaktivität und erfordert dafür keine spezialisierten Techniken oder komplexen Auswertungen. Seine Eignung für die Anwendung in der Routinediagnostik ergibt sich zudem aus der hohen Intra- und Interobserverreproduzierbarkeit (Krenn et al. 2006) und der hohen Korrelation mit klinischen Scores der Krankheitsaktivität (Schmidt et al. 2019). Daneben erfolgte die Einteilung nach der klinischen Angabe in therapierefraktäre Synovialitiden bei rheumatoider Arthritis, nicht-therapierefraktäre Synovialitiden bei rheumatoider Arthritis und Osteoarthritis. Im Folgenden werden die untersuchten Synovialitis-Typen näher erläutert.

Therapierefraktäre high-grade Synovialitis: Bei der high-grade Synovialitis handelt es sich um eine Synovialitis mit einem SC von  $\geq 5/9$  (Krenn et al. 2005; Najm et al. 2019). Zur Festlegung der Therapierefraktärität wurden die klinischen Angaben herangezogen. Diese variierten zwischen den Angaben „rebellisches Gelenk“, „Therapierefraktärität“ und „therapierefraktäre/therapieresistente Synovialitis/Arthritis“.

Nicht-therapierefraktäre high-grade Synovialitis: Dieser Begriff beschreibt im Zusammenhang dieser Studie eine Synovialitis mit einem SC von  $\geq 5/9$  (Krenn et al. 2005; Najm et al. 2019) ohne die klinische Angabe einer Therapierefraktärität.

Low-grade Synovialitis bei Osteoarthritis: Hierbei handelt es sich um Synovialitiden nicht rheumatischer Genese mit einem SC von  $< 5/9$  (Krenn et al. 2005; Najm et al. 2019).

### **3.8 Quantitätsbestimmung von Ki-67-positiven Zellen**

Um das Ausmaß der Entzündung zu beurteilen können, wurden proliferierende Zellen (Stromazellen, Lymphozyten, weitere Leukozyten) immunhistochemisch mit Ki-67 als braune Pigmente sichtbar gemacht und quantitativ bestimmt (Pessler et al. 2008b). Die immunhistochemischen Präparate wurden nach dem Prinzip des Worst Area-Gradings (Krenn et al. 2006) mit dem Leica DM 2500 Mikroskop begutachtet. Das Prinzip des Worst Area-Gradings besteht darin, am Präparat den Bildausschnitt mit der größten Dichte immunhistochemisch reagierender Zellen auszuwählen und mit einer vorher definierten mikroskopischen Vergrößerung (etwa 200fach) auf den Computerbildschirm zu übertragen (Krenn et al. 2006). Bei der Auswahl des Bildausschnittes wird dabei auf eine möglichst vollständige Ausfüllung des betrachteten Feldes durch repräsentatives Synovialisgewebe (synoviale Oberfläche mit darunter liegendem Stroma) geachtet (Diaz-Torne et al. 2007). Am Computer wurden dann zwei Quantifizierungsmethoden miteinander verglichen: Zunächst erfolgte die visuelle Auszählung/Quantifizierung nach Augenmaß. Anschließend wurde die Analyse durch die KI-Software MindPeak Breast Ki-67 durchgeführt.

Abbildung 8 zeigt den digitalisierten Bildausschnitt einer high-grade Synovialitis in HE-Färbung nach Identifizierung der Worst Area unter dem Lichtmikroskop.



Abbildung 8: high-grade Synovialitis, etwa 200fache Originalvergrößerung, HE, digitalisierter Bildausschnitt. Eigene Darstellung.

### 3.8.1 Visuelle computergestützte Ki-67-Quantifizierung

Der mikroskopische Bildausschnitt (Leica DM2500 LED, Format: 2028 x 1536 Pixel) wurde mittels PathoZoom Scan & LiveView (Version 3.0.2.0 © 2019 by Smart In Media) digitalisiert, um die spätere Auswertung durch KI zu ermöglichen und denselben Ausschnitt für beide Verfahren festzulegen. Nach elektronischer Umwandlung in eine rechteckige Fläche von ca. 595 x 447 µm (Originalgröße) wurden zunächst alle Zellen in dem HPF ausgezählt, anschließend auf derselben Fläche alle Ki-67-positiven Zellen ausgezählt. Die Gesamtzellzahl wurde als Zellzahl/HPF (etwa 200fache Vergrößerung) ausgegeben. Anschließend wurde der prozentuale Anteil der Ki-67-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl berechnet. Die Auswahl einer 200fachen Vergrößerung basierte auf einer Publikation von Cai et al. 2021, welche beim Abgleich von Ergebnissen der Ki-67-Quantifikation unter Verwendung eines AAM unter 200facher Vergrößerung eine bessere Intraobserverreliabilität (ICC = 0,87) erreichte, als unter 400facher Vergrößerung (ICC = 0,79). Zur internen Qualitätskontrolle erfolgte an zehn Fällen die Auszählung durch einen zweiten Untersucher und die Ergebnisse wurden miteinander verglichen.

### 3.8.2 KI-gestützte Ki-67-Quantifizierung

Bei der in dieser Arbeit verwendeten künstlichen Intelligenz-Software MindPeak Breast Ki-67 Rol handelt es sich um ein Unterstützungsverfahren zur Quantifizierung immunhistochemisch angefärbter Zellen anhand digitaler histopathologischer Bilder von Gewebeproben des menschlichen invasiven Mammakarzinoms (Mindpeak Solutions/ Mindpeak Breast Ki-67 Rol).

Alle in der Literatur beschriebenen Ki-67-Analysen dieser KI wurden bislang an Tumorgewebe durchgeführt (Abele et al. 2023). Zur Analyse von nicht tumorösen Geweben, wie in diesem Fall entzündlichen Geweben wie bei der Synovialitis, wird das Programm nicht angewendet. Zudem ist das Programm bisher lediglich für die Forschung und nicht für die Diagnostik zugelassen (Mindpeak Solutions/ Mindpeak Breast Ki-67 Rol). Somit stand im Vordergrund für die Anwendung in dieser Studie die Adaptation auf entzündliche gewebliche Veränderungen, welche im Wesentlichen eine Quantifizierung sämtlicher Populationen im synovialen Gewebe zu berücksichtigen hat.

In dieser Studie wurde der von der KI vorgeschlagene Schwellenwert für die Wertung einer Zelle als Ki-67-positiv nicht verändert und gleichermaßen für jeden einzelnen Fall angewendet. Da es sich bei der verwendeten Software (Mindpeak Breast Ki-67 Rol) um eine spezifisch auf die Analyse von Mammakarzinomen ausgelegte KI handelt, erfolgten zur Anpassung an das untersuchte Gewebe (Synovialis) zwei weitere Arbeitsschritte:

1. Zunächst erfolgte an jedem Fall eine visuell basierte Kontrolle dahingehend, ob die Ki-67-positiven Zellkerne durch die KI ebenfalls als positiv erkannt wurden. Über eine Anpassung des Schwellenwertes könnten auch primär nicht als positiv bewertete (da von der KI nicht als „Tumorzellen“ erkannte) Zellen im Nachhinein für die KI als positiv erkennbar gemacht werden. Diese Maßnahme war jedoch nicht notwendig, da stets alle visuell als positiv bewerteten Zellen auch von der KI als solche ausgegeben wurden. Die ursprüngliche auf das Mammakarzinom ausgelegte Datenausgabe durch Mindpeak Breast Ki-67 Rol erfolgte standardmäßig, und so auch in dieser Studie, in folgendem Format (s. Abbildung 9):
  - Proliferationscore (Prozentualer Anteil Ki-67-positiver Zellen an allen „Tumorzellen“, %)
  - Anzahl positiver „Tumorzellen“
  - Anzahl negativer „Tumorzellen“
  - Gesamtzahl „nicht-Tumorzellen“

Im Kontext dieser Studie wurden nicht-neoplastische Gewebe untersucht. Krenn et al. 2006 haben gezeigt, dass die Proliferationsrate aller in der Synovialis zu findenden Zellpopulationen insgesamt ein Substrat für das Maß der Entzündungsaktivität ist. Zudem wurde von Mehta et al. 2023 die Gesamtzelldichte als guter Parameter für die Diskriminierung von OA und RA etabliert. Die von der KI als „Tumorzellen“ und die als „nicht-Tumorzellen“ gewerteten Zellen konnten demnach für die Zwecke dieser Untersuchungen zu einer Gesamtzellzahl addiert werden.

2. Nach Überführen dieser gewonnenen Daten in eine Excel-Tabelle (Microsoft® Excel® 2021 MSO (Version 2401 Build 16.0.17231.20236) 32 Bit) wurde die Gesamtzellzahl

ermittelt und der prozentuale Anteil Ki-67-positiver Zellen errechnet. Zu den so ausgezählten Zellen zählten sowohl Leukozyten als auch proliferierende Stromazellen.

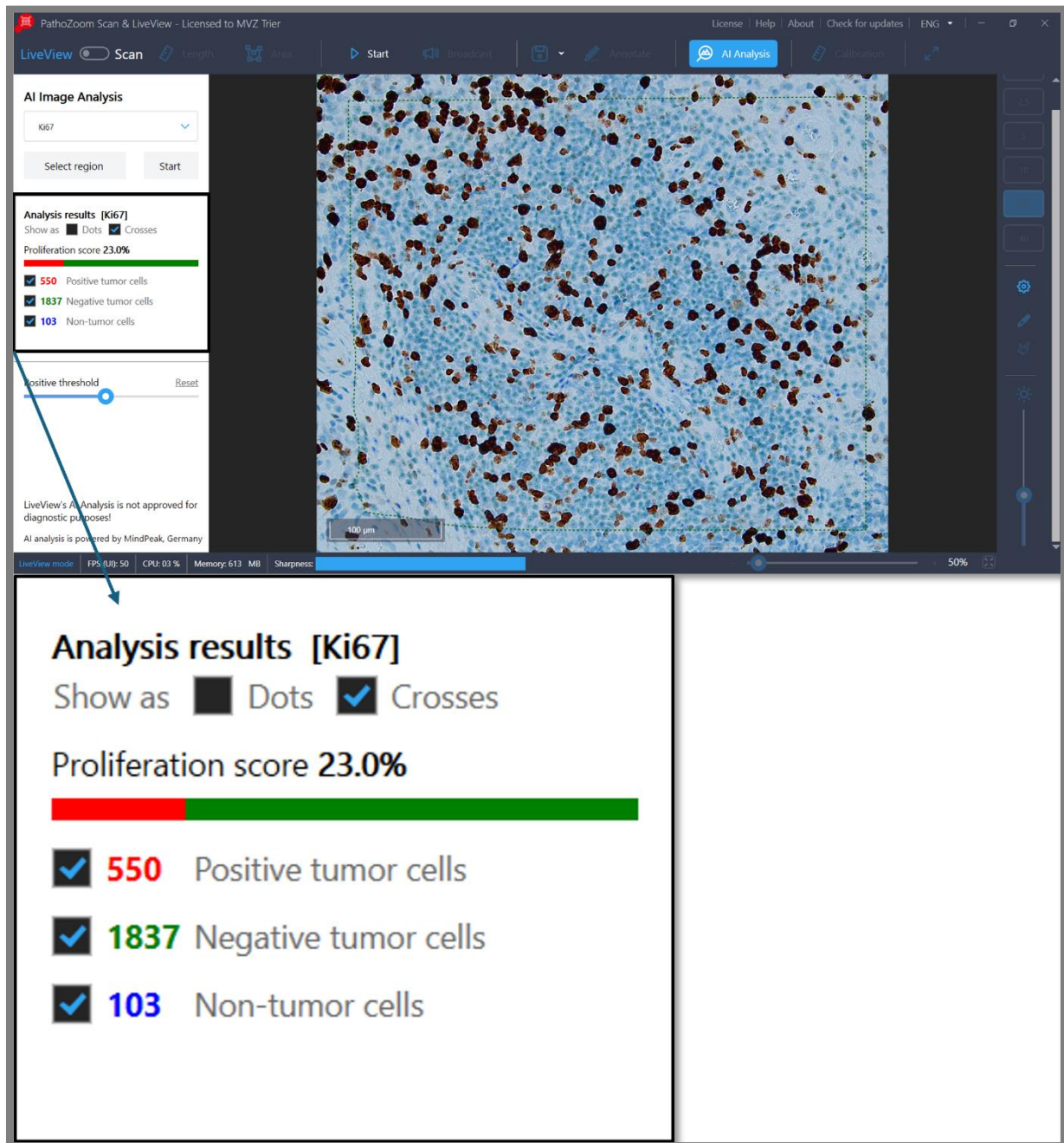


Abbildung 9: high-grade Synovialitis, etwa 200fache Originalvergrößerung, Ki-67 - KI-basierte Analyse. Eigene Darstellung.

### 3.8.3 Exemplarische Zeiterfassung

Die Auswirkung der Anwendung einer KI auf den Work Load wurde exemplarisch mittels einer Erfassung der Auswertungszeit mit und ohne KI anhand von je fünf high-grade und low-grade Synovialitiden ermittelt. Nach Auswahl eines repräsentativen Bildausschnittes (Leica DM2500 LED, Format: 2028 x 1536 Pixel) wurde dieser mit PathoZoom Scan & LiveView (Version

3.0.2.0 © 2019 by Smart In Media) digitalisiert und der gesamte Ausschnitt von einem Auswerter für die KI-Auswertung ausgewählt. Anschließend erfolgte die Auszählung der Ki-67-positiven Zellen sowie der Gesamtzellzahl durch die KI. Dabei wurde die benötigte Zeit vom Start der Auszählung bis zur Ausgabe der Ergebnisse in der in Kapitel 3.8.2 (1) dargestellten Form von einem zweiten Auswerter gestoppt. An demselben Bildausschnitt wurden dann vom ersten Auswerter mittels mäandernder Zählung die Ki-67-positiven Zellen ausgezählt. Die Zeit wurde dabei wiederum vom zweiten Auswerter gestoppt. Dabei wurde die Punktion der Ki-67-positiven und K-67-negativen „Tumorzellen“ durch die KI beibehalten.

Die Evaluation der erfassten Zeitersparnis erfolgte dann durch den statistischen Vergleich der Mittelwerte in folgender Form:

1. Vergleich der mittleren Auswertungsgeschwindigkeit von KI mit visueller Auszählung bei high-grade Synovialitiden.
2. Vergleich der mittleren Auswertungsgeschwindigkeit von KI mit visueller Auszählung bei low-grade Synovialitiden.

### **3.9 Anmerkung zu den Originalbildvergrößerungen**

Durch die Verarbeitung der Bilder kann es bei den angebenen Originalvergrößerungen zu einer geringfügigen Abweichung der Endvergrößerung kommen.

### **3.10 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Daten und die grafische Darstellung wurden mithilfe der statistischen Software IBM SPSS Statistics (© IBM Corporation 1989, 2020; Version 27.0.0) durchgeführt.

### **3.11 Ethikvotum**

Diese Arbeit beinhaltet keine Studien an Menschen oder Tieren. Unter der Bearbeitungsnummer 2023-14147 liegt ein positives Votum der Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz vor, mit dem Hinweis, dass keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken bestehen.

## **4 Ergebnisse**

Dieses Kapitel umfasst die Darstellung der erhobenen Ergebnisse. In jedem Unterkapitel wird zunächst auf die Ergebnisse der Ki-67-Analysen, dann auf die Gesamtzellzahl und abschließend auf die nur exemplarisch erfasste Zeitersparnis bzw. Work Load-Reduktion durch die Anwendung der KI eingegangen.

## 4.1 Deskriptive Statistik

### 4.1.1 Anteil Ki-67-positiver Zellen

Der mittels KI-basierter Analyse erfasste prozentuale Anteil Ki-67-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl bei therapierefraktärer rheumatoider Arthritis, high-grade, ergab einen Mittelwert von 19,4 % und einen Median von 17,77 %, bei einem minimalen Anteil von 7,45 % und einem maximalen Anteil von 47,56 %. Nicht-therapierefraktäre rheumatoide Arthritiden, high-grade, zeigten einen Mittelwert von 21,53 % und einen Median von 19,93 %, bei einem minimalen Anteil von 6,22 % und einem maximalen Anteil von 80,48 %. Die Kontrollgruppe der Osteoarthritis, low-grade, wies einen Mittelwert von 4,17 % und einen Median von 3,38 % auf, darunter minimal 0,3 % und maximal 17,36 %. Tabelle 5 zeigt zusammengefasst die Ergebnisse der deskriptiven statistischen Analyse der Ki-67-Positivität.

### Deskriptive Statistik Ki-67-Positivität

Gruppe		Statistik	Standardfehler		
Ki-67 in Prozent	therapierefraktär high-grade	Mittelwert	19,4032	1,82407	
		95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	15,6203	
			Obergrenze	23,1861	
		Median	17,7737		
		Minimum	7,45		
		Maximum	47,56		
		nicht-therapierefraktär high-grade	Mittelwert	21,5253	2,21865
95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze		17,0212		
	Obergrenze		26,0294		
Median	19,9298				
Minimum	6,22				
Maximum	80,49				
Osteoarthritis low-grade	Mittelwert	4,1666	0,82904		
	95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	2,4425		

	Obergrenze	5,8907	
	Median	3,3845	
	Minimum	,30	
	Maximum	17,36	

Tabelle 5: Deskriptive Statistik – Ki-67-Positivität in %; gekürzte Tabelle, vollständige Tabelle s. Anhang. Eigene Darstellung.

Die folgenden Abbildungen (Abbildung 10, Abbildung 11, Abbildung 12) zeigen je zwei exemplarische Fälle der drei untersuchten Gruppen (therapierefraktäre rheumatoide Synovialitis, nicht-therapierefraktäre rheumatoide Synovialitis und Osteoarthritis) in HE-Färbung und mit Ki-67-Reaktion.

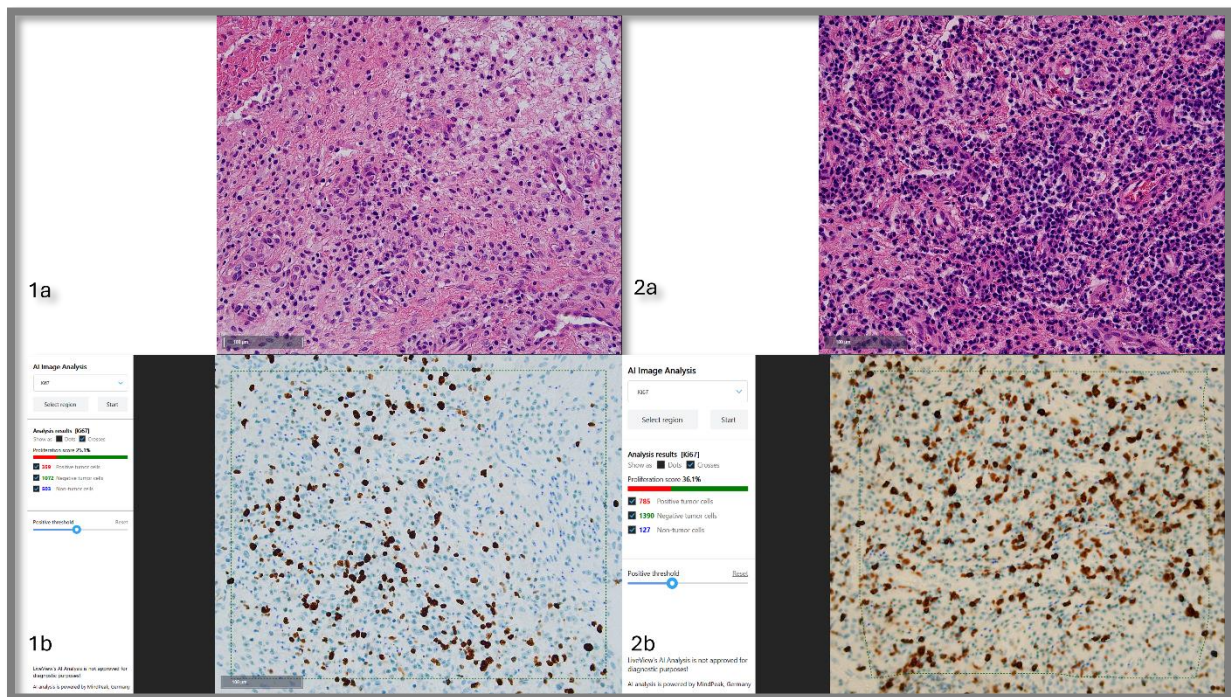


Abbildung 10: therapierefraktäre rheumatoide Arthritis, high-grade, etwa 200fache Originalvergrößerung. HE (1a, 2a), Ki-67 mit KI-basierter Analyse (1b, 2b). Eigene Darstellung.

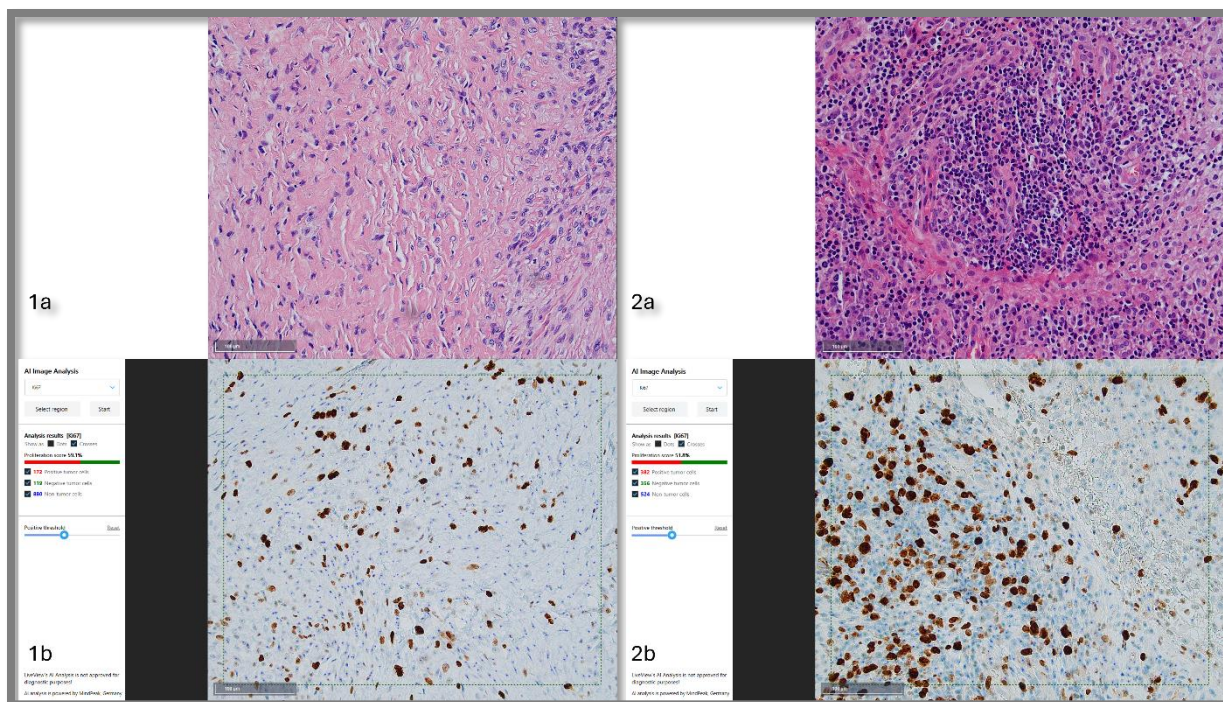


Abbildung 11: nicht-therapierefraktäre rheumatoide Arthritis, high-grade, etwa 200fache Originalvergrößerung. HE (1a, 2a), Ki-67 mit KI-basierter Analyse (1b, 2b). Eigene Darstellung.

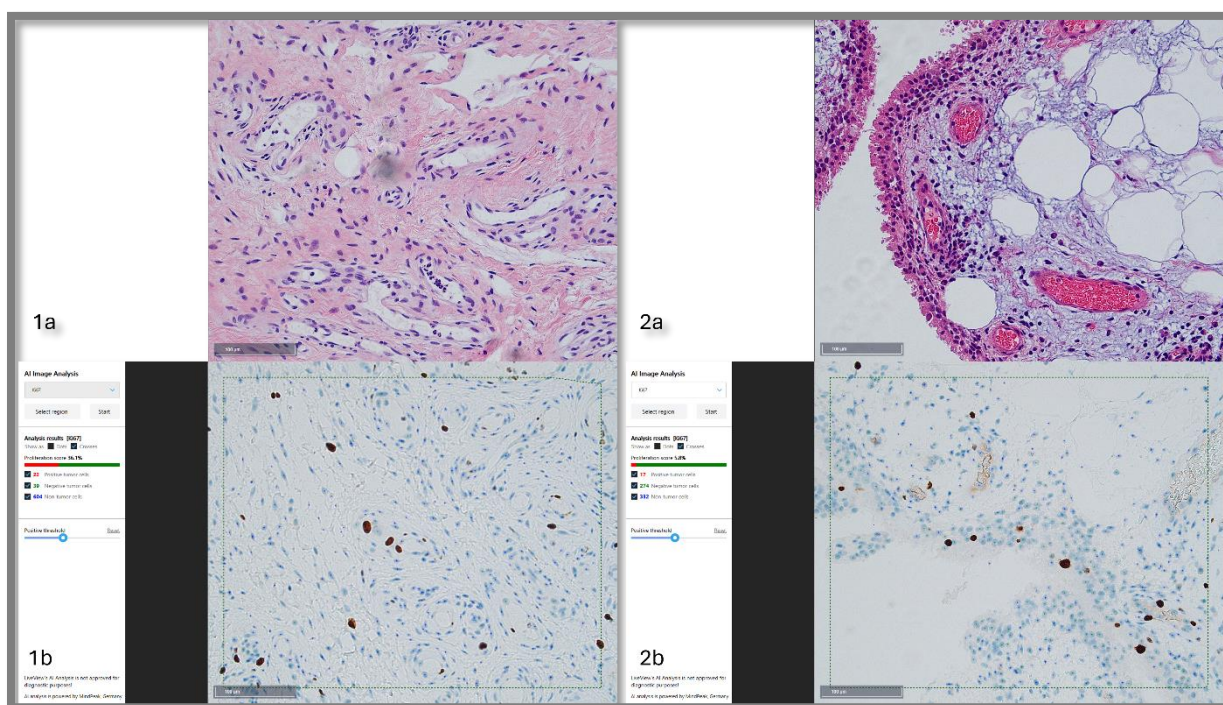


Abbildung 12: Osteoarthritis, low-grade, etwa 200fache Originalvergrößerung. HE (1a, 2a), Ki-67 mit KI-basierter Analyse (1b, 2b). Eigene Darstellung.

#### 4.1.2 Gesamtzellzahl

Zunächst erfolgte die Auszählung der Gesamtzellzahl pro untersuchtem HPF. Für die therapierefraktäre rheumatoide Arthritis, high-grade, ergab sich ein Mittelwert von 2293,13 Zellen/HPF mit Median von 2097 Zellen/HPF (zwischen 399 und 4977 Zellen /HPF). Die nicht-therapierefraktäre rheumatoide Arthritis, high-grade, wies einen Mittelwert von 1445,64 Zellen/HPF und einen Median von 1256,5 Zellen/HPF (zwischen 504 und 3307 Zellen/HPF) auf. Für die Kontrollgruppe der Osteoarthritis, low-grade, konnte ein Mittelwert von 1313 Zellen/HPF und ein Median von 1256,5 Zellen/HPF (zwischen 432 und 2389 Zellen/HPF) ermittelt werden. Tabelle 6 zeigt zusammengefasst die Ergebnisse der deskriptiven statistischen Analyse der Gesamtzellzahl.

#### Deskriptive Statistik Gesamtzellzahl

Gruppe		Statistik	Standardfehler		
Gesamtzellzahl/HPF	therapierefraktär high-grade	Mittelwert	2293,13	253,210	
		95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	1768,01	
			Obergrenze	2818,26	
		Median	2097,00		
		Minimum	399		
		Maximum	4977		
nicht-therapierefraktär high-grade	Osteoarthritis low-grade	Mittelwert	1445,64	123,726	
		95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	1194,46	
			Obergrenze	1696,82	
		Median	1256,50		
		Minimum	504		
		Maximum	3307		
		Mittelwert	1313,00	129,902	
		95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	1042,85	
			Obergrenze	1583,15	
		Median	1256,50		
		Minimum	432		
		Maximum	2389		

Tabelle 6: Deskriptive Statistik - Gesamtzellzahl/HPF; gekürzte Tabelle, vollständige Tabelle s. Anhang. Eigene Darstellung.

#### 4.1.3 Reduktion des Work Load

Die Reduktion des Work Load, d.h. die Zeitersparnis im diagnostischen Alltag durch Anwendung einer KI, wurde in Bezug auf die Ki-67-Quantifizierung exemplarisch anhand von je fünf high- und low-grade Synovialitisfällen erfasst. Dabei wurde zunächst mithilfe der KI die

Proliferationsfraktion quantifiziert und die dafür benötigte Zeit gestoppt. Anschließend wurde mittels mäandernder Auszählung dasselbe HPF ohne KI-Unterstützung ausgezählt und die dafür benötigte Zeit gestoppt. Zu beachten sei hierbei, dass das Definieren des auszuzählenden Feldes sowohl für die KI als auch für die visuelle Auszählung zum Zwecke der Vereinfachung der Datenerhebung nicht in den erfassten Zeitaufwand miteinbezogen wurde. Zudem wurde die visuelle Auszählung erleichtert, indem die von der KI durchgeführte Punktung der als Ki-67-positiv gewerteten Zellen für die Auszählung beibehalten wurde.

Der größte Zeitunterschied zeigte sich in der Gruppe der high-grade Synovialitiden mit einer Zeitersparnis durch KI-Unterstützung von im Mittel 79,6 Sekunden (s), mit einem Median von 75,2 s, einem Minimum von 61,1 s und einem Maximum von 114,2 s. Die folgende Tabelle 7 beinhaltet die zusammenfassende deskriptive statistische Erfassung der Zeitmessungen bei high-grade Synovialitis.

	Zeitdifferenz in s	Zeit visuell in s	Zeit mit KI in s
N	5	5	5
Mittelwert	79,6000	84,280	4,680
Median	75,2000	80,000	4,700
Minimum	61,10	65,8	4,5
Maximum	114,20	119,0	4,8

Tabelle 7: Zeiterfassung - therapierefraktäre high-grade Synovialitis; gekürzte Tabelle (vollständige Tabelle s. Anhang). Eigene Darstellung.

Bei der low-grade Synovialitis konnte im Mittel ebenfalls eine Zeitersparnis festgestellt werden, in dieser Gruppe von 3,8 s, mit einem Median von 3,4 s und einem Maximum von 9,3 s. Lediglich in einem Fall mit einer Ki-67-Fraktion von 1,3 % war die visuelle Auszählung um 0,8 s schneller (Minimum -0,8 s). Die folgende Tabelle 8 beinhaltet die zusammenfassende deskriptive statistische Erfassung der Zeitmessungen bei low-grade Synovialitis.

	Zeitdifferenz in s	Zeit visuell in s	Zeit mit KI in s
N	5	5	5
Mittelwert	3,8200	8,300	4,480
Median	3,4000	8,600	4,300
Minimum	-,80	3,6	4,2
Maximum	9,30	13,5	5,2

Tabelle 8: Zeiterfassung - low-grade Osteoarthritis; gekürzte Tabelle (vollständige Tabelle s. Anhang). Eigene Darstellung.

In Abbildung 13 wird der erfasste Zeitaufwand für die visuelle Ki-67-Auszählung der KI-unterstützten Auszählung, aufgeteilt nach high- und low-grade Synovialitis, in einem Boxplot-Diagramm gegenübergestellt.

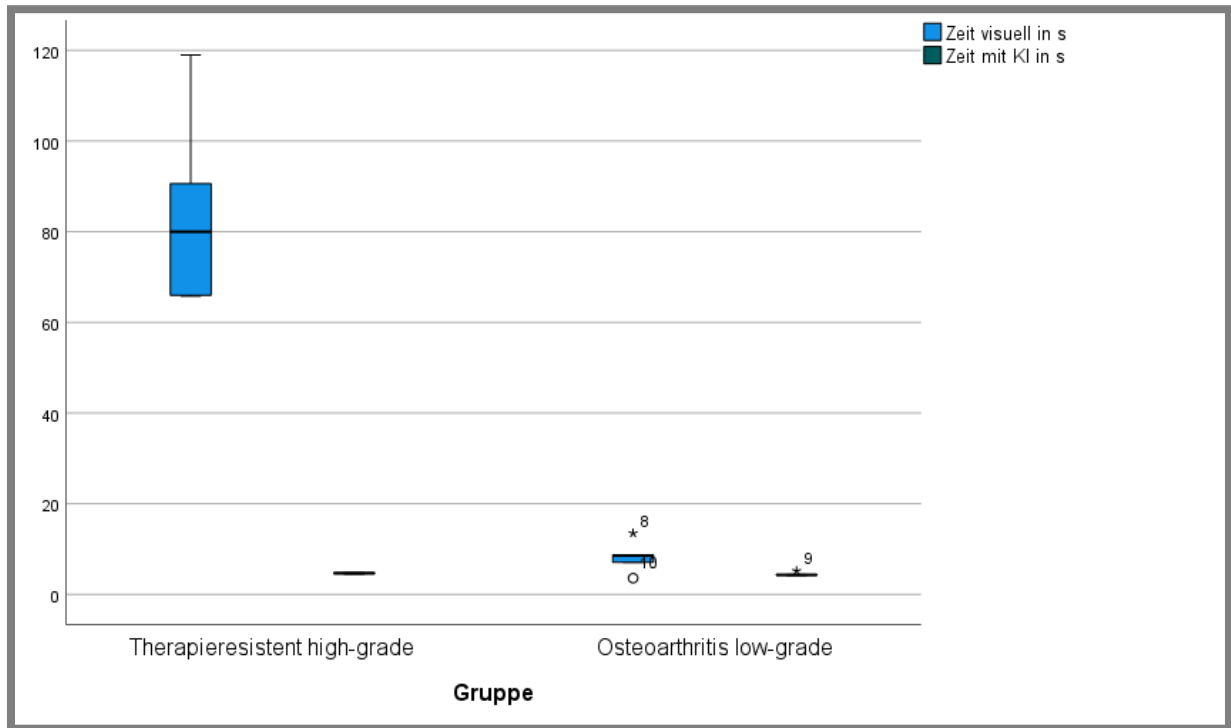


Abbildung 13: Vergleich Zeitaufwand mit KI vs visuell nach Gruppen. Eigene Darstellung.

Abbildung 14 visualisiert das Ausmaß der Zeitersparnis durch KI bei high-grade und low-grade Synovialitis in einem Boxplot-Diagramm. Dabei ist eine erhebliche Zeitersparnis insbesondere bei der Auswertung der Proliferationsfraktion bei high-grade Synovialitiden festzustellen ( $p = 0,001$ ).

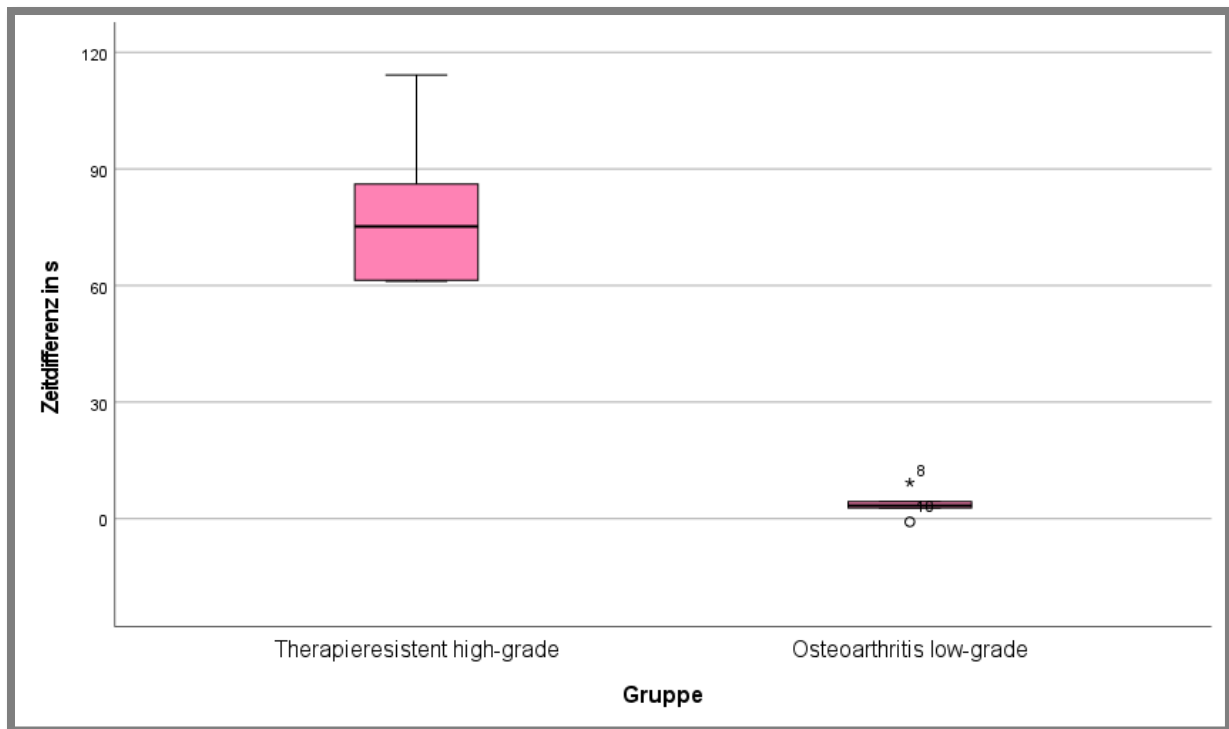


Abbildung 14: Zeitersparnis durch KI bei high-grade vs low-grade Synovialitis. Eigene Darstellung.

## 4.2 Analytische Statistik

### 4.2.1 Tests auf Normalverteilung

Die ermittelten Daten wurden zunächst auf Normalverteilung getestet. Die prozentuale Ki-67-Positivität war gemäß dem Shapiro-Wilk-Test in keiner der Gruppen normalverteilt,  $p < 0,05$ . Gesamtzellzahl/HPF war gemäß dem Shapiro-Wilk-Test in den Gruppen der therapierefraktären high-grade Synovialitis sowie der low-grade Osteoarthritis normalverteilt, in der Gruppe der nicht-therapierefraktären high-grade Synovialitis hingegen nicht,  $p < 0,05$ . Die grafische Darstellung der Datenverteilung erfolgte mittels trendbereinigtem Q-Q-Diagramm (Abbildung 15, Abbildung 16, Abbildung 17, Abbildung 18, Abbildung 19, Abbildung 20). Aufgrund dieser Datenverteilung wurde für die weitere Statistik auf nicht-parametrische Tests zurückgegriffen.

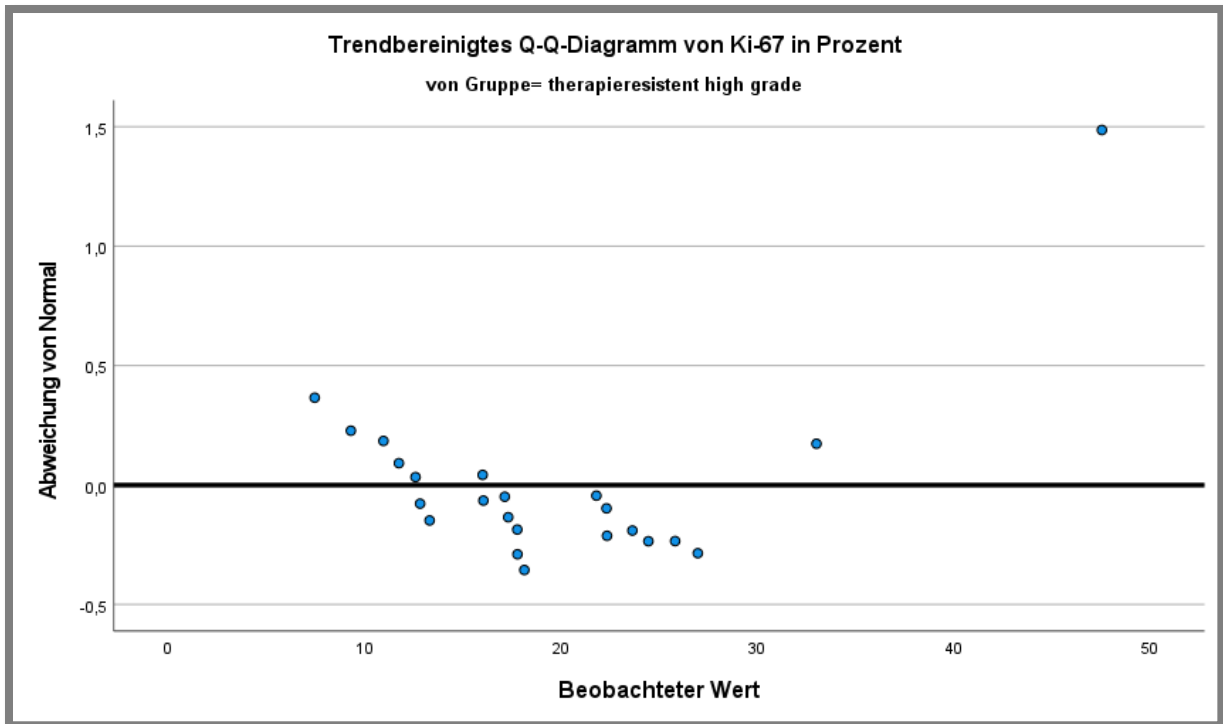


Abbildung 15: Prüfung auf Normalverteilung der Ki-67-Positivität bei therapierefraktärer high-grade Synovialitis. Eigene Darstellung.

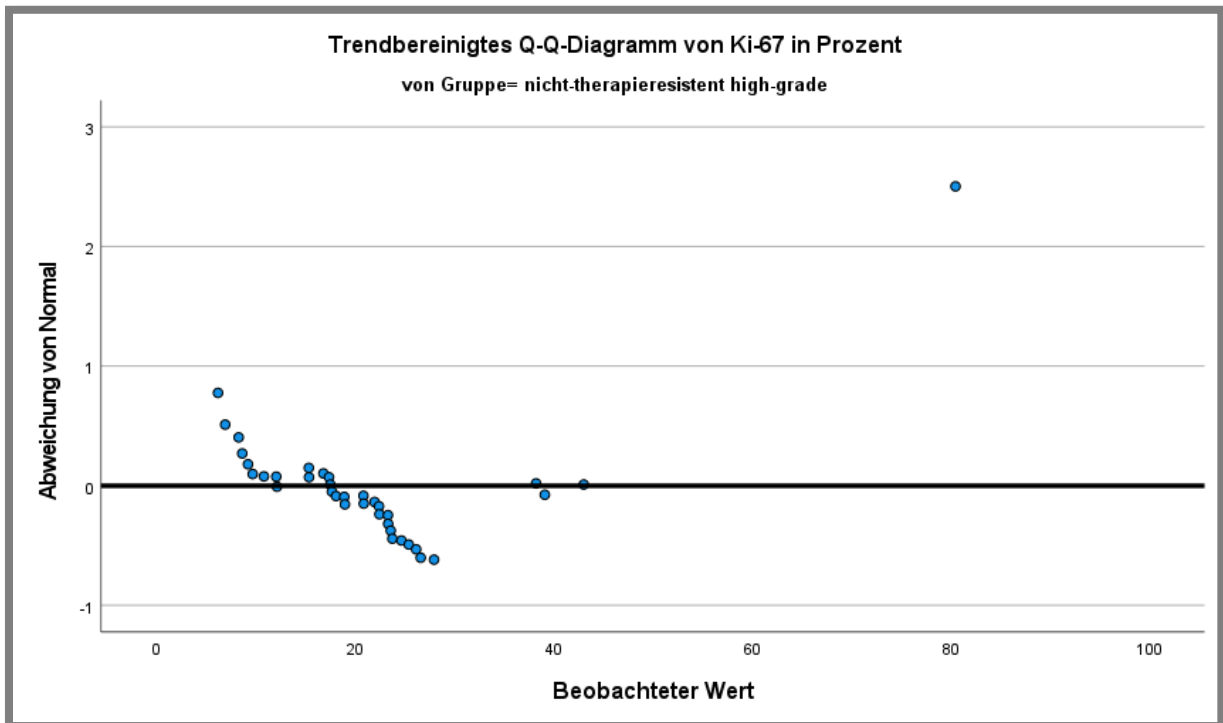


Abbildung 16: Prüfung auf Normalverteilung der Ki-67-Positivität bei nicht-therapierefraktärer high-grade Synovialitis. Eigene Darstellung.

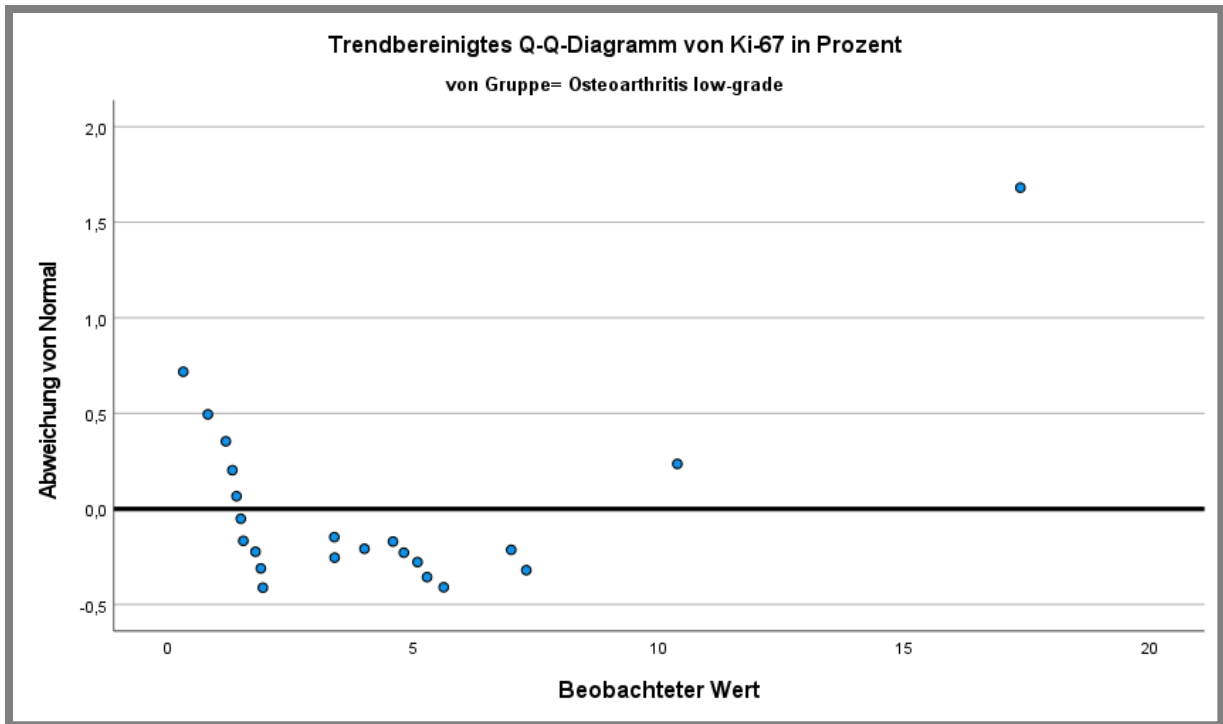


Abbildung 17: Prüfung auf Normalverteilung der Ki-67-Positivität bei low-grade Osteoarthritis. Eigene Darstellung.

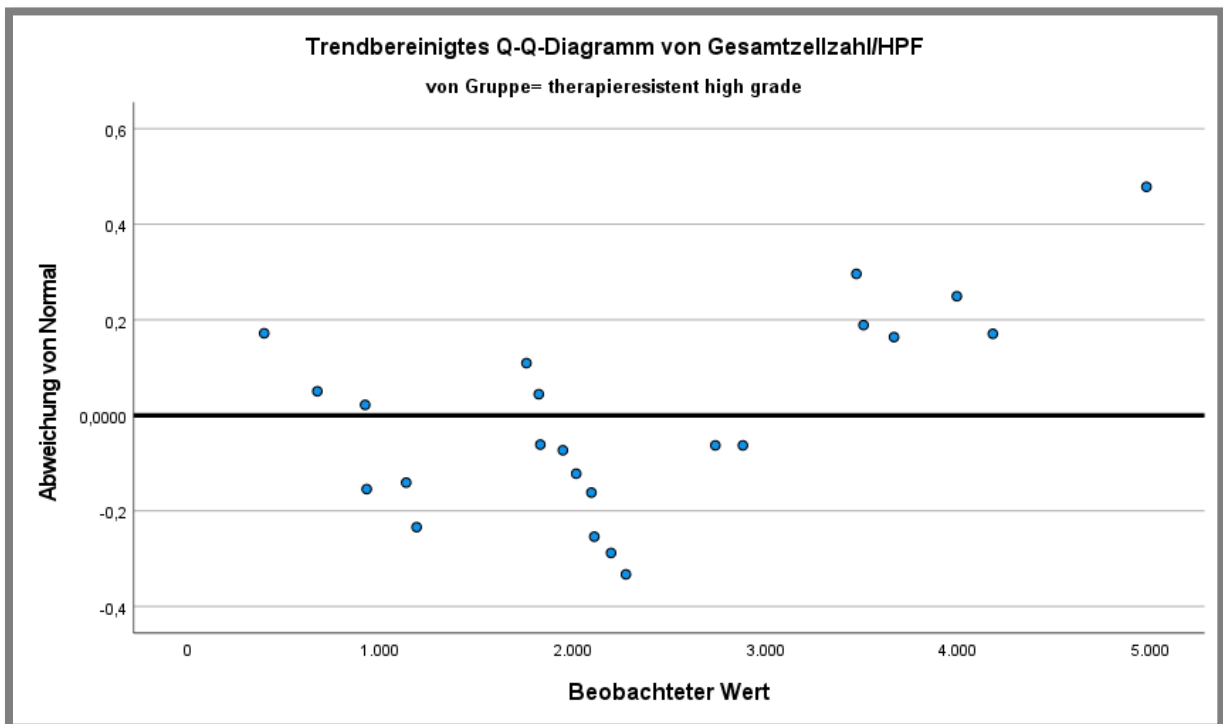


Abbildung 18: Prüfung auf Normalverteilung der Gesamtzellzahl/HPF bei therapieresistenter high-grade Synovialitis. Eigene Darstellung.

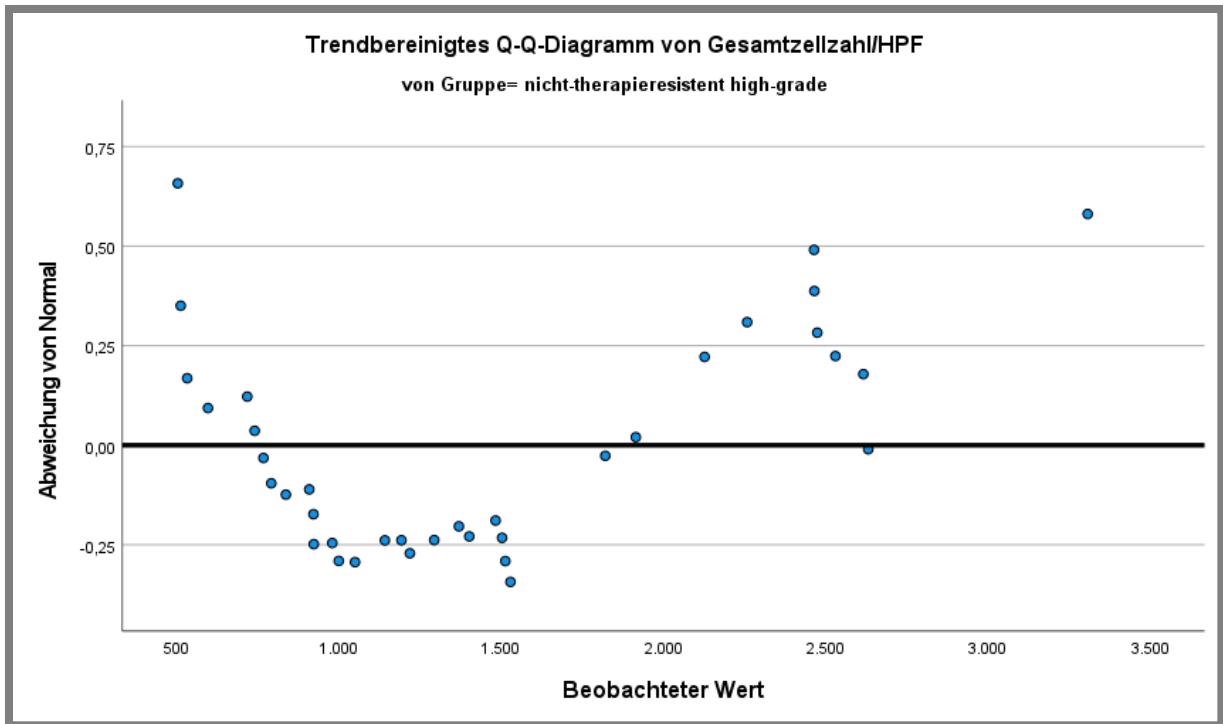


Abbildung 19: Prüfung auf Normalverteilung der Gesamtzellzahl/HPF bei nicht-therapieresistenter high-grade Synovialitis. Eigene Darstellung.

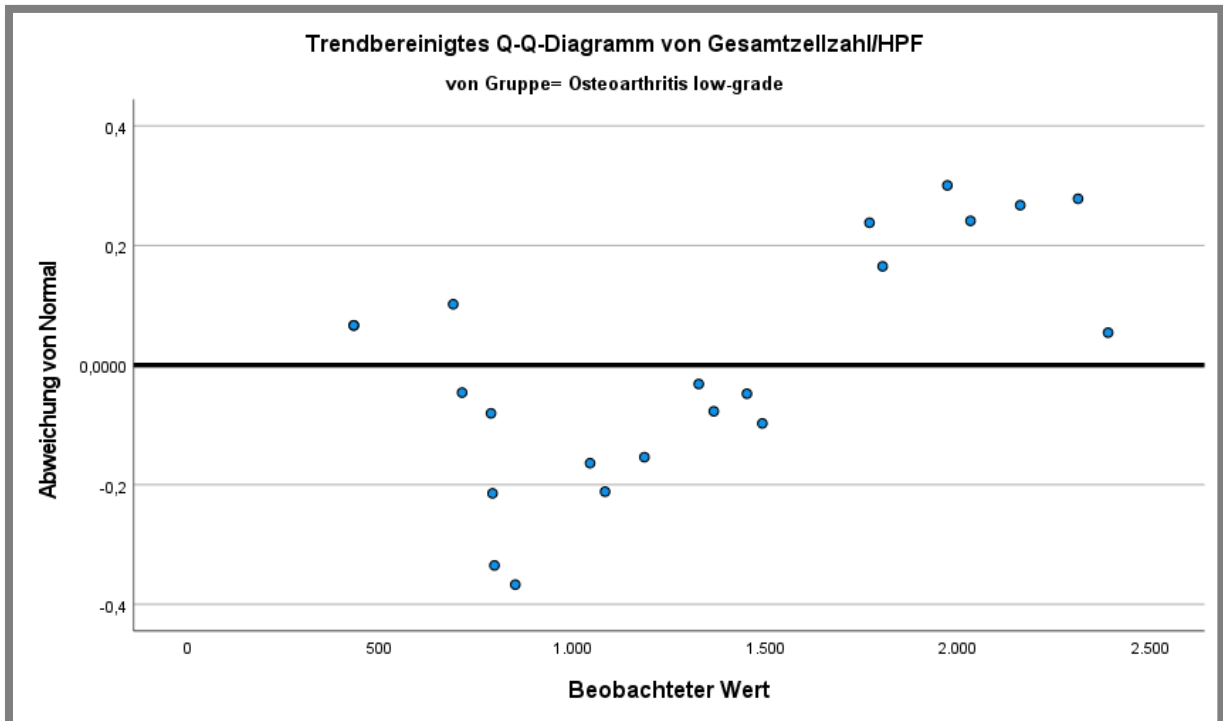


Abbildung 20: Prüfung auf Normalverteilung der Gesamtzellzahl/HPF bei low-grade Osteoarthritis. Eigene Darstellung.

#### 4.2.2 Signifikanzprüfung

Aufgrund der nicht-Normalverteilung der Daten in mehreren Gruppen wurden für die statistische Analyse nicht parametrische Tests ausgewählt. Mit dem Kruskal-Wallis-Test oder der Rangvarianzanalyse nach Kruskal-Wallis wird im Rahmen einer Varianzanalyse getestet, ob sich unabhängige Stichproben im Hinblick auf eine ordinalskalierte Variable unterscheiden (Kruskal und Wallis 1952). Die aufgestellte Nullhypothese „Die Verteilung von Ki-67 in Prozent bzw. Gesamtzellzahl/HPF ist über die Kategorien von Gruppe identisch.“ kann dann mit einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  angenommen oder abgelehnt werden. Zur Klärung der Frage, welche Gruppen sich voneinander unterscheiden, wurde als post-hoc-Analyse der Dunn-Bonferroni-Test verwendet. Mit diesem wird nach dem paarweisen Vergleich aller Gruppen gegeneinander bei einer größeren Anzahl an zu vergleichenden Mittelwert-Paaren das Alpha-Level angepasst, um die Wahrscheinlichkeit einen Fehler 1. Art zu begehen zu verringern (Problem der Mehrfachvergleiche) (Dunn 1961; Bland und Altman 1995). Es konnten einige statistisch signifikante Unterschiede zwischen den drei untersuchten Gruppen sowohl im Anteil Ki-67-positiver Zellen als auch in der Gesamtzellzahl festgestellt werden.

Beim Vergleich der Ki-67-Positivität konnte ein signifikanter Unterschied zwischen high- und low-grade Synovialitiden ermittelt werden. Mittels des Kruskal-Wallis-Tests mit anschließendem Dunn-Bonferroni-Test zum gruppenweisen Vergleich nicht-normalverteilter, nicht-verbundener Stichproben konnte ein p-Wert von  $< 0,001$  und damit ein signifikanter Unterschied für den Vergleich der low-grade Osteoarthritis mit sowohl therapierefraktärer als auch nicht-therapierefraktärer high-grade Synovialitis erhoben werden. Im Gegensatz dazu war ein statistisch signifikanter Unterschied der Ki-67-Positivität zwischen therapierefraktären und nicht-therapierefraktären high-grade Synovialitiden nicht festzustellen ( $p = 1,00$ ).

In Tabelle 9 werden die Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests mit anschließender Dunn-Bonferroni-Korrektur für die Ki-67-Positivität aufgeführt.

	Teststatistik	Standardfehler	Standardteststatistik	Sig.	Anp. Sig.a
Osteoarthritis low-grade-therapierefraktär high-grade	36,953	7,016	5,267	0,000	0,000
Osteoarthritis low-grade-nicht-therapierefraktär high-grade	39,187	6,367	6,155	0,000	0,000
therapierefraktär high-grade-nicht-therapierefraktär high-grade	2,234	6,280	-0,356	0,722	1,000

Tabelle 9: statistische Auswertung Proliferationsfraktion (% Ki-67) mittels Kruskal-Wallis-Test – paarweiser Vergleich der Gruppen: Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind. Asymptotische

Signifikanzen (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist 0,050. a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst. Eigene Darstellung.

Abbildung 21 zeigt die grafische Darstellung der Ki-67-Positivität in einem Boxplot-Diagramm, aufgeteilt nach den drei Analysegruppen.

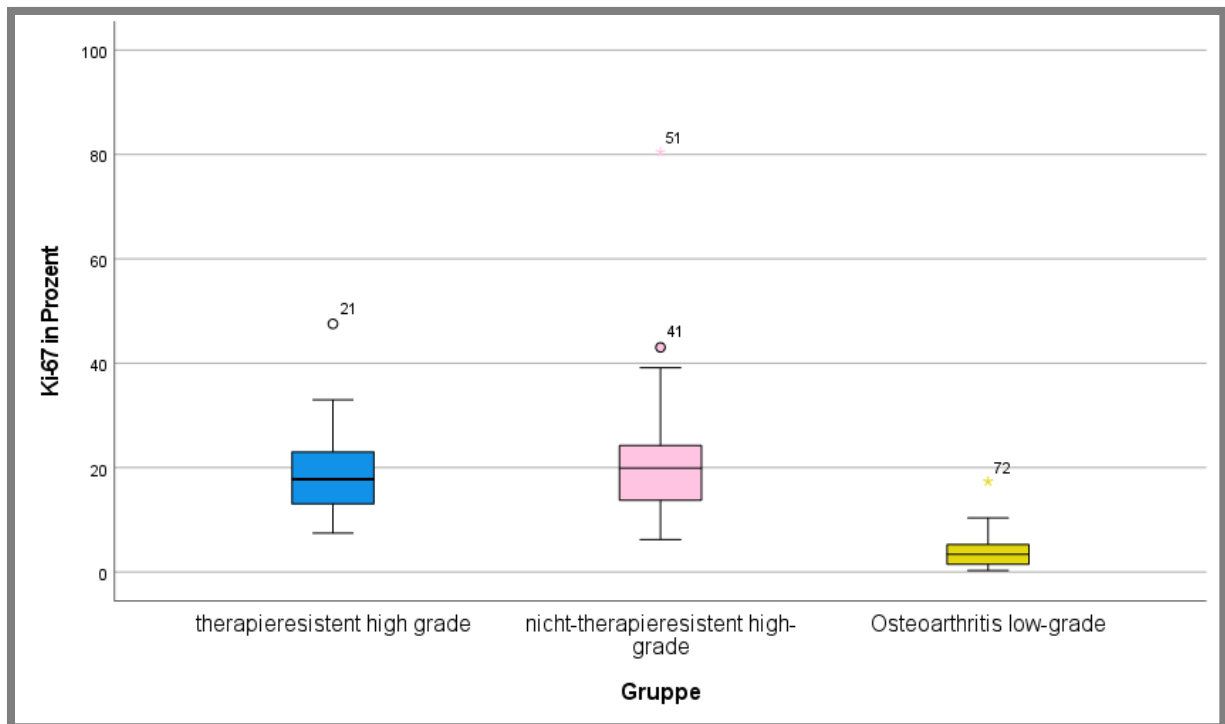


Abbildung 21: Proliferationsfraktion (% Ki-67) nach Gruppen. Eigene Darstellung.

Die Untersuchung der Gesamtzellzahl ergab signifikant höhere Werte bei therapierfraktären im Vergleich zu nicht-therapierfraktären Synovialitiden, und zwar sowohl zwischen therapierfraktärer high-grade Synovialitis und nicht-therapierfraktärer high-grade Synovialitis als auch zwischen therapierfraktärer high-grade Synovialitis und low-grade Osteoarthritis. Die ermittelten p-Werte waren hier 0,025 (therapierfraktär vs nicht-therapierfraktär) bzw. 0,011 (therapierfraktär vs Osteoarthritis). Nicht statistisch signifikant war hingegen der Unterschied in der Gesamtzellzahl/HPF zwischen nicht-therapierfraktärer high-grade Synovialitis und low-grade Osteoarthritis ( $p = 1,00$ ).

In Tabelle 10 werden die Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests mit anschließender Dunn-Bonferroni-Korrektur für die Gesamtzellzahl aufgeführt.

**Paarweise Vergleiche von Gruppen - Gesamtzellzahl**

	Teststatistik	Standardfehler	Standardteststatistik	Sig.	Anp. Sig. <sup>a</sup>
Osteoarthritis low-grade-nicht-therapierefraktär high-grade	3,811	6,367	,599	0,549	1,000
Osteoarthritis low-grade-therapierefraktär high-grade	20,369	7,016	2,903	0,004	0,011
nicht-therapierefraktär high-grade-therapierefraktär high-grade	16,558	6,280	2,637	0,008	0,025

Tabelle 10: statistische Auswertung Gesamtzellzahl/HPF mittels Kruskal-Wallis-Test – paarweiser Vergleich der Gruppen: Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind. Asymptotische Signifikanzen (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist 0,050. a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst. Eigene Darstellung.

Abbildung 22 zeigt die grafische Darstellung der Gesamtzellzahl in einem Boxplot-Diagramm, aufgeteilt nach den drei Analysegruppen.

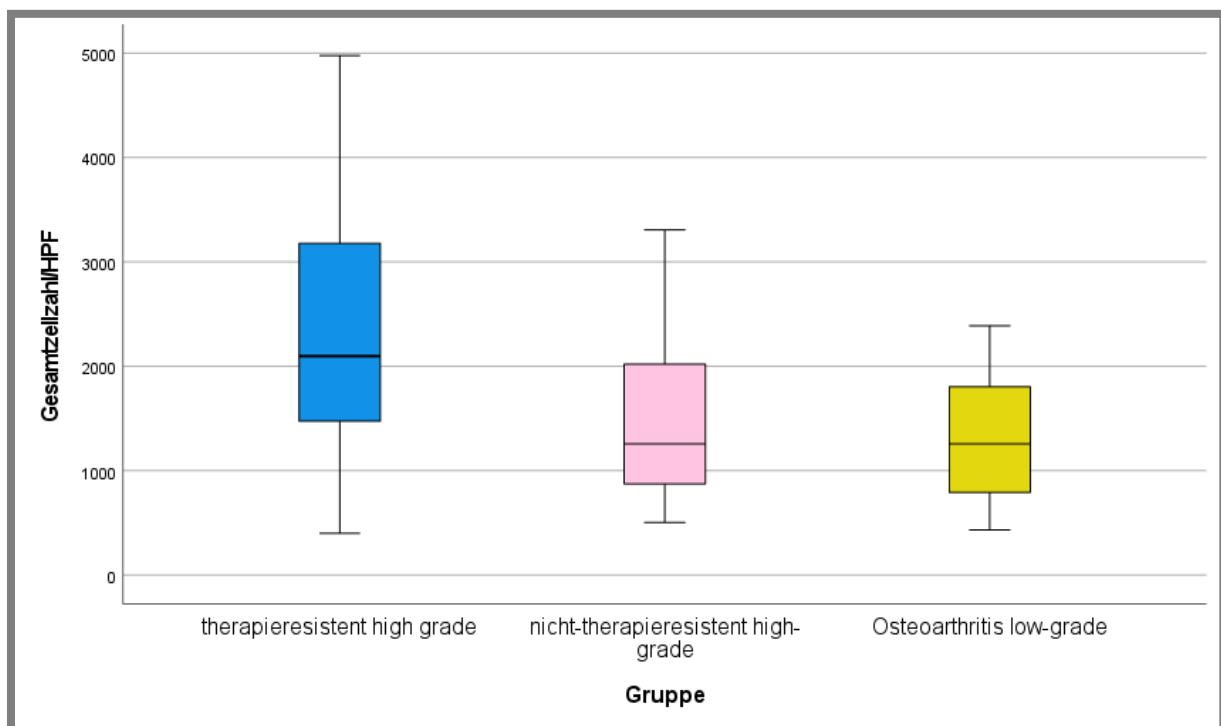


Abbildung 22: Gesamtzellzahl/HPF nach Gruppen. Eigene Darstellung.

Der für den diagnostischen Alltag relevanteste Aspekt ist der Vergleich zwischen therapierefraktärer und nicht-therapierefraktärer high-grade Synovialitis, welcher in den bisher etablierten Synovialitis-Scores nicht abgebildet ist. Hier zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied im prozentualen Anteil der Ki-67-positiven Zellen ( $p = 1,00$ ). In der Gesamtzellzahl hingegen konnte in dieser Studie ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,025$ ) mit deutlich höherer Gesamtzellzahl bei Therapierefraktarität im Vergleich zu nicht-Therapierefraktarität festgestellt werden.

Die exemplarisch erfasste Zeitersparnis wirkte sich insbesondere bei high-grade Synovialitiden aus, mit einer signifikanten Zeitersparnis durch KI-Unterstützung (im Mittel 79,6 s),  $t(4) = 8,098$ ,  $p = 0,001$ . Dagegen konnte bei der low-grade Synovialitis zwar im Mittel ebenfalls eine Zeitersparnis festgestellt werden (3,8 s), diese war in dieser Stichprobe jedoch nicht statistisch signifikant ( $t(4) = 2,348$ ,  $p = 0,079$ ).

## 5 Diskussion

### 5.1 Ki-67-Quantität und high-grade Synovialitis

Die hauptsächlich proliferierende Zellpopulation in der Synovialitis wird von den lokalen und eingewanderten Immunzellen wie T- und B-Lymphozyten und dendritischen Zellen gebildet (Krenn et al. 1996). Bei der Evaluation der Ki-67-positiven Fraktion wurde in dieser Arbeit keine Unterscheidung zwischen fibroblastenartigen Zellen, lokalen Zellen des Monozyten-Makrophagensystems und anderen lokalen und eingewanderten Immunzellen wie Lymphozyten, Plasmazellen, Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen unternommen.

Der prozentuale Anteil proliferierender (Ki-67-positiver) Zellen an allen erfassten Zellpopulationen bei high-grade Synovialitis (RA) ist in dieser Arbeit mit einem Median von 19,93 % (nicht-therapierefraktär) bzw. 17,77 % (therapierefraktär) signifikant höher als bei low-grade Synovialitis (OA) mit einem Median von 3,38 % (jeweils  $p < 0,001$ ). Dies passt zu den Ergebnissen mehrerer vorangegangener Studien, in denen eine deutliche Überexpression von Ki-67 in entzündlichen Arthropathien im Allgemeinen wie auch in der RA im Besonderen nachgewiesen wurde. Pessler et al. 2008b fanden z.B. im Vergleich zu Kontrollgeweben eine 26,6-fache Überexpression von Ki-67 bei RA und lediglich eine 3,9-fache Überexpression bei OA. Auch für die Synovialitis-Stratifizierung durch den IMSYC (Najm et al. 2019) spielt die Quantifizierung von Ki-67 als einer der fünf in den Score einfließenden Parameter eine entscheidende Rolle. Es bestätigt sich somit die Validität des Biomarkers Ki-67 für die immunhistochemische Unterscheidung zwischen OA und RA. In diesem Kontext stellt die Proliferationsfraktion synovialer Gewebe einen Surrogat-Parameter für die Gelenkdestruktion dar.

Neben der verbesserten Reproduzierbarkeit und diagnostischen Sicherheit KI-basierter Ki-67-Analyse im Vergleich zum Augenmaß (Zabaglo et al. 2010; Stålhammar et al. 2016; Dessauvagie et al. 2019; Wang et al. 2019; Cai et al. 2021) ist auch die Zeitersparnis im diagnostischen Alltag von erheblicher Bedeutung. Dies gilt insbesondere in der Beurteilung von high-grade Synovialitiden. Genauer untersucht wurde dies durch van den Berg et al. 2021. Zwar ist das Abschätzen der Proliferationsfraktion in entweder zufällig ausgewählten Arealen (bei homogenen Geweben) oder im Rahmen des Worst Area-Gradings (bei heterogenen Geweben wie der Synovialis) die schnellste Methode, sie ist aber besonders anfällig für Intra- und Interobservervariabilität und erfordert ein hohes Maß an Erfahrung. Dagegen hat die bisher in der Forschung meistangewandte Methode der genauen Auszählung von Zellen zwar eine hohe Interobserverkonkordanz (Lin's Konkordanz-Korrelationskoeffizienten von 0,965 und Cohen's Kappa-Koeffizient von  $\kappa = 0,814$  ( $p < 0,001$ , almost perfect agreement)), sie ist aber nicht nur anfällig für Ablenkungen, sondern auch sehr zeitaufwändig.

Für die Therapie der rheumatoiden Arthritis bestätigt sich anhand dieser Daten die antiproliferative Therapie als guter Ansatz. Mehrere csDMARDs funktionieren über diesen Weg: Leflunomid inhibiert Dihydroorotatdehydrogenase, ein Enzym der Pyrimidinsynthese, und hemmt die DNA-Replikation und damit die Zellproliferation (Fox et al. 1999; Breedveld und Dayer 2000; Rozman 2002). Auf einen ähnlichen Mechanismus greift die Azathioprintherapie zurück, indem dieses Molekül nach Umwandlung in 6-Mercaptopurin die Synthese von Purin inhibiert (Ranganathan 2008); Mycophenolat mofetil wirkt gleichermaßen über die Inhibition von Inosin Monophosphat Dehydrogenase und damit über die Unterbindung der Guaninsynthese (Allison und Eugui 2000). Insgesamt ist die antiproliferative Therapie in der Rheumatologie bereits gut etabliert und zeigt gute Evidenz für ihre Effektivität (Smolen et al. 2020).

## 5.2 Gesamtzellichte und high-grade Synovialitis

In der Literatur zeigt sich, dass sich die Mechanismen einer hohen Gesamtzellichte in der entzündeten Synovialis bei RA in vier Kategorien einteilen lassen:

1. Entzündungszellinfiltration (Smolen et al. 2016): Die Synovialmembran wird von zahlreichen Immunzellen wie T- und B-Lymphozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten infiltriert. Durch das Freisetzen proinflammatorischer Zytokine sowohl durch diese Immunzellen als auch durch aktivierte Fibroblasten werden weitere Immunzellen rekrutiert und die lokale Entzündung so verstärkt und aufrechterhalten.
2. Synoviale Fibroblastenproliferation (Buch et al. 2021): Unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine werden ortständige Synoviozyten aktiviert. Dies führt zum einen zu verstärkter Proliferation dieser Zellen und zum anderen zur vermehrten Sekretion von Zytokinen, welche wiederum weitere Immunzellen aus dem Blut rekrutieren. Daneben werden

Matrixmetalloproteinasen sezerniert, welche zur lokalen Gewebeschädigung beitragen. Proinflammatorische Mediatoren wie VEGF werden ebenfalls sezerniert und stimulieren die Angiogenese.

3. Angiogenese (Szekanecz und Koch 2007): Durch Mediatoren wie VEGF kommt es zur vermehrten Neubildung von Blutgefäßen. Neben der verbesserten Versorgung der ortsständigen Entzündungszellen mit Sauerstoff und Nährstoffen unterstützt die Angiogenese auch die Migration von Entzündungszellen in die Synovialis.
4. Gestörte Apoptose (Firestein 2003): Die Apoptose-Resistenz von Entzündungszellen und synovialen Fibroblasten in der rheumatoiden Synovialis trägt zur Zellakkumulation und damit zur hohen Gesamtzellichte bei.

Wie schon bei Mehta et al. 2023 zeigt sich auch in dieser Studie die Gesamtzellichte als gut geeigneter Parameter zur Unterscheidung zwischen OA und RA. In unserem Fall fand sich dieses Phänomen allerdings nur bei Therapierefraktärität der RA mit einem Median der Gesamtzellichte bei low-grade Synovialitis von 1256,5 Zellen/HPF und bei therapierefraktärer high-grade Synovialitis von 2097 Zellen/HPF ( $p = 0,011$ ).

Die Mittelwerte der nicht-therapierefraktären high-grade Synovialitis und der low-grade Synovialitis zeigen zwar eine Tendenz zu höherer Gesamtzellichte bei high-grade Synovialitis (1445,64 Zellen/HPF) im Vergleich zu low-grade Synovialitis (1313 Zellen/HPF), im Median findet sich jedoch eine identische Gesamtzellichte von 1256,5 Zellen/HPF und damit kein statistisch signifikanter Unterschied ( $p = 1,0$ ). Dies passt nicht zu der in anderen Studien festgestellten Zuverlässigkeit der Gesamtzellichte als Stratifizierungsmerkmal für high- versus low-grade Synovialitis (Slansky et al. 2010; Schmidt et al. 2019; Mehta et al. 2023). Als möglicher Erklärungsansatz für diese Diskrepanz kommt zum einen ein Sampling-Error infrage. Da es sich bei den Veränderungen in der Synovialis im Rahmen der chronischen Entzündung nicht um einen monoklonalen Prozess handelt und das untersuchte Material von einer ausgeprägten Gewebheterogenität gekennzeichnet ist, ist es denkbar, dass für die Auswertung der Gesamtzellichte in den Fällen der nicht-therapierefraktären Synovialitis für das Erkrankungsgeschehen nicht repräsentative Areale gewählt wurden. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist in der Auswahl der als Kontrollgewebe fungierenden OA-Fälle zu finden. So ist bei Osteoarthritis im Allgemeinen in der Regel eine mehr oder minder ausgeprägte Synovialhyperplasie sowie ein zum Teil ausgeprägtes Infiltrat mononukleärer Zellen vorhanden. Dies kann unter Umständen vom entzündlichen Infiltrat der RA kaum zu unterscheiden sein (Goldenberg et al. 1982; Lindblad und Hedfors 1987; Revell et al. 1988). Insbesondere bei arthroseassoziierten Detritussynovialitiden werden eine deutliche Zellvermehrung im Bereich der Synovialis, oft mit Ausbildung einer typischen villösen Hyperplasie, sowie subsynoviale und stromale Infiltrate CD68-positiver Zellen, neutrophiler Granulozyten und mehrkerniger Riesenzellen beschrieben (Oehler et al. 2002). Möglicherweise sind also die hier als Kontrollen verwendeten

OA-Fälle aufgrund der degenerativen Veränderungen im Rahmen der Arthrose ebenso durch eine erhöhte Gesamtzelldichte geprägt, ohne dass dies notwendigerweise pathogeneserelevant ist. Die Nutzung einer hochauflösenden Software für die Evaluation dieses Parameters könnte ebenso ein beitragender Faktor sein. Um dies auszuschließen oder zu bestätigen ist ein Vergleich mit entzündungsfreien Kontrollgeweben (z.B. aus Autopsien) notwendig. Möglicherweise handelt es sich auch bei einigen der in dieser Studie ausgewerteten low-grade Synovialitisfällen um ausgebrannte high-grade Synovialitiden. In diesem Fall könnte z.B. noch eine erhöhte Zelldichte nachweisbar sein, während die Proliferation nicht mehr das Ausmaß einer high-grade Synovialitis erreicht. Insbesondere die ausgebrannte RA weist sich durch Reste der im aktiven Stadium bestehenden synovialen Hyperplasie, insbesondere von Typ B-Synoviozyten und eine weiterhin im Vergleich zur OA erhöhte Dichte verbliebener Entzündungszellen aus (Benito et al. 2005; van de Sande und Baeten 2016; Mathiessen und Conaghan 2017).

Wieso die Gesamtzelldichte nicht-therapierefraktärer high-grade Synovialitiden in dieser Studie im Vergleich zu Osteoarthritiden nicht signifikant erhöht ist, bleibt letztlich unklar und muss bei zukünftigen Untersuchungen zu diesem Thema durch weitere Analysen aufgeklärt werden. Was prinzipiell dennoch für die pathogenetische Relevanz der Zelldichte spricht, ist die signifikant erhöhte Gesamtzelldichte der terapierefraktären high-grade Synovialitis.

### **5.3 Ki-67-Quantität bei terapierefraktärer vs nicht-therapierefraktärer high-grade Synovialitis**

Entgegen der ursprünglichen Hypothese, dass eine erhöhte Proliferationsfraktion ein Parameter für die Therapierefraktärität bei RA sein könnte, findet sich kein signifikanter Unterschied in der Ki-67-Positivität zwischen terapierefraktärer (Median 17,77 %) und nicht-therapierefraktärer RA (Median 17,02 %;  $p = 1,00$ ). Bislang gibt es keine veröffentlichten Studien, die diesen Aspekt der Therapierefraktärität im Detail untersuchen. Zwar besteht ein eindeutiger und mehrfach belegter Zusammenhang zwischen Krankheitsaktivität und Proliferationsfraktion der Synovialis (Pessler et al. 2008b; Schmidt et al. 2019), es ist aber auch bekannt, dass die Gesamtzelldichte und Intimahyperplasie für die Trennschärfe des SC eine größere Rolle spielt als die Entzündungszellinfiltration (Pessler et al. 2008b; Slansky et al. 2010). Zudem gelingt es anhand sowohl des SC als auch des IMSYC nicht in Korrelation mit klinischen Scores zwischen mäßiger und hoher Krankheitsaktivität zu unterscheiden. Für die Unterscheidung zwischen terapierefraktärer und nicht-therapierefraktärer Synovialitis wurden die Scores sowie spezifisch die Ki-67-Fraktion bislang nicht herangezogen. Es scheint anhand dieser Studie nunmehr der Fall zu sein, dass eine erhöhte Proliferation kein Substrat der Therapierefraktärität darstellt. Zur Bestätigung dieser Aussage sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich. Zum einen sollte eine größer angelegte Studie mit höheren Fallzahlen durchgeführt

werden, um einen Sampling Error auszuschließen. Die eingeschlossenen Patientengruppen sollten zudem in einer solchen Studie dezidiert nach der Art und Dauer ihrer Medikation unterschieden werden, da die verwendeten antirheumatischen Medikamente verschiedene Aspekte der Synovialitis und damit die Proliferation und Verteilung unterschiedlicher Zellgruppen zum Ziel haben. Eine Einordnung weiterer Läsionen, die eine erhöhte Proliferationsfraktion zur Folge haben können, wie etwa assoziierte Arthrose und Detritussynovialitis (Firestein und McInnes 2017), in die Ätiologie der Therapierefraktärität sollte in einer solchen Studie ebenfalls erfolgen. Daneben sollte untersucht werden, ob andere Mechanismen auf molekularer Basis für die Therapierefraktärität verantwortlich sind. Es ist denkbar, dass Ki-67 als Surrogat-Parameter in dieser pathologischen Population nicht geeignet ist und ein anderes Molekül besser als Biomarker für die Therapierefraktärität eingesetzt werden kann. Ein Beispiel hierfür wäre unter Umständen CD68, ein ebenfalls bereits etablierter Biomarker der RA. Für die Unterscheidung zwischen RA und OA eignen sich Ki-67 und CD68 gleichermaßen (Area under the Curve (AUC): Ki-67 = 0,91, CD68 = 0,94) (Pessler et al. 2008b). Auch korreliert CD68, ebenso wie Ki-67, positiv mit dem histologischen Synovialitis-Score ( $r = 0,79$  für CD68,  $r = 0,80$  für Ki-67) (Pessler et al. 2008b). Eine Untersuchung, inwiefern CD68 sich bei Therapierefraktärität von der nicht-therapierefraktären RA unterscheidet, könnte somit neue Erkenntnisse bringen.

Insgesamt ist die antiproliferative Therapie in der Rheumatologie bereits gut etabliert und zeigt gute Evidenz für ihre Effektivität (Smolen et al. 2020). Die therapierefraktäre RA definiert sich jedoch unter anderem über das Therapieversagen von csDMARDs. Dazu passen die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse der Ki-67-Positivität von therapierefraktärer vs nicht-therapierefraktärer RA: In beiden Fällen ist diese im Vergleich zu OA signifikant erhöht ( $p < 0,001$ ), während eine immunhistochemische Unterscheidung zwischen Therapierefraktärität und nicht-Therapierefraktärität anhand von Ki-67 nicht möglich war ( $p = 1,0$ ).

Es wurde allerdings lediglich eine Analyse der Proliferation insgesamt, ohne die Unterscheidung und Klassifikation proliferierender Subpopulationen, durchgeführt. Möglicherweise proliferiert bei der therapierefraktären RA eine andere Subpopulation von entweder lokalen oder auch eingewanderten Zellen als im Falle der nicht-Therapierefraktärität. Die Identifikation einer solchen, ggf. pathogeneserelevanten, Subpopulation wäre ein weiterer Forschungsansatz für das Verständnis der Therapierefraktärität der rheumatoiden Arthritis.

#### **5.4 Gesamtzelldichte bei therapierefraktärer vs nicht-therapierefraktärer high-grade Synovialitis**

Ein signifikanter Unterschied der Gesamtzelldichte besteht zwischen therapierefraktärer und nicht-therapierefraktärer high-grade Synovialitis mit einem p-Wert von 0,025. Eine solche

Unterscheidung der high-grade Synovialitis in therapierefraktär und nicht-therapierefraktär wurde in den bisher veröffentlichten Studien, die auf die Gesamtzelldichte der Synovialitis eingehen (Krenn et al. 1996; Krenn et al. 2006; Mehta et al. 2023), nicht unternommen. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zu diesen Arbeiten, in denen die hohe Gesamtzelldichte als zuverlässiger Parameter für die Unterscheidung zwischen low- und high-grade Synovialitis herangezogen wurde, wäre also ein nicht erkannter bzw. nicht differenzierter Anteil therapierefraktärer Synovialitiden an den dort untersuchten Fällen von high-grade Synovialitis. Zudem ist die Gesamtzelldichte für die Festlegung des SC (Krenn et al. 2006) nur ein Parameter von insgesamt drei, wenn auch für die Trennschärfe des Scores von hoher Relevanz (Slansky et al. 2010).

Nach unseren Ergebnissen kommt die Gesamtzelldichte für die Stratifizierung von high-grade Synovialitiden nach Therapierefraktärität und nicht-Therapierefraktärität in Frage. Insbesondere wäre dieser Parameter auch für die Anwendung von KI prädestiniert, wie von Mehta et al. 2023 bereits zur Unterscheidung von OA und RA untersucht, welche mit der Analyse von Whole Slide Images auch das Risiko eines Sampling Errors minimieren könnte. Die KI-unterstützte Analyse mit Festlegung auszuwertender Areale durch den Pathologen, wie in dieser Studie mit der MindPeak Ki-67 Rol-Software durch Worst Area-Grading durchgeführt, ist aber ebenfalls bereits vielversprechend. Die hohen Zahlenwerte bei Analyse der Gesamtzelldichte als diagnostisch relevanter Parameter zur histopathologischen Identifikation einer therapierefraktären Synovialitis legen den Nutzen einer KI-basierten Auswertung nahe. Der Grund hierfür ist, dass eine rein visuelle Auszählung oder auch Abschätzung derartig hoher Zahlen durch den Pathologen sowohl einen hohen Zeitaufwand bedeuten als auch eine relevante Fehlerquote aufweisen würde.

Trotz signifikant erhöhter Gesamtzelldichte in der therapierefraktären RA wurde keine erhöhte Proliferationsfraktion erfasst. Dies lässt darauf schließen, dass die Zelldichte in diesen Fällen nicht auf der Basis erhöhter Proliferation lokaler Zellpopulationen, sondern auf Basis der Rekrutierung im Blut zirkulierender Zellen entsteht. Überlegungen, dass z.B. im Blut zirkulierende aktivierte Typ-B-Synoviozyten ursächlich für das polyarthritische Verteilungsmuster der RA sind, wurden bereits durch Lefèvre et al. 2009 angestellt. Daneben ist die Rolle aus dem Blut rekrutierter Leukozyten bei der Aufrechterhaltung der lokalen Entzündungsreaktion in der RA bereits vielfach untersucht und bestätigt (Firestein et al. 1990). Für die Therapierefraktärität verantwortliche Zellpopulationen müssen also nicht zwangsläufig vor Ort proliferieren, sondern werden unter Umständen hauptsächlich aus dem Blut rekrutiert.

Für die Etablierung neuer therapeutischer Ansätze ist das Auftreten einer signifikant höheren Gesamtzelldichte bei Therapierefraktärität ein interessantes Ergebnis. Unter den bereits etablierten und vielfach angewendeten Antirheumatika gibt es mehrere, die gegen die Erhöhung

der Gesamtzelldichte gerichtet sind. Unter den csDMARDs ist als Beispiel dafür MTX zu erwähnen. Das Erstlinien-Basistherapeutikum als Folsäureantagonist inhibiert in hohen Dosen, wie sie in der Onkologie angewendet werden, Dihydrofolat-Reduktase, was zur Proliferationshemmung über die Hemmung von Purin und Pyrimidin und damit der DNA-Synthese führt (Schornagel und McVie 1983; Cronstein und Aune 2020). Dagegen wird das Medikament in der Erhaltungstherapie bei RA nur in niedrigen Dosen angewendet, wobei sich seine anti-proliferative Wirkung nicht entfalten kann. Es wirkt in diesem Zusammenhang über die Modulation der Immunantwort und antiinflammatorisch und damit der Erhöhung der Gesamtzell-dichte entgegen (Friedman und Cronstein 2019).

Zu den bDMARDs zählen unter anderem TNF- $\alpha$ -Inhibitoren wie Adalimumab, Etanercept und Infliximab. Auch diese wirken letztendlich über die Reduktion der Entzündungsaktivität, was wiederum mit einer Reduktion der Gesamtzell-dichte einhergeht (Smolen et al. 2007). Über die Blockade eines weiteren pro-inflammatorischen Zytokins, das u.a. von Typ B-Synoviozyten sezernierte IL-6 (Bartok und Firestein 2010), welches neben der Regulation der Entzündungsreaktion eine Rolle bei der Proliferationssteigerung von Synoviozyten spielt, wirkt z.B. das bDMARD Tocilizumab (Smolen et al. 2008). Abatacept ist ein Beispiel für die Interaktion mit dem zellulären Immunsystem, indem es die Aktivierung von T-Lymphozyten hemmt und damit direkt und indirekt eine Reduktion der Gesamtzell-dichte zur Folge hat (Kremer et al. 2006). IL-1 ist ebenfalls ein in der RA hochrelevantes Zytokin. Neben der Rekrutierung und Aktivierung verschiedener, an der lokalen Entzündungsreaktion beteiligter Zelltypen, insbesondere Makrophagen und Synoviozyten (Firestein et al. 1990), fördert dieses Zytokin die Produktion von Matrixmetalloproteinasen durch synoviale Fibroblasten und damit die Destruktion der extrazellulären Matrix und des subsynovialen Knorpels und Knochens (Bartok und Firestein 2010). Der IL-1-Rezeptor-Antagonist Anakinra blockiert dieses Zytokin und trägt damit zur Reduktion der Gesamtzell-dichte in der Synovialis bei RA bei (Cohen et al. 2002). Schließlich existiert noch die Gruppe der tsDMARDs, u.a. der JAK-Inhibitor Tofacitinib. Die Januskinase ist Bestandteil mehrerer Zytokin-basierter Signalkaskaden, welche beispielsweise über die Rekrutierung und Aktivierung von T-Lymphozyten zur erhöhten Gesamtzell-dichte beitragen (Gao et al. 2016; Fleischmann et al. 2017).

Ein Versagen von mindestens zwei bDMARDs oder tsDMARDs mit unterschiedlichen Wirkmechanismen nach dem Versagen einer csDMARD-Therapie ist ein notwendiges Kriterium für die Diagnose einer therapierefraktären RA (Tan und Buch 2022). Wie schon bei der Proliferation stellt sich auch in diesem Fall die Frage, ob die Analyse der beteiligten zellulären Subpopulationen in der therapierefraktären RA möglicherweise ein anderes Profil ergäbe als bei der nicht-therapierefraktären RA. Dies könnte ein Erklärungsansatz für das in dieser Studie erhobene Ergebnis einer signifikant höheren Gesamtzell-dichte bei therapierefraktärer RA unter bereits gegen diese Zelldichte gerichteter Medikation sein. In diesem Fall könnte unter

Umständen ein präziseres Therapieziel ausgemacht und eine Medikation etabliert werden, die auf der Reduktion der Gesamtzell-dichte durch targeting einer oder einiger zellulärer Subpopulationen in der rheumatoiden Synovialis basiert. Ein besonderes Augenmerk sollte dabei ggf. auf die aus dem Blut rekrutierten Immun- und aktivierten Stromazellen gerichtet werden.

Zu den Medikamentenklassen, die durch unterschiedliche Wirkmechanismen (antiproliferativ, antiinflammatorisch und/oder antifibrotisch) zu einer Reduktion der Gesamtzell-dichte in entzündeten Geweben beitragen, gehören neben den Nichtsteroidalen Antirheumatika, Kortikosteroiden und DMARDs (Smolen et al. 2016) auch antifibrotische Medikamente wie Pirfenidon oder Nintedanib (Barnes 2006; King et al. 2014; Richeldi et al. 2014). Diese antifibrotischen Medikamente wirken über eine Hemmung der Aktivierung von Fibroblasten und der Kollagenproduktion (King et al. 2014; Richeldi et al. 2014). In dieser Studie wurde keine signifikante Erhöhung der Proliferationsfraktion innerhalb der Synovialis bei Therapierefraktärität beobachtet, gleichzeitig aber eine signifikant erhöhte Gesamtzell-dichte festgestellt. Der Schluss liegt also nahe, dass diese dichte Zellpopulation sich nicht aus vor Ort in der Synovia proliferierenden Zellen, sondern vielmehr aus im Blut zirkulierenden und im Rahmen der Entzündung rekrutierten Zellen zusammensetzt. Das Versagen von mindestens zwei bDMARDs oder tsDMARDs mit unterschiedlichen Wirkmechanismen nach dem Versagen einer csDMARD-Therapie (Tan und Buch 2022) deutet darauf hin, dass andere Zielmechanismen für die Therapie ausgewählt werden müssen. Eine Hemmung der Aktivierung von Fibroblasten über andere Wirkmechanismen als die bereits erfolglos antherapierten könnte hier ein guter Ansatz sein.

## 5.5 Work Load-Reduktion durch Anwendung einer KI

In dieser Studie wurde keine dezidierte Evaluation der Interobservervariabilität vorgenommen. Es wurde aber exemplarisch anhand von je fünf low-grade und fünf high-grade Synovialitiden die Geschwindigkeit der Auswertung von KI-gestützter Analyse im Vergleich zur Auszählung durch einen erfahrenen Pathologen erfasst. Bei der low-grade Synovialitis ergab sich im Mittel eine kleine, bei  $n = 5$  nicht signifikante ( $p = 0,079$ ), Zeitersparnis von 3,4 s. Bei high-grade Synovialitiden hingegen konnte eine bereits bei dieser kleinen Fallzahl signifikante ( $p = 0,001$ ) Zeitersparnis von im Mittel 75,2 s festgestellt werden. Insbesondere in diagnostischen Einheiten mit einem hohen täglichen Aufkommen von Synovialitis-Diagnosen kann davon ausgegangen werden, dass eine Zeitersparnis von etwa 1,25 min pro Fall einen erheblichen Einfluss auf die Reduktion des Work Load hat. Es ist jedoch zu beachten, dass im Rahmen der exemplarischen Erfassung in dieser Studie zwei für die KI-basierte Analyse notwendige Arbeitsschritte in die Zeiterfassung nicht mit einbezogen wurden: Der ausgewählte Bildausschnitt musste zunächst digitalisiert und anschließend für die KI markiert werden. Dies erforderte einen zusätzlichen, wenn auch geringen, Zeitaufwand. Die visuelle, mäandernde Auszählung erfolgte an

demselben, bereits digitalisierten Bildausschnitt. Dies erleichterte und beschleunigte auf zwei Wegen die Auszählung: Der digitalisierte Bildausschnitt war einfacher zu beurteilen als der Schnitt unter dem Lichtmikroskop und weniger anfällig für versehentliche Verschiebungen. Außerdem wurde die von der KI vorgenommene Punktung der Zellen beibehalten, was die visuelle Identifikation von Zellen ebenfalls vereinfachte

Dass ein hohes Potenzial für eine Work Load-Reduktion in Form erheblicher Zeitersparnis bei der Diagnostik von Synovialitiden besteht, basiert insbesondere auf der hohen Quantität proliferierender Zellen und der hohen Gesamtzelldichte von high-grade Synovialitiden. Am Beispiel des Mammakarzinoms wurde bereits belegt, dass KI-gestützte Analyseverfahren in deutlich höherer Geschwindigkeit und mit optimierter Intra- und Interobservervariabilität die Quantität Ki-67-positiver Zellen erfassen (Stålhammar et al. 2016; Dessauvagie et al. 2019; Wang et al. 2019). Unsere Studie legt anhand der exemplarischen Messung nahe, dass dieses Erkenntnis auch auf die Analyse von high-grade Synovialitiden übertragbar ist. Wie Mehta et al. 2023 bereits feststellten, ist die KI-basierte Analyse besonders für zeldichte Gewebe von Vorteil. Dies könnte sich nicht nur für high-grade Synovialitiden im Allgemeinen, sondern nach den Ergebnissen unserer Studie für die therapierefraktäre RA im Besonderen im diagnostischen Alltag erheblich positiv auswirken.

## **6 Zusammenfassung**

Als wesentlicher und signifikanter Unterschied zwischen therapierefraktärer und nicht-therapierefraktärer Synovialitis wurde in dieser Studie nicht die Proliferation, welche in beiden Fällen deutlich erhöht ist, sondern die deutlich höhere Gesamtzelldichte der therapierefraktären RA identifiziert.

Bezogen auf die histopathologische Diagnostik lässt sich aus dieser Studie, konkordant mit anderen Untersuchungen zur therapierefraktären RA, folgender Schluss ziehen: Die Gesamtzelldichte ist ein gutes diagnostisches Kriterium zur Differenzierung zwischen therapierefraktärer und nicht-therapierefraktärer RA. Die Ki-67-Positivität als Marker der Proliferationsfraktion wird zwar bestätigt als guter Biomarker für die Differenzierung zwischen low-grade und high-grade Synovialitis, kann jedoch unter den in dieser Studie herrschenden Bedingungen nicht im gleichen Maße für die Klassifikation einer Therapierefraktärität herangezogen werden. Ggf. muss zu diesem Zweck eine Stratifizierung der proliferierenden Zellpopulationen erfolgen. Ein interessanter Forschungsansatz wäre die Frage, ob die zellulären Subpopulationen bei Therapierefraktärität sich von der nicht-therapierefraktären RA unterscheiden. Anschließend wäre die Frage zu klären, ob innerhalb einer oder mehrerer dieser Subpopulationen eine signifikant höhere Proliferationsrate besteht.

## 6.1 Ki-67-Quantität

Dass bei high-grade Synovialitis, unabhängig von der Klassifikation als therapierefraktär oder nicht-therapierefraktär, eine hohe Proliferationsfraktion (Median 17,77 % bzw. 19,93 %) vorliegt, ist nicht überraschend und ist bereits in der Etablierung von Ki-67 als Biomarker zur Stratifizierung der Synovialitis (Pessler et al. 2008b) belegt und als diagnostisches Kriterium Bestandteil des IMSYC (Najm et al. 2019). Passend zu diesen Untersuchungen präsentiert sich auch in dieser Studie die low-grade Synovialitis, repräsentiert durch OA, mit niedriger Proliferationsfraktion (Median 3,38 %).

Die ursprüngliche Hypothese dieser Arbeit lautete, dass die therapierefraktäre RA immunhistochemisch durch eine höhere Ki-67-Positivität als Substrat für die Proliferationsfraktion von der nicht-therapierefraktären RA zu unterscheiden sein könnte. Dies konnte nicht bestätigt werden. In dieser Studie zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied der Ki-67-Positivität zwischen therapierefraktärer und nicht-therapierefraktärer RA ( $p = 1,00$ ).

## 6.2 Gesamtzelldichte

Hingegen weist die therapierefraktäre im Vergleich zur nicht-therapierefraktären high-grade Synovialitis eine signifikant höhere Gesamtzelldichte auf (Median 2097 Zellen/HPF vs 1256,5 Zellen/HPF,  $p = 0,025$ ), während ein Unterschied zwischen nicht-therapierefraktärer high-grade und low-grade Synovialitis hier nicht nachweisbar war (Median je 1256,5 Zellen/HPF,  $p = 1,0$ ). Bei vergleichbarer Proliferationsfraktion der beiden RA-Gruppen stellt sich also die Frage, welche Zellpopulationen die vermehrte Gesamtzelldichte ausmachen.

In den bisher durchgeführten Studien zur Pathogenese der Synovialitis bei RA wurde keine dezidierte Unterscheidung zwischen therapierefraktärer und nicht-therapierefraktärer RA vorgenommen. Da die „echte“ therapierefraktäre RA nur einen sehr kleinen Anteil von wahrscheinlich deutlich unter 5 % der gesamten RA-Population ausmacht (Buch et al. 2021), können die Ergebnisse dieser vorangegangenen Studien überwiegend auf die nicht-therapierefraktären Synovialitiden extrapoliert werden. Die Therapierefraktärität kann also durchaus durch eine deutlich verschobene Relation zwischen den üblicherweise proliferierenden, aus dem Blut einwandernden und durch andere Mechanismen zur Entzündung beitragenden Zellgruppen verursacht sein. Da beide untersuchten Gruppen (therapierefraktäre und nicht-therapierefraktäre RA) sich nicht signifikant in der Proliferationsfraktion unterscheiden, ist ggf. die genaue Analyse aus dem Blut rekrutierter Zellen zielführend für weitere Studien.

Bezüglich einer optimierten Therapie der therapierefraktären Synovialitis bei RA indiziert die vorliegende Studie, dass die Reduktion der Gesamtzelldichte das wesentliche Therapieziel sein könnte. Eine genaue Evaluation spezifisch auf die Reduktion der Zelldichte abzielender

Medikamente stellt also unter Umständen einen Lösungsansatz für die Therapierefraktärität dar. Zu diesem Zweck könnte es zudem erforderlich sein, die genauen Subpopulationen der für die hohe Zelldichte verantwortlichen Zellen zu identifizieren und im Hinblick darauf zu analysieren, ob diese sich von den Populationen bei der nicht-therapierefraktären RA unterscheiden.

### **6.3 Bedeutung der KI und Reduktion des Work Load**

Aufgrund der hohen Quantität proliferierender Zellen und insbesondere der bei Therapierefraktärität zum Teil sehr hohen Gesamtzelldichte und der möglichen therapeutischen Bedeutung einer differenzierten Analyse dieser Zellpopulationen kann ein KI-basiertes Quantifizierungssystem einen entscheidenden Beitrag zur Bewältigung des diagnostischen Alltags leisten. Eine stichprobenartige Analyse der durch KI-Unterstützung erreichbaren Zeitersparnis ergab, dass die Auswertung von high-grade Synovialitiden mithilfe der KI im Median um 75,2 s schneller war als die Auszählung desselben Areals durch einen erfahrenen Pathologen.

Es würde durch KI-Unterstützung also ermöglicht werden, sowohl die Proliferationsfraktion als auch die Gesamtzelldichte (besonders kritisch im Hinblick auf den Work Load bei besonders hoher Anzahl zu analysierender Zellen) zeitnah und zuverlässig zu bestimmen. Damit könnte die Rationale einer differenzierten antiproliferativen oder spezifisch gegen die Gesamtzelldichte gerichteten Therapie untermauert werden.

## 7 Literaturverzeichnis

Abele, Niklas; Tiemann, Katharina; Krech, Till; Wellmann, Axel; Schaaf, Christian; Länger, Florian et al. (2023): Noninferiority of Artificial Intelligence-Assisted Analysis of Ki-67 and Estrogen/Progesterone Receptor in Breast Cancer Routine Diagnostics. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 36 (3), S. 100033. DOI: 10.1016/j.mod-pat.2022.100033.

Ács, Balázs; Zámbo, Veronika; Vízkeleti, Laura; Szász, A. Marcell; Madaras, Lilla; Szentmártoni, Gyöngyvér et al. (2017): Ki-67 as a controversial predictive and prognostic marker in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. In: *Diagnostic pathology* 12 (1), S. 20. DOI: 10.1186/s13000-017-0608-5.

Ahmad, Zubair; Rahim, Shabina; Zubair, Maha; Abdul-Ghafar, Jamshid (2021): Artificial intelligence (AI) in medicine, current applications and future role with special emphasis on its potential and promise in pathology: present and future impact, obstacles including costs and acceptance among pathologists, practical and philosophical considerations. A comprehensive review. In: *Diagnostic pathology* 16. DOI: 10.1186/s13000-021-01085-4.

Alamanos, Yannis; Drosos, Alexandros A. (2005): Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. In: *Autoimmunity reviews* 4 (3), S. 130–136. DOI: 10.1016/j.autrev.2004.09.002.

Aletaha, Daniel; Neogi, Tuhina; Silman, Alan J.; Funovits, Julia; Felson, David T.; Bingham, Clifton O. et al. (2010): 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. In: *Arthritis and rheumatism* 62 (9), S. 2569–2581. DOI: 10.1002/art.27584.

Allison, A. C.; Eugui, E. M. (2000): Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. In: *Immunopharmacology* 47 (2-3), S. 85–118. DOI: 10.1016/s0162-3109(00)00188-0.

Alzubaidi, Laith; Zhang, Jinglan; Humaidi, Amjad J.; Al-Dujaili, Ayad; Duan, Ye; Al-Shamma, Omran et al. (2021): Review of deep learning: concepts, CNN architectures, challenges, applications, future directions. In: *Journal of big data* 8 (1), S. 53. DOI: 10.1186/s40537-021-00444-8.

Ambarus, Carmen A.; Noordenbos, Troy; Hair, Maria J. H. de; Tak, Paul P.; Baeten, Dominique L. P. (2012): Intimal lining layer macrophages but not synovial sublining macrophages display an IL-10 polarized-like phenotype in chronic synovitis. In: *Arthritis research & therapy* 14 (2), R74. DOI: 10.1186/ar3796.

Athanasou, N. A.; Quinn, J. (1991): Immunocytochemical analysis of human synovial lining cells: phenotypic relation to other marrow derived cells. In: *Annals of the rheumatic diseases* 50 (5), S. 311–315. DOI: 10.1136/ard.50.5.311.

Baeten, D.; Houbiers, J.; Kruithof, E.; Vandooren, B.; van den Bosch, F.; Boots, A. M. et al. (2006): Synovial inflammation does not change in the absence of effective treatment: implications for the use of synovial histopathology as biomarker in early phase clinical trials in rheumatoid arthritis. In: *Annals of the rheumatic diseases* 65 (8), S. 990–997. DOI: 10.1136/ard.2005.047852.

Bang, Seongsik; Kim, Yeseul; Jang, Kiseok; Paik, Seung Sam; Shin, Su-Jin (2019): Clinicopathologic features of rheumatoid nodules: a retrospective analysis. In: *Clin Rheumatol* 38 (11), S. 3041–3048. DOI: 10.1007/s10067-019-04668-1.

Barnes, Peter J. (2006): How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. In: *British journal of pharmacology* 148 (3), S. 245–254. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706736.

- Bartok, Beatrix; Firestein, Gary S. (2010): Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. In: *Immunological reviews* 233 (1), S. 233–255. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2009.00859.x.
- Bause, L. (2018): Komplikationen in der orthopädischen Rheumatologie – Besonderheiten operativer Verfahren. In: *Der Orthopäde* 47 (11), S. 949–957. DOI: 10.1007/s00132-018-3648-y.
- Bécède, Manuel; Alasti, Farideh; Gessl, Irina; Haupt, Lukas; Kerschbaumer, Andreas; Landesmann, Uriel et al. (2019): Risk profiling for a refractory course of rheumatoid arthritis. In: *Seminars in arthritis and rheumatism* 49 (2), S. 211–217. DOI: 10.1016/j.semarthrit.2019.02.004.
- Beil, Frank Timo (2022): Welche Indikation sehe ich für eine Synovialektomie? In: *Zeitschrift für Rheumatologie* 81 (3), S. 236–239. DOI: 10.1007/s00393-021-01113-0.
- Benito, M. J.; Veale, D. J.; FitzGerald, O.; van den Berg, W. B.; Bresnihan, B. (2005): Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. In: *Annals of the rheumatic diseases* 64 (9), S. 1263–1267. DOI: 10.1136/ard.2004.025270.
- Bernhard G. (1985): Extra-articular rheumatoid arthritis: Clinical features and treatment overview. Philadelphia: JB Lippincott Co.
- Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework (2001). In: *Clinical pharmacology and therapeutics* 69 (3), S. 89–95.
- BioMed Central. (2020): ISRCTN Registry. Online verfügbar unter <http://isrctn.org/>.
- Bland, J. M.; Altman, D. G. (1995): Multiple significance tests: the Bonferroni method. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 310 (6973), S. 170. DOI: 10.1136/bmj.310.6973.170.
- Böcker, W.; Denk, Helmut; Heitz, Philipp U.; Höfler, Gerald; Kreipe, Hans H.; Moch, Holger (Hg.) (2012): Pathologie. Mit rund 150 Tabellen ; [Plus im Web, mediscript. 5., vollständig überarbeitete Auflage. München: Elsevier Urban & Fischer.
- Booth, Daniel G.; Beckett, Alison J.; Molina, Oscar; Samejima, Itaru; Masumoto, Hiroshi; Kouprina, Natalay et al. (2016): 3D-CLEM Reveals that a Major Portion of Mitotic Chromosomes Is Not Chromatin. In: *Molecular cell* 64 (4), S. 790–802. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.10.009.
- Booth, Daniel G.; Earnshaw, William C. (2017): Ki-67 and the Chromosome Periphery Compartment in Mitosis. In: *Trends in cell biology* 27 (12), S. 906–916. DOI: 10.1016/j.tcb.2017.08.001.
- Booth, Daniel G.; Takagi, Masatoshi; Sanchez-Pulido, Luis; Petfalski, Elizabeth; Vargiu, Giulia; Samejima, Kumiko et al. (2014): Ki-67 is a PP1-interacting protein that organises the mitotic chromosome periphery. In: *eLife* 3, e01641. DOI: 10.7554/eLife.01641.
- Bowman, Steven; Awad, Mohamed E.; Hamrick, Mark W.; Hunter, Monte; Fulzele, Sadanand (2018): Recent advances in hyaluronic acid based therapy for osteoarthritis. In: *Clinical and translational medicine* 7 (1), S. 6. DOI: 10.1186/s40169-017-0180-3.
- Breedveld, F. C.; Dayer, J. M. (2000): Leflunomide: mode of action in the treatment of rheumatoid arthritis. In: *Annals of the rheumatic diseases* 59 (11), S. 841–849. DOI: 10.1136/ard.59.11.841.
- Buch, Maya H. (2018): Defining refractory rheumatoid arthritis. In: *Annals of the rheumatic diseases* 77 (7), S. 966–969. DOI: 10.1136/annrheumdis-2017-212862.
- Buch, Maya H.; Eyre, Stephen; McGonagle, Dennis (2021): Persistent inflammatory and non-inflammatory mechanisms in refractory rheumatoid arthritis. In: *Nature reviews. Rheumatology* 17 (1), S. 17–33. DOI: 10.1038/s41584-020-00541-7.
- Buckley, Christopher D. (2011): Why does chronic inflammation persist: An unexpected role for fibroblasts. In: *Immunology letters* 138 (1), S. 12–14. DOI: 10.1016/j.imlet.2011.02.010.

- Burgers, L. E.; Siljehult, F.; Brinck, R. M. ten; van Steenberghe, H. W.; Landewé, R. B.; Rantapää-Dahlqvist, S.; van der Mil, A. Helm-vanH (2017): OP0073 Performance of the eular definition of arthralgia suspicious for progression to rheumatoid arthritis – a longitudinal study. In: *Annals of the rheumatic diseases* 76 (Suppl 2), 82.1-82. DOI: 10.1136/annrheumdis-2017-eular.3109.
- Burke, Harry B. (2016): Predicting Clinical Outcomes Using Molecular Biomarkers. In: *Biomarkers in cancer* 8, S. 89–99. DOI: 10.4137/BIC.S33380.
- Cai, Lijing; Yan, Kezhou; Bu, Hong; Yue, Meng; Dong, Pei; Wang, Xinran et al. (2021): Improving Ki67 assessment concordance by the use of an artificial intelligence-empowered microscope: a multi-institutional ring study. In: *Histopathology* 79 (4), S. 544–555. DOI: 10.1111/his.14383.
- Campanella, Gabriele; Hanna, Matthew G.; Geneslaw, Luke; Miraflor, Allen; Silva, Vitor Werneck Krauss; Busam, Klaus J. et al. (2019): Clinical-grade computational pathology using weakly supervised deep learning on whole slide images. In: *Nature medicine* 25 (8), S. 1301–1309. DOI: 10.1038/s41591-019-0508-1.
- Carlomagno, Nicola; Incollingo, Paola; Tammaro, Vincenzo; Peluso, Gaia; Rupealta, Niccolò; Chiacchio, Gaetano et al. (2017): Diagnostic, Predictive, Prognostic, and Therapeutic Molecular Biomarkers in Third Millennium: A Breakthrough in Gastric Cancer. In: *BioMed research international* 2017, S. 7869802. DOI: 10.1155/2017/7869802.
- Carubbi, Francesco; Alunno, Alessia; Cipriani, Paola; Bistoni, Onelia; Scipioni, Rosa; Liakouli, Valiki et al. (2019): Laboratory Assessment of Patients with Suspected Rheumatic Musculoskeletal Diseases: Challenges and Pitfalls. In: *Current rheumatology reviews* 15 (1), S. 27–43. DOI: 10.2174/1573397114666180320113603.
- Ceponis, A.; Konttinen, Y. T.; Imai, S.; Tamulaitiene, M.; Li, T. F.; Xu, J. W. et al. (1998): Synovial lining, endothelial and inflammatory mononuclear cell proliferation in synovial membranes in psoriatic and reactive arthritis: a comparative quantitative morphometric study. In: *British journal of rheumatology* 37 (2), S. 170–178. DOI: 10.1093/rheumatology/37.2.170.
- Chang, Pi-Yueh; Yang, Cheng-Tao; Cheng, Ching-Hui; Yu, Kuang-Hui (2016): Diagnostic performance of anti-cyclic citrullinated peptide and rheumatoid factor in patients with rheumatoid arthritis. In: *International journal of rheumatic diseases* 19 (9), S. 880–886. DOI: 10.1111/1756-185X.12552.
- Cheutin, Thierry; O'Donohue, Marie-Françoise; Beorchia, Adrien; Klein, Christophe; Kaplan, Hervé; Ploton, Dominique (2003): Three-dimensional organization of pKi-67: a comparative fluorescence and electron tomography study using FluoroNanogold. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 51 (11), S. 1411–1423. DOI: 10.1177/002215540305101102.
- Chierico, Luca; Rizzello, Loris; Guan, Lijuan; Joseph, Adrian Steve; Lewis, Andrew; Battaglia, Giuseppe (2017): The role of the two splice variants and extranuclear pathway on Ki-67 regulation in non-cancer and cancer cells. In: *PLoS one* 12 (2), e0171815. DOI: 10.1371/journal.pone.0171815.
- Choy, E. H. S.; Smith, C.; Doré, C. J.; Scott, D. L. (2005): A meta-analysis of the efficacy and toxicity of combining disease-modifying anti-rheumatic drugs in rheumatoid arthritis based on patient withdrawal. In: *Rheumatology (Oxford, England)* 44 (11), S. 1414–1421. DOI: 10.1093/rheumatology/kei031.
- Cohen, Jacob (1960): A Coefficient of Agreement for Nominal Scales. In: *Educational and Psychological Measurement* 20 (1), S. 37–46. DOI: 10.1177/001316446002000104.
- Cohen, Stanley; Hurd, Eric; Cush, John; Schiff, Michael; Weinblatt, Michael E.; Moreland, Larry W. et al. (2002): Treatment of rheumatoid arthritis with anakinra, a recombinant human interleukin-1

receptor antagonist, in combination with methotrexate: results of a twenty-four-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. In: *Arthritis and rheumatism* 46 (3), S. 614–624. DOI: 10.1002/art.10141.

Combs, Susan E.; Han, Gang; Mani, Nikita; Beruti, Susan; Nerenberg, Michael; Rimm, David L. (2016): Loss of antigenicity with tissue age in breast cancer. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 96 (3), S. 264–269. DOI: 10.1038/labinvest.2015.138.

Costenbader, Karen H.; Feskanich, Diane; Mandl, Lisa A.; Karlson, Elizabeth W. (2006): Smoking intensity, duration, and cessation, and the risk of rheumatoid arthritis in women. In: *The American Journal of Medicine* 119 (6), 503.e1-9. DOI: 10.1016/j.amjmed.2005.09.053.

Coudray, Nicolas; Ocampo, Paolo Santiago; Sakellaropoulos, Theodore; Narula, Navneet; Snuderl, Matija; Fenyö, David et al. (2018): Classification and Mutation Prediction from Non-Small Cell Lung Cancer Histopathology Images using Deep Learning. In: *Nature medicine* 24 (10), S. 1559–1567. DOI: 10.1038/s41591-018-0177-5.

Criswell, Lindsey A.; Merlino, Linda A.; Cerhan, James R.; Mikuls, Ted R.; Mudano, Amy S.; Burma, Molly et al. (2002): Cigarette smoking and the risk of rheumatoid arthritis among postmenopausal women: results from the Iowa Women's Health Study. In: *The American Journal of Medicine* 112 (6), S. 465–471. DOI: 10.1016/S0002-9343(02)01051-3.

Cronstein, Bruce N.; Aune, Thomas M. (2020): Methotrexate and its mechanisms of action in inflammatory arthritis. In: *Nature reviews. Rheumatology* 16 (3), S. 145–154. DOI: 10.1038/s41584-020-0373-9.

Cuylen, Sara; Blaukopf, Claudia; Politi, Antonio Z.; Müller-Reichert, Thomas; Neumann, Beate; Poser, Ina et al. (2016): Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. In: *Nature* 535 (7611), S. 308–312. DOI: 10.1038/nature18610.

Davey, Matthew G.; Hynes, Sean O.; Kerin, Michael J.; Miller, Nicola; Lowery, Aoife J. (2021): Ki-67 as a Prognostic Biomarker in Invasive Breast Cancer. In: *Cancers* 13 (17). DOI: 10.3390/cancers13174455.

Decker, Barry; McKenzie, Bernard F.; McGuckin, Warren F.; Slocumb, Charles H. (1959): Comparative distribution of proteins and glycoproteins of serum and synovial fluid. In: *Arthritis & Rheumatism* 2 (2), S. 162–177. DOI: 10.1002/1529-0131(195904)2:2<162::aid-art1780020208>3.0.co;2-6.

Dessauvagie, Benjamin; Thomas, Anitha; Thomas, Carla; Robinson, Cleo; Combrink, Marais; Budhavararam, Vanitha et al. (2019): Invasive lobular carcinoma of the breast: assessment of proliferative activity using automated Ki-67 immunostaining. In: *Pathology* 51 (7), S. 681–687. DOI: 10.1016/j.pathol.2019.08.004.

Díaz Cuña, Carolina; Consani, Sandra; Rostan, Sofía; Fernández, Lucía; Moreira, Emilia; Sanmartí, Raimon (2022): Rheumatoid arthritis: extra articular manifestations and comorbidities. In: *Revista Colombiana de Reumatología (English Edition)* 29 (3), S. 196–204. DOI: 10.1016/j.rcreue.2021.03.003.

Díaz-Torne, C.; Schumacher, H. R.; Yu, X.; Gomez-Vaquero, C.; Dai, L.; Chen, L. X. et al. (2007): Absence of histologic evidence of synovitis in patients with Gulf War veterans' illness with joint pain. In: *Arthritis and rheumatism* 57 (7), S. 1316–1323. DOI: 10.1002/art.23006.

Dowsett, Mitch; Nielsen, Torsten O.; A'Hern, Roger; Bartlett, John; Coombes, R. Charles; Cuzick, Jack et al. (2011): Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. In: *Journal of the National Cancer Institute* 103 (22), S. 1656–1664. DOI: 10.1093/jnci/djr393.

- Dunn, Olive Jean (1961): Multiple Comparisons among Means. In: *Journal of the American Statistical Association* 56 (293), S. 52–64. DOI: 10.1080/01621459.1961.10482090.
- Echle, Amelie; Rindtorff, Niklas Timon; Brinker, Titus Josef; Luedde, Tom; Pearson, Alexander Thomas; Kather, Jakob Nikolas (2020): Deep learning in cancer pathology: a new generation of clinical biomarkers. In: *British Journal of Cancer* 124 (4), S. 686–696. DOI: 10.1038/s41416-020-01122-x.
- Ehteshami Bejnordi, Babak; Veta, Mitko; van Johannes Diest, Paul; van Ginneken, Bram; Karssemeijer, Nico; Litjens, Geert et al. (2017): Diagnostic Assessment of Deep Learning Algorithms for Detection of Lymph Node Metastases in Women With Breast Cancer. In: *JAMA* 318 (22), S. 2199–2210. DOI: 10.1001/jama.2017.14585.
- Encarnacion-Rivera, Lucas; Foltz, Steven; Hartzell, H. Criss; Choo, Hyojung (2020): Myosoft: An automated muscle histology analysis tool using machine learning algorithm utilizing Fiji/ImageJ software. In: *PLoS one* 15 (3), e0229041. DOI: 10.1371/journal.pone.0229041.
- Endl, E.; Gerdes, J. (2000): Posttranslational modifications of the Ki-67 protein coincide with two major checkpoints during mitosis. In: *Journal of cellular physiology* 182 (3), S. 371–380. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<371::AID-JCP8>3.0.CO;2-J.
- Esteva, Andre; Kuprel, Brett; Novoa, Roberto A.; Ko, Justin; Swetter, Susan M.; Blau, Helen M.; Thrun, Sebastian (2017): Dermatologist-level classification of skin cancer with deep neural networks. In: *Nature* 542 (7639), S. 115–118. DOI: 10.1038/nature21056.
- Faragalla, Hala; Plotkin, Anna; Barnes, Penny; Lu, Fang-I; Kos, Zuzana; Mulligan, Anna Marie et al. (2023): Ki67 in Breast Cancer Assay: An Ad Hoc Testing Recommendation from the Canadian Association of Pathologists Task Force. In: *Current Oncology* 30 (3), S. 3079–3090. DOI: 10.3390/curroncol30030233.
- Firestein, G. S.; Alvaro-Gracia, J. M.; Maki, R. (1990): Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 144 (9), S. 3347–3353.
- Firestein, Gary S. (2003): Evolving concepts of rheumatoid arthritis. In: *Nature* 423 (6937), S. 356–361. DOI: 10.1038/nature01661.
- Firestein, Gary S.; McInnes, Iain B. (2017): Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. In: *Immunity* 46 (2), S. 183–196. DOI: 10.1016/j.immuni.2017.02.006.
- Fleischmann, Roy; Mysler, Eduardo; Hall, Stephen; Kivitz, Alan J.; Moots, Robert J.; Luo, Zhen et al. (2017): Efficacy and safety of tofacitinib monotherapy, tofacitinib with methotrexate, and adalimumab with methotrexate in patients with rheumatoid arthritis (ORAL Strategy): a phase 3b/4, double-blind, head-to-head, randomised controlled trial. In: *Lancet (London, England)* 390 (10093), S. 457–468. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31618-5.
- Fox, R. I.; Herrmann, M. L.; Frangou, C. G.; Wahl, G. M.; Morris, R. E.; Strand, V.; Kirschbaum, B. J. (1999): Mechanism of action for leflunomide in rheumatoid arthritis. In: *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 93 (3), S. 198–208. DOI: 10.1006/clim.1999.4777.
- Friedman, Benjamin; Cronstein, Bruce (2019): Methotrexate mechanism in treatment of rheumatoid arthritis. In: *Joint bone spine* 86 (3), S. 301–307. DOI: 10.1016/j.jbspin.2018.07.004.
- Frisell, Thomas; Saevarsdottir, Saedis; Askling, Johan (2016): Family history of rheumatoid arthritis: an old concept with new developments. In: *Nature reviews. Rheumatology* 12 (6), S. 335–343. DOI: 10.1038/nrrheum.2016.52.
- Gao, W.; McGarry, T.; Orr, C.; McCormick, J.; Veale, D. J.; Fearon, U. (2016): Tofacitinib regulates synovial inflammation in psoriatic arthritis, inhibiting STAT activation and induction of negative feedback

inhibitors. In: *Annals of the rheumatic diseases* 75 (1), S. 311–315. DOI: 10.1136/annrheumdis-2014-207201.

Gaulke, Ralph: Histopathologisches Arthritis-Register (DGORh). Hg. v. Deutsche Gesellschaft für orthopädische Rheumatologie e.V. (DGORh). Online verfügbar unter <https://www.dgorh.de>, zuletzt geprüft am 07.09.2023.

Genç, C. G.; Falconi, M.; Partelli, S.; Muffatti, F.; van Eeden, S.; Doglioni, C. et al. (2018): Recurrence of Pancreatic Neuroendocrine Tumors and Survival Predicted by Ki67. In: *Annals of Surgical Oncology* 25 (8), S. 2467–2474. DOI: 10.1245/s10434-018-6518-2.

Gerdes, J.; Lemke, H.; Baisch, H.; Wacker, H. H.; Schwab, U.; Stein, H. (1984): Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 133 (4), S. 1710–1715.

Gerdes, J.; Li, L.; Schlueter, C.; Duchrow, M.; Wohlenberg, C.; Gerlach, C. et al. (1991): Immunohistochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. In: *The American journal of pathology* 138 (4), S. 867–873.

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. In: *International journal of cancer* 31 (1), S. 13–20. DOI: 10.1002/ijc.2910310104.

Gerdes, J.; Stein, H.; Pileri, S.; Rivano, M. T.; Gobbi, M.; Ralfkiaer, E. et al. (1987): Prognostic relevance of tumour-cell growth fraction in malignant non-Hodgkin's lymphomas. In: *Lancet (London, England)* 2 (8556), S. 448–449. DOI: 10.1016/s0140-6736(87)90977-9.

Golden, Jeffrey Alan (2017): Deep Learning Algorithms for Detection of Lymph Node Metastases From Breast Cancer: Helping Artificial Intelligence Be Seen. In: *JAMA* 318 (22), S. 2184–2186. DOI: 10.1001/jama.2017.14580.

Goldenberg, D. L.; Egan, M. S.; Cohen, A. S. (1982): Inflammatory synovitis in degenerative joint disease. In: *The Journal of rheumatology* 9 (2), S. 204–209.

Goldenberg, S. Larry; Nir, Guy; Salcudean, Septimiu E. (2019): A new era: artificial intelligence and machine learning in prostate cancer. In: *Nature reviews. Urology* 16 (7), S. 391–403. DOI: 10.1038/s41585-019-0193-3.

Goodfellow, Ian; Bengio, Yoshua; Courville, Aaron (2016): Deep learning. Cambridge, Massachusetts: The MIT Press (Adaptive computation and machine learning).

Gordon, D. A.; Stein, J. L.; Broder, I. (1973): The extra-articular features of rheumatoid arthritis. A systematic analysis of 127 cases. In: *The American Journal of Medicine* 54 (4), S. 445–452. DOI: 10.1016/0002-9343(73)90040-5.

Graham, Simon; Vu, Quoc Dang; Raza, Shan E. Ahmed; Azam, Ayesha; Tsang, Yee Wah; Kwak, Jin Tae; Rajpoot, Nasir (2019): Hover-Net: Simultaneous segmentation and classification of nuclei in multi-tissue histology images. In: *Medical image analysis* 58, S. 101563. DOI: 10.1016/j.media.2019.101563.

Guo, Qiang; Wang, Yuxiang; Xu, Dan; Nossent, Johannes; Pavlos, Nathan J.; Xu, Jiake (2018): Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies. In: *Bone research* 6, S. 15. DOI: 10.1038/s41413-018-0016-9.

Hair, Maria J. H. de; Jacobs, Johannes W. G.; Schoneveld, Jan L. M.; van Laar, Jacob M. (2018): Difficult-to-treat rheumatoid arthritis: an area of unmet clinical need. In: *Rheumatology (Oxford, England)* 57 (7), S. 1135–1144. DOI: 10.1093/rheumatology/kex349.

- Hajishengallis, George (2015): Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. In: *Nature reviews. Immunology* 15 (1), S. 30–44. DOI: 10.1038/nri3785.
- Haringman, J. J.; Gerlag, D. M.; Zwiderman, A. H.; Smeets, T. J. M.; Kraan, M. C.; Baeten, D. et al. (2005): Synovial tissue macrophages: a sensitive biomarker for response to treatment in patients with rheumatoid arthritis. In: *Annals of the rheumatic diseases* 64 (6), S. 834–838. DOI: 10.1136/ard.2004.029751.
- Harrison, James H.; Gilbertson, John R.; Hanna, Matthew G.; Olson, Niels H.; Seheult, Jansen N.; Sorace, James M.; Stram, Michelle N. (2021): Introduction to Artificial Intelligence and Machine Learning for Pathology. In: *Archives of pathology & laboratory medicine* 145 (10), S. 1228–1254. DOI: 10.5858/arpa.2020-0541-CP.
- Helmchen, B.; Weckauf, H.; Ehemann, V.; Wittmann, I.; Meyer-Scholten, C.; Berger, I. (2005): Expression pattern of cell cycle-related gene products in synovial stroma and synovial lining in active and quiescent stages of rheumatoid arthritis. In: *Histology and histopathology* 20 (2), S. 365–372. DOI: 10.14670/HH-20.365.
- Hemminki, Kari; Li, Xinjun; Sundquist, Jan; Sundquist, Kristina (2009): Familial associations of rheumatoid arthritis with autoimmune diseases and related conditions. In: *Arthritis and rheumatism* 60 (3), S. 661–668. DOI: 10.1002/art.24328.
- Hernandez-Verdun, Danièle; Roussel, Pascal; Thiry, Marc; Sirri, Valentina; Lafontaine, Denis L. J. (2010): The nucleolus: structure/function relationship in RNA metabolism. In: *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 1 (3), S. 415–431. DOI: 10.1002/wrna.39.
- Hollstein, Guido (2022): Disease Modifying Antirheumatic Drugs (DMARDs). Pschyrembel online. Online verfügbar unter <https://www.pschyrembel.de/Disease%20Modifying%20Antirheumatic%20Drugs/K064D>, zuletzt aktualisiert am 2022-11, zuletzt geprüft am 31.01.2024.
- Horie, Yoshimasa; Yoshio, Toshiyuki; Aoyama, Kazuharu; Yoshimizu, Shoichi; Horiuchi, Yusuke; Ishiyama, Akiyoshi et al. (2019): Diagnostic outcomes of esophageal cancer by artificial intelligence using convolutional neural networks. In: *Gastrointestinal endoscopy* 89 (1), S. 25–32. DOI: 10.1016/j.gie.2018.07.037.
- Hügler, Thomas; Gashi, Gani; Wiewiorski, Martin; Müller-Gerbl, Magdalena; Valderrabano, Victor; Nowakowski, Andrej M. (2015): Development of a New Device for Synovial Biopsies. In: *Surgical Innovation* 22 (5), S. 496–499. DOI: 10.1177/1553350614549634.
- Huizinga, Tom W. J.; Amos, Christopher I.; van der Helm-van Mil, Annette H. M.; Chen, Wei; van Gaalen, Floris A.; Jawaheer, Damini et al. (2005): Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. In: *Arthritis and rheumatism* 52 (11), S. 3433–3438. DOI: 10.1002/art.21385.
- Ishida, S.; Huang, E.; Zuzan, H.; Spang, R.; Leone, G.; West, M.; Nevins, J. R. (2001): Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis. In: *Molecular and cellular biology* 21 (14), S. 4684–4699. DOI: 10.1128/MCB.21.14.4684-4699.2001.
- Iyengar, Karthikeyan P.; Vaish, Abhishek; Nune, Arvind (2022): Anti-cyclic citrullinated peptide antibody (ACPA) and Rheumatoid arthritis: Clinical relevance. In: *Journal of clinical orthopaedics and trauma* 24, S. 101729. DOI: 10.1016/j.jcot.2021.101729.
- Jang, Sunhee; Kwon, Eui-Jong; Lee, Jennifer Jooha (2022): Rheumatoid Arthritis: Pathogenic Roles of Diverse Immune Cells. In: *International journal of molecular sciences* 23 (2). DOI: 10.3390/ijms23020905.

- Källberg, Henrik; Ding, Bo; Padyukov, Leonid; Bengtsson, Camilla; Rönnelid, Johan; Klareskog, Lars; Alfredsson, Lars (2011): Smoking is a major preventable risk factor for rheumatoid arthritis: estimations of risks after various exposures to cigarette smoke. In: *Annals of the rheumatic diseases* 70 (3), S. 508–511. DOI: 10.1136/ard.2009.120899.
- Kastenschmidt, Jenna M.; Ellefsen, Kyle L.; Mannaa, Ali H.; Giebel, Jesse J.; Yahia, Rayan; Ayer, Rachel E. et al. (2019): QuantiMus: A Machine Learning-Based Approach for High Precision Analysis of Skeletal Muscle Morphology. In: *Frontiers in physiology* 10, S. 1416. DOI: 10.3389/fphys.2019.01416.
- Kausch, Ingo; Lingnau, Anja; Endl, Elmar; Sellmann, Kirsten; Deinert, Irina; Ratliff, Timothy L. et al. (2003): Antisense treatment against Ki-67 mRNA inhibits proliferation and tumor growth in vitro and in vivo. In: *International journal of cancer* 105 (5), S. 710–716. DOI: 10.1002/ijc.11111.
- Kay, Jonathan; Upchurch, Katherine S. (2012): ACR/EULAR 2010 rheumatoid arthritis classification criteria. In: *Rheumatology (Oxford, England)* 51 Suppl 6, vi5-9. DOI: 10.1093/rheumatology/kes279.
- Kayser, Klaus; Görtler, Jürgen; Bogovac, Milica; Bogovac, Aleksandar; Goldmann, Torsten; Vollmer, Ekkehard; Kayser, Gian (2009): AI (artificial intelligence) in histopathology--from image analysis to automated diagnosis. In: *Folia histochemica et cytobiologica* 47 (3), S. 355–361. DOI: 10.2478/v10042-009-0087-y.
- Kearsley-Fleet, Lianne; Davies, Rebecca; Cock, Diederik de; Watson, Kath D.; Lunt, Mark; Buch, Maya H. et al. (2018): Biologic refractory disease in rheumatoid arthritis: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register for Rheumatoid Arthritis. In: *Annals of the rheumatic diseases* 77 (10), S. 1405–1412. DOI: 10.1136/annrheumdis-2018-213378.
- Kennedy, Aisling; Ng, Chin Teck; Biniecka, Monika; Saber, Tajvur; Taylor, Cormac; O'Sullivan, Jacintha et al. (2010): Angiogenesis and blood vessel stability in inflammatory arthritis. In: *Arthritis & Rheumatism* 62 (3), S. 711–721. DOI: 10.1002/art.27287.
- Kill, I. R. (1996): Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus. Evidence for a fibrillar-deficient region of the dense fibrillar component. In: *Journal of cell science* 109 (Pt 6), S. 1253–1263. DOI: 10.1242/jcs.109.6.1253.
- Kim, Yoo-Jin; Brox, Thomas; Feiden, Wolfgang; Weickert, Joachim (2007): Fully automated segmentation and morphometrical analysis of muscle fiber images. In: *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 71 (1), S. 8–15. DOI: 10.1002/cyto.a.20334.
- King, Talmadge E.; Bradford, Williamson Z.; Castro-Bernardini, Socorro; Fagan, Elizabeth A.; Glaspole, Ian; Glassberg, Marilyn K. et al. (2014): A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. In: *The New England journal of medicine* 370 (22), S. 2083–2092. DOI: 10.1056/NEJMoa1402582.
- Klemencic, Ale; Kovacic, Stanislav; Pernu, Franjo (1998): Automated segmentation of muscle fiber images using active contour models. In: *Cytometry* 32 (4), S. 317–326. DOI: 10.1002/(sici)1097-0320(19980801)32:4<317::aid-cyto9>3.0.co;2-e.
- Konnaris, Maxwell A.; Brendel, Matthew; Fontana, Mark Alan; Otero, Miguel; Ivashkiv, Lionel B.; Wang, Fei; Bell, Richard D. (2022): Computational pathology for musculoskeletal conditions using machine learning: advances, trends, and challenges. In: *Arthritis research & therapy* 24. DOI: 10.1186/s13075-021-02716-3.
- Konstantinos Ntzeros; Philip Stanier; Dimitrios Mazis; Neoklis Kritikos; Meletios Rozis; Eustathios Anesidis et al. (2014): MKI67 (marker of proliferation Ki-67). Hg. v. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. Online verfügbar unter <http://atlasgeneticsoncology.org/gene/41369/mki67-%28marker-of-proliferation-ki-67%29>, zuletzt geprüft am 15.07.2024.

- Kraan, M. C.; Haringman, J. J.; Ahern, M. J.; Breedveld, F. C.; Smith, M. D.; Tak, P. P. (2000): Quantification of the cell infiltrate in synovial tissue by digital image analysis. In: *Rheumatology (Oxford, England)* 39 (1), S. 43–49. DOI: 10.1093/rheumatology/39.1.43.
- Kremer, Joel M.; Genant, Harry K.; Moreland, Larry W.; Russell, Anthony S.; Emery, Paul; Abud-Mendoza, Carlos et al. (2006): Effects of abatacept in patients with methotrexate-resistant active rheumatoid arthritis: a randomized trial. In: *Annals of internal medicine* 144 (12), S. 865–876. DOI: 10.7326/0003-4819-144-12-200606200-00003.
- Krenn, V.; Morawietz, L.; Burmester, G-R; Häupl, T. (2005): Synovialitis-Score: Histopathologisches Graduierungsschema rheumatischer und nicht-rheumatischer Synovialitiden. In: *Zeitschrift für Rheumatologie* 64 (5), S. 334–342. DOI: 10.1007/s00393-005-0704-x.
- Krenn, V.; Morawietz, L.; Burmester, G-R; Kinne, R. W.; Mueller-Ladner, U.; Müller, B.; Haupt, T. (2006): Synovitis score: discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis. In: *Histopathology* 49 (4), S. 358–364. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2006.02508.x.
- Krenn, V.; Perino, G.; Rütther, W.; Krenn, V. T.; Huber, M.; Hügle, T. et al. (2017): 15 years of the histopathological synovitis score, further development and review: A diagnostic score for rheumatology and orthopaedics. In: *Pathology, research and practice* 213 (8), S. 874–881. DOI: 10.1016/j.prp.2017.05.005.
- Krenn, V.; Schalhorn, N.; Greiner, A.; Molitoris, R.; König, A.; Gohlke, F.; Müller-Hermelink, H. K. (1996): Immunohistochemical analysis of proliferating and antigen-presenting cells in rheumatoid synovial tissue. In: *Rheumatology international* 15 (6), S. 239–247. DOI: 10.1007/BF00290377.
- Krenn, Veit; Rütther, Wolfgang (Hg.) (2012): Pathologie des Bewegungsapparates. 2., aktualisierte Auflage. Berlin: De Gruyter. Online verfügbar unter <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=407446>.
- Krizhevsky, Alex; Sutskever, Ilya; Hinton, Geoffrey E. (2017): ImageNet classification with deep convolutional neural networks. In: *Commun. ACM* 60 (6), S. 84–90. DOI: 10.1145/3065386.
- Kruskal, William H.; Wallis, W. Allen (1952): Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. In: *Journal of the American Statistical Association* 47 (260), S. 583–621. DOI: 10.1080/01621459.1952.10483441.
- Kurmis, Andrew P.; Ianunzio, Jamie R. (2022): Artificial intelligence in orthopedic surgery: evolution, current state and future directions. In: *Arthroplasty* 4 (1), S. 9. DOI: 10.1186/s42836-022-00112-z.
- Lake, Brenden M.; Ullman, Tomer D.; Tenenbaum, Joshua B.; Gershman, Samuel J. (2017): Building machines that learn and think like people. In: *The Behavioral and brain sciences* 40, e253. DOI: 10.1017/S0140525X16001837.
- Landis, J. R.; Koch, G. G. (1977): The measurement of observer agreement for categorical data. In: *Biometrics* 33 (1), S. 159–174.
- LeCun, Yann; Bengio, Yoshua; Hinton, Geoffrey (2015): Deep learning. In: *Nature* 521 (7553), S. 436–444. DOI: 10.1038/nature14539.
- Lefèvre, Stephanie; Knedla, Anette; Tennie, Christoph; Kampmann, Andreas; Wunrau, Christina; Dinsler, Robert et al. (2009): Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. In: *Nat Med* 15 (12), S. 1414–1420. DOI: 10.1038/nm.2050.
- Levick, J. R. (1981): Permeability of rheumatoid and normal human synovium to specific plasma proteins. In: *Arthritis and rheumatism* 24 (12), S. 1550–1560. DOI: 10.1002/art.1780241215.

- Li, Fangqi; Tang, Yiyong; Song, Bin; Yu, Menglei; Li, Qingyue; Zhang, Congda et al. (2019): Nomenclature clarification: synovial fibroblasts and synovial mesenchymal stem cells. In: *Stem cell research & therapy* 10 (1), S. 260. DOI: 10.1186/s13287-019-1359-x.
- Liljequist, David; Elfving, Britt; Skavberg Roaldsen, Kirsti (2019): Intraclass correlation – A discussion and demonstration of basic features. In: *PloS one* 14 (7). DOI: 10.1371/journal.pone.0219854.
- Lin, L. I. (1989): A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. In: *Biometrics* 45 (1), S. 255–268.
- Lindblad, S.; Hedfors, E. (1987): Arthroscopic and immunohistologic characterization of knee joint synovitis in osteoarthritis. In: *Arthritis and rheumatism* 30 (10), S. 1081–1088. DOI: 10.1002/art.1780301001.
- Litjens, Geert; Kooi, Thijs; Bejnordi, Babak Ehteshami; Setio, Arnaud Arindra Adiyoso; Ciampi, Francesco; Ghafoorian, Mohsen et al. (2017): A survey on deep learning in medical image analysis. In: *Medical image analysis* 42, S. 60–88. DOI: 10.1016/j.media.2017.07.005.
- Liu, Fujun; Fry, Christopher S.; Mula, Jyothi; Jackson, Janna R.; Lee, Jonah D.; Peterson, Charlotte A.; Yang, Lin (2013): Automated fiber-type-specific cross-sectional area assessment and myonuclei counting in skeletal muscle. In: *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 115 (11), S. 1714–1724. DOI: 10.1152/jappphysiol.00848.2013.
- Liu X., Zhou H, Hu Z, Jin Q, Wang J, Ye B (2019): Clinical Application of Artificial Intelligence Recognition Technology in the Diagnosis of Stage T1 Lung Cancer. In: *Chinese Journal of Lung Cancer* 22 (5), S. 319–323. DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2019.05.09.
- Ljung, Lotta; Jönsson, Elias; Franklin, Johan; Berglin, Ewa; Lundquist, Anders; Rantapää-Dahlqvist, Solbritt (2024): Incidence and predisposing factors of extra-articular manifestations in contemporary rheumatoid arthritis. In: *European journal of internal medicine*. DOI: 10.1016/j.ejim.2024.04.026.
- Lopez, F.; Belloc, F.; Lacombe, F.; Dumain, P.; Reiffers, J.; Bernard, P.; Boisseau, M. R. (1991): Modalities of synthesis of Ki67 antigen during the stimulation of lymphocytes. In: *Cytometry* 12 (1), S. 42–49. DOI: 10.1002/cyto.990120107.
- LOWNEY, E. D.; SIMONS, H. M. (1963): "Rheumatoid" nodules of the skin: their significance as an isolated finding. In: *Arch Dermatol* 88 (6), S. 853–858. DOI: 10.1001/archderm.1963.01590240177030.
- Luo, Yihuan; Ren, Fanghui; Liu, Yongru; Shi, Zhenhong; Tan, Zhong; Xiong, Huojie et al. (2015): Clinicopathological and prognostic significance of high Ki-67 labeling index in hepatocellular carcinoma patients: a meta-analysis. In: *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 8 (7), S. 10235–10247.
- MacCallum, D. E.; Hall, P. A. (2000): The location of pKi67 in the outer dense fibrillary compartment of the nucleolus points to a role in ribosome biogenesis during the cell division cycle. In: *The Journal of pathology* 190 (5), S. 537–544. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(200004)190:5<537::AID-PATH577>3.0.CO;2-W.
- MacGregor, A. J.; Snieder, H.; Rigby, A. S.; Koskenvuo, M.; Kaprio, J.; Aho, K.; Silman, A. J. (2000): Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. In: *Arthritis and rheumatism* 43 (1), S. 30–37. DOI: 10.1002/1529-0131(200001)43:1<30::AID-ANR5>3.0.CO;2-B.
- Marcucci, E.; Bartoloni, E.; Alunno, A.; Leone, M. C.; Cafaro, G.; Luccioli, F. et al. (2018): Extra-articular rheumatoid arthritis. In: *Reumatismo* 70 (4), S. 212–224. DOI: 10.4081/reumatismo.2018.1106.

- Mathiessen, Alexander; Conaghan, Philip G. (2017): Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications. In: *Arthritis research & therapy* 19 (1), S. 18. DOI: 10.1186/s13075-017-1229-9.
- Mayeux, Richard (2004): Biomarkers: potential uses and limitations. In: *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 1 (2), S. 182–188. DOI: 10.1602/neurorx.1.2.182.
- McCulloch, Warren S.; Pitts, Walter (1943): A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity. In: *Bulletin of Mathematical Biophysics* 5 (4), S. 115–133. DOI: 10.1007/BF02478259.
- McShane, Lisa M.; Hayes, Daniel F. (2012): Publication of Tumor Marker Research Results: The Necessity for Complete and Transparent Reporting. In: *Journal of Clinical Oncology* 30 (34), S. 4223–4232. DOI: 10.1200/JCO.2012.42.6858.
- Mehta, Bella; Goodman, Susan; DiCarlo, Edward; Jannat-Khah, Deanna; Gibbons, J. Alex B.; Otero, Miguel et al. (2023): Machine learning identification of thresholds to discriminate osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial inflammation. In: *Arthritis research & therapy* 25 (1), S. 31. DOI: 10.1186/s13075-023-03008-8.
- Miazaki, Mauro; Viana, Matheus P.; Yang, Zhong; Comin, Cesar H.; Wang, Yaming; da F Costa, Luciano; Xu, Xiaoyin (2015): Automated high-content morphological analysis of muscle fiber histology. In: *Computers in biology and medicine* 63, S. 28–35. DOI: 10.1016/j.combiomed.2015.04.020.
- Mikuls, Ted R.; Sayles, Harlan; Yu, Fang; Levan, Tricia; Gould, Karen A.; Thiele, Geoffrey M. et al. (2010): Associations of cigarette smoking with rheumatoid arthritis in African Americans. In: *Arthritis & Rheumatism* 62 (12), S. 3560–3568. DOI: 10.1002/art.27716.
- Mindpeak Solutions/ Mindpeak Breast Ki-67 Rol. Online verfügbar unter <https://www.mindpeak.ai/products/mindpeak-breast-ki-67-roi>.
- Miyasaka, N.; Sato, K.; Yamamoto, K.; Goto, M.; Nishioka, K. (1989): Immunological and immunohistochemical analysis of rheumatoid nodules. In: *Annals of the rheumatic diseases* 48 (3), S. 220–226. DOI: 10.1136/ard.48.3.220.
- Moore, Helen M.; Kelly, Andrea; Jewell, Scott D.; McShane, Lisa M.; Clark, Douglas P.; Greenspan, Renata et al. (2011): Biospecimen Reporting for Improved Study Quality. In: *Biopreservation and biobanking* 9 (1), S. 57–70. DOI: 10.1089/bio.2010.0036.
- Morawietz, L.; Fernahl, G.; Krenn, V. (2008a): Differenzialdiagnostik der Synovialitis. In: *Der Pathologe* 29 Suppl 2, S. 218–222. DOI: 10.1007/s00292-008-1036-9.
- Morawietz, Lars; Schaeper, Frank; Schroeder, Joerg H.; Gansukh, Tserenchunt; Baasanjav, Nachin; Krukemeyer, Manfred G. et al. (2008b): Computer-assisted validation of the synovitis score. In: *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 452 (6), S. 667–673. DOI: 10.1007/s00428-008-0587-8.
- Muehlematter, Urs J.; Daniore, Paola; Vokinger, Kerstin N. (2021): Approval of artificial intelligence and machine learning-based medical devices in the USA and Europe (2015-20): a comparative analysis. In: *The Lancet. Digital health* 3 (3), e195–e203. DOI: 10.1016/S2589-7500(20)30292-2.
- Mula, Jyothi; Lee, Jonah D.; Liu, Fujun; Yang, Lin; Peterson, Charlotte A. (2013): Automated image analysis of skeletal muscle fiber cross-sectional area. In: *Journal of Applied Physiology* 114 (1), S. 148–155. DOI: 10.1152/jappphysiol.01022.2012.
- Najm, Aurélie; Le Goff, Benoît; Venet, Guillaume; Garraud, Thomas; Amiaud, Jérôme; Biha, Noura et al. (2019): IMSYC immunologic synovitis score: A new score for synovial membrane characterization in

inflammatory and non-inflammatory arthritis. In: *Joint bone spine* 86 (1), S. 77–81. DOI: 10.1016/j.jbspin.2018.04.004.

National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Nell, V. P. K.; Machold, K. P.; Stamm, T. A.; Eberl, G.; Heinzl, H.; Uffmann, M. et al. (2005): Autoantibody profiling as early diagnostic and prognostic tool for rheumatoid arthritis. In: *Annals of the rheumatic diseases* 64 (12), S. 1731–1736. DOI: 10.1136/ard.2005.035691.

Nielen, Markus M. J.; van Schaardenburg, Dirkjan; Reesink, Henk W.; van de Stadt, Rob J.; van der Horst-Bruinsma, Irene E.; Koning, Margret H. M. T. de et al. (2004): Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. In: *Arthritis and rheumatism* 50 (2), S. 380–386. DOI: 10.1002/art.20018.

Nielsen, Torsten O.; Leung, Samuel C. Y.; Rimm, David L.; Dodson, Andrew; Acs, Balazs; Badve, Sunil et al. (2021): Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Updated Recommendations From the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. In: *Journal of the National Cancer Institute* 113 (7), S. 808–819. DOI: 10.1093/jnci/djaa201.

NIENHUIS, R. L.; MANDEMA, E. (1964): A NEW SERUM FACTOR IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS; THE ANTIPERINUCLEAR FACTOR. In: *Annals of the rheumatic diseases* 23 (4), S. 302–305. DOI: 10.1136/ard.23.4.302.

Nishimura, Kunihiro; Sugiyama, Daisuke; Kogata, Yoshinori; Tsuji, Goh; Nakazawa, Takashi; Kawano, Seiji et al. (2007): Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. In: *Annals of internal medicine* 146 (11), S. 797–808. DOI: 10.7326/0003-4819-146-11-200706050-00008.

Ntatsaki, Eleana; Mooney, Janice; Scott, David G. I.; Watts, Richard A. (2014): Systemic rheumatoid vasculitis in the era of modern immunosuppressive therapy. In: *Rheumatology (Oxford, England)* 53 (1), S. 145–152. DOI: 10.1093/rheumatology/ket326.

Nygaard, Gyrid; Firestein, Gary S. (2020): Restoring synovial homeostasis in rheumatoid arthritis by targeting fibroblast-like synoviocytes. In: *Nature reviews. Rheumatology* 16 (6), S. 316–333. DOI: 10.1038/s41584-020-0413-5.

Oehler, S.; Neureiter, D.; Meyer-Scholten, C.; Aigner, T. (2002): Subtyping of osteoarthritic synoviopathy. In: *Clinical and experimental rheumatology* 20 (5), S. 633–640.

Orange, Dana E.; Agius, Phaedra; DiCarlo, Edward F.; Mirza, Serene Z.; Pannellini, Tania; Szymonifka, Jackie et al. (2019): Histologic and Transcriptional Evidence of Subclinical Synovial Inflammation in Patients With Rheumatoid Arthritis in Clinical Remission. In: *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* 71 (7), S. 1034–1041. DOI: 10.1002/art.40878.

Orange, Dana E.; Yao, Vicky; Sawicka, Kirsty; Fak, John; Frank, Mayu O.; Parveen, Salina et al. (2020): RNA Identification of PRIME Cells Predicting Rheumatoid Arthritis Flares. In: *The New England journal of medicine* 383 (3), S. 218–228. DOI: 10.1056/NEJMoa2004114.

Orr, Carl; Vieira-Sousa, Elsa; Boyle, David L.; Buch, Maya H.; Buckley, Christopher D.; Cañete, Juan D. et al. (2017): Synovial tissue research: a state-of-the-art review. In: *Nature reviews. Rheumatology* 13 (8), S. 463–475. DOI: 10.1038/nrrheum.2017.115.

Palmer, D. G.; Hogg, N.; Highton, J.; Hessian, P. A.; Denholm, I. (1987): Macrophage migration and maturation within rheumatoid nodules. In: *Arthritis and rheumatism* 30 (7), S. 728–736. DOI: 10.1002/art.1780300702.

- Pantanowitz, Liron; Quiroga-Garza, Gabriela M.; Bien, Lilach; Heled, Ronen; Laifenfeld, Daphna; Linhart, Chaim et al. (2020): An artificial intelligence algorithm for prostate cancer diagnosis in whole slide images of core needle biopsies: a blinded clinical validation and deployment study. In: *The Lancet. Digital health* 2 (8), e407-e416. DOI: 10.1016/S2589-7500(20)30159-X.
- Panush, R. S.; Katz, P.; Longley, S.; Carter, R.; Love, J.; Stanley, H. (1983): Rheumatoid vasculitis: diagnostic and therapeutic decisions. In: *Clin Rheumatol* 2 (4), S. 321–330. DOI: 10.1007/BF02041550.
- Pathmanathan, Nirmala; Balleine, Rosemary L. (2013): Ki67 and proliferation in breast cancer. In: *Journal of clinical pathology* 66 (6), S. 512–516. DOI: 10.1136/jclinpath-2012-201085.
- Pei, Linmin; Vidyaratne, Lasitha; Rahman, Md Monibor; Iftekharuddin, Khan M. (2020): Context aware deep learning for brain tumor segmentation, subtype classification, and survival prediction using radiology images. In: *Scientific reports* 10. DOI: 10.1038/s41598-020-74419-9.
- Pessler, F.; Dai, L.; Diaz-Torne, C.; Gomez-Vaquero, C.; Paessler, M. E.; Zheng, D-H et al. (2008a): The synovitis of "non-inflammatory" orthopaedic arthropathies: a quantitative histological and immunohistochemical analysis. In: *Annals of the rheumatic diseases* 67 (8), S. 1184–1187. DOI: 10.1136/ard.2008.087775.
- Pessler, F.; Ogdie, A.; Diaz-Torne, C.; Dai, L.; Yu, X.; Einhorn, E. et al. (2008b): Subintimal Ki-67 as a synovial tissue biomarker for inflammatory arthropathies. In: *Annals of the rheumatic diseases* 67 (2), S. 162–167. DOI: 10.1136/ard.2007.071670.
- Pezzilli, Raffaele; Partelli, Stefano; Cannizzaro, Renato; Pagano, Nico; Crippa, Stefano; Pagnanelli, Michele; Falconi, Massimo (2016): Ki-67 prognostic and therapeutic decision driven marker for pancreatic neuroendocrine neoplasms (PNEs): A systematic review. In: *Advances in medical sciences* 61 (1), S. 147–153. DOI: 10.1016/j.advms.2015.10.001.
- Pons, Laura; Hernández-León, Laura; Altaleb, Ahmad; Ussene, Esperança; Iglesias, Roman; Castillo, Ana et al. (2022): Conventional and digital Ki67 evaluation and their correlation with molecular prognosis and morphological parameters in luminal breast cancer. In: *Scientific reports* 12. DOI: 10.1038/s41598-022-11411-5.
- Pyo, Jung-Soo; Kang, Guhyun; Sohn, Jin Hee (2016): Ki-67 labeling index can be used as a prognostic marker in gastrointestinal stromal tumor: a systematic review and meta-analysis. In: *The International journal of biological markers* 31 (2), e204-10. DOI: 10.5301/jbm.5000183.
- Radhakrishnan, Adityanarayanan; Damodaran, Karthik; Soylemezoglu, Ali C.; Uhler, Caroline; Shivashankar, G. V. (2017): Machine Learning for Nuclear Mechano-Morphometric Biomarkers in Cancer Diagnosis. In: *Scientific reports* 7. DOI: 10.1038/s41598-017-17858-1.
- Rahmanzadeh, R.; Hüttmann, G.; Gerdes, J.; Scholzen, T. (2007): Chromophore-assisted light inactivation of pKi-67 leads to inhibition of ribosomal RNA synthesis. In: *Cell proliferation* 40 (3), S. 422–430. DOI: 10.1111/j.1365-2184.2007.00433.x.
- Ranganathan, Prabha (2008): Pharmacogenomics in rheumatoid arthritis. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 448, S. 413–435. DOI: 10.1007/978-1-59745-205-2\_14.
- Reece, R. J.; Canete, J. D.; Parsons, W. J.; Emery, P.; Veale, D. J. (1999): Distinct vascular patterns of early synovitis in psoriatic, reactive, and rheumatoid arthritis. In: *Arthritis & Rheumatism* 42 (7), S. 1481–1484. DOI: 10.1002/1529-0131(199907)42:7<1481::AID-ANR23>3.0.CO;2-E.
- Revell, P. A.; Mayston, V.; Lalor, P.; Mapp, P. (1988): The synovial membrane in osteoarthritis: a histological study including the characterisation of the cellular infiltrate present in inflammatory

osteoarthritis using monoclonal antibodies. In: *Annals of the rheumatic diseases* 47 (4), S. 300–307. DOI: 10.1136/ard.47.4.300.

Richards-Taylor, Sebastian; Ewings, Sean M.; Jaynes, Eleanor; Tilley, Charles; Ellis, Sarah G.; Armstrong, Thomas et al. (2016): The assessment of Ki-67 as a prognostic marker in neuroendocrine tumours: a systematic review and meta-analysis. In: *Journal of clinical pathology* 69 (7), S. 612–618. DOI: 10.1136/jclinpath-2015-203340.

Richeldi, Luca; Du Bois, Roland M.; Raghu, Ganesh; Azuma, Arata; Brown, Kevin K.; Costabel, Ulrich et al. (2014): Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. In: *The New England journal of medicine* 370 (22), S. 2071–2082. DOI: 10.1056/NEJMoa1402584.

Rieck, Mary; Arechiga, Adrian; Onengut-Gumuscu, Suna; Greenbaum, Carla; Concannon, Patrick; Buckner, Jane H. (2007): Genetic variation in PTPN22 corresponds to altered function of T and B lymphocytes. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 179 (7), S. 4704–4710. DOI: 10.4049/jimmunol.179.7.4704.

Rivellese, F.; Humby, F.; Bugatti, S.; Fossati-Jimack, L.; Rizvi, H.; Lucchesi, D. et al. (2020): B Cell Synovitis and Clinical Phenotypes in Rheumatoid Arthritis: Relationship to Disease Stages and Drug Exposure. In: *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* 72 (5), S. 714–725. DOI: 10.1002/art.41184.

Ronneberger, Olaf; Fischer, Philipp; Brox, Thomas (2015): U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation. In: Nassir Navab, Joachim Hornegger, William M. Wells und Alejandro F. Frangi (Hg.): *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention - MICCAI 2015*, Bd. 9351. Cham: Springer Nature (Lecture Notes in Computer Science), S. 234–241.

Rooney, Terence; Bresnihan, Barry; Andersson, Ulf; Gogarty, Martina; Kraan, Maarten; Schumacher, H. Ralph et al. (2007): Microscopic measurement of inflammation in synovial tissue: inter-observer agreement for manual quantitative, semiquantitative and computerised digital image analysis. In: *Annals of the rheumatic diseases* 66 (12), S. 1656–1660. DOI: 10.1136/ard.2006.061143.

Rozman, Blaz (2002): Clinical pharmacokinetics of leflunomide. In: *Clinical pharmacokinetics* 41 (6), S. 421–430. DOI: 10.2165/00003088-200241060-00003.

Saag, Kenneth G.; Teng, Gim Gee; Patkar, Nivedita M.; Anuntiyo, Jeremy; Finney, Catherine; Curtis, Jeffrey R. et al. (2008): American College of Rheumatology 2008 recommendations for the use of nonbiologic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis. In: *Arthritis and rheumatism* 59 (6), S. 762–784. DOI: 10.1002/art.23721.

Saeidmehr, Amirhossein; Steel, Piers David Gareth; Samavati, Faramarz F. (2024): Systematic review using a spiral approach with machine learning. In: *Systematic reviews* 13 (1), S. 32. DOI: 10.1186/s13643-023-02421-z.

Sagar, Gaurav; Syrovatskyi, Vitalii (2023): Artificial Intelligence: Making Machines Learn. In: GAURAV, SYROVATSKYI VITALII SAGAR (Hg.): *TECHNICAL BUILDING BLOCKS. A technology reference for professionals working with engineering teams*. [S.l.]: Apress, S. 213–274.

Saiwaki, Takuya; Kotera, Ippei; Sasaki, Mitsuho; Takagi, Masatoshi; Yoneda, Yoshihiro (2005): In vivo dynamics and kinetics of pKi-67: transition from a mobile to an immobile form at the onset of anaphase. In: *Experimental cell research* 308 (1), S. 123–134. DOI: 10.1016/j.yexcr.2005.04.010.

Sauerbrei, Willi; Taube, Sheila E.; McShane, Lisa M.; Cavenagh, Margaret M.; Altman, Douglas G. (2018): Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK): An Abridged Explanation and Elaboration. In: *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 110 (8), S. 803–811. DOI: 10.1093/jnci/djy088.

- Sayah, Anousheh; English, Joseph C. (2005): Rheumatoid arthritis: a review of the cutaneous manifestations. In: *Journal of the American Academy of Dermatology* 53 (2), 191-209; quiz 210-2. DOI: 10.1016/j.jaad.2004.07.023.
- Schaser, K.; Kinne, R. W.; Beil, H.; Kladny, B.; Stöss, H. (1996): Proliferation von T-Zellen, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Fibroblasten-ähnlichen Zellen in der Synovialmembran von Patienten mit rheumatoider Arthritis. In: *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 80, S. 276–280.
- Scherer, Hans Ulrich; Häupl, Thomas; Burmester, Gerd R. (2020): The etiology of rheumatoid arthritis. In: *Journal of autoimmunity* 110, S. 102400. DOI: 10.1016/j.jaut.2019.102400.
- Schlüter, C.; Duchrow, M.; Wohlenberg, C.; Becker, M. H.; Key, G.; Flad, H. D.; Gerdes, J. (1993): The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. In: *The Journal of cell biology* 123 (3), S. 513–522. DOI: 10.1083/jcb.123.3.513.
- Schmidt, M. H. H.; Broll, Rainer; Bruch, Hans-Peter; Bögl, Oliver; Duchrow, Michael (2003): The proliferation marker pKi-67 organizes the nucleolus during the cell cycle depending on Ran and cyclin B. In: *The Journal of pathology* 199 (1), S. 18–27. DOI: 10.1002/path.1221.
- Schmidt, Tobias; Najm, Aurélie; Mussawy, Haider; Burghardt, Rolf; Oehler, Nicola; Krenn, Veit et al. (2019): General synovitis score and immunologic synovitis score reflect clinical disease activity in patients with advanced stage rheumatoid arthritis. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 8448. DOI: 10.1038/s41598-019-44895-9.
- Scholzen, Thomas; Endl, Elmar; Wohlenberg, Claudia; van der Sar, Sjaak; Cowell, Ian G.; Gerdes, Johannes; Singh, Prim B. (2002): The Ki-67 protein interacts with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family: a potential role in the regulation of higher-order chromatin structure. In: *The Journal of pathology* 196 (2), S. 135–144. DOI: 10.1002/path.1016.
- Schornagel, J. H.; McVie, J. G. (1983): The clinical pharmacology of methotrexate. In: *Cancer treatment reviews* 10 (1), S. 53–75. DOI: 10.1016/s0305-7372(83)80032-2.
- Schumacher, H. Ralph (1988): Pathology of Crystal Deposition Diseases. In: *Rheumatic Disease Clinics of North America* 14 (2), S. 269–288. DOI: 10.1016/s0889-857x(21)00964-9.
- Scirè, Carlo Alberto; Epis, Oscar; Codullo, Veronica; Humby, Frances; Morbini, Patrizia; Manzo, Antonio et al. (2007): Immunohistological assessment of the synovial tissue in small joints in rheumatoid arthritis: validation of a minimally invasive ultrasound-guided synovial biopsy procedure. In: *Arthritis research & therapy* 9 (5), R101. DOI: 10.1186/ar2302.
- Scott, David L.; Wolfe, Frederick; Huizinga, Tom W. J. (2010): Rheumatoid arthritis. In: *Lancet (London, England)* 376 (9746), S. 1094–1108. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60826-4.
- Scott, I. C.; Machin, A.; Mallen, C. D.; Hider, S. L. (2018): The extra-articular impacts of rheumatoid arthritis: moving towards holistic care. In: *BMC rheumatology* 2, S. 32. DOI: 10.1186/s41927-018-0039-2.
- Scott D.G., Bacon P.A., Tribe C.R. (1981): Systemic rheumatoid vasculitis: a clinical and laboratory study of 50 cases. Online verfügbar unter [https://journals.lww.com/md-journal/citation/1981/07000/systemic\\_rheumatoid\\_vasculitis\\_\\_a\\_clinical\\_and.4.aspx](https://journals.lww.com/md-journal/citation/1981/07000/systemic_rheumatoid_vasculitis__a_clinical_and.4.aspx).
- Sertel, Olcay; Dogdas, Belma; Chiu, Chi Sung; Gurcan, Metin N. (2011): Microscopic image analysis for quantitative characterization of muscle fiber type composition. In: *Computerized medical imaging*

- and graphics : the official journal of the Computerized Medical Imaging Society* 35 (7-8), S. 616–628. DOI: 10.1016/j.compmedimag.2011.01.009.
- Silman, Alan J.; Pearson, Jacqueline E. (2002): Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. In: *Arthritis research* 4 Suppl 3 (Suppl 3), S265-72. DOI: 10.1186/ar578.
- Slansky, Elisabeth; Li, Jialiang; Häupl, Thomas; Morawietz, Lars; Krenn, Veit; Pessler, Frank (2010): Quantitative determination of the diagnostic accuracy of the synovitis score and its components. In: *Histopathology* 57 (3), S. 436–443. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2010.03641.x.
- Smith, Lucas R.; Barton, Elisabeth R. (2014): SMASH - semi-automatic muscle analysis using segmentation of histology: a MATLAB application. In: *Skeletal muscle* 4, S. 21. DOI: 10.1186/2044-5040-4-21.
- Smith, M. D.; Barg, E.; Weedon, H.; Papangelis, V.; Smeets, T.; Tak, P. P. et al. (2003): Microarchitecture and protective mechanisms in synovial tissue from clinically and arthroscopically normal knee joints. In: *Annals of the rheumatic diseases* 62 (4), S. 303–307. DOI: 10.1136/ard.62.4.303.
- Smith, Malcolm D. (2011): The normal synovium. In: *The open rheumatology journal* 5, S. 100–106. DOI: 10.2174/1874312901105010100.
- Smolen, Josef S.; Aletaha, Daniel; Koeller, Marcus; Weisman, Michael H.; Emery, Paul (2007): New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. In: *Lancet (London, England)* 370 (9602), S. 1861–1874. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)60784-3.
- Smolen, Josef S.; Aletaha, Daniel; McInnes, Iain B. (2016): Rheumatoid arthritis. In: *Lancet (London, England)* 388 (10055), S. 2023–2038. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)30173-8.
- Smolen, Josef S.; Beaulieu, Andre; Rubbert-Roth, Andrea; Ramos-Remus, Cesar; Rovensky, Josef; Alecock, Emma et al. (2008): Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomised trial. In: *Lancet (London, England)* 371 (9617), S. 987–997. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)60453-5.
- Smolen, Josef S.; Landewé, Robert B. M.; Bijlsma, Johannes W. J.; Burmester, Gerd R.; Dougados, Maxime; Kerschbaumer, Andreas et al. (2020): EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. In: *Annals of the rheumatic diseases* 79 (6), S. 685–699. DOI: 10.1136/annrheumdis-2019-216655.
- Sobecki, Michal; Mrouj, Karim; Camasses, Alain; Parisi, Nikolaos; Nicolas, Emilien; Llères, David et al. (2016): The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin. In: *eLife* 5, e13722. DOI: 10.7554/eLife.13722.
- Sobecki, Michal; Mrouj, Karim; Colinge, Jacques; Gerbe, François; Jay, Philippe; Krasinska, Liliana et al. (2017): Cell-Cycle Regulation Accounts for Variability in Ki-67 Expression Levels. In: *Cancer research* 77 (10), S. 2722–2734. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0707.
- Spearman, C. (1904): The Proof and Measurement of Association between Two Things. In: *The American Journal of Psychology* 15 (1), S. 72. DOI: 10.2307/1412159.
- Stålhammar, Gustav; Fuentes Martinez, Nelson; Lippert, Michael; Tobin, Nicholas P.; Møhlholm, Ida; Kis, Lorand et al. (2016): Digital image analysis outperforms manual biomarker assessment in breast cancer. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 29 (4), S. 318–329. DOI: 10.1038/modpathol.2016.34.
- Starborg, M.; Gell, K.; Brundell, E.; Höög, C. (1996): The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. In: *Journal of cell science* 109 (Pt 1), S. 143–153. DOI: 10.1242/jcs.109.1.143.

- Steiner, David F.; MacDonald, Robert; Liu, Yun; Truszkowski, Peter; Hipp, Jason D.; Gammage, Christopher et al. (2018): Impact of Deep Learning Assistance on the Histopathologic Review of Lymph Nodes for Metastatic Breast Cancer. In: *The American Journal of Surgical Pathology* 42 (12), S. 1636–1646. DOI: 10.1097/PAS.0000000000001151.
- Stevens, C. R.; Mapp, P. I.; Revell, P. A. (1990): A monoclonal antibody (Mab 67) marks type B synovio-cytes. In: *Rheumatology international* 10 (3), S. 103–106. DOI: 10.1007/BF02274823.
- Stolt, P.; Källberg, H.; Lundberg, I.; Sjögren, B.; Klareskog, L.; Alfredsson, L. (2005): Silica exposure is associated with increased risk of developing rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA study. In: *Annals of the rheumatic diseases* 64 (4), S. 582–586. DOI: 10.1136/ard.2004.022053.
- Sugiyama, D.; Nishimura, K.; Tamaki, K.; Tsuji, G.; Nakazawa, T.; Morinobu, A.; Kumagai, S. (2010): Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. In: *Annals of the rheumatic diseases* 69 (1), S. 70–81. DOI: 10.1136/ard.2008.096487.
- Sultan, Ahmed S.; Elgharib, Mohamed A.; Tavares, Tiffany; Jessri, Maryam; Basile, John R. (2020): The use of artificial intelligence, machine learning and deep learning in oncologic histopathology. In: *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 49 (9), S. 849–856. DOI: 10.1111/jop.13042.
- Sun, Xiaoming; Kaufman, Paul D. (2018): Ki-67: more than a proliferation marker. In: *Chromosoma* 127 (2), S. 175–186. DOI: 10.1007/s00412-018-0659-8.
- Suzuki, Akari; Yamada, Ryo; Chang, Xiaotian; Tokuhira, Shinya; Sawada, Tetsuji; Suzuki, Masakatsu et al. (2003): Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. In: *Nature genetics* 34 (4), S. 395–402. DOI: 10.1038/ng1206.
- Swann, D. A.; Radin, E. L.; Nazimiec, M.; Weisser, P. A.; Curran, N.; Lewinnek, G. (1974): Role of hyaluronic acid in joint lubrication. In: *Annals of the rheumatic diseases* 33 (4), S. 318–326. DOI: 10.1136/ard.33.4.318.
- Szekanecz, Zoltán; Koch, Alisa E. (2007): Mechanisms of Disease: angiogenesis in inflammatory diseases. In: *Nature clinical practice. Rheumatology* 3 (11), S. 635–643. DOI: 10.1038/ncprheum0647.
- Tak, P. P.; Smeets, T. J.; Daha, M. R.; Kluin, P. M.; Meijers, K. A.; Brand, R. et al. (1997): Analysis of the synovial cell infiltrate in early rheumatoid synovial tissue in relation to local disease activity. In: *Arthritis and rheumatism* 40 (2), S. 217–225. DOI: 10.1002/art.1780400206.
- Takagi, M.; Matsuoka, Y.; Kurihara, T.; Yoneda, Y. (1999): Chmadrin: a novel Ki-67 antigen-related perichromosomal protein possibly implicated in higher order chromatin structure. In: *Journal of cell science* 112 (Pt 15), S. 2463–2472. DOI: 10.1242/jcs.112.15.2463.
- Takagi, Masatoshi; Ono, Takao; Natsume, Toyoaki; Sakamoto, Chiyomi; Nakao, Mitsuyoshi; Saitoh, Noriko et al. (2017): Ki-67 and condensins support the integrity of mitotic chromosomes through distinct mechanisms.
- Tan, Yvonne; Buch, Maya H. (2022): 'Difficult to treat' rheumatoid arthritis: current position and considerations for next steps. In: *RMD open* 8 (2). DOI: 10.1136/rmdopen-2022-002387.
- Tao, Zhiwei; Xue, Runxin; Wei, Zhongcao; Qin, Lingzhi; Bai, Rui; Liu, Na et al. (2023): The assessment of Ki-67 for prognosis of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasm patients: a systematic review and meta-analysis. In: *Translational cancer research* 12 (8), S. 1980–1991. DOI: 10.21037/tcr-23-248.

- Turesson, C.; Jacobsson, L. T. H. (2004): Epidemiology of extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. In: *Scandinavian journal of rheumatology* 33 (2), S. 65–72. DOI: 10.1080/03009740310004621.
- Urruticoechea, Ander; Smith, Ian E.; Dowsett, Mitch (2005): Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. In: *Journal of Clinical Oncology* 23 (28), S. 7212–7220. DOI: 10.1200/JCO.2005.07.501.
- van de Sande, Marleen G.; Baeten, Dominique L. (2016): Immunopathology of synovitis: from histology to molecular pathways. In: *Rheumatology (Oxford, England)* 55 (4), S. 599–606. DOI: 10.1093/rheumatology/kev330.
- van den Berg, Eunice Joy; Duarte, Raquel; Dickens, Caroline; Joffe, Maureen; Mohanlal, Reena (2021): Ki67 immunohistochemistry quantification in breast carcinoma: A comparison of visual estimation, counting and Immunoratio©. In: *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM* 29 (2), S. 105–111. DOI: 10.1097/PAI.0000000000000864.
- van der Helm-van Mil, Annette H. M.; Verpoort, Kirsten N.; Breedveld, Ferdinand C.; Toes, René E. M.; Huizinga, Tom W. J. (2005): Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis. In: *Arthritis research & therapy* 7 (5), R949–58. DOI: 10.1186/ar1767.
- van der Woude, Diane; van der Helm-van Mil, Annette H. M. (2018): Update on the epidemiology, risk factors, and disease outcomes of rheumatoid arthritis. In: *Best practice & research. Clinical rheumatology* 32 (2), S. 174–187. DOI: 10.1016/j.berh.2018.10.005.
- van Leeuwen, M. A.; van Rijswijk, M. H.; van der Heijde, D. M.; Te Meerman, G. J.; van Riel, P. L.; Houtman, P. M. et al. (1993): The acute-phase response in relation to radiographic progression in early rheumatoid arthritis: a prospective study during the first three years of the disease. In: *British journal of rheumatology* 32 Suppl 3, S. 9–13. DOI: 10.1093/rheumatology/32.suppl\_3.9.
- van Steenbergen, Hanna W.; Aletaha, Daniel; Beart-van de Voorde, Liesbeth J. J.; Brouwer, Elisabeth; Codreanu, Catalin; Combe, Bernard et al. (2017): EULAR definition of arthralgia suspicious for progression to rheumatoid arthritis. In: *Annals of the rheumatic diseases* 76 (3), S. 491–496. DOI: 10.1136/annrheumdis-2016-209846.
- Varga, Zsuzsanna; Diebold, Joachim; Dommann-Scherrer, Corina; Frick, Harald; Kaup, Daniela; Noske, Aurelia et al. (2012): How Reliable Is Ki-67 Immunohistochemistry in Grade 2 Breast Carcinomas? A QA Study of the Swiss Working Group of Breast- and Gynecopathologists. In: *PLoS one* 7 (5). DOI: 10.1371/journal.pone.0037379.
- Venerito, Vincenzo; Angelini, Orazio; Cazzato, Gerardo; Lopalco, Giuseppe; Maiorano, Eugenio; Cimmino, Antonietta; Iannone, Florenzo (2021): A convolutional neural network with transfer learning for automatic discrimination between low and high-grade synovitis: a pilot study. In: *Internal and emergency medicine* 16 (6), S. 1457–1465. DOI: 10.1007/s11739-020-02583-x.
- Verheijen, R.; Kuijpers, H. J.; Schlingemann, R. O.; Boehmer, A. L.; van Driel, R.; Brakenhoff, G. J.; Ramaekers, F. C. (1989a): Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. I. Intracellular localization during interphase. In: *Journal of cell science* 92 (Pt 1), S. 123–130. DOI: 10.1242/jcs.92.1.123.
- Verheijen, R.; Kuijpers, H. J.; van Driel, R.; Beck, J. L.; van Dierendonck, J. H.; Brakenhoff, G. J.; Ramaekers, F. C. (1989b): Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. In: *Journal of cell science* 92 (Pt 4), S. 531–540. DOI: 10.1242/jcs.92.4.531.
- Viatte, Sebastien; Plant, Darren; Raychaudhuri, Soumya (2013): Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis. In: *Nature reviews. Rheumatology* 9 (3), S. 141–153. DOI: 10.1038/nrrheum.2012.237.

- Waalder, Erik (2007): On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. 1939. In: *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 115 (5), 422–38; discussion 439. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm\_682a.x.
- Wang, Yi-xing; Wang, Yuan-yuan; Yang, Cheng-gang; Bu, Hong; Yang, Wen-tao; Wang, Li et al. (2019): An interobserver reproducibility analysis of size-set semiautomatic counting for Ki67 assessment in breast cancer. In: *The Breast : official journal of the European Society of Mastology* 49, S. 225–232. DOI: 10.1016/j.breast.2019.12.009.
- Wasserman, Amy M. (2011): Diagnosis and management of rheumatoid arthritis. In: *American family physician* 84 (11), S. 1245–1252.
- Weinblatt, M. E.; Coblyn, J. S.; Fox, D. A.; Fraser, P. A.; Holdsworth, D. E.; Glass, D. N.; Trentham, D. E. (1985): Efficacy of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis. In: *The New England journal of medicine* 312 (13), S. 818–822. DOI: 10.1056/NEJM198503283121303.
- Winthrop KL (2012): Infections and biologic therapy in rheumatoid arthritis: our changing understanding of risk and prevention.
- Wu, Chao-Yi; Yang, Huang-Yu; Luo, Shue-Fen; Lai, Jenn-Haung (2021a): From Rheumatoid Factor to Anti-Citrullinated Protein Antibodies and Anti-Carbamylated Protein Antibodies for Diagnosis and Prognosis Prediction in Patients with Rheumatoid Arthritis. In: *International journal of molecular sciences* 22 (2). DOI: 10.3390/ijms22020686.
- Wu, Fengping; Gao, Jinfang; Kang, Jie; Wang, Xuexue; Niu, Qing; Liu, Jiayi; Zhang, Liyun (2021b): B Cells in Rheumatoid Arthritis : Pathogenic Mechanisms and Treatment Prospects. In: *Frontiers in immunology* 12, S. 750753. DOI: 10.3389/fimmu.2021.750753.
- Yang, Karren Dai; Belyaeva, Anastasiya; Venkatachalapathy, Saradha; Damodaran, Karthik; Katcoff, Abigail; Radhakrishnan, Adityanarayanan et al. (2021): Multi-domain translation between single-cell imaging and sequencing data using autoencoders. In: *Nature communications* 12. DOI: 10.1038/s41467-020-20249-2.
- Yang, Linjun; Coleman, Mitchell C.; Hines, Madeline R.; Kluz, Paige N.; Brouillette, Marc J.; Goetz, Jessica E. (2019): Deep Learning for Chondrocyte Identification in Automated Histological Analysis of Articular Cartilage. In: *The Iowa orthopaedic journal* 39 (2), S. 1–8.
- Yoshitomi, Hiroyuki (2019): Regulation of Immune Responses and Chronic Inflammation by Fibroblast-Like Synoviocytes. In: *Frontiers in immunology* 10, S. 1395. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01395.
- Zabaglo, Lila; Salter, Janine; Anderson, Helen; Quinn, Emma; Hills, Margaret; Detre, Simone et al. (2010): Comparative validation of the SP6 antibody to Ki67 in breast cancer. In: *Journal of clinical pathology* 63 (9), S. 800–804. DOI: 10.1136/jcp.2010.077578.
- Zhang, Xuan; Zhang, Dongya; Jia, Huijue; Feng, Qiang; Wang, Donghui; Di Liang et al. (2015): The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. In: *Nat Med* 21 (8), S. 895–905. DOI: 10.1038/nm.3914.
- Zhao, Kun; Ruan, Jiaqi; Nie, Liuyan; Ye, Xiangming; Li, Juebao (2023): Effects of synovial macrophages in osteoarthritis. In: *Frontiers in immunology* 14, S. 1164137. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1164137.
- Zheng, J-N; Pei, D-S; Mao, L-J; Liu, X-Y; Mei, D-D; Zhang, B-F et al. (2009): Inhibition of renal cancer cell growth in vitro and in vivo with oncolytic adenovirus armed short hairpin RNA targeting Ki-67 encoding mRNA. In: *Cancer gene therapy* 16 (1), S. 20–32. DOI: 10.1038/cgt.2008.61.
- Zheng, Jun-Nian; Ma, Teng-Xiang; Cao, Jing-Yi; Sun, Xiao-Qing; Chen, Jia-Cun; Li, Wang et al. (2006): Knockdown of Ki-67 by small interfering RNA leads to inhibition of proliferation and induction of

apoptosis in human renal carcinoma cells. In: *Life sciences* 78 (7), S. 724–729. DOI: 10.1016/j.lfs.2005.05.064.

Ziff, M. (1990): The rheumatoid nodule. In: *Arthritis and rheumatism* 33 (6), S. 761–767. DOI: 10.1002/art.1780330601.

## 8 Anhang

### Deskriptive Statistik

	Gruppe	Statistik	Standardfehler				
Ki-67 in Prozent	therapierefraktär high-grade	high-Mittelwert	19,4032	1,82407			
		95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	15,6203			
			Obergrenze	23,1861			
		5% getrimmtes Mittel	18,5950				
		Median	17,7737				
		Varianz	76,526				
		Standardabweichung	8,74792				
		Minimum	7,45				
		Maximum	47,56				
		Spannweite	40,10				
		Interquartilbereich	10,81				
		Schiefe	1,567	0,481			
		Kurtosis	3,823	0,935			
		nicht-therapierefraktär high-grade	Mittelwert	Mittelwert	21,5253	2,21865	
				95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	17,0212	
					Obergrenze	26,0294	
5% getrimmtes Mittel	20,0066						
Median	19,9298						
Varianz	177,206						
Standardabweichung	13,31189						
Minimum	6,22						
Maximum	80,49						
Spannweite	74,27						
Interquartilbereich	11,51						
Schiefe	2,659			0,393			
Kurtosis	10,456			0,768			
Osteoarthritis low-grade	Mittelwert			Mittelwert	4,1666	0,82904	
				Untergrenze	2,4425		

	95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Obergrenze	5,8907	
	5% getrimmtes Mittel		3,6810	
	Median		3,3845	
	Varianz		15,121	
	Standardabweichung		3,88855	
	Minimum		0,30	
	Maximum		17,36	
	Spannweite		17,06	
	Interquartilbereich		3,90	
	Schiefe		2,095	0,491
	Kurtosis		5,587	0,953
Gesamtzellzahl/HPF	therapierefraktär	high-Mittelwert	2293,13	253,210
		95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	1768,01
			Obergrenze	2818,26
		5% getrimmtes Mittel		2253,03
		Median		2097,00
		Varianz		1474650,119
		Standardabweichung		1214,352
		Minimum		399
		Maximum		4977
		Spannweite		4578
		Interquartilbereich		2282
		Schiefe		0,496
		Kurtosis		0,481
	nicht-therapierefraktär	Mittelwert	1445,64	123,726
	high-grade	95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	1194,46
			Obergrenze	1696,82
		5% getrimmtes Mittel		1411,01
		Median		1256,50
		Varianz		551094,237
		Standardabweichung		742,357
		Minimum		504
		Maximum		3307
		Spannweite		2803
		Interquartilbereich		1219
		Schiefe		0,731
				0,393

Kurtosis	-0,438	0,768
Osteoarthritis low-grade Mittelwert	1313,00	129,902
95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze 1042,85	
	Obergrenze 1583,15	
5% getrimmtes Mittel	1302,56	
Median	1256,50	
Varianz	371239,714	
Standardabweichung	609,294	
Minimum	432	
Maximum	2389	
Spannweite	1957	
Interquartilbereich	1055	
Schiefe	0,312	0,491
Kurtosis	-1,104	0,953

Tabelle 11: Deskriptive Statistik - Ki-67-Positivität in %, Gesamtzellzahl/HPF, Gruppen: 1 = therapierefraktäre high-grade Synovialitis, 2 = nicht-therapierefraktäre high-grade Synovialitis; 3 = low-grade Osteoarthritis. Eigene Darstellung.

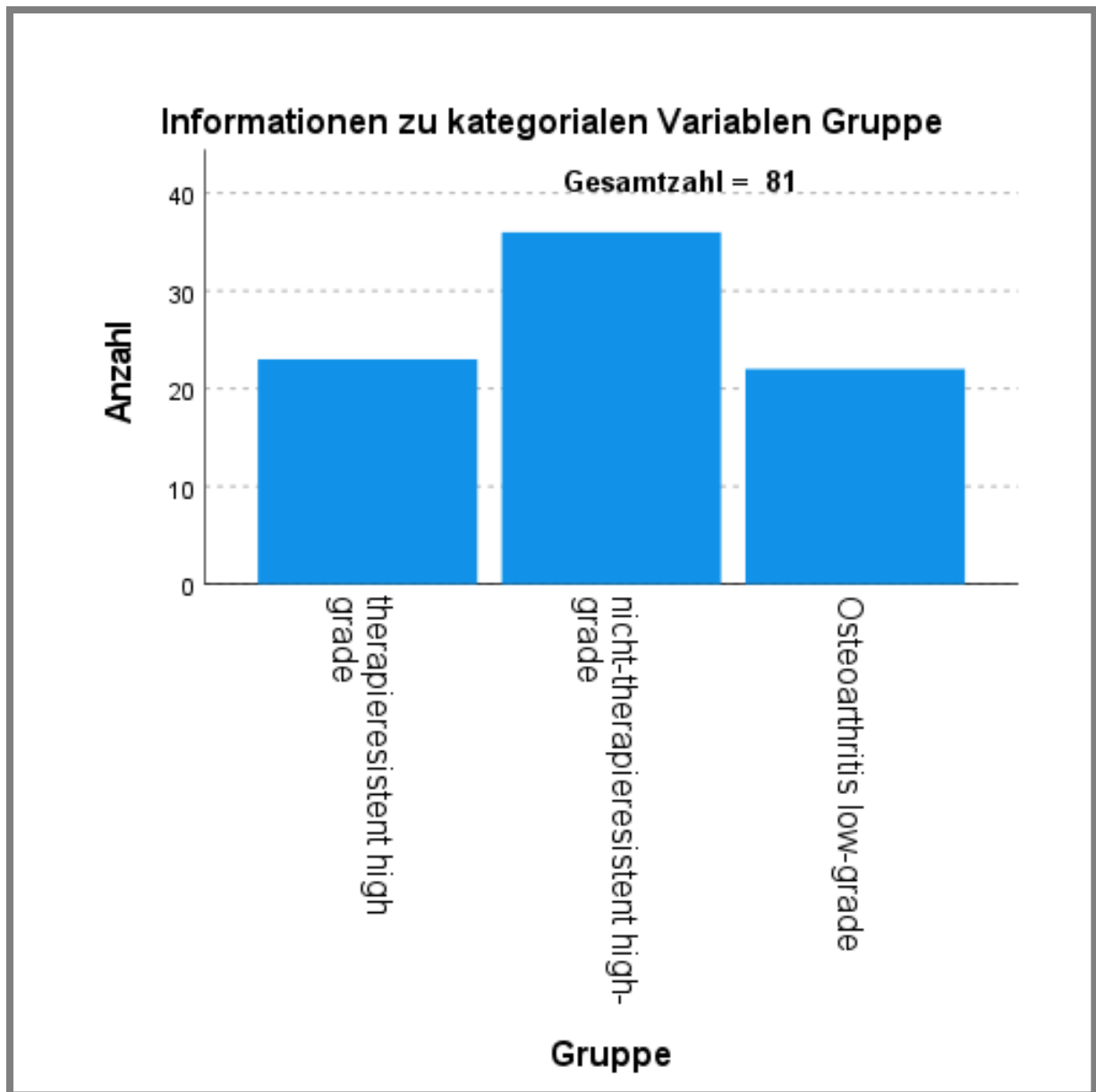


Abbildung 23: Gruppenverteilung. Eigene Darstellung.

	Zeitdifferenz in s	Zeit manuell in s	Zeit mit KI in s
N	5	5	5
Mittelwert	79,6000	84,280	4,680
Median	75,2000	80,000	4,700
Std.-Abweichung	21,97874	22,0194	0,1304
Schiefe	1,148	1,156	-0,541
Standardfehler der Schiefe	0,913	0,913	0,913
Minimum	61,10	65,8	4,5
Maximum	114,20	119,0	4,8

Perzentile	25	61,2500	65,900	4,550
	50	75,2000	80,000	4,700
	75	100,1500	104,800	4,800

Tabelle 12: Zeiterfassung - therapierefraktäre high-grade Synovialitis. Eigene Darstellung.

		Zeitdifferenz in s	Zeit manuell in s	Zeit mit KI in s
N		5	5	5
Mittelwert		3,8200	8,300	4,480
Median		3,4000	8,600	4,300
Std.-Abweichung		3,63758	3,5644	0,4087
Schiefe		0,563	0,323	2,070
Standardfehler der Schiefe		0,913	0,913	0,913
Minimum		-0,80	3,6	4,2
Maximum		9,30	13,5	5,2
Perzentile	25	1,0000	5,350	4,250
	50	3,4000	8,600	4,300
	75	6,8500	11,100	4,800

Tabelle 13: Zeiterfassung - low-grade Osteoarthritis. Eigene Darstellung.

### Tests auf Normalverteilung

	Gruppe	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Ki-67 in Prozent	therapierefraktäre high-grade	0,166	23	0,098	0,885	23	0,013
	nicht-therapierefraktär high-grade	0,212	36	0,000	0,761	36	0,000
	Osteoarthritis low-grade	0,173	22	0,084	0,791	22	0,000
Gesamtzellzahl/HPF	therapierefraktär high-grade	0,158	23	0,143	0,958	23	0,418
	nicht-therapierefraktär high-grade	0,150	36	0,040	0,915	36	0,009
	Osteoarthritis low-grade	0,139	22	0,200*	0,942	22	0,217

Tabelle 14: Prüfung auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test und mittels Shapiro-Wilk-Test; a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors. Eigene Darstellung.

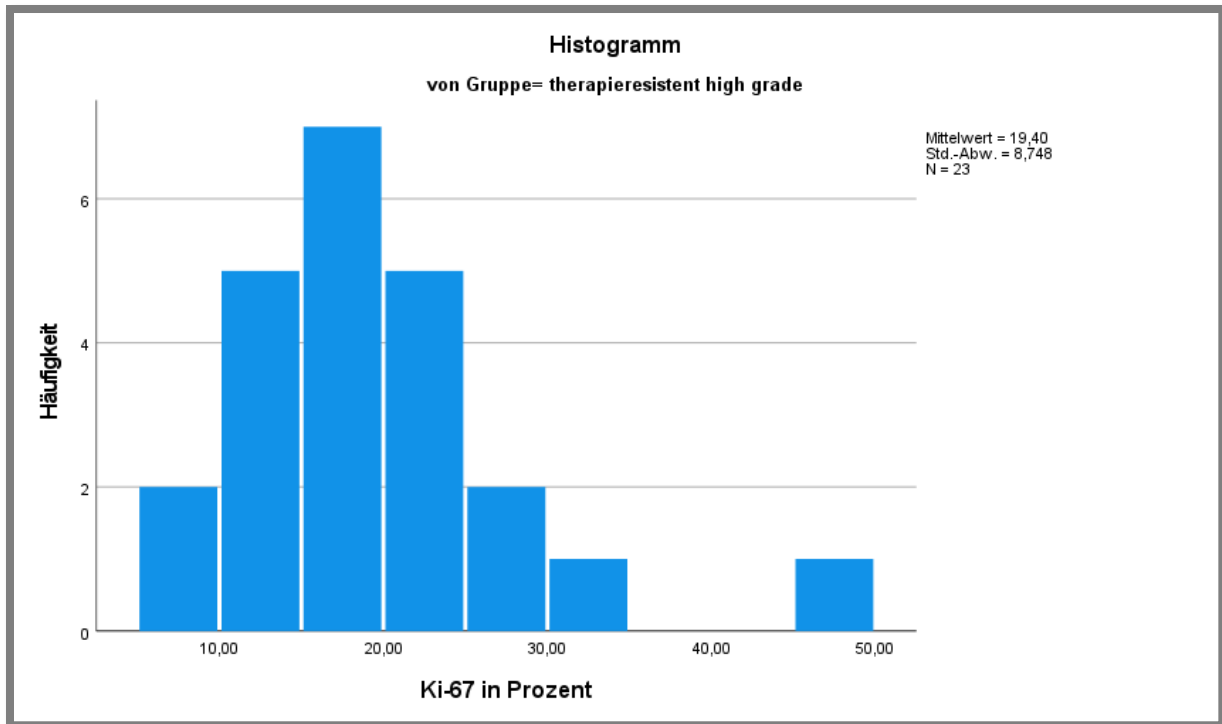


Abbildung 24: Prüfung auf Normalverteilung von Ki-67 in % - therapierefraktäre high-grade Synovialitis. Eigene Darstellung.

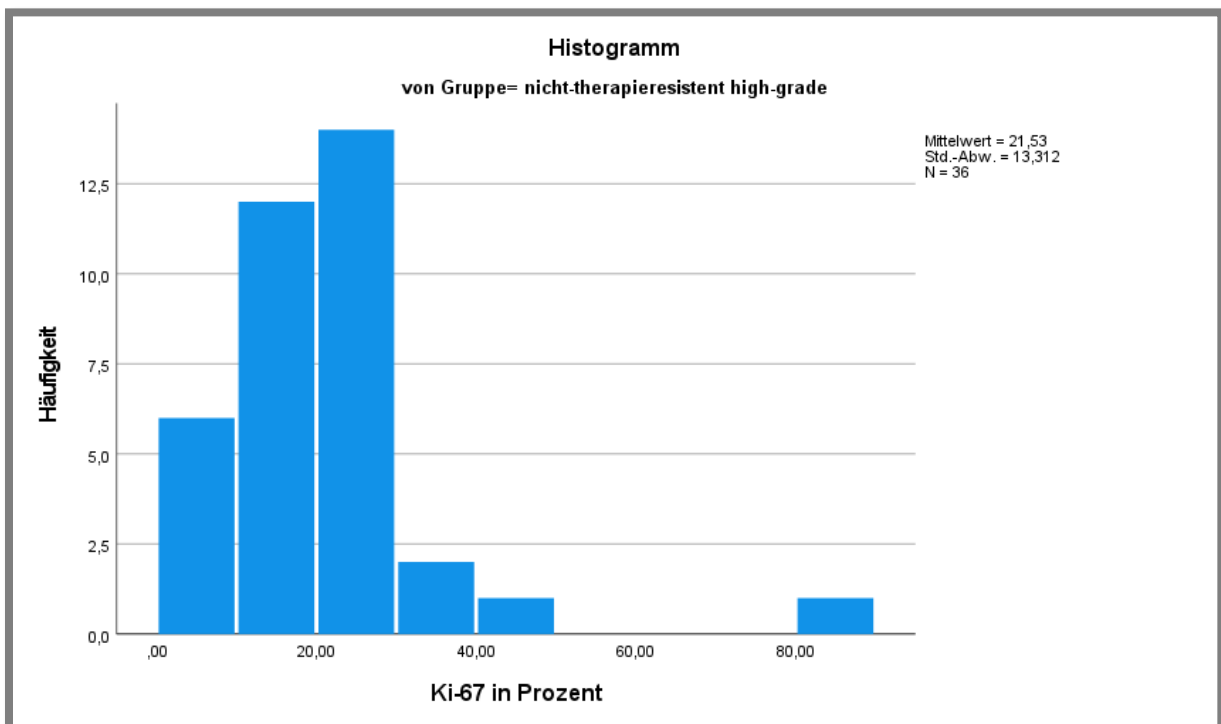


Abbildung 25: Prüfung auf Normalverteilung von Ki-67 in % - nicht-therapierefraktäre high-grade Synovialitis. Eigene Darstellung.

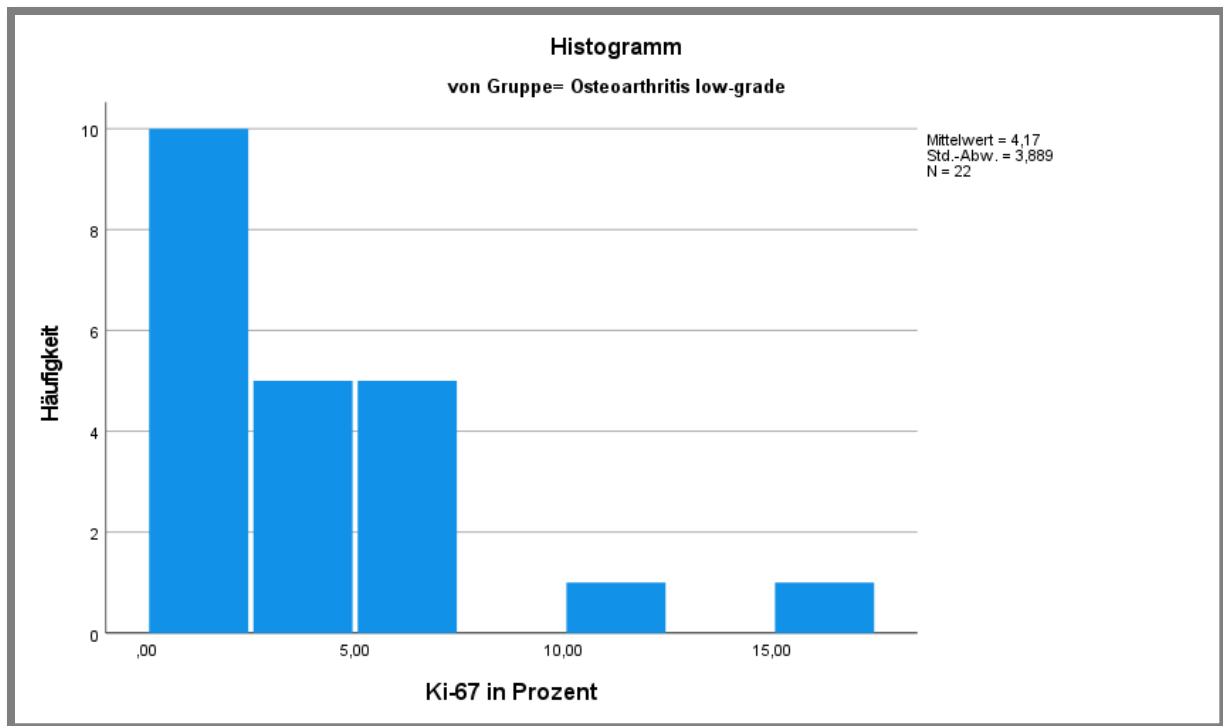


Abbildung 26: Prüfung auf Normalverteilung von Ki-67 in % - low-grade Osteoarthritis. Eigene Darstellung.

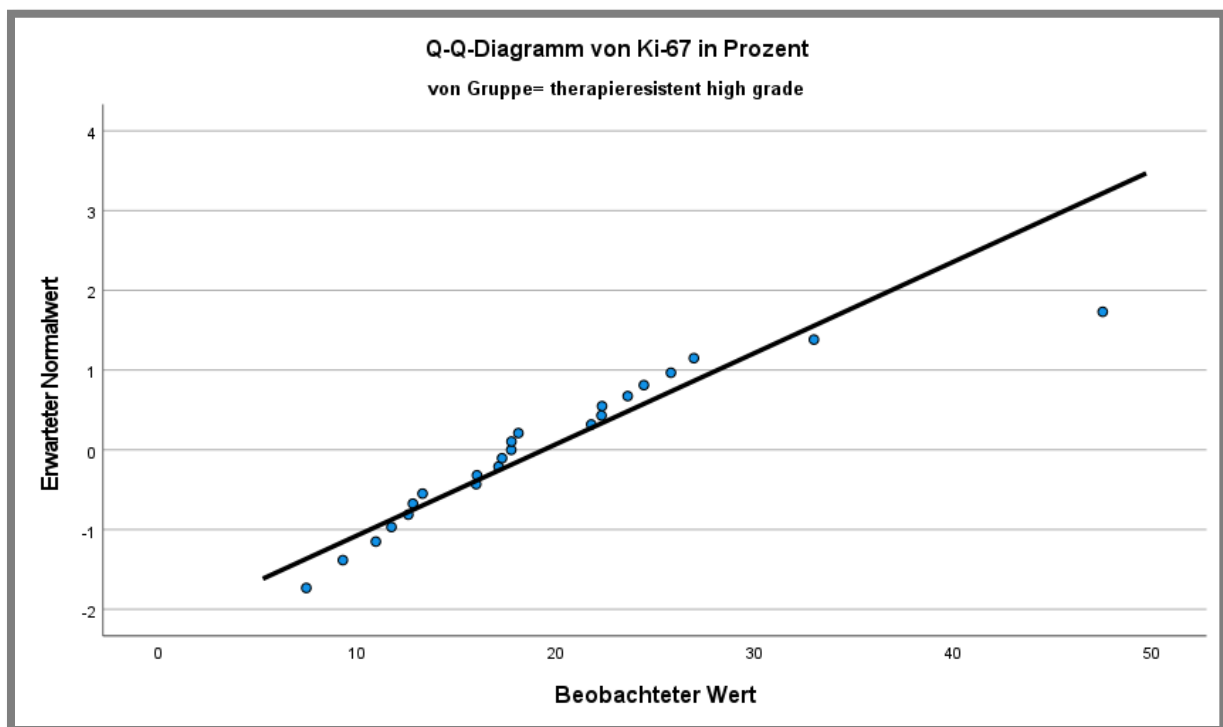


Abbildung 27: Prüfung auf Normalverteilung von Ki-67 in % - therapieresistente high-grade Synovialitis. Eigene Darstellung.

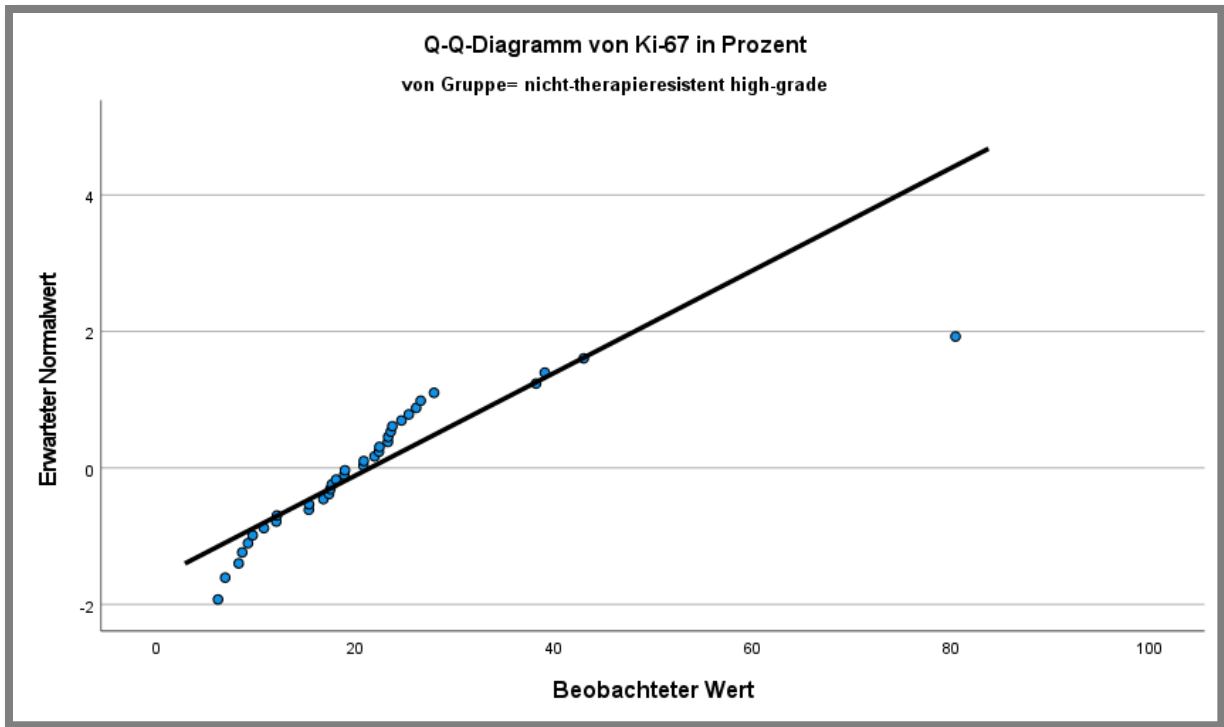


Abbildung 28: Prüfung auf Normalverteilung von Ki-67 in % - nicht-therapierefraktäre high-grade Synovialitis. Eigene Darstellung.

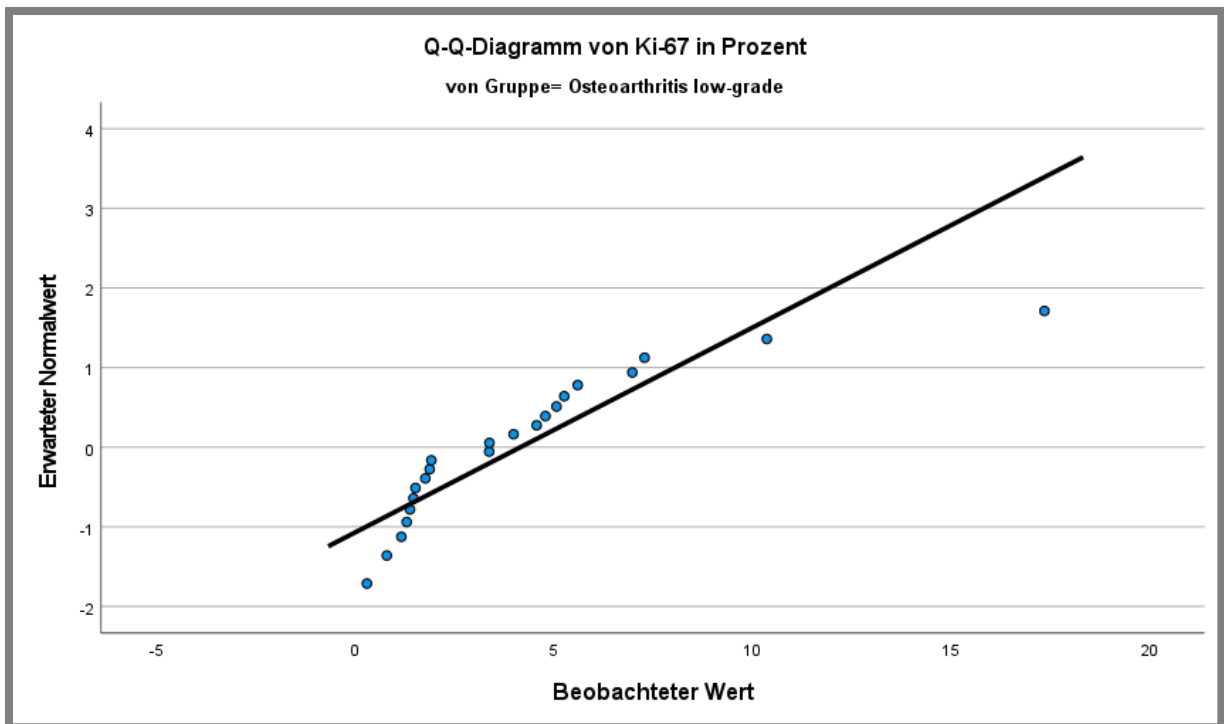


Abbildung 29: Prüfung auf Normalverteilung von Ki-67 in % - nicht-therapierefraktäre high-grade Synovialitis. Eigene Darstellung.

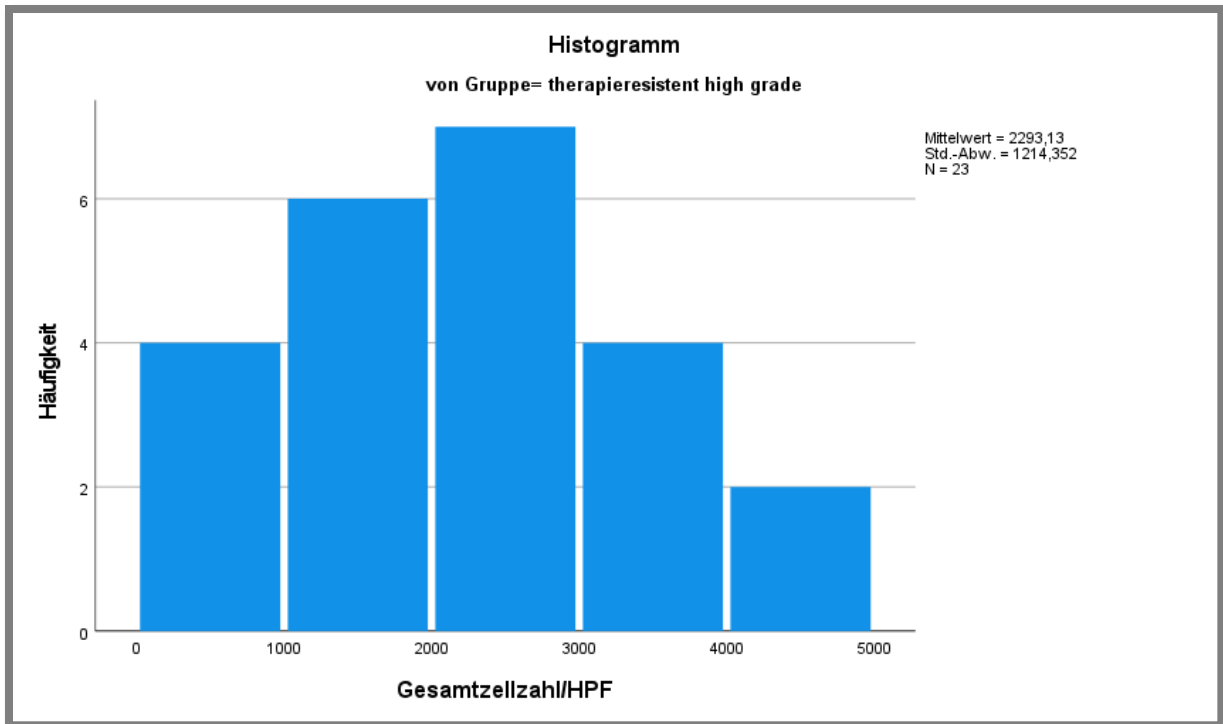


Abbildung 30: Prüfung auf Normalverteilung von Gesamtzellzahl/HPF - therapierefraktäre high-grade Synovialitis. Eigene Darstellung.

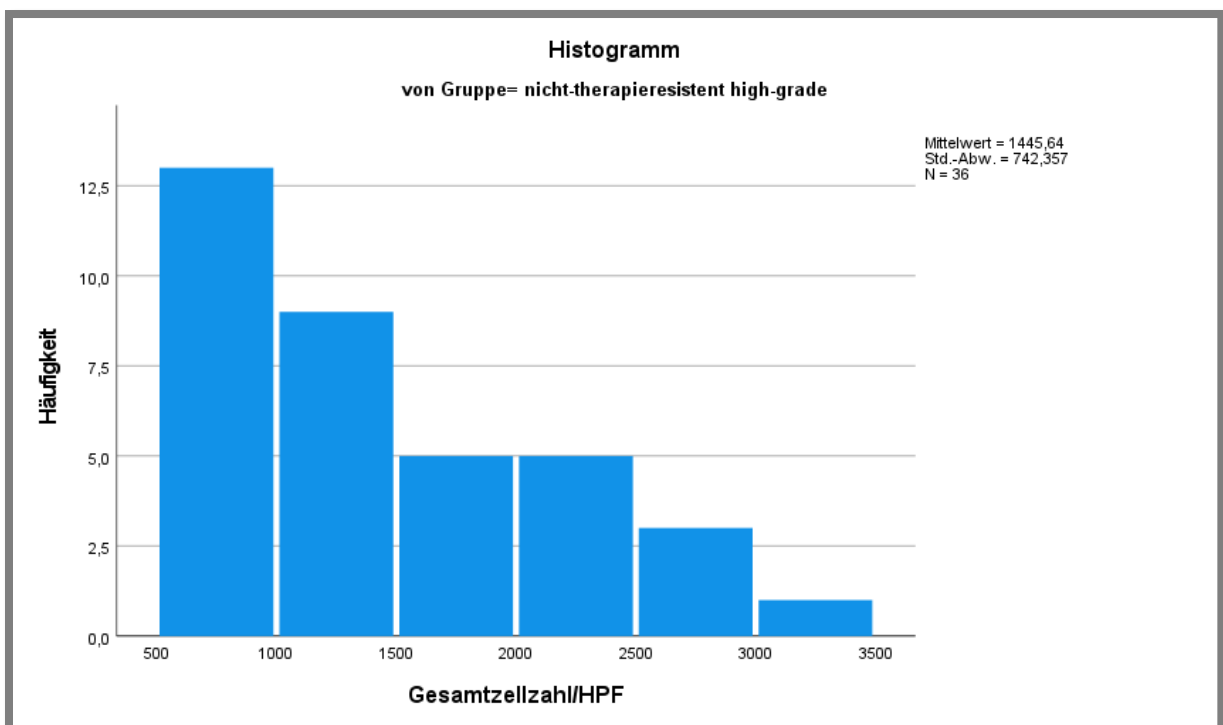


Abbildung 31: Prüfung auf Normalverteilung von Gesamtzellzahl/HPF - nicht-therapierefraktäre high-grade Synovialitis. Eigene Darstellung.

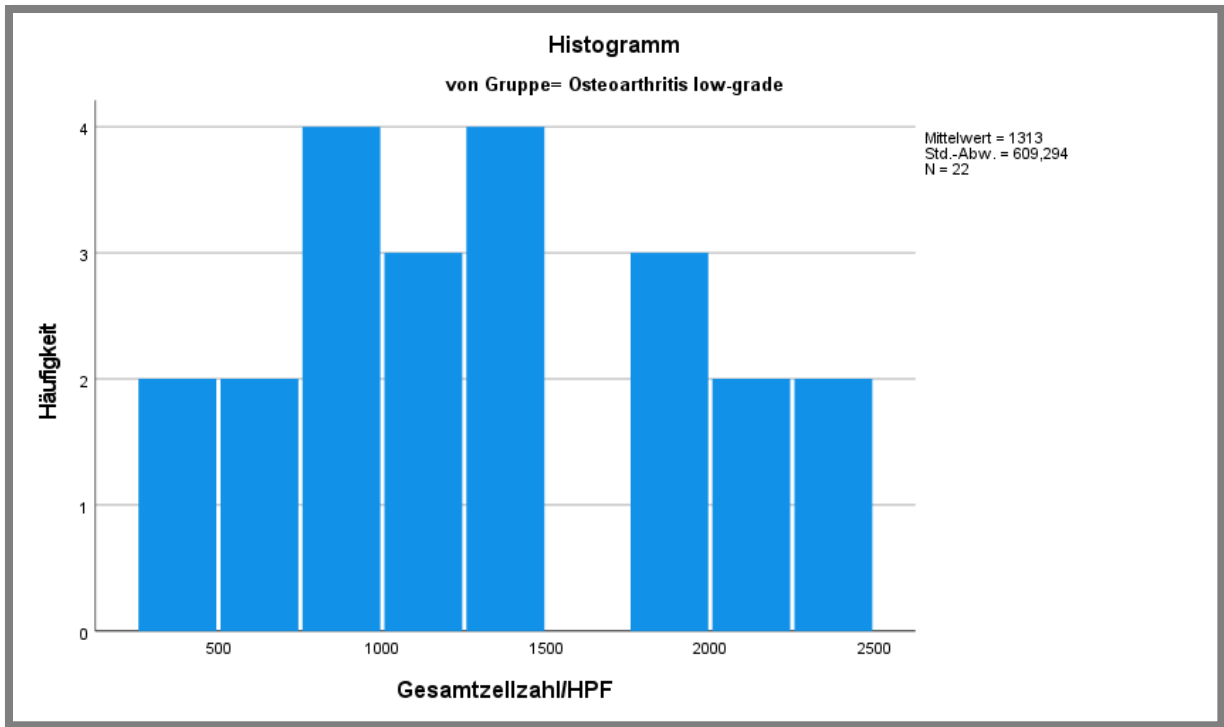


Abbildung 32: Prüfung auf Normalverteilung von Gesamtzellzahl/HPF - low-grade Osteoarthritis. Eigene Darstellung.

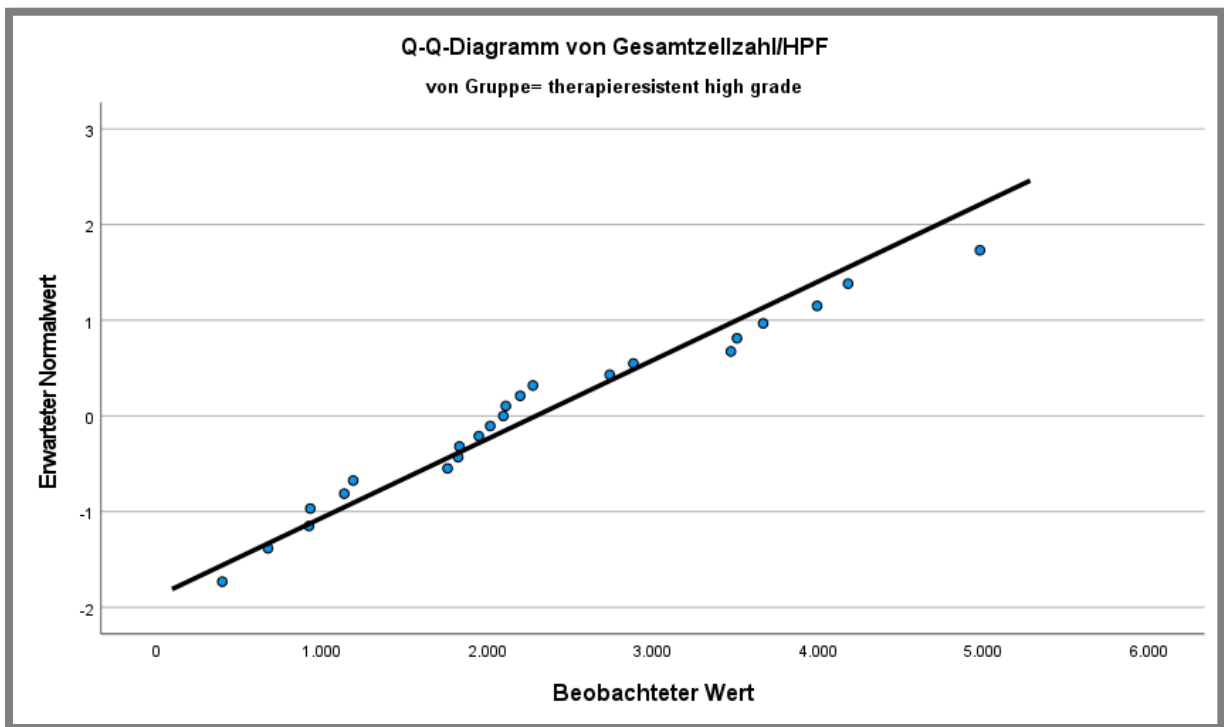


Abbildung 33: Prüfung auf Normalverteilung von Gesamtzellzahl/HPF - therapieresistente high-grade Synovialitis. Eigene Darstellung.

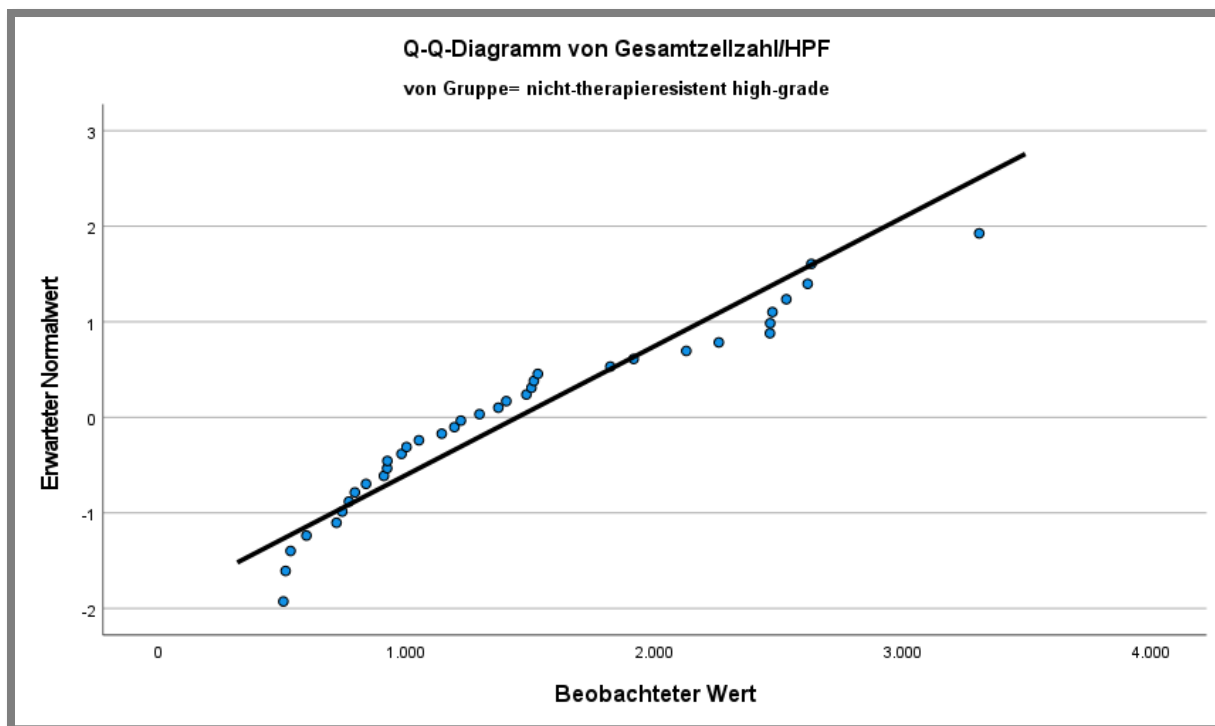


Abbildung 34: Prüfung auf Normalverteilung von Gesamtzellzahl/HPF - nicht-therapieresistente high-grade Synovialitis. Eigene Darstellung.

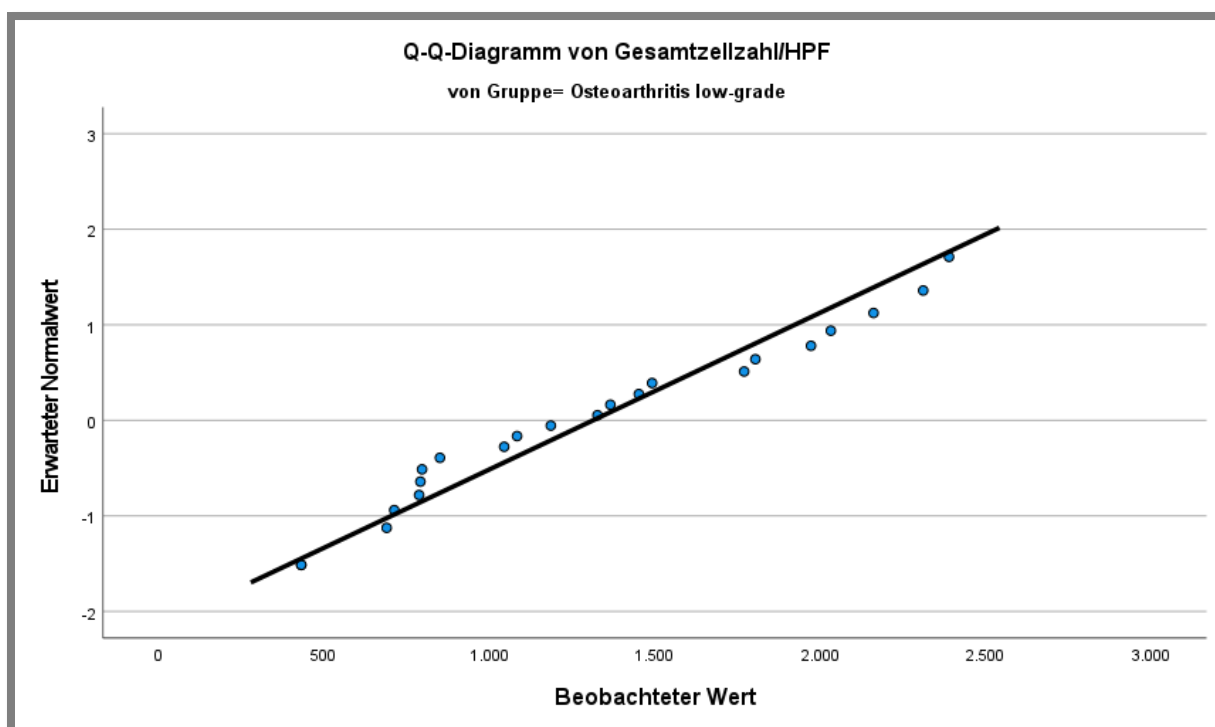


Abbildung 35: Prüfung auf Normalverteilung von Gesamtzellzahl/HPF - low-grade Osteoarthritis. Eigene Darstellung.

**Hypothesentestübersicht**

	Nullhypothese	Test	Sig. <sup>a,b</sup>
1	Die Verteilung von Ki-67 in Prozent ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	Kruskal-Wallis-Test bei unabhängigen Stichproben	0,000
2	Die Verteilung von Gesamtzellzahl/HPF ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	Kruskal-Wallis-Test bei unabhängigen Stichproben	0,007

**Hypothesentestübersicht**

	Entscheidung
1	Nullhypothese ablehnen
2	Nullhypothese ablehnen

- a. Das Signifikanzniveau ist ,050.  
 b. Asymptotische Signifikanz wird angezeigt.

Tabelle 15: Kruskal-Wallis-Test Hypothesentestübersicht. Eigene Darstellung.

**Zusammenfassung des Kruskal-Wallis-Tests bei unabhängigen Stichproben**

Gesamtzahl	81
Teststatistik	42,631 <sup>a</sup>
Freiheitsgrad	2
Asymptotische Sig. (zweiseitiger Test)	0,000

- a. Die Teststatistik wird für Bindungen angepasst.

Tabelle 16: Zusammenfassung des Kruskal-Wallis-Tests bei unabhängigen Stichproben – Ki-67 in %. Eigene Darstellung.

**Zusammenfassung des Kruskal-Wallis-Tests bei unabhängigen Stichproben**

Gesamtzahl	81
Teststatistik	10,003 <sup>a</sup>
Freiheitsgrad	2
Asymptotische Sig. (zweiseitiger Test)	0,007

- a. Die Teststatistik wird für Bindungen angepasst.

Tabelle 17: Zusammenfassung des Kruskal-Wallis-Tests bei unabhängigen Stichproben - Gesamtzellzahl/HPF. Eigene Darstellung.

## 9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Torsten Hansen für die Überlassung meines Wunschthemas der KI-basierten Analyse therapierefraktärer rheumatoider Arthritis für die Promotion. Insbesondere möchte ich mich für die hervorragende Betreuung, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes mit optimalen Arbeitsbedingungen und die konstruktive Kritik und förderlichen Ratschläge bedanken.

Ebenso gilt mein Dank in besonderem Maße Herrn Prof. Dr. Veit Krenn für seine höchst intensive Unterstützung und den ausgiebigen fachlichen Austausch in wöchentlichen Arbeitstreffen, die zu neuen Anregungen und innovativen Ideen geführt haben. Seine Hilfsbereitschaft und seine besondere Motivationsfähigkeit waren mir immer ein Ansporn.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Simone Giak und dem ganzen Team des MVZ-HZMD Trier für die reibungslose persönliche, telefonische und schriftliche Kommunikation und umfangreiche Hilfestellung bei jeglicher Fragestellung bedanken.

Von der Johannes-Gutenberg-Universität zu Mainz stand mir Herr Roman Paul aus der Abteilung Biometrie, Genomische Statistik und Bioinformatik für die statistische Auswertung meiner Daten beratend zur Seite, wofür ich mich herzlich bedanke.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie, meinen Eltern Susanne Holland-Blümke und Dr. Alexander Blümke und meiner Schwester Mona Blümke, für die moralische Unterstützung während meiner Promotionszeit bedanken. Ganz besonders gilt mein Dank dabei meiner Schwester, die als fachfremde Lektorin viel Zeit, Energie und Wissen in die sprachliche und formelle Optimierung meiner Arbeit investiert und mir dabei auch zu zahlreichen neuen inhaltlichen Ideen und Verbesserungen verholfen hat.

## **10 Tabellarischer Lebenslauf**

Der Lebenslauf steht in der elektronischen Version nicht zur Verfügung.