

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Morphometrische Validierung des histopathologischen
Synovitis-Scores

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin
Berlin

von

Frank Schäper

aus Linnich

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. V. Krenn

2. Prof. Dr. med. U. Sack

3. Prof. Dr. med. Th. Dörner

Datum der Promotion: 7. Dezember 2007

Die hier vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und Vorschlag von
Herrn Prof. Dr. med. Veit Krenn im
Institut für Pathologie der
Charité, Humboldt-Universität zu Berlin durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Veit Krenn für die hilfreiche Unterstützung, für die
Betreuung, für die Überlassung des Themas sowie für die konstruktiven und kritischen
Hinweise im Rahmen dieser Arbeit.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
2. Materialien und Methoden	10
2.1. Untersuchungsmaterial	10
2.1.1. Patienten und klinische Daten	10
2.1.2. Probengewinnung	11
2.2. Probenaufbereitung	11
2.3. Mikroskopie und Morphometrie	11
2.3.1. Mikroskop Leica DMRB	11
2.3.2. Videokamera Sony DXC-930P	12
2.3.3. Computergestützte Bildanalyse - CAIA (Leica Quantimet Q600)	12
2.3.3.1. Eichung des Systems	13
2.3.3.2. Interaktive Messungen	13
2.3.3.3. Automatisierte Meßverfahren	14
2.3.3.4. Quips-Programm NucDetect	14
2.4. Vergleich konventioneller Abschätzverfahren und CAIA	22
2.4.1. Vorversuche	22
2.4.2. Eichung	22
2.5. Datenerhebung	23
2.5.1. Gewebegröße und Schnittstufen	23
2.5.2. Entzündliche Infiltrate	23
2.5.3. Deckzellschichtdicke	24
2.5.4. Stromazellichte	24
2.5.5. Nekrosen	24
2.6. Auswertung und Statistik	25
2.6.1. Vergleich CAIA gegen konventionellen Score	25
3 Ergebnisse	27
3.1. Vorlaufphase	27
3.1.1. Eichung des Systems	27
3.1.2. Vorversuche	27
3.2. Evaluation	29

3.3. Gewebegröße und Schnittstufen	33
3.4. Entzündliche Infiltrate	35
3.5. Deckzellschichtdicke	41
3.6. Stromazellendichte	44
3.7. Nekrosen	47
3.8. Konventioneller Score und CAIA-Score	50
4 Diskussion	54
4.1. Gradingssysteme in der Pathologie	54
4.2. Gradingssysteme der Synovitis	55
4.3. Der neue Synovitis-Score	57
4.4. Nekrosen als zusätzlicher Parameter	57
4.5. Validisierung mit Computergestützter Bildanalyse (CAIA)	59
5 Zusammenfassung	64
6 Literatur	66

1. Einleitung

In der Diagnostik der entzündlichen Gelenkinnenhauterkrankungen (Synovialitiden, Synovitiden) spielte die histomorphologische Diagnostik in den letzten Jahrzehnten zur Diagnosefindung nur eine untergeordnete Rolle, da immer wieder darauf verwiesen wurde, daß die histomorphologischen Veränderungen nicht mit dem Krankheitsbild und dem Schweregrad einer Erkrankung korrelieren [Henderson]. Gerade der Formenkreis der rheumatoiden Erkrankungen war diagnostisch ausschließlich klinisch definiert [Arnett]. Dies hatte seinen Grund zum einen darin, daß der Schweregrad eines klinischen Krankheitsbildes oft nicht mit dem Schweregrad der histomorphologischen Veränderungen korrelierte und deshalb Aussagen nach Beobachtung morphologischer Phänomene nur bedingt Rückschlüsse über den Krankheitsverlauf zuließen, zum anderen aber auch darin, daß die histomorphologische Diagnostik ihren Schwerpunkt in der Diagnostik neoplastischer Erkrankungen gesucht hatte und den Formenkreis der entzündlichen Gewebsveränderungen mit geringerem Engagement verfolgte.

Den Schweregrad einer Erkrankung versucht man, mit Gradingssystemen zu erfassen, die auch eine Aussage über die Prognose einer Erkrankung ermöglichen sollen. Gradingssysteme waren so auch zunächst in der Tumorpathologie bekannt [Rosai], wurden aber schrittweise auch für die Entzündungspathologie übernommen: Bei der Gastritis wird die chronische und akute Komponente der Entzündung bestimmt und mit der Besiedlung durch *Helicobacter pylori* korreliert [Genta, Stolte], bei der Einteilung der chronischen Hepatitis vom Virustyp findet man eine Übereinstimmung mit der Viruslast [Ishak], die Klassifikation der Rejektion nach Transplantation gibt nach Lebertransplantation den Schweregrad einer Abstoßungsreaktion an [Datta Gupta], gleichartiges gilt für die Rejektion nach Herztransplantation [Kemnitz]. Die Behandlungsoptionen richten sich maßgeblich nach der histomorphologischen Diagnostik und nach dem Ergebnis des Gradings.

In letzter Zeit wurden für die rheumatoide Arthritis verschiedene Gradingssysteme vorgeschlagen, die auch eine positive Korrelation zwischen histologischen, immunhistologischen und klinischen Befunden zeigten [Braun, Kahle, Kraan, Krenn, Ostendorf, Rooney, Tak 1996, Tak 1997]. Es konnte gezeigt werden, daß eine genaue histopathologische Klassifikation von hoher diagnostischer Wertigkeit war und sowohl

Rheumatologen als auch Orthopäden wichtige Informationen bieten konnte [Bresnihan, Fritz, Ostendorf, Rosenberger, Stiehl]. Es gab zwar ein Grading der Synovitis bei rheumatoider Arthritis, das immunhistologisch basiert war und teilweise auch digitale Bildanalysen verwendete [Bresnihan, Kraan, Kraan, Tak 1996, Tak 1997, Youssef], aber ein umfassendes Grading der Synovitis, unbeachtet der Ätiologie, gab es bis vor kurzer Zeit nicht.

2002 wurde ein einfach zu handhabendes Grading-System vorgestellt, das in der Routinediagnostik am HE-Präparat Anwendung findet [Krenn, Morawietz]. Dabei werden drei Merkmale untersucht: Hyperplasie der synovialen Deckzellschicht, Zelldichte des synovialen Stromas und Ausprägung entzündlicher Infiltrate. Den einzelnen Merkmalen werden je nach Ausprägung Punktwerte von 0 bis 3 zugeordnet, es ergibt sich also am HE-Schnittpräparat eine Punktwertsumme zwischen 0 und 9. Dabei sollen die entzündlichen Infiltrate bei 100-facher Vergrößerung, die Deckzellschichtdicke und die Stromaaktivierung bei 400-facher Vergrößerung untersucht werden. Die diagnostischen Kategorien sind: Entzündungsgrad 0 (0-1 Punkt, keine Synovitis), Entzündungsgrad 1 (2-3 Punkte, geringgradige Synovitis), Entzündungsgrad 2 (4-6 Punkte, mittelgradige Synovitis), Entzündungsgrad 3 (7-9 Punkte, schwere Synovitis). Dieses System wurde als Synovitis-Score veröffentlicht.

Datenbasis für den Score war ein Patientenkollektiv von 308 Patienten. Als Grunderkrankung bestand entweder eine degenerative Osteoarthritis oder eine entzündliche Synovitis, speziell reaktive Arthritis, Psoriasisarthritis oder rheumatoide Arthritis. Zusätzlich gehörten zum Kollektiv Synovektomiepräparate von gesunden Patienten ohne Synovitis oder Arthritis.

Im Ergebnis zeigte sich, daß der mittlere Entzündungsgrad bei rheumatoider Arthritis signifikant höher war als der mittlere Entzündungsgrad bei degenerativer Osteoarthritis. Die Intra-observer-Reproduzierbarkeit lag bei 72% (63% bis 81%), die Inter-observer-Reproduzierbarkeit lag bei 83% (79% bis 88%).

Ein Ziel der hier vorgestellten Arbeit ist es, den neuen Synovitis-Score zu validieren. Die bisherigen Score-Werte sind geschätzte Werte und sollen durch Messungen und Zählungen geprüft werden. Als Methode wurde die computergestützte Bildanalyse

(computer assisted image analysis, CAIA) gewählt, ein Verfahren, das bei größtmöglicher Genauigkeit größtmögliche Reproduzierbarkeit gewährleistet.

Der diagnostische Terminus Synovitis wird hier in Anlehnung an das internationale Schrifttum synonym zum Begriff Synovialitis gebraucht, in beiden Fällen sind entzündliche Veränderungen der Gelenkinnenhaut gemeint.

2. Materialien und Methoden

2.1. Untersuchungsmaterial

Zwischen 1992 und 2001 wurden am Universitätsklinikum Würzburg und am Universitätsklinikum Charite, Berlin, 308 Synovektomiepräparate gewonnen und histologisch untersucht. Nach klinischer Diagnostik litten die Patienten an einer rheumatoiden Arthritis, an einer Psoriasisarthritis, an einer reaktiven Arthritis oder an einer Osteoarthritis. Der neuartige Synovitis-Score, der eine Einteilung in vier Schweregrade ermöglichte, wurde bei jedem Präparat angewandt [Krenn 2002]. Von diesen 308 Synovektomiepräparaten wurden 70 Präparate aus allen Kategorien zufällig ausgewählt, um morphometrisch per computergestützter Bildanalyse weiteruntersucht zu werden. 16 Fälle entsprachen dem Entzündungsgrad 0, 18 Fälle entsprachen dem Entzündungsgrad 1, 18 Fälle entsprachen dem Entzündungsgrad 2 und 18 Fälle entsprachen dem Entzündungsgrad 3.

2.1.1. Patienten und klinische Daten

An einer Osteoarthritis litten 112 Patienten. Die Diagnose wurde klinisch und radiologisch in Anlehnung an die Klassifikation von Altman et al. gestellt [Altmann]. Die Diagnose einer rheumatoiden Arthritis wurde auf der Basis der ARA-Kriterien bei 152 Patienten gestellt [Arnett]. 13 Patienten litten an einer Psoriasisarthritis, diagnostiziert nach den Kriterien von Moll and Wright [Moll]. Eine reaktive Arthritis (7 Patienten) wurde bei Patienten mit Infektionen des Urogenitalsystems oder des Gastrointestinaltraktes sechs Monate vor Einsetzen klinischer und radiologischer Arthritissymptome diagnostiziert [Braun]. Synovialgewebe von Patienten mit Meniskusläsionen oder Bandläsionen wurde als posttraumatische Synovitis eingeordnet (2 Patienten). Die Kontrollgruppe bestand aus 22 Synovektomiepräparaten von Autopsiefällen, bei denen anamnestisch keine Gelenkerkrankung bekannt war und die keine Auffälligkeiten der Synovia zeigten. Das mittlere Patientenalter war 58,4 Jahre.

2.1.2. Probengewinnung

Die Patienten wurden unmittelbar vor der Operation aufgenommen. Noch während der Operation wurden Anteile der resezierten pathologisch veränderten Gelenkinnenhaut in 5%-igem gepufferten Formalin asserviert.

2.2. Probenaufbereitung

Das formalinfixierte Gewebe wurde über Nacht in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und paraffiniert. Am nächsten Tag wurde das Gewebe in Paraffinblöckchen gegossen und abgekühlt. Anschließend konnte es mit dem Rotationsmikrotom geschnitten werden, wobei die Schnittdicke zwischen 4µm und 6µm betrug. Die Gewebeschnitte wurden in warmem Wasser gestreckt und anschließend auf Objektträger aufgezogen. Nach Lufttrocknung waren die Schnittpräparate fixiert und konnten gefärbt werden. Hämatoxylin/Eosin-Färbungen wurden als Standardfärbeverfahren bei jeder Gewebeprobe durchgeführt, zusätzlich wurde ein kleinerer Umfang von Gewebeproben (n=5) für immunhistologische Untersuchungen vorbereitet.

2.3. Mikroskopie und Morphometrie

2.3.1. Mikroskop Leica DMRB

Für alle Untersuchungen wurde ein Durchlichtmikroskop Leica DMRB mit den Objektiven 1,6x - 2,5x - 5x - 10x - 20x - 40x - 100x Öl, einem justierbaren Klappkondensator und Okularen mit einem Sehfeld von 25 mm verwendet. Im Strahlengang war ein Prisma zur Lichtteilung montiert, so daß jeweils die Hälfte des Lichtes zu den Okularen und zur aufgesetzten Videokamera geleitet wurde.

2.3.2. Videokamera Sony DXC-930P

Als Videokamera wurde eine Sony-3-Chipkamera DXC-930P verwendet, die das Mikroskopbild permanent aufzeichnen konnte. Der 3-Chip-CCD-Wandler der 1/2-Zoll-Kamera bot eine Auflösung von 420.000 Pixel und hatte folgende Merkmale: Horizontalauflösung 720 Zeilen, Wirkungsgrad 2.000 Lux bei Blende 5, Signal-Rauschabstand 56 dB. Die Kamera war mit einem justierbaren Zwischentubus mit dem Mikroskop verbunden, der im Bereich 0,8x bis 1,1x verstellt werden konnte. Die Aufnahmen und Messungen erfolgten in der Stellung 1,0x. Die Softwareeinstellungen der Videokamera wurden wie folgt vorgenommen: Automatische Verstärkung (automatic gain control, AGC), Farbtemperatur 5600 °K, Belichtungszeit 310/625 s, automatischer Weißabgleich, CCD-Iris ausgeschaltet, Hauptschwarzwert 0, Horizontalphase 0, Gammakorrektur an, Grünsynchronisation an, Vollbildmodus an, AusgangssignalfORMAT Y/C.

2.3.3. Computergestützte Bildanalyse - CAIA (Leica Quantimet Q600)

Das Videosignal wurde in den Bildspeicher eines Bildanalysegerätes eingelesen. Hierbei handelte es sich um ein computergestütztes Bildanalyzesystem (computer assisted image analysis, CAIA) der Firma Leica, speziell um das Modell Quantimet Q600. Dieses System basierte auf einem Personal Computer (PC), dem ein framegrabber und verschiedene Karten zur Hardwarebeschleunigung aufsaßen. Die Eckdaten des Systems, das nachträglich aufgerüstet wurde, sind: Prozessor: Pentium MMX, getaktet mit 200 Mhz, 32 MB Arbeitsspeicher, 2 Festplatten mit je 1 GB.

Als Betriebssystem diente Microsoft Windows 95. Die installierte Betriebssoftware QWin stammte von Leica, Cambridge. Die Programmiersprache Quips, ein Basic-Dialekt, war in dieser Betriebssoftware enthalten. Mit Quips wurden die Routinen zur automatisierten Bildverarbeitung geschrieben. Während die interaktiven Messungen im live-Bild-Modus erfolgten, wurden die automatisierten Messungen am gespeicherten digitalen Bild durchgeführt.

In jedem Fall wurde das Bild (der Inhalt des Bildspeichers) in einem Fenster auf einem 17-Zoll Monitor dargestellt. Die Fenstergröße (und damit die Größe des Bildes) betrug 736x574 Pixel. Interaktive Messungen und automatisierte Messungen konnten hier durchgeführt und verfolgt werden.

2.3.3.1. Eichung des Systems

Um maßstabsgerechte genaue Messungen vornehmen zu können, mußte das System vor Beginn aller Versuchsreihen einmal geeicht werden. Dazu wurde ein Objektträger mit geeichter eingravierter Mikrometerskala auf dem Objektisch eingespannt, per Durchlichtmikroskopie wurde die Skala auf dem Bildschirm dargestellt. Auf dem Bildschirm wurde eine definierte Strecke abgetragen, die auf der Skala abgelesene Entfernung wurde manuell in das System eingetragen. Die Eichung wurde für jedes Objektiv und für jede Vergrößerung des Zwischentubus durchgeführt. Die Eichwerte sind in Tabelle 3.1. aufgeführt.

2.3.3.2. Interaktive Messungen

Interaktive Messungen waren Messungen, bei denen der Untersucher anhand vorbestimmter Kriterien Anfangspunkt und Endpunkt einer Messung selbst bestimmt. Derartige Messungen wurden in der Bildanalyse eingesetzt, wenn durch Hardware oder Software eine gewünschte Diskriminierung zwischen zwei Bildpunkten technisch nicht möglich war oder Anfangspunkt und Endpunkt einer Messung bei jeder Untersuchung individuell neu bestimmt werden mußten oder eine automatisierte Messung gegenüber einer interaktiven Messung keine Vorteile brachte. In den vorliegenden Untersuchungen wurde die Dicke der Deckzellschicht interaktiv bestimmt. Dazu wurde ein Punkt auf der Oberfläche markiert und ein weiterer Punkt unterhalb der Deckzellschicht zwischen Deckzellschicht und Stroma definiert. Das Quantimet Q600 zog dann eine gerade Linie zwischen den Punkten, die Entfernung wurde pixelweise gemessen. Weiterhin wurde die Größe der untersuchten Gewebestücke ergänzend interaktiv ermittelt: Nach einem

Durchgang automatisierter Gewebeerkenkung wurde interaktiv korrigiert. Dazu wurden sowohl zuviel detektierte Areale abgezogen, als auch nicht detektierte Areale ergänzt. Hier wurde keine Punkt-zu-Punkt Funktion gewählt, vielmehr wurde die zu bearbeitende Fläche bei gedrückter Maustaste mit dem Bildschirmzeiger umfahren.

2.3.3.3. Automatisierte Meßverfahren

Bei einer automatisierten Messung wurden Bildpunkte, für die vorher festgelegte Kriterien erfüllt waren, von anderen Bildpunkten diskriminiert. So hatte jeder Bildpunkt eines Bildes einen definierten Wert für Rot, Blau und Grün (RGB-Modus), der zwischen 0 und 255 lag. Stellte ein Bildpunkt z.B. reines Blau dar, so lauteten die Werte für die einzelnen Farben $R=0$ und $G=0$ und $B=255$, stellte ein Bildpunkt reines Gelb dar, so lauteten die Werte für die einzelnen Farben $R=0$ und $G=255$ und $B=255$. Die einzelnen Werte konnten auch auf einer Schwarz-Weiß Skala dargestellt werden. Wenn Schwarz=0 war und Weiß=255 war, resultierte daraus, das es jeweils ein "Graubild für Rot", ein "Graubild für Grün" und ein "Graubild für Blau" gab. Diese Graubilder waren voneinander verschieden, ihre Addition ergab das eigentliche Farbbild. Das Farbbild lag in der Farbbildebene des Bildspeichers, mehrere Farbbilder konnten mehrere Farbbildebenen besetzen. Die Anzahl der Farbbildebenen war in der Regel auf drei begrenzt. Über den Farbbildebenen gab es zahlreiche Binärbildebenen. In diese wurden Bildpunkte, die aufgrund der festgelegten Kriterien diskriminiert wurden, transferriert. Lauteten die Kriterien im RGB-Modus z.B. $85 < R < 123$ und $90 < G < 163$ und $50 < B < 255$, so wurden Farbpunkte, die dem dunklen Blau von Zellkernen in der HE-Färbung entsprachen, in die erste Binärbildebene transferriert. Dort wurden sie digital abgebildet und als farbliche Bildpunkte dargestellt, wobei jede Farbe einer bestimmten Binärbildebene zugeordnet war. Wurden z.B. in einer 100x100 Pixel großen Matrix (also ein 100x100 Pixel großes Bild) die Bildpunkte 3,5 u. 3,6 u. 3,7 u. 3,8 u. 4,6 u. 4,7 u. 5,7 u. 5,8 u. 5,9 diskriminiert ("detektiert"), weil sie dem tiefen Blau von Zellkernen in der HE-Färbung entsprachen, dann wurden diese "Zellkerne" in der Binärbildebene als z.B. gelbe Pixel dargestellt, der Rest der "gelben" Binärbildebene war leer und zeigte somit auch nichts. In der ersten ("gelben") Binärbildebene lagen somit nur noch Informationen über Zellkerne, die jetzt gemessen, gezählt, kurzum: quantifiziert werden konnten.

2.3.3.4. Quips-Programm NucDetect

Hierbei handelte es sich um ein selbst entwickeltes Programm, daß unter dem Basic-Dialekt Quips lief und nach oben dargestelltem Muster Zellkerne erkennen konnte. Dabei traten naturgemäß Probleme und Fehler auf, die in dem Programm korrigiert wurden; auf die einzelnen Schritte wird im Folgenden eingegangen. Das Programm NucDetect sah textlich folgendermaßen aus:

Routine Header:

Number of Fields: 1

Standard Frames

Display (Colour0 (on), frames (on,on), planes (off,off,off,off,off,off), lut 0, x 0, y 0, z 1, Reduction off)

Configure (Image Store 736 x 574, Grey Images 6, Binaries 24, Shading, Colour)

Select Lens (Transmitted, 40 x, mag changer 1 x)

BUTTON = 1

Define Button (#1, "Weiter trennen?")

Define Button (#2, "Fortfahren?")

Binary Edit (Clear Binary0)

Binary Edit (Clear Binary1)

Binary Edit (Clear Binary2)

Binary Edit (Clear Binary3)

Binary Edit (Clear Binary4)

PauseText ("Bildausschnitt, Schärfe, Helligkeit einstellen.")

Image Setup [PAUSE] (Camera 3, White 64.96, Black 40.02, Lamp 100.00)

Acquire (into Colour0)

Detektion, binäres Editieren und Segmentieren

PauseText ("Zellkerne detektieren (obere Grenze Rot).")

Colour Detect [PAUSE] (RGB: 0-119, 0-255, 0-255, from Colour0 into Binary0)

Binary Amend (Close from Binary0 to Binary1, cycles 1, operator Disc, edge erode on)

Binary Identify (FillHoles from Binary1 to Binary1)

Binary Segment (Segment from Binary1 to Binary2, filter 1, max cycles 10, operator Disc)

Binary Identify (Outline from Binary2 to Binary3)

Schleife: Zellkerne trennen

Repeat

PauseText ("Zellkernkonglomerate trennen.")

Binary Edit [PAUSE] (Line from Binary3 to Binary3, nib Fill, width 1)

Binary Identify (Holes from Binary3 to Binary4)

Binary Edit (Clear Binary3)

Binary Identify (Outline from Binary4 to Binary3)

Display (Colour0 (on), frames (on,on), planes (off,off,off,3,off,off), lut 0, x 0, y 0, z 1, Reduction off)

Pause (Buttons, "Trennen/Fortfahren?")

Until (BUTTON=2)

Zellkerne ergänzen

Binary Edit [PAUSE] (Draw from Binary3 to Binary3, nib Circle, width 1)

Binary Identify (FillHoles from Binary3 to Binary3)

Messen

Measure feature (plane Binary3, 64 ferets, minimum area: 50, grey image: Colour0)

Selected parameters: Area, X FCP, Y FCP

Display Feature Results (x 764, y 290, w 244, h 448)

In den ersten drei Zeilen wurde festgelegt, daß jede Messung in nur einem Meßfeld erfolgte, die Bildrahmen und Meßrahmen entsprachen den Standardvorgaben (736 x 574 Pixel Bildgröße).

In Zeile 4 wurde festgelegt, daß die Darstellung in der oberen linken Bildschirmecke erfolgte, angezeigt wurde das zu messende Farbbild, Binärebenen sollten nicht dargestellt werden, die Darstellung sollte ohne Zoom-Faktor erfolgen.

In Zeile 5 wurde der Farbbildspeicher konfiguriert, die Anzahl der möglichen Farbbilder wurde festgelegt (zwei, entsprechend sechs Graubildern), die Anzahl der maximal möglichen Binärbildebenen wurde auf 24 festgelegt.

In Zeile 6 wurde das zu verwendende Objektiv und der Vergrößerungsfaktor definiert.

In Zeile 7 wurde die Eingabevariable BUTTON gesetzt, mittels derer der Untersucher später entscheiden konnte, ob weitere interaktive Korrekturen durchgeführt werden sollen oder nicht,

in den Zeilen 8 und 9 wurde die Eingabevariable definiert.

In den Zeilen 10 bis 14 wurden die ersten fünf Binärebenen auf Null gesetzt, damit ab der zweiten Messung keine Restdaten aus vorangegangenen Messungen im Binärspeicher resident sein konnten. Normalerweise wurden nur die ersten fünf Binärbildebenen verwendet.

Zeile 15 enthielt einen Anweisungstext für den Untersucher.

Zeile 16 enthielt die Grundeinstellungen für Helligkeit und Kontrast, die gemäß Zeile 15 vom Untersucher nach seiner Bildeinschätzung variiert werden sollten. Die Anweisung in

Zeile 17 brachte das Bild in den Farbbildspeicher.

Zeile 18 war eine programminterne Textzeile.

Zeile 19 enthielt einen Anweisungstext für den Untersucher, der in

Zeile 20 umgesetzt werden sollte. Grünwerte und Blauwerte wurden von 0 bis 255 erkannt, also im gesamten Intensitätsbereich, Rotwerte wurden in der Grundeinstellung von 0 bis 119 erkannt, je nach Dicke des Schnittes und Färbeintensität des Präparates sollte dieser Wert vom Untersucher angepaßt werden. Nach dem Anpassen wurden die detektierten Bildpunkte in die erste Binärbildebene kopiert (Binary0).

In Zeile 21 wurde ein "Closing" veranlaßt: Dabei wurden zunächst jedem Pixel bzw. jeder Pixelgruppe die umliegenden Pixel dazuaddiert, den neu entstandenen Pixelgruppen wurden anschließend die peripheren Pixel subtrahiert. Dieses Verfahren bedingte ein besseres Erkennen der detektierten Pixelgruppen, also letztlich der Zellkerne. Das Ergebnis wurde von der ersten in die zweite Binärbildebene kopiert (von Binary0 nach Binary1). Da gelegentlich nicht die komplette Fläche der Zellkerne detektiert wurde, mußten "leere" Pixel innerhalb der Zellkerne aufgefüllt werden, dies geschah in

Zeile 22. Zeile 23 enthielt einen entscheidenden Schritt, der Konglomeratbildungen von Zellkernen möglichst effektiv in einzelne Zellkerne zergliedern sollte. Das Ergebnis wurde in die dritte Binärbildebene kopiert (Binary2). Um das gewonnene Ergebnis besser betrachten zu können, wurde ein "Outlining", also ein Markieren der peripheren Pixellagen, veranlaßt, dieses Ergebnis wurde in die Binärbildebene vier (Binary3) kopiert (Zeile 24). Da das Programm gelegentlich nicht alle Zellkerne trennen konnte, muß evtl. nachgebessert werden. Dies geschah in den

Zeilen 25 bis 34. Dieser Vorgang konnte wiederholt werden, bis alle Kernansammlungen aufgetrennt waren (Schleife: Repeat-Until). Auch das Gegenteil konnte passieren: vereinzelt wurden Zellkerne nicht erkannt. Da auch hier nachgebessert werden mußte, wurden entsprechende Kommandos in

Zeile 35-37 eingefügt. Zeile 38-41 enthielten den Meßvorgang, der die erkannten Zellkerne aus Binärbildebene 4 (Binary3) auslas. Die minimale Fläche wurde auf 50 Pixel festgesetzt, da es eigentlich keine Zellkerne gab, die kleiner als 50 Pixel waren.

Das Ergebnis wurde in einem Fenster angezeigt, die Zahlen wurden direkt in ein Excel-Arbeitsblatt übertragen.

Der Ablauf des Programmes wird im Folgenden anhand festgehaltener „Screenshots“ wiedergegeben. Zunächst erfolgt die Erkennung lymphozytärer entzündlicher Infiltrate mittels automatisierter Detektion.

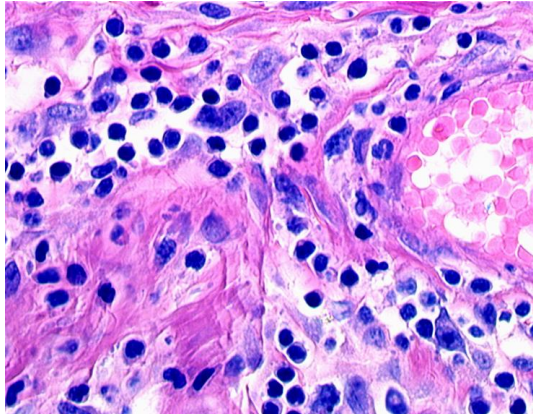


Abbildung 2.1.

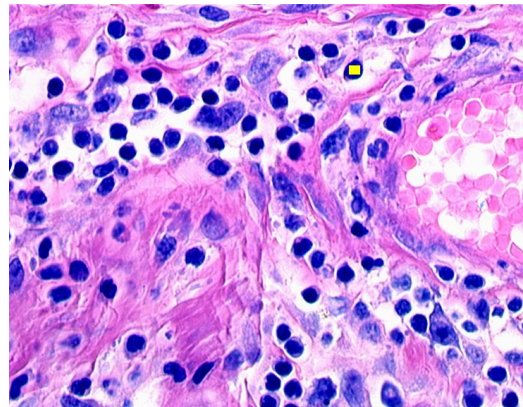


Abbildung 2.2.

Abbildung 2.1. zeigt ein typisches lymphozytäres Infiltrat, im Hintergrund befinden sich einzelne Stromazellen. Abbildung 2.2. zeigt die Markierung eines Lymphozytenkernes mittels Mauszeiger, das entsprechende Feld wird gelb dargestellt.

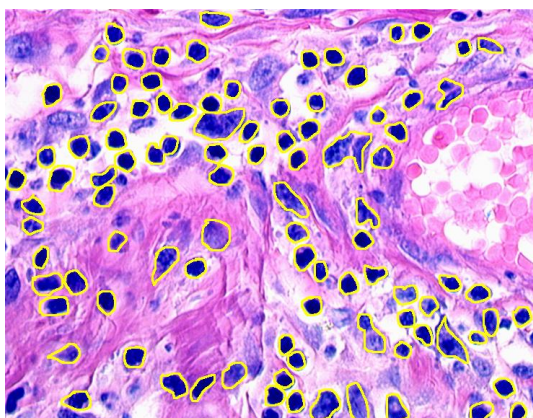


Abbildung 2.3.

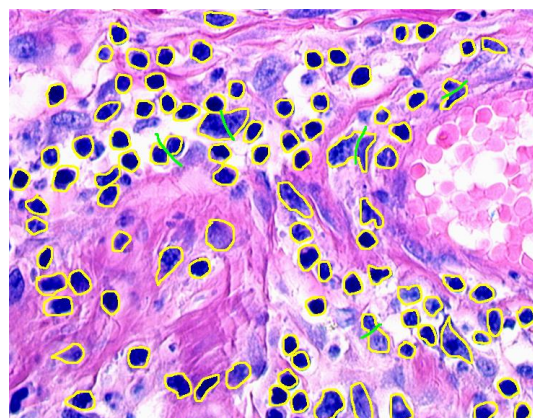


Abbildung 2.4.

In Abbildung 2.3. ist zu erkennen, dass per CAIA alle markierten Blauwerte auf das gesamte Bild übertragen werden und somit alle Zellkerne dargestellt werden. Eng beieinander liegende Zellkerne werden jedoch als ein Zellkern detektiert, die Kerntrennung funktioniert in diesem Beispiel nur unzureichend. Daher muß manuell nachkorrigiert werden, was in Abbildung 2.4. zu sehen ist. Die grünen Striche stellen nachträglich manuell durchgeführte Kerntrennungen (per Mauszeiger) dar. Die anschließende automatische Zählung aller eingekreisten Strukturen ergibt eine quantitativ korrekte Wiedergabe der Zellzahl. Anschließend wird die Dicke der synovialen Deckzellschicht ermittelt.

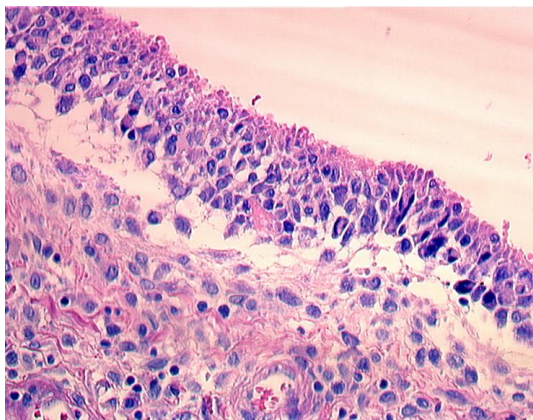


Abbildung 2.5.

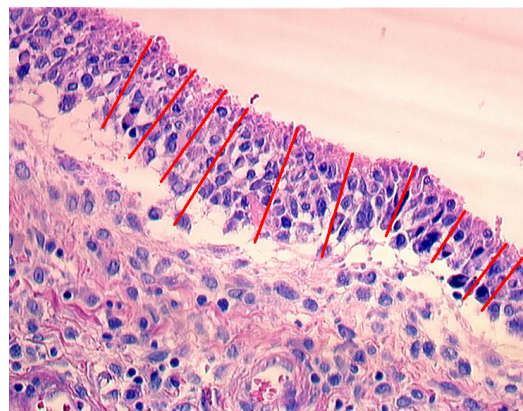


Abbildung 2.6.

Abbildung 2.5. zeigt eine homogene synoviale Deckzellschicht, in Abbildung 2.6. wurden manuell zehn Meßstrecken von der Basis bis zur Oberfläche per Mausklick eingefügt. Das System ermittelt nun Pixelgenau die Länge jeder einzelnen Strecke und berechnet den Mittelwert sowie die Standardabweichung aus diesen zehn Messungen. Der Mittelwert und die Standardabweichung werden danach in ein Excel-Arbeitsblatt (Primärdaten) übertragen. Anschließend erfolgt die Messung der Stromazellen.

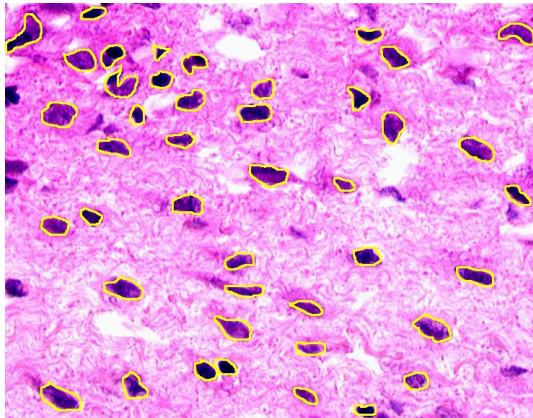
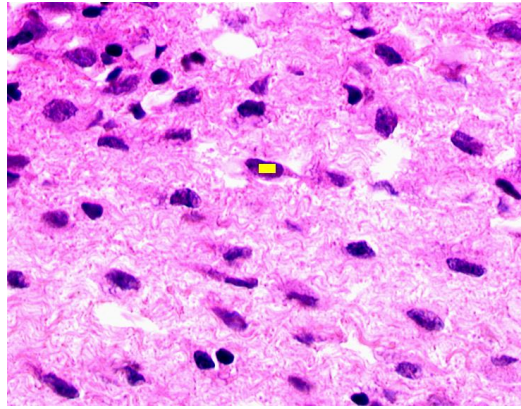
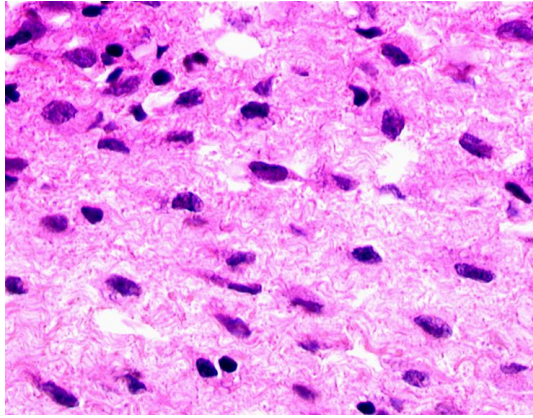


Abbildung 2.7.,
Abbildung 2.8.,
Abbildung 2.9.

In den hier vorliegenden Abbildungen erkennt man diffus gelagerte fibrohistiozytäre Zellen, im Hintergrund diesmal diffus einzelne Lymphozyten. Auch hier wird per Mauszeiger ein Zellkern markiert, per CAIA werden alle so definierten Farbwerte (Blauwerte) auf das gesamte Bild übertragen. Diesmal sind keine Konglomerate zu erkennen, falls dies hier vorläge, könnte analog zur Lymphozytenerkennung korrigiert werden. Einzelne nicht erkannte Zellen können ebenso per Mausklick nachträglich markiert werden.

2.4. Vergleich konventioneller Abschätzverfahren und CAIA

2.4.1. Vorversuche

Um einen Vergleich zwischen herkömmlicher Abschätzung und computergestützter Bildanalyse zu erreichen, wurden Aufnahmen von Synovektomiepräparaten verschiedenen Untersuchern vorgelegt. Abgeschätzt werden sollte die lymphozytäre Infiltration an vier Bildern mit unterschiedlicher Lymphozytendichte (Abb. 3-1 bis 3-4). Anschließend wurde die Lymphozytendichte mittels CAIA bestimmt. Abschließend wurden die Zellkerne visuell-manuell gezählt. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 3.2.

2.4.2. Eichung

Ein wesentliches Problem bei der Anwendung der computergestützten Bildanalyse war die Eichung. D. h., in Abhängigkeit von der Einstellung der Detektionsgrenzen konnten evtl. zuviele oder zuwenig Zellkerne erkannt werden. Damit die computergestützte Bildanalyse die korrekten Detektionsgrenzen erlernte, mußte das System geeicht werden. Dazu wurden am Bildschirm zunächst Zellkerne gezählt, jeder Zellkern wurde manuell mit einem Punkt markiert. Anschließend sollte das System Zellkerne erkennen. Bei einer Abweichung von über 5% wurden die Detektionsgrenzen geändert, dies geschah entweder manuell oder automatisiert durch das System. Lag die Abweichung unter 5%, wurden die Detektionsgrenzen beibehalten. Das System mußte dann in zehn aufeinanderfolgenden Messungen Zellkerne erkennen, deren Anzahl wiederum mit einer Abweichung von unter 5% zu den visuell-manuell ermittelten Werten lagen. Wurde diese Bedingung erfüllt, war das System geeicht. Die Messungen konnten dann beginnen.

Das geeichte System wurde hinsichtlich der Kernererkennung mit den Einschätzungen morphologisch erfahrener Pathologen verglichen. Die Werte hierfür finden sich in Tabelle 3.3 wieder.

2.5. Datenerhebung

2.5.1. Gewebegröße und Schnittstufen

Da die untersuchten Synovektomiepräparate keine einheitliche Gewebegröße hatten, mußten alle untersuchten Parameter in Bezug zur Gewebefläche gesetzt werden. Die Gewebefläche wurde wie oben beschrieben pixelgenau bestimmt. Anschließend wurde die Gewebefläche mit der Anzahl der vorhandenen Schnittstufen multipliziert. Die so erhaltene Gesamtgewebefläche, die für die Untersuchungen zur Verfügung stand, ist in Tabelle 3.4 wiedergegeben.

2.5.2. Entzündliche Infiltrate

Die Detektion entzündlicher Infiltrate erfolgte automatisiert wie oben beschrieben. Dazu wurden Areale ausgesucht, in denen die Zellkerne vor allem Lymphozyten repräsentierten. Da Lymphozyten und Stromazellen in der HE-Färbung prinzipiell gleichartig angefärbt wurden, konnte das Programm bei der Erfassung der Zellkerne nicht zwischen Lymphozyten und Stromazellen unterscheiden. D.h. bei jeder Messung wurden einige Zellkerne zuviel gemessen, was aber durch die bewußte Auswahl der Areale zu vernachlässigen war. Dies wurde durch den Vergleich mit immunhistologischen Präparaten deutlich: Durch anti-CD45 wurden Lymphozyten markiert und rot dargestellt. Diese vergleichenden Messungen wurden an sechs Präparaten durchgeführt, wobei drei Präparate einem Synovitis-Score 2 und drei Präparate einem Synovitis-Score 3 entsprachen. Die Änderung der Detektionsgrenzen im Programm auf "rot" ermöglichte eine selektive Erfassung der entzündlichen Infiltrate unter Ausblendung der Stromazellen, die Ergebnisse der automatisierten Zählungen an diesen immunhistologischen Präparaten waren nicht signifikant verschieden von den Ergebnissen der automatisierten Zählungen am herkömmlichen HE-Präparat. Die Ergebnisse der vergleichenden automatisierten Zählungen an immunhistologischen Präparaten und am herkömmlichen HE-Präparat sind in Tabelle 3.5 wiedergegeben. Die Dichte der entzündlichen Infiltrate für jede Gewebeprobe findet sich in Tabelle 3.6.

2.5.3. Deckzellschichtdicke

Die Messung der Deckzellschichtdicke erfolgte interaktiv wie oben beschrieben. Da die Deckzellschicht nur diskontinuierlich vorhanden war und oft eine unterschiedliche Breite aufwies, wurden zur Messung Areale ausgewählt, die repräsentativ erschienen. Als repräsentativ wurden Strecken angesehen, die keine Ablederung der oberen Lagen aufwiesen und innerhalb eines Kontinuums eine ähnliche Breite zeigten. Hier wurden parallel mehrere Messungen vorgenommen. Die Meßwerte, Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 3.7 wiedergegeben.

2.5.4. Stromazellichte

Für die Erfassung der Stromazellichte galt das gleiche Problem wie für die Erfassung der Lymphozytendichte: Da die Zellkerne der verschiedenen Zellpopulationen in der HE-Färbung vom Programm nicht zu differenzieren waren, wurden bei jeder Messung etwas zu hohe Werte erzielt. Analog zur Messung der Lymphozytendichte wurde auch hier durch bewußte Auswahl der Meßfelder (keine oder minimale entzündliche Infiltrate) dieser Fehler gering gehalten. Ausgewählt wurden sowohl Areale mit geringer Stromazellichte, als auch Areale mit mittlerer und hoher Stromazellichte. Meßwerte, Mittelwerte und Standardabweichungen finden sich in Tabelle 3.8.

2.5.5. Nekrosen

Als letzter Parameter wurden Nekrosen erfaßt, die morphologisch fast ausschließlich als fibrinoide Nekrosen imponierten. Fibrinoide Nekrosen stellten sich im HE-Präparat als homogene, eosinophile, amorphe Substanz ohne Zellkerne oder mit nur geringem Zellgehalt dar. Per automatisiertem Meßverfahren waren derartige Areale schwer zu erfassen, da aufgrund von Rotüberschneidungen mit der Umgebung immer wieder falsch zu hohe Werte gemessen wurden. Diese automatisiert gemessenen Werte waren von der tatsächlichen Nekroseausdehnung mitunter signifikant verschieden, die

vergleichenden Daten mit Mittelwerten und Standardabweichungen finden sich in Tabelle 3.9. Aus diesem Grund wurde auch bei der Nekrosenbestimmung auf die interaktive Meßmethode zurückgegriffen: Per Mauszeiger wurden die Nekroseareale umfahren, die eingeschlossene Fläche wurde pixelweise bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.10 zu finden.

2.6. Auswertung und Statistik

Die erhobenen Daten wurden mit Hilfe des Kolmogoroff-Smirnoff-Testes auf Normalverteilung geprüft. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,01$ festgelegt. Alle Unterschiede zwischen den Meßwerten wurden mit Hilfe des t-Tests nach Student auf Signifikanz geprüft; das Signifikanzniveau wurde für die Vorversuche auf $p < 0,05$ und für die Meßreihen ebenfalls auf $p < 0,01$ festgelegt.

2.6.1. Vergleich CAIA gegen konventionellen Score

Beim konventionellen Synovitis-Score wurden Punktwerte für die drei Parameter Dichte der entzündlichen Infiltrate, Stromazelldichte und Deckzellschichtbreite bestimmt. Anhand des Summenscores wurde der Entzündungsgrad festgestellt.

Beim CAIA-Score wurde das gesamte gemessene Spektrum eines Parameters arithmetisch in vier gleiche Viertel geteilt: Das erste Viertel entsprach der konventionellen Einschätzung „keine/nicht“, das zweite Viertel entsprach der konventionellen Einschätzung „wenig/geringgradig“, das dritte Viertel entsprach der konventionellen Einschätzung „mäßiggradig/mittelgradig“, das vierte Viertel entsprach der konventionellen Einschätzung „stark/hochgradig“. Analog dem konventionellen Score wurde für Werte im ersten Viertel des Spektrums ein Punktwert 0, für Werte im zweiten Viertel des Spektrums ein Punktwert 1, für Werte im dritten Viertel des Spektrums ein Punktwert 2 und für Werte im vierten Viertel des Spektrums ein Punktwert 3 vergeben. Die Zuteilung erfolgte mathematisch per Formel in einem Excel-

Arbeitsblatt. Zunächst wurde der minimale Wert und der maximale Wert einer Datengruppe ermittelt. Die Differenz wurde durch vier geteilt (vier Gruppen). Dieser Wert wurde als Quotient jedem Messergebnis zugeordnet, vorher wurde vom Messergebnis der minimale Wert für ein Messergebnis der Gruppe abgezogen. Dem ganzzahligen Anteil des Ergebnisses entsprach der zugehörige Punktwert. Die Formel für die Punktwertermittlung lautet also:

$$\text{GANZZAHL}((M - M(\text{min})) / M(\text{max}) - M(\text{min})) * 1/4)$$

Die Punktwertsumme wurde genauso eingeordnet, wie es mit den Punktwertsummen des konventionellen Scores geschah. Die Scores und die Punktwertsummen für konventionellen Score und CAIA-Score sind in Tabelle 3.11 zu finden. Die graphische Umsetzung ist in Abbildung 3.15. zu sehen.

3 Ergebnisse

3.1. Vorlaufphase

3.1.1. Eichung des Systems

Geeicht wurden die Objektive 2,5x - 5x - 10x - 20x - 40x - 100xÖl für die einstellbaren Vergrößerungsfaktoren 0,8x - 1,0x - 1,1x. Angegeben ist der Durchmesser eines Pixels in Mikrometer.

Vergr./Obj.	2,5	5	10	20	40	100
0,8	12,24	6,12	3,06	1,53	0,76	0,31
1,0	9,79	4,90	2,45	1,22	0,61	0,24
1,1	8,90	4,45	2,22	1,11	0,56	0,22

Tabelle 3.1: Eichungen für alle Kombinationen Objektiv/Vergrößerungsfaktor, Pixeldurchmesser in Mikrometer.

3.1.2. Vorversuche

Vier Bilder mit Aufnahmen von Synovektomiepräparaten wurden zehn Testpersonen vorgelegt (TP 1 – TP 10). Die Bilder waren auf einer DIN-A-4 Seite in schwarz-weiß mit hoher Auflösung und guter Druckqualität (300 dpi). reproduziert. Die Bilder wurden von Präparaten aufgenommen, die auch Eingang in die per CAIA vermessene Serie gefunden hatten. Pro Bild sollte nach 5-10 Sekunden eine geschätzte Lymphozytendichte angegeben werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2. wiedergegeben.

Bild	Zellen	TP 1	TP 2	TP 3	TP 4	TP 5	TP 6	TP 7	TP 8	TP 9	TP 10
1	37	20	20	25	25	30	20	50	30	25	50
2	319	120	100	100	70	150	250	500	300	250	200
3	33	15	25	30	20	30	60	40	45	25	40
4	24	15	10	20	15	30	30	30	30	20	35

Tabelle 3.2.

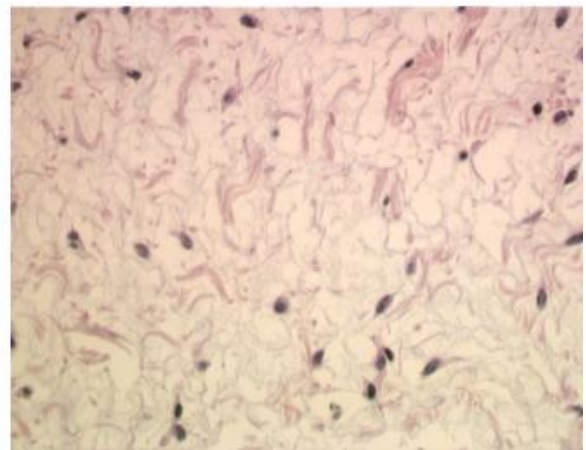
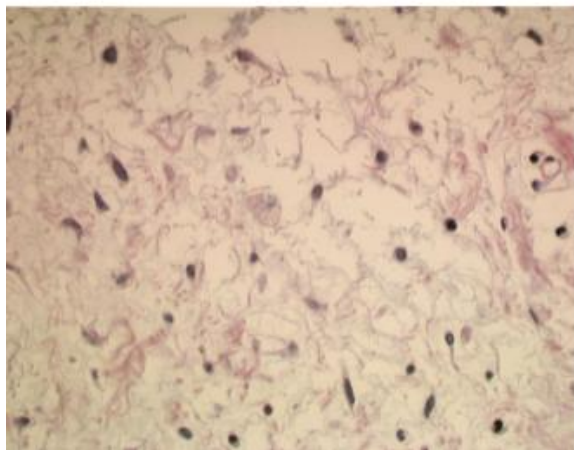
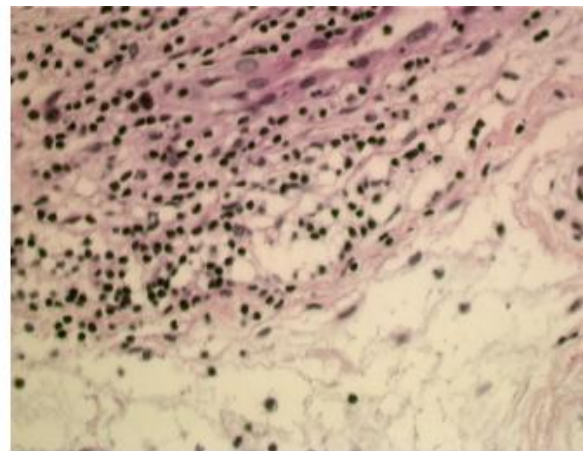
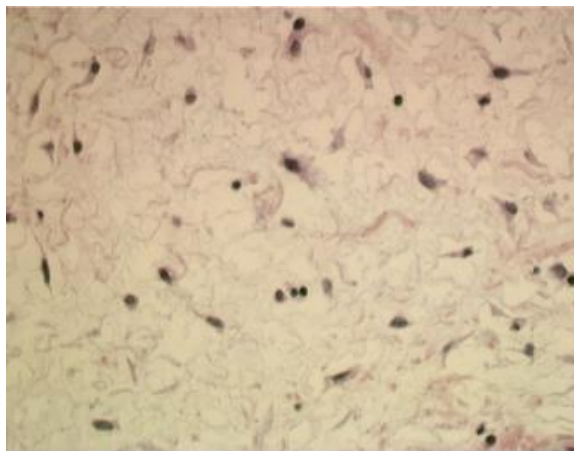


Abbildung 3.1. bis 3.4.: Bilder der Vorversuchsreihe mit unterschiedlichen Lymphozytendichten.

Die Mittelwerte und die Standardabweichungen für die einzelnen Bilder betrugen (Bild/Zellen/Mittelwert Schätzung/Standardabweichung Schätzung):

Bild1 / 37 / 29,5 / 11,41

Bild2 / 319 / 204 / 129,37

Bild3 / 33 / 33 / 13,37

Bild4 / 24 / 24,5 / 7,25

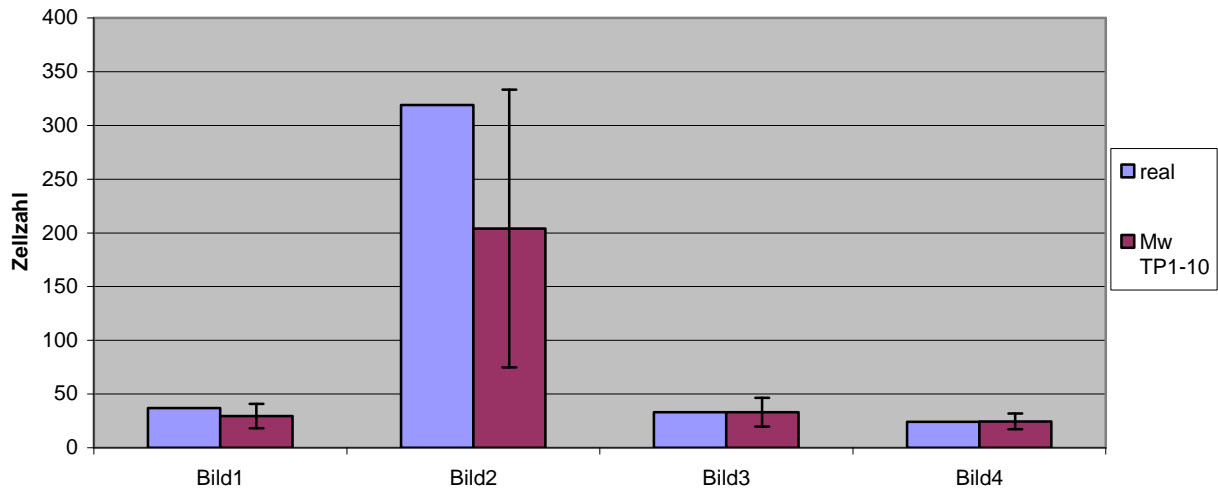


Abbildung 3.5.: Reale und geschätzte Zellzahlen mit Standardabweichungen in den ersten vier Bildern der Vorversuchsreihe.

Da insbesondere bei hohen Zellzahlen die Schätzungen erheblich sowohl voneinander als auch von den tatsächlichen Zellzahlen abweichen, wurden für die Evaluation mehr Fälle mit hohen Lymphozytendichten ausgesucht. Statistisch ergibt sich eine Prüfgröße $t=2,01/2,81/0/0,22$ für Bild 1/Bild 2/Bild 3/Bild 4, das Quantil liegt bei 2,26. Auf einem Signifikanzniveau von $p<0,05$ sind die geschätzten Werte nach Anwendung des parametrischen Ein-Stichproben-Tests (t-Test) in Bild 2 voneinander verschieden.

3.2. Evaluation

Drei morphologisch erfahrene Pathologen (Path 1 – Path 3) und das Programm NucDetect sollten hintereinander Zellzahlen schätzen bzw. detektieren. Die „Lernphase“ des Programms NucDetect (die Eichung) war abgeschlossen.

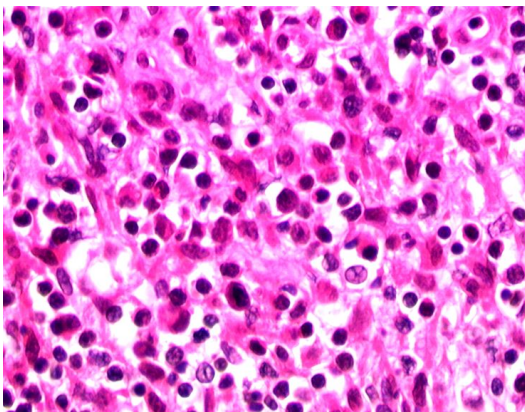
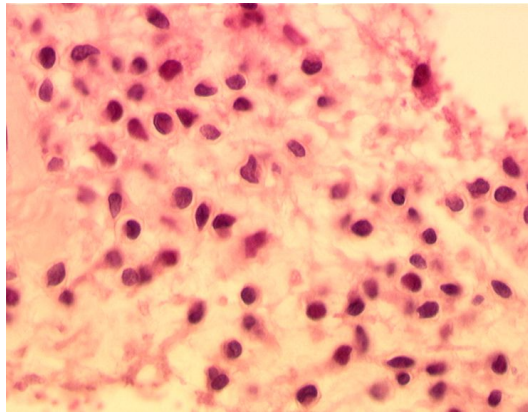
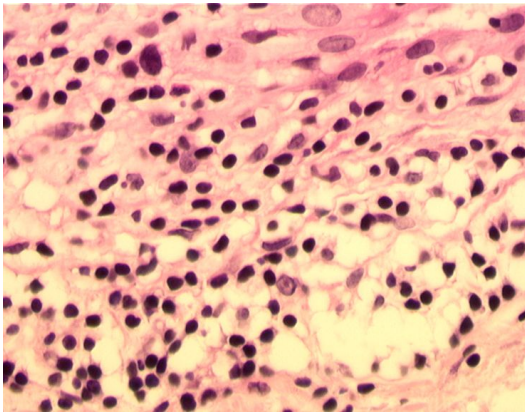
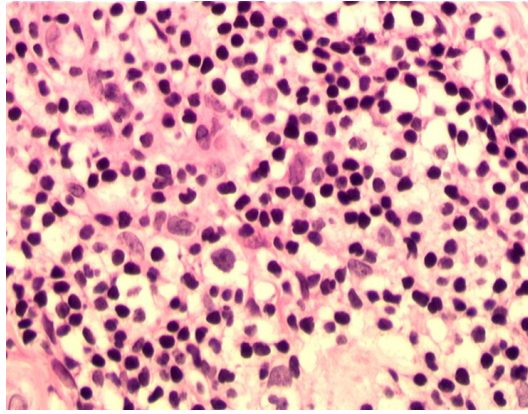
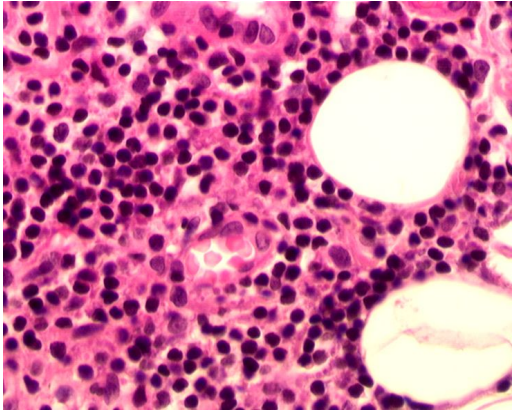


Abb. 3.9:
Eval1-Eval5.

Die CAIA-Detektion dauerte pro Bild ca. 1,5-mal so lange wie die gemittelte Abschätzung der Untersucher. Die geschätzten/ermittelten/gezählten Zellzahlen finden sich in Tabelle 3.3.

Bild	Zellzahl	NucDetect	Path 1	Path 2	Path 3
Eval1	293	295	200	400	100
Eval2	289	313	260	400	80
Eval3	193	195	120	250	50
Eval4	71	74	90	80	30
Eval5	198	210	160	350	60

Tabelle 3.3.: gezählte, gemessene und geschätzte Zellzahlen

Die Auswertung bestätigt den Verdacht aus den Vorversuchen, das insbesondere bei hohen Zellzahlen die CAIA der geschätzten Erhebung überlegen ist. Dies verdeutlichen die Abbildungen 3.6. und 3.7., in der jeder Untersucher getrennt aufgeführt ist. In Abbildung 3.6. sind die absolut geschätzten Zahlen wiedergegeben, in Abbildung 3.7. die relativ zur tatsächlichen Zellzahl geschätzten Zahlenwerte. Offenbar herrscht intraindividuell immer eine bestimmte Tendenz vor, nämlich grundsätzlich zu hoch oder zu niedrig zu schätzen. Eindeutig kann hier gezeigt werden, daß das Programm NucDetect die realen Zellzahlen am besten schätzen kann. Die Differenz zwischen realer Zellzahl und geschätzter Zellzahl ist beim Programm NucDetect minimal: $\text{Min}(\Delta) = \text{Min}(x - x(i)) = X(\text{NucDetect})$.

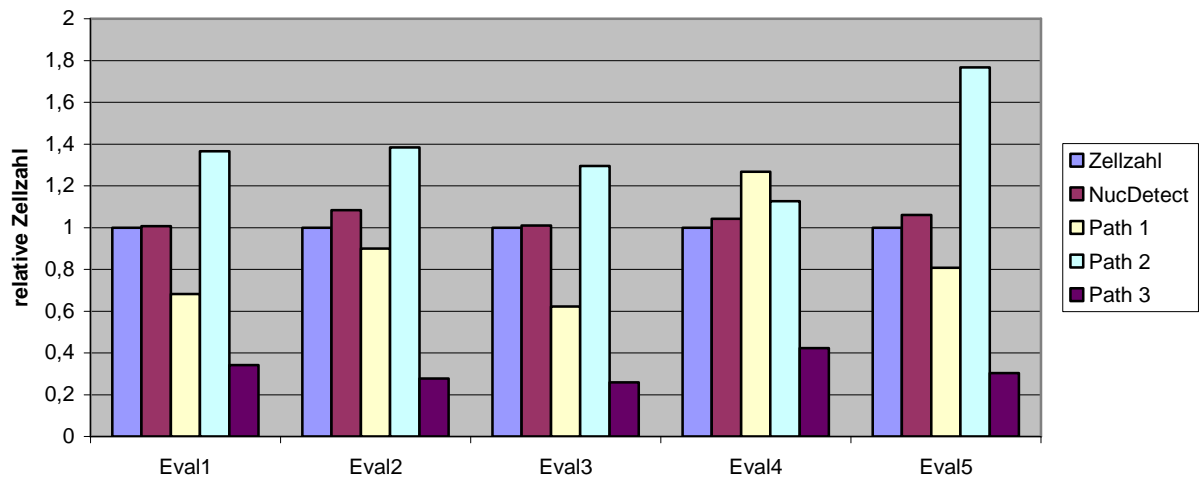
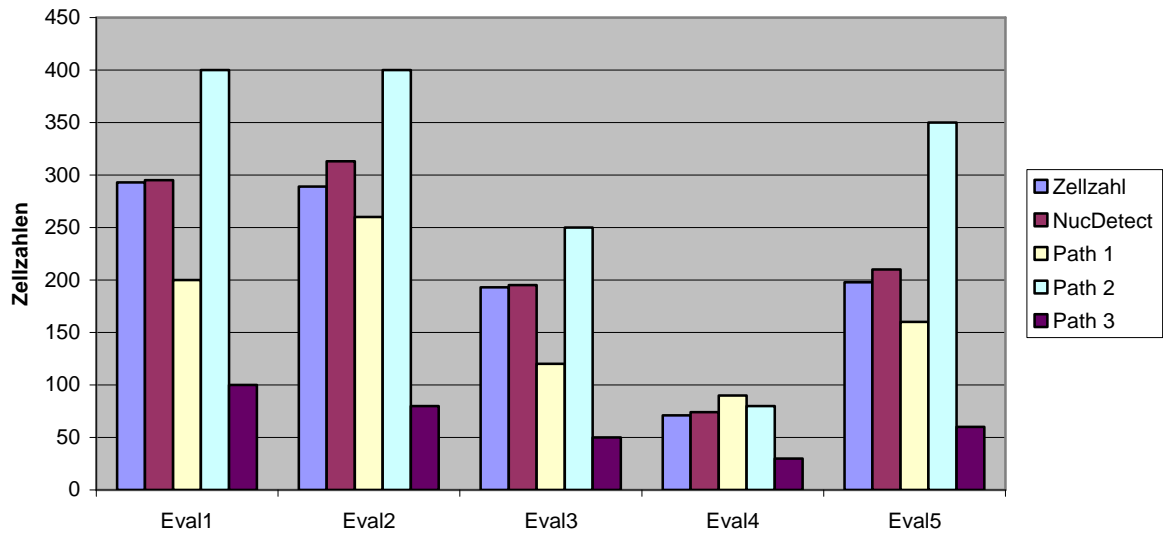


Abbildung 3.6. und Abbildung 3.7.

3.3. Gewebegröße und Schnittstufen

Die Synovektomiepräparate hatten unterschiedliche Größen. Um dies wenigstens teilweise auszugleichen, wurden von kleineren Präparaten Schnittserien zu mehreren Schnittstufen angefertigt. Schnittstufengröße, Schnittstufenanzahl und Gesamtgewebefläche finden sich in Tabelle 3.4.

Im arithmetischen Mittel war die untersuchte Fläche 112,55 mm² groß (Standardabweichung 75,51 mm²).

Die minimale untersuchte Fläche betrug 14,61 mm², die maximale untersuchte Fläche betrug 342,82 mm² (Median 95,75 mm²).

Gewebe-Nr.	Größe einer Schnittbene	Anzahl der Schnittebenen	Gesamtgröße aller Schnittebenen
syn89	212,67	1	212,67
syn169	111,46	1	111,46
syn171	134,64	1	134,64
syn209	103,29	1	103,29
syn238	97,28	1	97,28
syn301	9,30	2	18,59
syn350	9,56	4	38,26
syn40	215,84	1	215,84
syn138	87,50	1	87,50
syn265	124,78	1	124,78
syn285	35,31	2	70,61
syn292	26,60	2	53,19
syn381	4,66	4	18,64
syn382	8,52	4	34,06
syn385	15,20	4	60,80
syn421	6,49	3	19,47
syn5	83,42	1	83,42
syn79	174,19	1	174,19
syn113	124,68	1	124,68
syn251	186,78	1	186,78

syn148	161,51	1	161,51
syn181	89,06	1	89,06
syn186	162,77	1	162,77
syn229	146,91	1	146,91
syn156	191,28	1	191,28
syn38	130,02	1	130,02
syn182	80,20	1	80,20
syn187	190,08	1	190,08
syn195	149,47	1	149,47
syn207	71,69	1	71,69
syn213	44,26	1	44,26
syn234	79,56	1	79,56
syn239	14,61	1	14,61
syn363	20,56	3	61,68
syn62	171,41	2	342,82
syn286	10,54	4	42,16
syn140	177,49	1	177,49
syn143	89,18	1	89,18
syn145	79,89	1	79,89
syn150	65,71	1	65,71
syn192	157,21	1	157,21
syn218	18,45	1	18,45
syn1	21,25	2	42,50
syn20	117,29	2	234,58
syn44	53,07	2	106,14
syn50	95,87	1	95,87
syn80	49,12	1	49,12
syn110	132,17	1	132,17
syn153	46,99	1	46,99
syn183	141,47	1	141,47
syn193	22,69	1	22,69
syn219	37,41	1	37,41
syn24	301,22	1	301,22

syn68	86,45	1	86,45
syn149	87,03	1	87,03
syn151	103,50	1	103,50
syn167	145,38	1	145,38
syn177	315,83	1	315,83
syn180	42,38	1	42,38
syn197	34,19	1	34,19
syn198	95,75	1	95,75
syn200	62,76	1	62,76
syn11	261,57	1	261,57
syn53	43,97	2	87,94
syn60	110,26	1	110,26
syn64	120,83	1	120,83
syn137	215,26	1	215,26
syn302	12,91	2	25,82
syn311	17,37	3	52,12
syn356	171,39	1	171,39
syn357	123,20	2	246,39

Tabelle 3.4.

3.4. Entzündliche Infiltrate

Methodisch bedingt wurden bei der Messung lymphozytärer entzündlicher Infiltrate auch immer wieder Stromazellen oder andere Zellen wie zum Beispiel Endothelien mitgemessen. Dies erklärte sich aus der Formähnlichkeit der Zellkerne. Um diese morphologisch per CAIA auseinanderhalten zu können, müssten 400-fache bis 1000-fache Vergrößerungen gewählt werden, was praktisch jedoch unakzeptabel war, da unter diesen Bedingungen zu viele Messfelder ausgewertet werden müssten, was wiederum die Auszähldauer erheblich verlängert hätte. Also wurden die Messungen bei 100-facher Vergrößerung vorgenommen. Die Messungen wurden auf Bereiche hoher Lymphozytendichte fokussiert, nicht-lymphozytäre Zellen waren in diesen Arealen kaum

zu erkennen. Immunhistologische Kontrollen mit anti-CD45 wurden angefertigt. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 3.5.

Immunhistologischer Ansatz Nr.	Anzahl Messungen CD45	Mittelwert Messung CD45	Standardabweichung CD45
CD45-1	15	357,47	47,51
CD45-2	12	312,17	44,32
CD45-3	12	328,75	39,27
CD45-4	12	355,25	39,22
CD45-5	12	295,75	61,35
CD45-6	10	224,30	79,72
Immunhistologischer Ansatz Nr.	Anzahl Messungen HE	Mittelwert Messung HE	Standardabweichung HE
CD45-1	15	383,27	34,54
CD45-2	12	320,58	40,41
CD45-3	12	345,33	40,37
CD45-4	12	375,33	31,40
CD45-5	12	310,83	30,01
CD45-6	10	251,30	57,73

Tabelle 3.5.

Die graphische Darstellung verdeutlichte, dass konventionell (in der HE-Färbung) immer ein leicht erhöhter Zellgehalt gemessen wurde. Dieser war jedoch nie signifikant höher als der immunhistologisch gemessene Entzündungszellgehalt. Durchgeführt wurde ein Zwei-Stichproben-t-Test für paarige Stichproben. Die t-Werte betragen für CD45(1-6) jeweils 1,55-0,55-0,86-1,29-0,70-0,67. Für $\alpha=0,05$ lagen die Quantile bei 2,14-2,2-2,2-2,2-2,2-2,26. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 5% ($p<0,05$) kann davon ausgegangen werden, daß der immunhistologisch gemessene Entzündungszellgehalt vom konventionell-lichtmikroskopisch gemessenen Zellgehalt nicht verschieden ist.

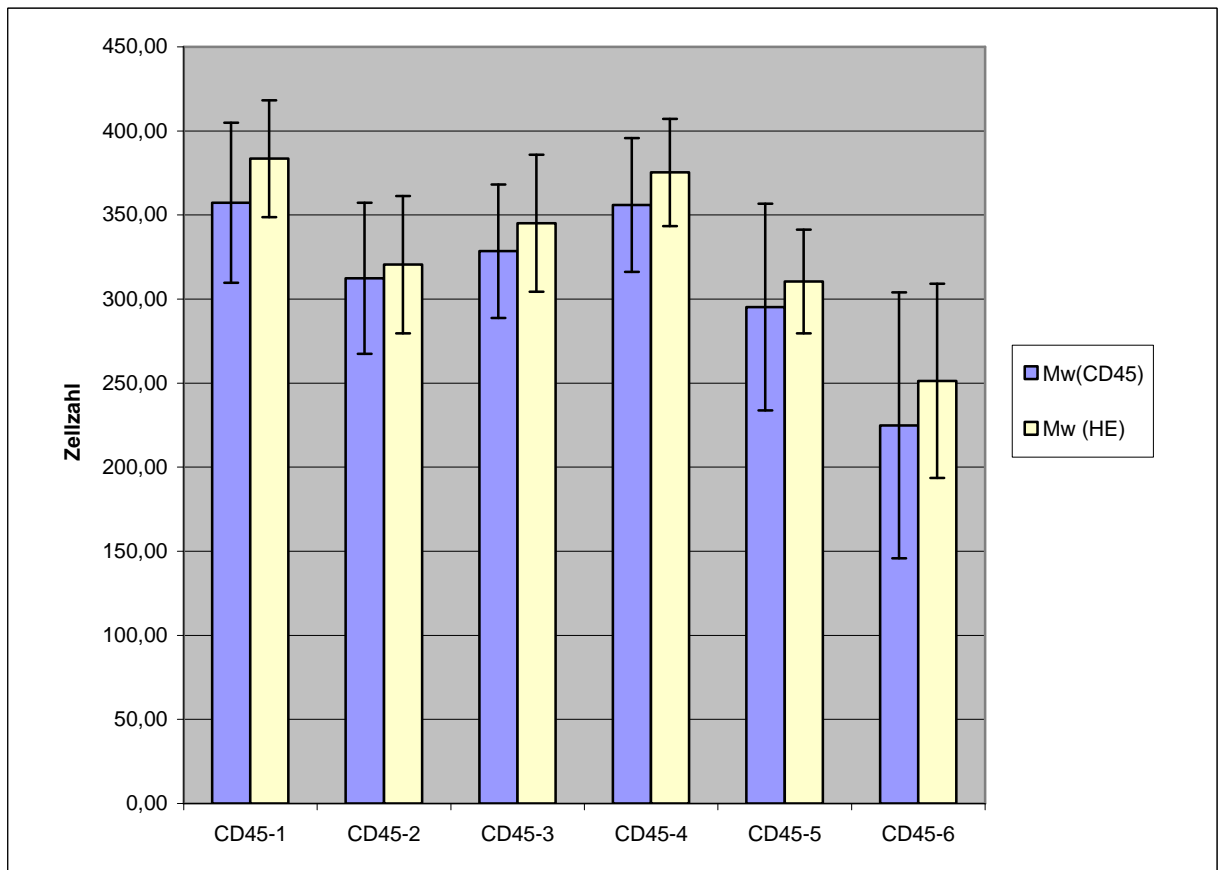


Abbildung 3.13.

In Tabelle 3.6. sind alle gemessenen Zelldichten in allen Präparaten wiedergegeben. Zusätzlich findet sich in der Tabelle der konventionell-lichtmikroskopisch erhobene Synovitis-Score. Die Anzahl der beobachteten lymphozytären Infiltrate ist ebenfalls aufgeführt, wobei 20 lymphozytäre Infiltrate und mehr einer diffusen dichten lymphozytären Infiltration gleichkommen.

Gewebe-Nr.	Anzahl lymphozyt. Infiltrate	Anzahl der Messungen	MW der gemessenen Lymphozyten	STD der gemessenen Lymphozyten	Konvention. Entzündungsgrad
syn89	0	0	0,00	0,00	0
Syn169	0	0	0,00	0,00	0
Syn171	0	0	0,00	0,00	0
Syn209	0	0	0,00	0,00	0
Syn238	1	3	175,33	30,10	0
Syn301	0	0	0,00	0,00	0
Syn350	0	0	0,00	0,00	0
syn40	0	0	0,00	0,00	0
Syn138	0	0	0,00	0,00	0
Syn265	0	0	0,00	0,00	0
Syn285	0	0	0,00	0,00	0
Syn292	0	0	0,00	0,00	0
Syn381	0	0	0,00	0,00	0
Syn382	0	0	0,00	0,00	0
Syn385	1	1	71,00	0,00	0
Syn421	0	0	0,00	0,00	0
syn5	0	0	0,00	0,00	1
syn79	0	0	0,00	0,00	1
Syn113	1	3	295,66	12,57	1
Syn251	0	0	0,00	0,00	1
Syn148	0	0	0,00	0,00	1
Syn181	0	0	0,00	0,00	1
Syn186	0	0	0,00	0,00	1
Syn229	0	0	0,00	0,00	1
Syn156	0	0	0,00	0,00	1
syn38	0	0	0,00	0,00	1
Syn182	0	0	0,00	0,00	1
Syn187	0	0	0,00	0,00	1
Syn195	2	5	274,25	163,40	1

Syn207	5	10	364,40	62,19	1
Syn213	9	9	291,33	37,07	1
Syn234	1	1	238,00	0,00	1
Syn239	0	0	0,00	0,00	1
Syn363	0	0	0,00	0,00	1
syn62	13	10	301,00	32,00	2
Syn286	20	13	258,08	38,83	2
Syn140	20	15	385,26	40,25	2
Syn143	9	12	347,33	58,51	2
Syn145	10	8	315,75	45,32	2
Syn150	11	8	325,81	39,36	2
Syn192	18	14	351,84	29,31	2
Syn218	20	10	343,29	20,58	2
syn1	6	11	216,25	52,42	2
syn20	4	6	151,33	21,52	2
syn44	16	10	345,30	45,32	2
syn50	14	8	333,21	57,51	2
syn80	6	6	187,48	21,68	2
Syn110	3	3	149,66	41,50	2
Syn153	8	10	280,45	84,27	2
Syn183	0	0	0,00	0,00	2
Syn193	0	0	0,00	0,00	2
Syn219	4	4	259,75	43,81	2
syn24	19	15	392,15	45,84	3
syn68	20	10	324,85	69,51	3
Syn149	12	8	313,86	36,12	3
Syn151	18	10	330,28	454,73	3
Syn167	10	10	354,16	51,84	3
Syn177	9	8	299,25	43,87	3
Syn180	8	8	264,91	54,26	3
Syn197	16	10	356,72	62,45	3
Syn198	17	10	346,82	47,61	3
Syn200	20	10	294,23	60,10	3

syn11	20	10	214,38	88,74	3
syn53	20	12	356,82	39,24	3
syn60	20	10	309,41	38,46	3
syn64	20	15	182,27	36,58	3
Syn137	20	8	202,13	30,58	3
Syn302	20	6	351,33	59,21	3
Syn311	20	6	254,66	37,51	3
Syn356	15	9	288,81	65,24	3
Syn357	18	8	307,63	54,97	3

Tabelle 3.6.

3.5. Deckzellschichtdicke

Zunächst wurde die Anzahl der Zellschichten gezählt. Da die Deckzellschichthöhe örtlich unterschiedlich hoch sein konnte, wurde die Zählung mehrmals wiederholt (4mal bei optisch gleichmäßiger Deckzellschichtdicke, bis zu 10mal bei optisch ungleichmäßiger Deckzellschichtdicke). Das arithmetische Mittel wurde tabellarisch erfasst. Anschließend wurde die Deckzellschichtdicke wiederholt an verschiedenen Stellen gemessen (interaktiver Modus). Anzahl der Messungen, Mittelwerte und Standardabweichungen finden sich in der Tabelle 3.7.

Gewebe-Nr.	Anzahl der Zellschichten	Anzahl der Messungen	MW Breite in μm	STD Breite in μm
syn89	2,50	10	14,29	3,73
syn169	1,00	14	6,61	2,18
syn171	1,25	15	8,51	1,38
syn209	3,50	18	19,32	6,36
syn238	1,00	20	6,20	2,50
syn301	2,00	12	12,10	3,50
syn350	1,00	15	7,30	2,90
syn40	2,50	12	16,50	5,20
syn138	2,00	10	14,79	6,60
syn265	3,00	20	23,60	4,90
syn285	3,00	22	21,51	2,88
syn292	1,00	5	7,02	0,90
syn381	3,00	6	27,45	2,41
syn382	2,00	20	13,98	0,89
syn385	3,50	19	22,05	2,11
syn421	3,00	20	25,36	1,56
syn5	6,00	12	44,31	8,32
syn79	5,00	12	35,37	9,45
syn113	5,00	10	38,04	6,30
syn251	4,00	15	27,79	3,81
syn148	3,50	15	23,25	3,21

syn181	2,50	20	21,42	3,18
syn186	3,00	30	25,21	10,12
syn229	3,00	15	16,12	2,84
syn156	1,50	5	11,80	1,28
syn38	2,00	10	13,51	0,22
syn182	1,50	15	9,90	0,29
syn187	2,50	13	18,74	5,62
syn195	3,00	15	24,09	2,51
syn207	3,00	15	40,72	9,68
syn213	2,00	10	21,45	3,77
syn234	3,50	15	24,28	6,91
syn239	2,50	8	18,18	2,10
syn363	3,00	5	38,11	5,25
syn62	3,00	25	37,35	20,41
syn286	2,50	10	18,18	2,63
syn140	5,00	10	72,45	10,62
syn143	0,00	0	0,00	0,00
syn145	7,00	12	73,25	31,85
syn150	3,00	5	18,24	3,21
syn192	4,00	10	35,21	15,64
syn218	0,00	0	0,00	0,00
syn1	1,50	12	12,25	0,65
syn20	5,00	10	56,89	4,16
syn44	1,00	5	7,50	0,21
syn50	5,00	5	53,84	6,98
syn80	5,50	6	49,54	10,60
syn110	4,50	8	45,60	9,39
syn153	5,00	8	65,29	11,82
syn183	0,00	0	0,00	0,00
syn193	0,00	0	0,00	0,00
syn219	0,00	0	0,00	0,00
syn24	4,00	10	37,54	3,64
syn68	0,00	0	0,00	0,00

syn149	5,00	5	54,66	8,06
syn151	2,00	8	15,85	3,16
syn167	3,00	5	25,68	6,83
syn177	3,50	9	31,28	5,49
syn180	5,00	5	43,28	6,64
syn197	4,00	9	38,53	8,61
syn198	4,50	8	35,54	6,21
syn200	5,00	6	52,06	10,80
syn11	3,50	6	28,50	4,61
syn53	5,00	4	35,75	2,54
syn60	4,50	6	29,66	5,87
syn64	5,50	10	69,96	16,43
syn137	3,00	8	27,53	7,16
syn302	4,50	7	42,42	10,47
syn311	4,00	6	46,25	12,76
syn356	3,50	8	31,83	9,84
syn357	4,50	8	38,63	14,51

Tabelle 3.7.

3.6. Stromazellendichte

Die Stromazellendichte wurde in entzündungsarmen Abschnitten ermittelt. Der Grund hierfür war die zuvor beschriebene Problematik der morphometrisch nicht differenzierbaren Zellkernstrukturen in der 100fachen Vergrößerung. Anzahl der Messungen pro Synovektomiepräparat, Mittelwerte und Standardabweichungen finden sich in Tabelle 3.8.

Gewebe-Nr.	Anzahl der Messungen	MW Anzahl der Stromazellen	STD Anzahl der Stromazellen
Syn89	6	16,17	3,31
Syn169	5	25,50	4,31
Syn171	8	41,85	10,24
Syn209	8	40,25	75,76
Syn238	7	31,87	12,56
Syn301	4	20,72	5,39
Syn350	4	25,46	10,71
Syn40	6	18,54	3,86
Syn138	6	15,24	3,68
Syn265	5	22,53	5,27
Syn285	6	32,92	6,17
Syn292	4	16,27	3,54
Syn381	4	13,42	2,98
Syn382	4	14,28	2,59
Syn385	4	19,52	4,38
Syn421	3	13,55	3,34
Syn5	10	92,56	62,14
Syn79	8	33,40	30,43
Syn113	8	20,84	12,06
Syn251	8	46,29	39,47
Syn148	10	30,49	23,13
Syn181	8	22,51	14,32
Syn186	10	15,74	10,10

Syn229	8	20,59	12,49
Syn156	8	13,36	4,17
Syn38	8	20,14	5,96
Syn182	6	12,58	3,57
Syn187	10	45,82	39,31
Syn195	8	51,23	32,54
Syn207	8	36,27	15,38
Syn213	10	43,25	45,41
Syn234	8	24,56	21,34
Syn239	6	41,82	23,72
Syn363	6	19,94	6,27
Syn62	8	65,76	23,58
Syn286	6	104,17	69,61
syn140	8	82,44	30,65
syn143	8	79,63	31,51
syn145	8	86,22	36,47
syn150	8	101,83	32,47
syn192	8	105,65	39,44
syn218	6	99,54	29,63
syn1	6	47,22	20,47
syn20	8	36,88	15,29
syn44	8	41,78	29,31
syn50	8	62,56	31,14
syn80	8	31,44	34,85
syn110	10	63,31	29,88
syn153	8	24,47	10,62
syn183	8	89,29	30,18
syn193	10	9,88	2,17
syn219	6	38,19	21,82
syn24	8	49,54	20,45
syn68	8	111,56	35,85
syn149	8	51,42	29,82
syn151	8	120,18	35,11

syn167	8	63,25	36,44
syn177	8	30,25	19,66
syn180	8	86,24	31,22
syn197	10	99,55	40,12
syn198	10	40,28	23,61
syn200	8	125,43	26,58
syn11	8	85,46	25,96
syn53	8	42,12	34,87
syn60	8	101,56	25,49
syn64	8	75,75	25,94
syn137	8	96,54	21,73
syn302	4	72,65	32,87
syn311	8	64,48	29,82
syn356	8	81,22	30,89
syn357	8	81,42	36,85

Tabelle 3.8.

3.7. Nekrosen

Die Schwierigkeiten in der automatisierten Erkennung von Nekrosen mittels CAIA bestand in der Rotüberschneidung zum umgebenden Gewebe. Daß mit diesem Verfahren fälschlicherweise zu hohe Werte gemessen werden, veranschaulichen Tabelle 3.9. und Abbildung 3.14.

Nekrosemessung Nr.	Anzahl Messungen CAIA	Mittelwert CAIA	Standardabweichung CAIA
Nek1	10	33,69	10,45
Nek2	10	19,81	9,56
Nek3	8	45,53	6,49
Nek4	8	25,58	12,09
Nek5	10	5,69	2,10
Nek6	8	2,89	0,91
Nekrosemessung Nr.	Anzahl Messungen manuell	Mittelwert manuell	Standardabweichung Manuell
Nek1	10	27,16	2,55
Nek2	10	9,14	0,36
Nek3	8	37,55	3,97
Nek4	8	11,96	2,08
Nek5	10	2,61	0,91
Nek6	8	0,45	0,20

Tabelle 3.9.

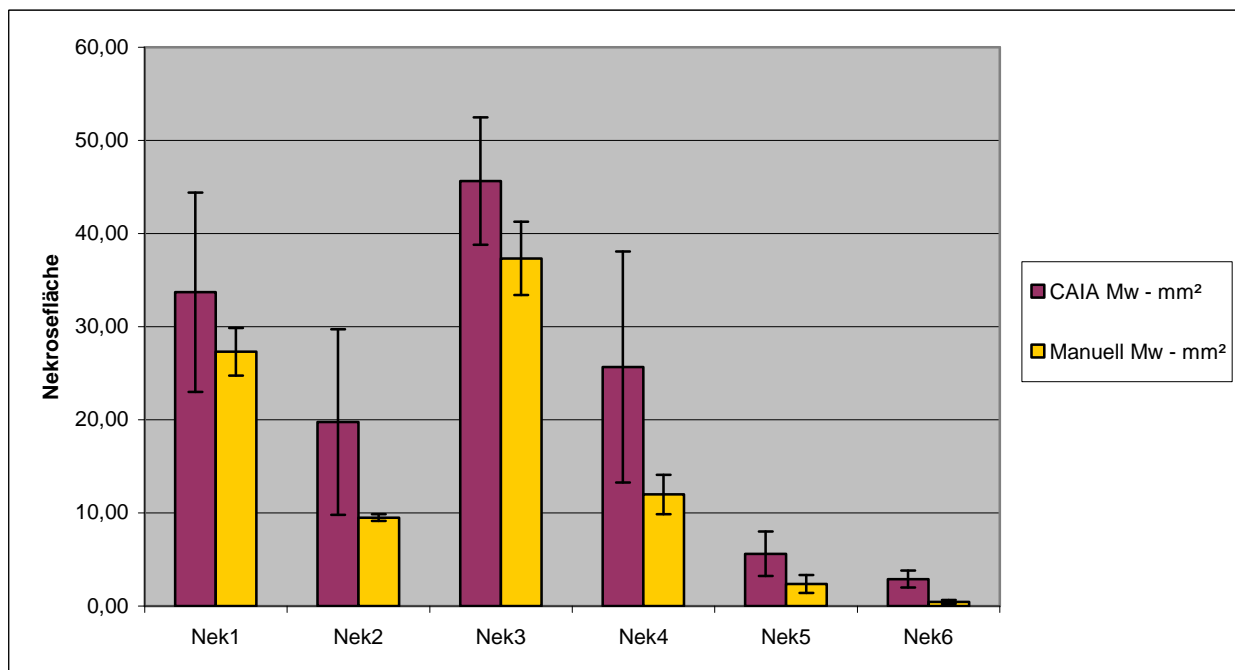


Abbildung 3.14.

Zu erkennen waren nicht nur die falsch zu hoch gemessenen Nekroseflächen, sondern auch die relativ großen Standardabweichungen, die einer großen Meßungenauigkeit entsprachen. Ausgewählt wurden 6 Präparate (Nek1-6) mit kleinen und großen Nekroseflächen aus allen Entzündungsgraden. Die Nekrosen wurden manuell und per CAIA bestimmt. Durchgeführt wurde ein Zwei-Stichproben-t-Test für paarige Stichproben. Die t-Werte betragen für Nek1-6 jeweils 2,06-3,31-2,64-3,53-4,06-7,90. Für $\alpha=0,05$ lagen die Quantile bei 2,26-2,26-2,36-2,36-2,26-2,36. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 5% ($p<0,05$) kann davon ausgegangen werden, daß der per CAIA gemessene Nekroseanteil vom manuell gemessenen Nekroseanteil für Nek2-6 verschieden ist. Die Nekroseareale wurden daher manuell bestimmt.

Gewebe-Nr.	Nekrosen in mm²	Konvention. Score	Gewebe-Nr.	Nekrosen in mm²	Konvention. Score
Syn89	0,00	0	syn140	1,46	2
Syn169	0,00	0	syn143	0,63	2
Syn171	0,00	0	syn145	0,00	2
Syn209	2,93	0	syn150	3,86	2
Syn238	0,00	0	syn192	5,56	2
Syn301	0,00	0	syn218	0,00	2
Syn350	0,00	0	syn1	0,05	2

Syn40	0,00	0	syn20	1,00	2
Syn138	0,00	0	syn44	4,17	2
Syn265	0,00	0	syn50	7,15	2
Syn285	0,00	0	syn80	1,17	2
Syn292	0,00	0	syn110	6,42	2
Syn381	0,00	0	syn153	0,00	2
Syn382	0,00	0	syn183	36,60	2
Syn385	0,00	0	syn193	0,00	2
Syn421	0,00	0	syn219	13,30	2
Syn5	0,00	1	syn24	0,00	3
Syn79	0,00	1	syn68	10,15	3
Syn113	0,00	1	syn149	2,64	3
Syn251	0,00	1	syn151	0,00	3
Syn148	0,00	1	syn167	31,92	3
Syn181	0,00	1	syn177	60,44	3
Syn186	0,00	1	syn180	0,00	3
Syn229	0,00	1	syn197	1,67	3
Syn156	0,00	1	syn198	3,95	3
Syn38	0,00	1	syn200	0,71	3
Syn182	0,00	1	syn11	27,30	3
Syn187	0,00	1	syn53	9,49	3
Syn195	0,00	1	syn60	37,33	3
Syn207	0,00	1	syn64	11,98	3
Syn213	0,00	1	syn137	2,37	3
Syn234	0,00	1	syn302	0,45	3
Syn239	0,00	1	syn311	1,10	3
Syn363	0,00	1	syn356	12,54	3
Syn62	56,88	2	syn357	0,00	3
Syn286	0,00	2			

Tabelle 3.10.

Alle Proben mit Entzündungsgrad 0 und 1 waren nekrosefrei, während 75% der mittleren und hohen Entzündungsgrade (27/36) Nekrosen aufwiesen.

3.8. Konventioneller Score und CAIA-Score

Der Vergleich der Scores und Punktwertsummen zwischen konventionellem Verfahren und CAIA-Verfahren sind in Tabelle 3.11. zusammengefaßt.

Gewebe-Nr.	Punkte Lymphozyten-dichte	Punkte Höhe der Deck-zellschicht	Punkte Stromazell-dichte	Summe CAIA-Score	CAIA-Score	Konv.-Score
syn89	0	0	0	0	0	0
syn169	0	0	0	0	0	0
syn171	0	0	1	1	0	0
syn209	0	1	1	2	1	0
syn238	1	0	0	1	0	0
syn301	0	0	0	0	0	0
syn350	0	0	0	0	0	0
syn40	0	0	0	0	0	0
syn138	0	0	0	0	0	0
syn265	0	1	0	1	0	0
syn285	0	1	0	1	0	0
syn292	0	0	0	0	0	0
syn381	0	1	0	1	0	0
syn382	0	0	0	0	0	0
syn385	0	1	0	1	0	0
syn421	0	1	0	1	0	0
syn5	0	2	2	4	2	1
syn79	0	1	0	1	0	1
syn113	3	2	0	5	2	1
syn251	0	1	1	2	1	1
syn148	0	1	0	1	0	1
syn181	0	1	0	1	0	1
syn186	0	1	0	1	0	1
syn229	0	0	0	0	0	1

syn156	0	0	0	0	0	1
syn38	0	0	0	0	0	1
syn182	0	0	0	0	0	1
syn187	0	1	1	2	1	1
syn195	2	1	1	4	2	1
syn207	3	2	0	5	2	1
syn213	2	1	1	4	2	1
syn234	2	1	0	3	1	1
syn239	0	0	1	1	0	1
syn363	0	2	0	2	1	1
syn62	3	2	1	6	2	2
syn286	2	0	3	5	2	2
syn140	3	3	2	8	3	2
syn143	3	0	2	5	2	2
syn145	3	3	2	8	3	2
syn150	3	0	3	6	2	2
syn192	3	1	3	7	3	2
syn218	3	0	3	6	2	2
syn1	2	0	1	3	1	2
syn20	1	3	0	4	2	2
syn44	3	0	1	4	2	2
syn50	3	2	1	6	2	2
syn80	1	2	0	3	1	2
syn110	1	2	1	4	2	2
syn153	2	3	0	5	2	2
syn183	0	0	2	2	1	2
syn193	0	0	0	0	0	2
syn219	2	0	0	2	1	2
syn24	3	2	1	6	2	3
syn68	3	0	3	6	2	3
syn149	3	2	1	6	2	3
syn151	3	0	3	6	2	3
syn167	3	1	1	5	2	3

syn177	3	1	0	4	2	3
syn180	2	2	2	6	2	3
syn197	3	2	3	8	3	3
syn198	3	1	1	5	2	3
syn200	3	2	3	8	3	3
syn11	2	1	2	5	2	3
syn53	3	1	1	5	2	3
syn60	3	1	3	7	3	3
syn64	1	3	2	6	2	3
syn137	2	1	2	5	2	3
syn302	3	2	2	7	3	3
syn311	2	2	1	5	2	3
syn356	2	1	2	5	2	3
syn357	3	2	2	7	3	3

Tabelle 3.11.

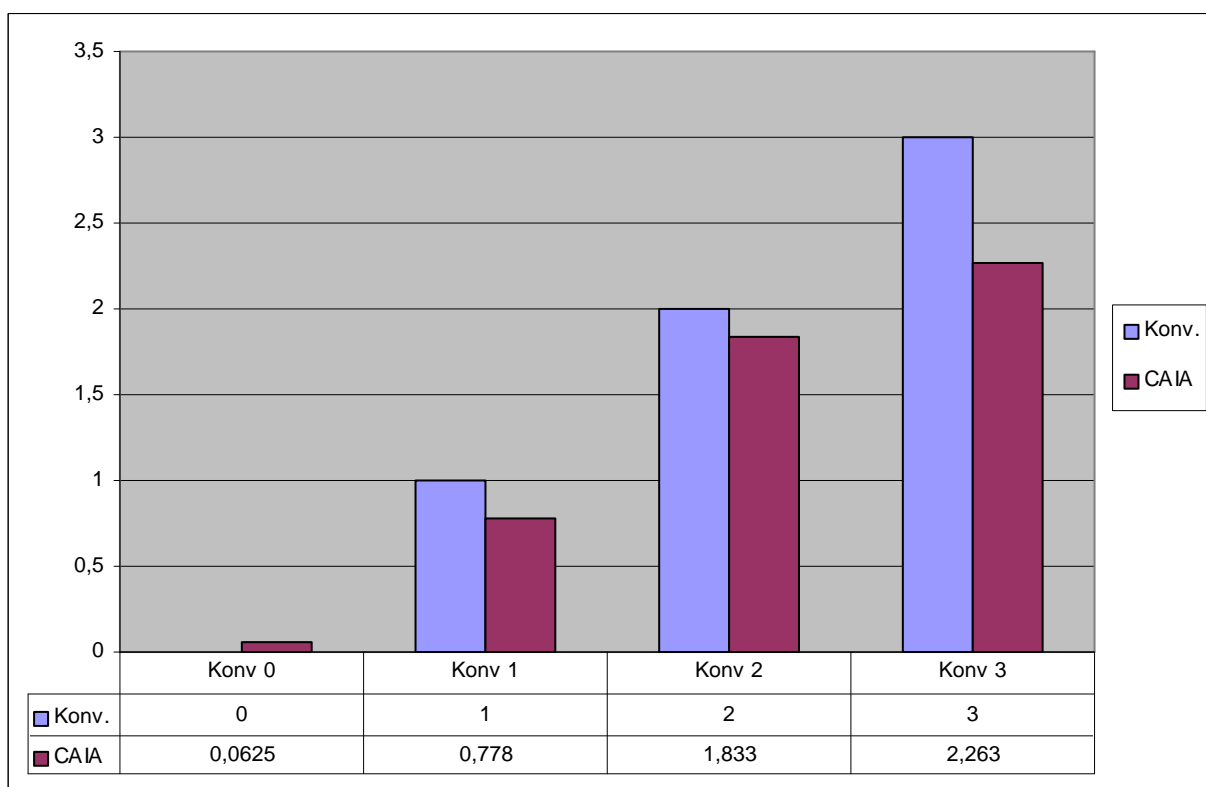


Abbildung 3.15.

Ein graphischer Vergleich zwischen konventionellem Score und CAIA-Score ergab, daß konventionell zu hohe Punktwertsummen ermittelt wurden. Die Eingruppierung fiel, insbesondere in den höheren Gruppen, zu hoch aus. Dargestellt ist in Abbildung 3.15. der Mittelwert der CAIA-Gruppierung im direkten Vergleich zur konventionellen Eingruppierung. Die Werte sind für alle Entzündungsgrade normalverteilt. Für die Entzündungsgrade 0,1 und 2 sind die Unterschiede nicht signifikant. Für den Entzündungsgrad 3 sind die Unterschiede signifikant ($p < 0,01$). Durchgeführt wurde ein Zwei-Stichproben-t-Test für paarige Stichproben. Die t-Werte betragen für die Entzündungsgrade 0-3 jeweils 1-1,07-0,90-6,65. Für $\alpha = 0,01$ lagen die Quantile bei 2,95-2,9-2,9-2,9. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 1% ($p < 0,01$) kann davon ausgegangen werden, daß der per CAIA gemessene Entzündungsgrad vom manuell ermittelten Entzündungsgrad für die Entzündungsgrade 0-2 nicht verschieden ist. Für den Entzündungsgrad 3 ist diese Hypothese zu verwerfen. Dies liegt daran, daß für 14 Fälle des konventionellen Scores 3 nur ein CAIA-Score von 2 ermittelt wird. Von diesen 14 Fällen haben 6 die Punktwertsumme 6 und 7 die Punktwertsumme 5. Nur ein Fall hat die Punktwertsumme 4.

4 Diskussion

4.1. Gradingssysteme in der Pathologie

Sowohl in der Tumorpathologie als auch in der Entzündungspathologie spielen Gradingssysteme eine Rolle. Die diagnostische Wertigkeit reicht hierbei von therapieentscheidend bis lediglich unterstützend. Insbesondere in der Tumorpathologie sind Gradingssysteme lange etabliert. Der Graduierung von Sarkomen kommt hinsichtlich der postoperativen Therapie eine tragende Rolle zu (Rosai). Hinsichtlich der Prognose weisen hochdifferenzierte Karzinome eine bessere Prognose auf als niedrig differenzierte Karzinome. Gelegentlich nehmen in der Entzündungspathologie Graduierungssysteme nur einen unterstützenden Stellenwert ein, wie z. B. in der Diagnostik der chronischen Sialadenitis (Chisholm/Masholm), mehrheitlich nehmen in der Entzündungspathologie Graduierungssysteme jedoch einen zunehmend höheren Stellenwert ein, dies geht bis zur definitiven Typisierung der Erkrankung wie z. B. bei der Lupus-Glomerulonephritis nach WHO (Weening) oder bei der Graduierung der Gastritis (Stolte). Wenn sich ein Graduierungssystem im Alltag durchsetzen soll, muß es neben einer hohen diagnostischen Wertigkeit als Grundvoraussetzung leicht durchführbar sein und eine gute Reproduzierbarkeit aufweisen. Auch in der Transplantationspathologie sind Graduierungssysteme inzwischen existentiell. Insbesondere hier zeigt sich, wie sehr leichte Durchführbarkeit bei guter Reproduzierbarkeit die Alltagstauglichkeit bestimmen. Während ein recht aufwändiges System zur Klassifizierung der Abstoßungsreaktion bei herztransplantierten Patienten (Kemnitz 1987) keinen weitverbreiteten Durchbruch gefunden hat, gibt es für die Rejektion nach Lebertransplantation international anerkannte Klassifizierungssysteme (Datta Gupta, Scheuer 1995).

4.2. Gradingssysteme der Synovitis

Nur wenige Erkrankungen, die sich primär oder sekundär an der Synovia manifestieren, rufen pathognomonische Veränderungen hervor. Die Synovialitisdiagnostik zeichnet sich somit durch einen variablen Sicherheitsgrad aus (Stiehl, Mohr, Fassbender).

Für die Pathologen stellt die Synovialitisdiagnostik daher schon lange eine Herausforderung dar. Ein gutes Typisierungsschema für die Klassifikation der Synovialitis wurde von Fritz und Mitarbeiter (1989) vorgeschlagen: Der sicheren Synovitis (certain-synovitis, C-synovitis) wird die nicht sichere Synovitis gegenübergestellt (synovitis with non-characteristic morphological findings, NC-synovitis). Die diagnostische Sicherheit wird hier als Kriterium benutzt, um zwischen den wichtigsten degenerativen und metabolischen sowie entzündlichen Gelenkerkrankungen zu unterscheiden (Fritz). Ein speziell für die Typisierung der rheumatoiden Arthritis ausgelegtes System zur Graduierung wurde von Stiehl und Mitarbeitern vorgestellt. Drei Typen der Synovialitis bei rheumatoider Arthritis mit jeweils unterschiedlichem aggressivem Potential werden hierbei unterschieden. Der Typ I zeigt eine dichte lymphofollikuläre entzündliche Infiltration. Der Typ II stellt eine Prädominanz der chronischen granulierenden Entzündung mit Fibrininsudationen und Deckzellschichtulcerationen in den Vordergrund. Der Typ III stellt ein Mischbild der beiden erstgenannten Typen dar. Diese drei Synovistypen korrelieren mit dem destruktiven Potential der Synovitis, sie zeigen ferner eine unterschiedliche Assoziation mit HLA-DR (Stiehl1994, Ilgner2002). In diese Typisierung gehen weiterhin 2 Parameter ein, die charakteristische Veränderungen der Synovialmembran darstellen. Hierbei handelt es sich um die sog. „Basisaktivität“ und um die „aktuelle Aktivität“. Basisaktivität und aktuelle Aktivität stellen das histopathologische Äquivalent für Chronizität und Floridität der Arthritis dar (Geiler, Stiehl74). Nach wie vor fehlten histopathologische Scores, um den klinischen Schweregrad einer rheumatoiden Arthritis mit dem histologischen Bild zu korrelieren. Mehrere Autoren versuchten in den letzten Jahrzehnten, diese Lücke aufzufüllen, ferner sollten die Auswirkungen der medikamentösen Therapie auf die Synovialitis objektiviert werden. (Stiehl, Bresnihan, Geiler, Koizumi, Rooney Youssef/Tak, Kraan, Tak). Die Versuche blieben jedoch frustan, weil die Mehrzahl der histologischen Befunde nicht mit den klinischen Befunden korrelierte. Eine Ausnahme war die Korrelation der Rheumafaktor-Titer und

die Anzahl der betroffenen Gelenke mit dem Score nach Koizumi (Koizumi). Die meisten bis heute veröffentlichten histopathologischen Scores konzentrieren sich somit auf die Graduierung der entzündlichen Aktivität der RA-Synovialitis.

In der histopathologischen Diagnostik wäre jedoch ein Score erforderlich, welcher unabhängig von der Ätiologie der Gelenkerkrankung eine histopathologische Graduierung der entzündlichen Veränderungen ermöglicht, anhand derer der Befund tendenziell eher dem Formenkreis der reaktiven/degenerativen Gelenkerkrankungen oder dem Formenkreis der rheumatischen Erkrankungen zugeordnet werden kann. Der hier vorgestellte Synovitis-Score geht auf diese Erfordernis ein und orientiert sich an histologischen Veränderungen, welche in einem konventionell HE-gefärbten Schnittpräparat einfach identifizierbar sind. Auch am konventionell gefärbten Präparat gibt es in der Routinediagnostik das grundsätzliche Problem der Heterogenität der pathologischen Veränderungen. So ist z.B. die Deckzellschicht selten gleichmäßig verbreitert, und auch die entzündlichen Infiltrate sind zumeist ungleichmäßig verteilt. Es hat sich auch in anderen Graduierungssystemen (Rosai) bewährt, Veränderungen qualitativ unterschiedlicher Ausprägung immer nach dem höchsten Ausprägungsgrad zu beurteilen. Die Beurteilung einer großen Anzahl von Synovialektomiepräparaten/Synovialgewebsbiopsien mittels dieses Scores zeigt eine gute Reproduzierbarkeit bei wiederholter Analyse des gleichen Präparats vom selben bzw. von unterschiedlichen Untersuchern und ist damit in seiner Qualität vergleichbar zu anderen Graduierungsschemata aus der Tumorpathologie wie z.B. dem Gleason-Grading des Prostatakarzinoms oder der Graduierung des Mammakarzinoms (Allsbrook, Fisher).

4.3. Der neue Synovitis-Score

Bei den Einschätzungen durch erfahrene Morphologen mittels des hier dargestellten Synovitis-Scores zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Entzündungsgraden von rheumatischen und degenerativen Gelenkerkrankungen. Anhand des Scores kann also zwischen einer degenerativen/reaktiven Arthritis und einer rheumatoiden Arthritis unterschieden werden. Ferner besteht ein signifikanter Unterschied zwischen einer posttraumatischen Synovitis und einer Synovitis bei rheumatoider Arthritis. Die Fälle der posttraumatischen Synovitis zeigen die auch in der Literatur beschriebenen geringen Veränderungen (Müller, Fissler-Eckhof). Ähnliche Ergebnisse kann auch Koizumi vorweisen (Koizumi). Sein Score bezieht jedoch 11 wesentliche histologische Charakteristika in semiquantitativer Weise in die Diagnose ein, wobei quantitativ ein Maximalwert von 20 erreicht werden kann. Dieser Score erscheint vergleichsweise kompliziert und für den diagnostischen Alltag wenig brauchbar. Das für die histopathologische Diagnostik wichtigste Ergebnis stellt der Befund dar, dass ein Synovitis-Score von 5 oder höher für das Vorliegen einer primär entzündlichen, rheumatischen Gelenkerkrankung spricht. Bei serologisch und klinisch unklaren entzündlichen Gelenkerkrankungen kann somit eine Synovialisbiopsie eine zusätzliche diagnostische Information beisteuern.

4.4. Nekrosen als zusätzlicher Parameter

Nekrosen in Synovitiden sind zwar ein sehr inkonstantes Merkmal, treten jedoch praktisch nur bei mittleren und hohen Entzündungsgraden auf. Alle Proben mit einem Entzündungsgrad 0 oder 1 zeigten keine Nekrosen. Die Inkonstanz erkennt man am besten daran, daß nicht alle Präparate mit mittleren und hohen Entzündungsgraden Nekrosen aufweisen, ferner daran, daß die Streuung der Meßwerte sehr groß ist. Wenn Nekrosen vorhanden sind, liegt aber immer ein hoher Entzündungsgrad vor. Daraus kann man ableiten, daß man bei der Bewertung von Synovitiden im Entzündungsgrading zu höheren Werten korrigieren kann, wenn Nekrosen beobachtet

werden. Dies kann insbesondere bei mittleren Entzündungsgraden hilfreich sein, da hier die Grenze zwischen der reaktiven Arthritis und der Arthritis bei primär entzündlichen Gelenkerkrankungen verläuft. Empfehlenswert erscheint die Erhöhung um einen Punktwert (Synovitis-Score+1), wenn fibrinoide Nekrosen mehr als 25% der Gewebefläche ausmachen.

4.5. Validierung mit Computergestützter Bildanalyse (CAIA)

Computergestützte Bildanalyse ist eine Technologie von zunehmender Wichtigkeit in der diagnostischen Pathologie. Anwendungen der Bildanalyse in der Pathologie beinhalten DNA-Ploidiemessungen, quantitative Immunhistologie, dreidimensionale Rekonstruktion von Gewebsschnitten, Bewegungsstudien und Chromosomenanalyse. Morphometrie, das quantitative Messen von Größe, Konturen und Texturen von Zellen und Geweben, ist ein weiteres sich schnell entwickelndes Gebiet der Bildanalyse in der Pathologie. Die Forschung bemüht sich, diagnostische Anwendungen zu etablieren [Erlor]. Der bestehende Synovitis-Score ist ein subjektives Abschätzverfahren, das von erfahrenen Morphologen mit relativ großer intra-observer Reproduzierbarkeit und inter-observer Reproduzierbarkeit durchgeführt werden kann. Bisher wurden die einzelnen diagnostischen Kategorien nicht quantifiziert, die subjektiven Einschätzungen wurden hinsichtlich ihrer empirischen Validität nicht geprüft. Es stellt sich die Frage, ob die subjektiv gewonnenen Einschätzungen objektivierbar sind. Um die subjektiven Eindrücke zu objektivieren, könnte natürlich jeder Parameter nachgezählt bzw. nachgemessen werden. Dieses Verfahren ist jedoch sehr zeitintensiv und aufgrund des Zeitaufwandes nur an wenigen Proben durchführbar. Mit der computergestützten Bildanalyse (Computer assisted image analysis, CAIA) steht grundsätzlich ein Instrumentarium zur Verfügung, das in der Lage ist, auf morphologischer Ebene objektive Daten zu erheben. Gleichartige Programme wie das dieser Arbeit zugrunde liegende belegen valide Messungen, kontrolliert durch manuelles Nachzählen und durch Abgleich mit kommerziell erhältlichen Programmen [Benali, Leefken]. Die Bildanalyse hat zahlreiche Anwendungen in der Forschung und in der Klinik. Sie unterstützt die Pathohistologie insbesondere in der Diagnostik maligner Tumoren, insbesondere hat die automatisierte Bildanalyse sich als hilfreich in der Objektivierung des Tumorgradings erwiesen [Hufnagl, Guski, Wolf]. Moderne Bildanalyseysteme verfügen über Morphometrie, Densitometrie, neurale Netzwerke und Expertensysteme. Rasche technische Entwicklungen führen auch dazu, daß die Bildanalyse eine Alternative zur Durchflusszytometrie darstellt [Russack]. Generell kann durch zusätzliche morphometrische Analyse die Erkennung und differentialdiagnostische Abklärung pathologischer Prozesse verbessert werden [Pesce]. In den vergangenen Jahren hat die computergestützte Bildanalyse eine zunehmende Rolle in der quantitativen Pathologie gespielt [Nazeran]. Die digitale Bildanalyse wird auch

gegenwärtig zur Analyse klinischer Fragestellung wie z.B. Tumorgrading eingesetzt. Quantitative Messungen sind, verglichen mit herkömmlichen Zählverfahren (per Okularmikrometer oder per okularem Meßfeld) in hohem Grade reproduzierbar und genau [Nafe, Van De Nees]. Beim Grading des Urothelkarzinoms leistet die CAIA gute Dienste, die Ergebnisse sind objektivierbar und reproduzierbar. Die Einordnung der Kerne gelang in 95% der Fälle [Spyridonos, Cavouras]. Die Siderose des Leberparenchyms kann morphometrisch quantifiziert werden und korreliert mit den Eisenwerten im Blut, ferner mit den biochemischen Eisenwerten im Lebergewebe [Ortega, Ladero]. Es konnte gezeigt werden, daß mit Hilfe der CAIA eine Unterscheidung zwischen rheumatoider Arthritis-assoziiertes (RA-assoziiertes) interstitieller Lungenerkrankung und idiopathischer interstitieller Lungenerkrankung möglich ist, obwohl konventionell-lichtmikroskopisch große Ähnlichkeiten bestehen [Atkins]. Auch der Erfolg therapeutischer Maßnahmen ist mit Hilfe der Bildanalyse zu kontrollieren. Mit Hilfe der Morphometrie kann der therapeutische Effekt von angiogeneseinhibierenden Medikamenten studiert und verifiziert werden, sodaß bei therapierter Psoriasisarthritis eine signifikante Senkung der Gefäßneubildung gezeigt werden kann [Maymo, Gratacos]. Antirheumatische Therapien richten sich auch nach den Ergebnissen der Synovialisbiopsie. Computergestützte Bildanalyse von Proben aus großen und kleinen Gelenken bei rheumatoider Arthritis zeigen vergleichbare quantitative Untersuchungsergebnisse [Kraan].

Der limitierende Faktor der Bildanalyse ist aber immer noch, daß keine reproduzierbare automatische Kernsegmentierung existiert [Gil, Wu, 2002]. Moderne Softwareentwicklungen haben an diesem grundsätzlichen Problem nichts geändert. So können Multivarianzanalysen zu einer besseren Diskriminierung zweier Populationen führen, wenn Zellen erst einmal quantifiziert sind [Baak], das Problem des Quantifizierens stellt aber nach wie vor das Grundproblem dar. Die Achillesferse der Bildanalyse ist also nach wie vor die Trennung aggregierter Zellkerne (nuclear segmentation). Es gibt zwar interaktive Trennverfahren, ein vollautomatisches Verfahren ist bisher jedoch nicht verfügbar.

Die Kernquantifizierung ist wiederholt als hilfreich bei der differentialdiagnostischen Abklärung von Krankheiten beschrieben worden, insbesondere wenn es um Größenverteilungen und Kernphänotypisierung (nuclear profiles) geht [Gil, Wu, 2003].

Trotz der oben genannten Grundproblematik haben einzelne Autoren deskriptive und statistische Merkmale mit Hilfe der Morphometrie erarbeiten können, die z.B. geeignet scheinen, bei der differentialdiagnostischen Unterteilung der Non-Hodgkin-Lymphome hinsichtlich Kerngröße und Morphologie zwischen den Entitäten zu diskriminieren [Lesty, Raphael, Nonnenmacher] und [Marchevski, Klapper].

Erstrebenswert ist also in jedem Fall eine genaue Trennung aggregierter Kerne, insbesondere wenn es um die Quantifizierung zellreicher Infiltrate in dicht entzündlich infiltrierten Gewebeabschnitten geht. Aus diesem Grund wurde das vorliegende Programm dahingehend entwickelt, daß zunächst in einem automatisierten Modus mit frei einstellbaren Detektionsgrenzen Kernstrukturen automatisiert erkannt werden, und danach in einem interaktiven Modus Korrekturen durchgeführt werden können. Interaktiv unterscheidet sich von automatischen Messungen dadurch, daß essentielle Elemente der Zell- und Gewebserkennung von einem geübten Untersucher durchgeführt werden, assistiert durch computergestützte Bildanalyse [Marchevsky]. Mit diesem Verfahren sind die nicht in Frage stehenden Vorteile der Bildanalyse gewahrt und eingesetzt, gleichzeitig werden mögliche Fehler durch Interaktion des Untersuchers minimiert oder eliminiert. Man kann also sagen, daß die computergestützte Bildanalyse sich als automatisiertes bzw. semiautomatisiertes Meßverfahren anbietet, um die subjektiv gewonnenen Daten zu überprüfen.

Zusätzlich ergibt sich hier die Möglichkeit, Messungen und Zählungen auch von Laien durchführen zu lassen. Inzwischen sind Systeme erprobt, die es Laienanwendern erlauben, komplexe Strukturen zu untersuchen, die bisher nur von erfahrenen Morphologen mittels CAIA analysiert werden konnten [Chubb, Ingaki]. Dies ist für die weitere Anwendung des Synovitis-Scores interessant, weil damit der technische Ablauf des Quantifizierens von der Expertenebene auf die Laienebene übertragen werden kann.

Moderne Verfahren gehen über konventionelle Lichtmikroskopie in Verbindung mit CAIA hinaus. Erst kürzlich erschien eine Studie, in der gezeigt wurde, daß der nukleäre DNS-Index in melanozytären Tumoren streng mit den diagnostischen Kategorien benigner Nävus, dysplastischer Nävus Clark und malignes Melanom korreliert. Angewandt wurde hier die Laser-Scanning-Mikroskopie in Verbindung mit

computergestützter Bildanalyse der mittels AcridinOrange (AO) gefärbten fluoreszierenden Zellkerne [Berman, Wincovitch].

Bei den vorliegenden Untersuchungen bestätigt die computergestützte Bildanalyse die geschätzten Werte für niedrige und mittlere Entzündungsgrade. Für hohe Entzündungsgrade ergeben sich signifikante Unterschiede, die in einer Überbewertung des geschätzten Zellgehaltes durch das menschliche Auge liegen. 14 Fälle mit dem konventionell erhobenen Entzündungsgrad 3 erhielten nach CAIA-Messung nur den Entzündungsgrad 2. Zum Entzündungsgrad 3 gehören die Punktwertsummen 9,8 und 7. Zum Entzündungsgrad 2 gehören die Punktwertsummen 6,5 und 4. Von diesen 14 Fällen hatten nun 6 Fälle die Punktwertsumme 6 und 7 Fälle die Punktwertsumme 5. Nur ein Fall hatte die Punktwertsumme 4. In den dieser Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen [Krenn] konnte gezeigt werden, daß die Zuordnung einer Synovitis zu einer primären destruierenden Gelenkentzündung wie rheumatoider Arthritis oder Psoriasisarthritis ab einer Punktwertsumme von 5 Punkten erfolgt, während reaktive und sekundäre Arthritiden Punktschichten von 4 und niedriger aufweisen. Legt man die Diskriminierung der niedrigen Punktwertsummen 0-4 als „low grade“ und der höheren Punktwertsummen 5-9 als „high grade“ zugrunde, ergibt sich Folgendes: Von den 14 Fällen, die im CAIA-Score den Entzündungsgrad 2 und im konventionellen Score den Entzündungsgrad 3 hatten, wiesen 13 Fälle eine „high grade“ Entzündung auf. Berücksichtigt man die biologische Wertigkeit der gefundenen Entzündungswerte (Deckzellschichtdicke, Stromazellaktivierung, Lymphozytendichte), so ergibt sich innerhalb der Gruppe Entzündungsgrad 3 eine Übereinstimmung in 17/18 Fällen.

Für die hier durchgeführten Untersuchungen kann gesagt werden, daß mit Hilfe der CAIA die subjektiv ermittelten Entzündungsgrade insbesondere hinsichtlich ihrer biologischen Wertigkeit objektiviert werden konnten. Grundsätzlich ist offenbar das menschliche Auge ein gutes Instrumentarium zum Abschätzen empirischer Größen. Es gibt zwar deutliche interindividuelle Unterschiede, insgesamt können die Einordnungen, die nach dem neuen Synovitis-Score erfolgten, jedoch bestätigt werden.

Der Synovitis-Score erscheint damit als ein valides diagnostisches Instrumentarium, das in der Differenzierung zwischen reaktiven und primär entzündlichen Prozessen der Gelenkinnenhaut von Bedeutung ist. Die Zuordnung von Entzündungen an der

Gelenkinnenhaut zu primär entzündlichen Prozessen kann offenbar verbessert werden, wenn Nekrosen als zusätzlicher Faktor berücksichtigt werden. 75% (27/36) der Gewebeproben der mittleren und höheren Entzündungsgraden wiesen Nekrosen auf, während Nekrosen bei den niedrigen Entzündungsgraden nicht zu beobachten waren. Es erscheint sinnvoll, beim Auftreten von Nekrosen (25% der Gewebefläche und mehr) den Synovitis-Score um einen Punkt anzuheben.

5. Zusammenfassung

Die Diagnostik der Synovialitiden ist seit vielen Jahren klinisch definiert. Histopathologische Befunde an Synovektomiepräparaten oder Synovialisbiopsien spielen bei Diagnose und Therapie keine wesentliche Rolle.

Trotz immer wieder festgestellter grundsätzlicher Diskrepanzen zwischen histopathologischem Befund und Schweregrad des Krankheitsbildes gibt es jedoch auch Hinweise auf Zusammenhänge zwischen Pathohistologie, Genese und Ausprägung einer Synovialitis.

Neu entwickelt wurde ein histopathologisches Gradingssystem, das am Routine-HE Präparat drei Kriterien berücksichtigt, die jeweils mit Punktwerten von 0-3 bewertet werden, sodaß sich ein Summenscore von 0-9 ergibt (Synovitis-Score). Die Punktwerte werden geschätzt, eine genaue Quantifizierung erfolgte bisher nicht. Der Summenscore wird einem Entzündungsgrad zugeordnet, wobei 0-1 Punkt dem Entzündungsgrad 0, 2-3 Punkte dem Entzündungsgrad 1, 4-6 Punkte dem Entzündungsgrad 2 und 7-9 Punkte dem Entzündungsgrad 3 entsprechen. Der Entzündungsgrad korreliert mit verschiedenen Krankheitsbildern, wobei niedrige Scorewerte bei reaktiven Synovialitiden und Osteoarthritis beobachtet werden und hohe Scorewerte (ab einem Summenscore 5) bei rheumatoider Synovitis oder bei Psoriasisarthritis vorkommen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der geschätzte, semiquantitative Synovitis-Score quantifiziert. Methodisch wurde die computergestützte Bildanalyse (CAIA, computer assisted image analysis) eingesetzt. Abhängig vom untersuchten Merkmal kamen dabei primär automatisierte Verfahren nach selbstgeschriebenen Algorithmen oder interaktive Methoden zur Anwendung.

Insgesamt wurden 2555 Einzelmessungen (EM) durchgeführt. 1549 EM waren automatisiert durchgeführte Operationen, 1006 EM wurden interaktiv angewandt. Entzündliche Infiltrate wurden in 887 EM quantifiziert, die Stromazelldichte in 524 EM, immunhistologische Überprüfungen wurden 138 mal durchgeführt. Deckzellschichtdicke (802 EM), Größe der Gewebstücke (102 EM) und Größe der Nekrosen (102 EM) wurden interaktiv ermittelt.

Die semiquantitativen Einschätzungen der Untersucher wurden bestätigt. Bei niedrigen und mittleren Entzündungsgraden ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen geschätzten Entzündungsgraduierungen und per CAIA gemessenen Entzündungsgraduierungen ($n=52$, $p<0,01$). Bei hohen Entzündungsgraden waren konventionell erhobener Synovitis-Score und CAIA-Score voneinander verschieden ($n=18$, $p<0,01$), was an einem hohen Anteil von „high grade“ Entzündungen in der Gruppe 2 lag. Vergleicht man die „high grade“ Entzündungen des CAIA-Scores der Gruppe 2 mit dem konventionellen Score, so ergibt sich eine Übereinstimmung von 17/18 Fällen (94,4%) hinsichtlich der biologischen Wertigkeit, sodaß auch bei den hohen Entzündungsgraden hinsichtlich der biologischen Wertigkeit eine hohe Übereinstimmung besteht.

Die geschätzten Punktwerte und die Summenscores wurden somit hinsichtlich ihrer Aussage zur Genese einer Synovialitis bestätigt.

Bei den Messungen fiel auf, daß bei höheren Summenwerten auch häufig vermehrt fibrinoide Nekrosen vorhanden waren. Eine Korrelation mit den Krankheitsbildern ergab, daß fibrinoide Nekrosen signifikant mit rheumatoider Arthritis und Psoriasisarthritis assoziiert waren. Dieser Befund wurde bisher nicht im Synovitis-Score aufgenommen.

Es erscheint ratsam, den Synovitis-Score um einen Punkt anzuheben, wenn Nekrosen mehr als 25% der Gewebefläche einnehmen.

6. Literatur

Allsbrook WC Jr, Mangold KA, Johnson MH, et al. Interobserver reproducibility of Gleason grading of prostatic carcinoma: general pathologist. *Hum Pathol* 2001;32:81-88

Altmann R, Asch E, Bloch D, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: Classification of osteoarthritis of the knee - Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheuma* 1986;29:1039-49

Arnett F, Edworthy S, Bloch D et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-24

Atkins SR, Turesson C, Myers JL, Tazelaar HD, Ryu Jh, et al. Morphologic and quantitative assessment of CD20+ B cell infiltrates in rheumatoid arthritis-associated nonspecific interstitial pneumonia and usual interstitial pneumonia. *Arthritis Rheum* 2006 Feb;54(2):635-41

Baak JP The principles and advances of quantitative pathology. *Anal Quant Cytol Histol* 1987;9(2):89-95

Berman DM, Wincovitch S, Garfield S, Romeo MJ. Grading melanocytic dysplasia in paraffin wax embedded tissue by the nucleic acid index. *J Clin Pathol* 2005;58(11):1206-10

Braun J, Kingsley G, van der Heijde D, et al. On the difficulties of establishing a consensus on the definition of and diagnostic investigations for reactive arthritis. Results and discussion of a questionnaire prepared for the fourth International Workshop on Reactive Arthritis, Berlin, Germany, July 3-6, 1999. *J Rheumatol* 2000;27:2185-92

Bresnihan B, Cunnane G, Youssef P, et al. Microscopic measurement of synovial membrane inflammation in rheumatoid arthritis: Proposals for the evaluation of tissue samples by quantitative analyses. *Brit J Rheumatol* 1998;37:636-42

Bresnihan B. Synovial history in rhaumatoid arthritis: Clues for clinicians. *J Rheumatol* 1988;15:636-42

Canete JD, Pablos JL, Sanmarti R, Mallofre C, Marsal S, Maymo J, Gratacos J, Mezquita J, Mezquita C, Cid MC. Antiangiogenic effects of anti-tumor necrosis factor alpha therapy with infliximab in psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004;50(5):1636-41

Chisholm DM, Mason DK. Labial salivary gland biopsy in Sjogren's disease. *J Clin Pathol.* 1968;21(5):656-60

Chubb C, Ingaki Y, Sheu P, Cummings B, Wasserman A, et al. BioVision: An application for the automated image analysis of histological sections. *Neurobiol Aging* 2005 in press

Datta Gupta S, Hudson M, Burroughs AK, et al. Grading of cellular rejection after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1995;21(1):46-57

Erler BS, Chein K, Marchevsky AM An image analysis workstation for the pathology laboratory. *Mod Pathol* 1993;6(5):612-8

Fassbender HG. Morphologische Kriterien für die Beurteilung und Klassifikation von Synovialisgewebe. *Therapiewoche* 1970;20:720-23

Fassbender HG. Pathologie rheumatischer Erkrankungen. Springer-Verlag Inc, Berlin, Heidelberg, New York. 1975

Fassbender HG. Rheumatoide Arthritis. In: Doerr W, Seifert G (Eds.) *Spezielle pathologische Anatomie*. Vol 18/I: Pathologie der Gelenke und Weichteiltumoren, 1984:191-229. Springer-Verlag Inc, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo

Fisher ER, Redmond C, Fisher B. Histologic grading of breast cancer. *Pathol Annu* 1980;15:239-51

Fritz P, Laschner W, Saal JG, et al. Histological classification of synovitis. *Zentralbl Allg Pathol Pathol Anat* 1989;135:8

Geiler G, Stiehl P. Zur Bedeutung der Begriffe "Basisaktivität" und "Aktuelle Aktivität" in der morphologischen Beurteilung der Synovialmembranen bei Rheumatoid-Arthritis. *Z Rheumatol* 1974;33:73–86

Genta RM, Dixon MF. The Sydney System revisited: The Houston international Gastritis Workshop. *Am J Gastroenterol* 1995;90:1039-41

Gil J, Wu H Applications of Image Analysis to anatomic pathology: realities and promises. *Cancer Invest* 2003;21(6):950-9

Gil J, Wu H, Wang BY Image analysis and morphometry in the diagnosis of breast cancer. *Microsc Res Tech* 2002;59(2):109-18

Henderson HF, Jayson MIV, Tribe CR. Lack of correlation of synovial histology with joint damage in the rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1975;34:7-11

Hufnagl P, Guski H, Meyer R, Wassilew G, Wenzelides K Comparison of conventional morphometry and image analysis for the solution of histomorphometric problems. *Gegenbaurs Morphol Jahrb* 1989;135(1):145-50

Hufnagl P, Guski H, Wolf G, Wenzelides K, Martin H, Roth K. The PARTICLE expert system for tumor grading by automated image analysis. *Anal Quant Cytol Histol* 1989;11(6):440-6

Ilgner S, Stiehl P. Strong LFA-1 and VCAM-1 expression in histological type of rheumatoid arthritis. *Cell Mol Biol* 2002;48 Online Pub:OL 243-49

Ishak K, Baptista A, Bianchi L et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22:696-99

Kahle P, Saal JG, Schaudt K, et al. Determination of cytokines in synovial fluids: correlation with diagnosis and histomorphological characteristics of synovial tissue. *Ann Rheum Dis* 1992;51: 731-34

Kemnitz J, Cohnert T, Schafers HJ, et al. A classification of cardiac allograft rejection. A modification of the classification by Billingham. *Am Surg Pathol* 1987;11(7):503-15

Koizumi F, Matsuno H, Wakaki K, et al. Synovitis in rheumatoid arthritis: Scoring of characteristic histopathological features. *Pathol Int* 1999;49:298-304

Kraan MC, Reece RJ, Smeets TJ, Veale DJ, Emery P, TakPP. Comparison of synovial tissues from the knee joints and the small joints of rheumatoid arthritis patients: Implications for pathogenesis and evaluation of treatment. *Arthritis Rheum* 2002;46(8):2034-8

Kraan, Haringman JJ, Post WJ, et al. Immunohistological analysis of synovial tissue for differential diagnosis in early arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 1999;38:1074-80

Krenn V, Morawietz L, Häupl T, Neidel J, Petersen I, König A. Grading of chronic synovitis - a histopathological grading system for molecular and diagnostic pathology. *Pathol Res Pract* 2002;198:317-25

Krenn V, Schalhorn N, Greiner A, et al. Immunohistochemical analysis of proliferating and antigen-presenting cells in rheumatoid synovial tissue. *Rheumatol. Int.* 1996;15(6):239-47

Lesty C, Raphael M, Nonnenmacher L, Binet JL. Two statistical approaches to nuclei shape and size in a morphometric description of lymph node sections in non-Hodgkin's lymphoma. *Cytometry* 1989;10(1):28-36

Loukas CG, Wilson GD, Vojnovic B, Linney A. An image analysis-based approach for automated counting of cancer cell nuclei in tissue sections. *Cytometry A* 2003;55(1):30-42

Marchevsky AM, Gil J, JeantyH Computerized interactive morphometry in pathology: current instrumentation and methods. *Hum Pathol* 1987;18(4):320-31

Marchevsky AM, Klapper E, Gil J. Computerized classification of nuclear profiles in non-Hodgkin's lymphomas. *AM J Clin Pathol* 1987;87(5):561-8

Mohr. Gelenkpathologie. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 2000

Moll JMH, Wright V. Psoriathic arthritis. Semin Arthritis Rheum 1973;3:55-78

Müller KM, Fisseler-Eckhoff A. Morphologie arthroskopisch gewonnener Synovialbiopsien. Arthroskopie 1989;2:94-103

Nafe R, Van de Nes J, Yan B, Schlote W. Distribution of nuclear size and internuclear distance are important criteria for grading astrocytomas. Clin Neuropathol 2006;25(1):48-56

Nazeran H, Rice F, Moran W, Skinner J Biomedical Image processing in pathology: a review. Australas Phs Eng Sci Med 1995;18(1):26-36

Ortega L, Ladero JM, Carreras MP, Alvarez T, et al. A computer-assisted morphometric quantitative analysis of iron overload in liver biopsies. A comparison with histological and biochemical methods. Pathol Res Pract 2005;201(10):673-7

Ostendorf B, Dann P, Wedekind F, et al. Miniarthroscopy of metacarpophalangeal joints in rheumatoid arthritis. Rating of diagnostic value in synovitis staging and efficiency of synovial biopsy. J Rheumatol 1999;26:1901-08

Pesce CM Defining and interpreting diseases through morphometry. Lab Invest 1987;56(6):568-75

Rooney M, Condell D, Quinlan W, et al. Analysis of the histologic variation of synovitis in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1988;31:956-63

Rooney M, Whelan A, Feighery C, et al. Changes in lymphocyte infiltration of the synovial membrane and the clinical course of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1989;32:361-69

Rosai J, Ackermann LV. The pathology of tumours, part III: grading, staging & classification. *CA Cancer J Clin* 1979;29:66-77

Rosenberger JL, Cooper NS, Soren A, et al. A statistical approach to the histopathological diagnosis of synovitis. *Hum Pathol* 1981;12:329-37

Russack V Image cytometry: current applications and future trends. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1994;31(1):1-34

Spyridonos P, Cavouras D, Ravazoula P, Nikiforidis G. Neural network-based segmentation and classification system for automated grading of histologic sections of bladder carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 2002;24(6):317-24

Stiehl P. Histological classification of synovial membranes of rheumatoid arthritis in dependence on the kind of cell infiltrates, destruction of synovial lining cells as well as of course of disease. *Z Rheumatol Suppl* 1994;53:50

Stolte M, Meining A. The updated Sydney system: Classification and grading of gastritis as the basis of diagnosis and treatment. *Can J Gastroenterol* 2001;15:591-98

Tak PP, Smeets TJ, Daha MR, et al. Analysis of the synovial cell infiltrate in early rheumatoid synovial tissue in relation to local disease activity. *Arthritis Rheum* 1997;40:217-25

Tak PP, Taylor PC, Breedvild FC et al. Decrease in cellularity and expression of adhesion molecules by antitumor necrosis factor monoclonal antibody treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996;39:1077-81

Tak PP, van der Lubbe PA, Cauli A, et al. Reduction of synovial inflammation after anti-CD4 monoclonal antibody treatment in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995;38:535-54

Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, et al. International Society of Nephrology Working Group on the Classification of Lupus Nephritis; Renal Pathology Society Working Group on the Classification of Lupus Nephritis. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney Int* 2004;65(2):521-30

Werner, Jürgen. *Biomathematik und medizinische Statistik, eine praktische Anleitung für Studierende Doktoranden, Ärzte und Biologen.* Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore. 2. Auflage. 1992

Youssef PP, Kraan M, Breedveld F, et al. Quantitative microscopic analysis of inflammation in rheumatoid arthritis synovial membrane samples selected at arthroscopy compared with samples obtained blindly by needle biopsy. *Arthritis Rheum* 1988;41:663-69

Youssef PP, Smeets TJ, Bresnihan B, et al. Microscopic measurement of cellular infiltration in the rheumatoid arthritis synovial membrane: a comparison of semiquantitative and quantitative analysis. *Brit J Rheumatol* 1998;37:1003-7

Publikationsliste

Nahles G, Schäper F, Bier J, Klein M.

An intraosseous lipoma in the frontal bone--a case report.

Int J Oral Maxillofac Surg. 2004 Jun;33(4):408-10.

Seehofer D, Rayes N, Schiller R, Stockmann M, Muller AR, Schirmeier A, Schäper F, Tullius SG, Bengmark S, Neuhaus P.

Probiotics partly reverse increased bacterial translocation after simultaneous liver resection and colonic anastomosis in rats.

J Surg Res. 2004 Apr;117(2):262-71.

Grosse-Siestrup C, Unger V, Fehrenberg C, v Baeyer H, Fischer A, Schäper F, Groneberg DA.

A model of isolated autologously hemoperfused porcine slaughterhouse kidneys.

Nephron. 2002 Oct;92(2):414-21.

Staudt A, Schäper F, Stangl V, Plagemann A, Bohm M, Merkel K, Wallukat G, Wernecke KD, Stangl K, Baumann G, Felix SB.

Immunohistological changes in dilated cardiomyopathy induced by immunoabsorption therapy and subsequent immunoglobulin substitution.

Circulation. 2001 Jun 5;103(22):2681-6.

Sehouli J, Kopetsch OJ, Ricke J, Buchmann E, Stengel D, Riess H, Weidemann H, Schäper F, Freiesleben W, Lichtenegger W.

Primary mucinous adenocarcinoma of the appendix: a rare entity in the differential diagnosis of ovarian cancer.

J Obstet Gynaecol Res. 2000 Oct;26(5):333-9.

Daum S, Hummel M, Weiss D, Peters M, Wiedenmann B, Schäper F, Stein H, Riecken EO, Foss H.

Refractory sprue syndrome with clonal intraepithelial lymphocytes evolving into overt enteropathy-type intestinal T-cell lymphoma.

Digestion. 2000;62(1):60-5.

Partl S, Herbst H, Schäper F, Mohnhaupt A, Stoltenburg-Didinger G.

GFAP gene expression is altered in young rats following developmental low level lead exposure.

Neurotoxicology. 1998 Aug-Oct;19(4-5):547-51.

Glanemann N, Langrehr JM, Schäper F, Hänninen EL, Neuhaus P.

Muzinöses Adenokarzinom als Spätkomplikation nach duodenumerhaltender Pankreaskopfresektion. Viszeralchirurgie. 1998;33:230-233

Krabatsch T, Schäper F, Tambeur L, Leder C, Thalmann U, Hetzer R.

[Histomorphology after transmyocardial laser revascularization]

Herz. 1997 Aug;22(4):205-10.

Krabatsch T, Schäper F, Leder C, Tulsner J, Thalmann U, Hetzer R.

Histological findings after transmyocardial laser revascularization. J Card Surg. 1996 Sep-Oct;11(5):326-31.

Schäper F, Lippek F, Krabatsch T, Blümcke S.

Results of Histomorphological and Histomorphometrical Investigations of Left Ventricular Myocardium After Transmyocardial Laser-Revascularisation (TMLR).

J Am Coll Cardiol. 1997 Feb;29(2):72A

Buchbeitrag

Krabatsch T, Tambeur E, Lieback E, Schäper, F, Hetzer R. Transmyocardial Laser Revaskularisation in the Treatment of Severe Diffuse Coronary Artery Disease. In: Klein M, Schulte HD, Gams E. TMLR. Management of Coronary Artery Diseases. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1998.

Erklärung

„Ich, Frank Schäper, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Morphometrische Validierung des histopathologischen Synovitis-Scores“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.