

Diplomarbeit

**Die Bedeutung von Ki-67 in der Diagnostik von
neuroendokrinen Lungentumoren**

eingereicht von

Arne Enrico Völcker

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Diagnostik- und Forschungsinstitut für Pathologie

Klinische Abteilung für Pathologie

unter der Anleitung von

Univ.-Prof. Dr.med.univ. Helmuth Popper

Graz, 20. Oktober 2025

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Des Weiteren erkläre ich hiermit, dass, sofern bei der Erstellung dieser Arbeit Künstliche Intelligenz (KI) Werkzeuge zur Generierung und/oder Korrektur bestimmter Textpassagen verwendet wurden, dieser Einsatz unter Einhaltung ethischer Grundsätze, akademischer Integrität und den Vorgaben meiner Universität erfolgte, sowie in Folge dies transparent gemacht und in angemessener Weise gekennzeichnet wurde.

Graz, 20. Oktober 2025

Arne Enrico Völcker eh.

Zusammenfassung

Hintergrund: Neuroendokrine Tumoren der Lunge (pulmonale NET) bilden eine heterogene Entität mit variabler biologischer Aktivität und Prognose. Die präzise histopathologische Klassifikation ist essenziell für die Wahl geeigneter therapeutischer Strategien und die Abschätzung des klinischen Verlaufs. Während der Proliferationsmarker Ki-67 in der Diagnostik gastroenteropankreatischer NETs etabliert ist, wird seine diagnostische und prognostische Relevanz bei pulmonalen NET bislang zurückhaltender behandelt. In der aktuellen WHO-Klassifikation 2021 wird der Ki-67 Proliferationsindex als wünschenswertes Kriterium genannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, im Rahmen eines systematischen Literaturreviews den aktuellen Kenntnisstand zur Bedeutung von Ki-67 bei neuroendokrinen Lungentumoren zusammenzufassen und dessen potenziellen Stellenwert für die zukünftige Integration in die standardisierte Diagnostik zu evaluieren. Analysiert wurden internationale Leitlinien, technische Aspekte der Ki-67-Bestimmung, deren Reproduzierbarkeit sowie der prognostische und differentialdiagnostische Nutzen des Markers.

Methoden: Es wurde eine Literaturrecherche durchgeführt und anschließend die wichtigsten Diskussionspunkte narrativ ausgearbeitet. Zwei Studien zur digitalen Bildanalyse und eine Studie zur Ki-67-Indexerstellung mittels Deep Learning-Ansatz wurden beschrieben. Anschließend wird ein Fazit zum derzeitigen Stand der Literatur, sowie der Zukunft des Markers Ki-67 bei neuroendokrinen Lungentumoren gezogen.

Ergebnisse: Die Ergebnisse zeigen, dass Ki-67 insbesondere bei Biopsien mit artefaktbedingter eingeschränkter Morphologiebewertung eine wertvolle Ergänzung darstellen kann. Ferner besteht Evidenz für einen prognostischen Nutzen in der Stratifizierung von Karzinoiden und hochgradigen neuroendokrinen Karzinomen.

Schlussfolgerung: Moderne Verfahren wie digitale Bildanalyse und KI-gestützte Auswertungsmethoden könnten zu einer erhöhten Objektivierbarkeit, Standardisierbarkeit sowie Zeitersparnis in der klinischen Praxis beitragen.

Abstract

Background: Neuroendocrine tumors of the lung (pulmonary NETs) constitute a heterogeneous entity with variable biological activity and prognosis. Precise histopathological classification is essential for selecting appropriate therapeutic strategies and assessing the clinical course. While the proliferation marker Ki-67 is well established in the diagnosis of gastroenteropancreatic NETs, its diagnostic and prognostic relevance in pulmonary NETs has so far been addressed more cautiously. In the current WHO classification (2021), the Ki-67 index is mentioned as a desirable criterion. The aim of the present review was to summarize the current state of knowledge on the significance of Ki-67 in neuroendocrine lung tumors and to evaluate its potential role for future integration into standardized diagnostics. The analysis covered international guidelines, technical aspects of Ki-67 assessment, its reproducibility, as well as the prognostic and differential diagnostic value of the marker.

Methods: A literature search was performed, and the most important discussion points were subsequently elaborated in a narrative format. Two studies on digital image analysis and one study on Ki-67 index determination using deep learning were described. A conclusion on the current state of the literature and the future of Ki-67 in neuroendocrine lung tumors was then drawn.

Results: The findings indicate that Ki-67 can be a valuable addition, particularly in biopsies where morphological assessment is limited by artifacts. Furthermore, there is evidence for its prognostic value in the stratification of carcinoids and high-grade neuroendocrine carcinomas.

Conclusion: Modern approaches such as digital image analysis and AI-assisted evaluation methods may contribute to increased objectivity, standardization, and time efficiency in clinical practice.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	iii
Abstract.....	iv
Inhaltsverzeichnis.....	v
Abkürzungen.....	vii
Abbildungsverzeichnis.....	xi
Tabellenverzeichnis.....	xi
Formelverzeichnis.....	xi
1 Einleitung.....	1
1.1 Epidemiologie.....	1
1.2 NE Zellen in der Lunge.....	2
1.2.1 Embryonale PNEC Differenzierung.....	4
1.2.2 Stammzeleigenschaften bei Epithelschäden.....	7
1.2.3 Pathogenese neuroendokriner Tumoren.....	7
1.3 Neuroendokrine Tumoren der Lunge.....	8
1.3.1 DIPNECH.....	8
1.3.2 Karzinoide.....	10
1.3.3 LCNEC.....	17
1.3.4 SCLC.....	19
1.4 Immunhistochemische Marker.....	21
1.4.1 Synaptophysin.....	21
1.4.2 Chromogranin A.....	21
1.4.3 CD56.....	23
1.4.4 TTF-1.....	23
1.4.5 Ki-67.....	24
1.4.6 ASCL1.....	26
1.4.7 NEUROD1.....	27
1.4.8 POU2F3.....	27
1.4.9 INSM1.....	28
1.4.10 DLL3.....	29
1.4.11 YAP1.....	30
2 Material und Methoden.....	31
3 Die Bedeutung von Ki-67 in der Diagnostik von neuroendokrinen Lungentumoren.....	32
3.1 Hintergrund und Zielsetzung.....	32
3.2 Ergebnisse.....	33
3.2.1 Internationale Empfehlungen und Leitlinien.....	33
3.2.2 Ki-67 bei NEN der Lunge.....	39
3.2.3 NET G3 und Äquivalenz bei Lungen-NETs.....	41
3.2.4 Technische Aspekte der Ki-67-Bestimmung.....	42

3.2.5	Standardisierbarkeit	48
3.2.6	Arbeiten zur Ki-67 Auswertung mittels digitaler Bildanalyse	50
3.2.7	Ki-67 Auswertung mittels Deep Learning Algorithmus	58
4	Diskussion	62
4.1	Trennschärfe	62
4.2	Prognoseerstellung.....	62
4.3	Standardisierung	63
4.4	Zukunftsausblick.....	63
4.5	Fazit.....	63
4.6	Limitationen	64
5	Literaturverzeichnis	65

Abkürzungen

⁶⁸ Ga-DOTATOC	Gallium-68 und Eiweißverbindung »DOTATOC«
AC	atypisches Karzinoid
ACTH	adrenocorticotrophes Hormon
AI	artificial intelligence
ARIDA1A- AT	rich interactive domain-containing protein 1A
Ascl1	Achaete-scute homolog 1
ATP	Adenosintriphosphat
CD44	Extracellular matrix receptor III
CD45	receptor type C – ursprünglich leukocyte common antigen (LCA)
CD56	neural cell adhesion molecule 1
CgA	Chromogranin A
CGRP	calcitonin gene-related peptide
CI	Konfidenzintervall
CIAM	computer-assisted image analysis method
CNN	convolutional neural network
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
CT	Computertomographie
DIPNECH	diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia
DL	Deep Learning
DLL1	Delta-like canonical Notch ligand 1
DLL3	Delta-like canonical Notch ligand 3
DLL4	Delta-like canonical Notch ligand 4
EBUS	Endobronchialer Ultraschall
ED	Extensive Disease
EGFR	epithelial growth factor receptor
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition

epNEC extrapulmonal Neuroendocrine Carcinoma
 GEP-NET Gastroenteropankreatischer Neuroendokriner Tumor
 Hes1..... Hairy and enhancer of split-1
 HUH Universitätskrankenhaus Helsinki
 ICC..... Intraklassen-Korrelation
 IHCCH.... immunohistochemical color histogram for Ki-67 index calculation
 Insm1 Insulinoma-associated protein 1
 Jag 1 Jagged canonical Notch ligand 1
 Jag 2 Jagged canonical Notch ligand 2
 KAI KI-basierter Algorithmus zur Ki-67 PI Erstellung
 KEAP1 Kelch-like ECH-associated protein 1
 KI..... Künstliche Intelligenz
 Ki-67..... marker of proliferation Kiel 67
 KRAS Kirsten Rat Sarcoma virus – kodierendes Gen für Protein K-RAS
 LCC..... Large Cell Carcinoma
 LCNEC..... Large Cell Neuroendocrine Carcinoma
 LCNEC-L..... Large Cell Neuroendocrine Carcinoma of the Lung
 LI..... labeling index
 LNET neuroendokriner Tumor der Lunge
 MCM manual count method – Manuelle Zählmethode
 MEN1 Tumor-Suppressor Gen
 MYC..... Protoonkogen MYC
 Napsin A Tumormarker, Enzym aus der Gruppe der Aspartatproteasen
 NCAM Neural Cell Adhesion Molecule
 NE neuroendokrin
 NEB..... Neuroepithelial Body
 NEC Neuroendokrines Karzinom

NEN	Neuroendokrine Neoplasie
NET	Neuroendokriner Tumor
NeuroD1	Neurogenic differentiation factor 1
NOS	not otherwise specified
NOTCH	Neurogenic locus notch homolog protein
OTP	orthopaedia homeobox protein
p21	Synonym CDK-Inhibitor 1
p40	Protein p40
PET	Positonen-Emissions-Tomographie
pi-NET	automatischer Pi- Kalkulator für Ki67in Brustkrebs
PI	Proliferationsindex
PNEC	pulmonale neuroendokrine Zelle
pNET	pulmonaler neuroendokriner Tumor
POU2F3	Transkriptionsfaktor POU class 2 homeobox 3
PSIP1	PC4 and SFRS1 interacting protein 1
QuPath	Frei zugängliche Software für Bioimage Analysis
R	Korrelationskoeffizient
RB1	Tumor-Suppressor-Gen codierend für Retinoblastoma Protein 1
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	region of interest
SCC	Plattenepithelkarzinom der Lunge
SCLC	kleinzelliges Karzinom der Lunge
scRNA-seq	Einzelzell-RNA-Sequenzierung
TBNA	Transbronchiale Nadelaspiration
TC	typisches Karzinoid
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TMA	Tissue Microarray

TP53tumor protein p53 / Tumor-Suppressorgen 53
TTF-1thyroid transcription factor-1 / thyroidaler Transkriptionsfaktor 1
UCHL1Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1
WHOWorld Health Organisation
YAP1..... Yes-associated protein 1

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Legende mit Zelltypen.....	4
Abbildung 2: Neuroepitheliales Körperchen (NEB), Abbildung adaptiert von Noguchi et al. (8)	4
Abbildung 3: Lungenknospenausprossung und Epithelausbildung von proximal nach distal.....	6
Abbildung 4: Embryonale Lungenentwicklung mit NEB Entstehung, Abbildung adaptiert von Noguchi et al.(8)	7
Abbildung 5: Cutoff-Werte der WHO von Mitosezahl und Ki-67 PI der NE Tumoren der Lunge.....	37

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Diagnostische Kriterien der WHO für Neuroendokrine Neoplasien der Lunge: Morphologische Kriterien grau hinterlegt Adaptiert von Pelosi et al. (65)	41
Tabelle 2: Vergleich DIA Modelle	57

Formelverzeichnis

Formel 1: Formel zur Berechnung des Ki-67 PI, Formel adaptiert von Fulawka et al. (160) ..	26
--	----

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie

Im Jahr 2022 war Lungenkrebs mit 2.302 Neuerkrankungen - (11 %) bei Frauen und 2.901 Fällen (12 %) bei Männern - jeweils die zweithäufigste neu diagnostizierte Krebsart in Österreich. Bezüglich Überleben war Lungenkrebs sowohl bei Männern (21%) als auch bei Frauen (18%) die häufigste krebsbedingte Todesursache. Bei Frauen hat Lungenkrebs damit den Brustkrebs als häufigste Todesursache abgelöst (18% gegenüber 16%). Nachdem das Erkrankungsrisiko für Frauen in den letzten Jahren deutlich angestiegen war, zeigt es seit 2016 eine weitgehend stabile Entwicklung. Bei Männern ist die Wahrscheinlichkeit, an Lungenkrebs zu erkranken, hingegen seit längerer Zeit rückläufig (1).

Zwischen den Diagnosezeiträumen 2003–2007 und 2018–2020 verbesserten sich die relativen Überlebensraten bei Lungenkrebs deutlich: Das 1-Jahres-Überleben stieg von 44 % auf 55 %, das 3-Jahres-Überleben von 22 % auf 33 %. Frauen wiesen dabei eine höhere 3-Jahres-Überlebensrate auf als Männer (38 % gegenüber 30 %). Bei mehr als der Hälfte der Betroffenen wurde die Erkrankung jedoch erst in einem fortgeschrittenen Stadium festgestellt, nachdem der Tumor bereits über die Organgrenzen hinausgewachsen war. Da ein solch spätes Tumorstadium mit einer ungünstigeren Prognose einhergeht, unterstreicht dies die zentrale Bedeutung einer frühzeitigen Diagnose. In Österreich existiert derzeit allerdings kein etabliertes Früherkennungsprogramm für Lungenkrebs (2).

Eine Implementierung wurde diskutiert, die Austrian Society of Radiology und die Austrian Society of Pneumology empfahlen eine Einführung eines Screening Systems in Österreich. Jedoch herrscht Uneinigkeit über die anzuwendende Strategie, über die Finanzierung über das Gesundheitssystem und das Bewusstsein in der österreichischen Bevölkerung für die Wichtigkeit von Krebsvorsorge (3). Das in den Niederlanden und Belgien durchgeführte NELSON Trial (4) zur Low-Dose CT-Screeninguntersuchung bei Hochrisikopatient*innen (Raucher*innen) führte zu weiteren Diskussionen des Mehrwerts eines solchen Screenings für die Gesellschaft: Während eine Verschiebung zu niedrigeren

Stadien bei Diagnosestellung mit gewonnener chirurgischer Interventionsmöglichkeit stattfand, war die Zahl der falsch positiven, überdiagnostizierten Fälle nicht zu vernachlässigen. Der Kosten-Nutzen-Aufwand sowie psychologische Faktoren einer falsch-positiven Diagnose sind zentrale Punkte der Diskussion. Neuroendokrine Tumoren der Lunge machen weltweit etwa 20 bis 25 % aller primären Lungentumoren aus. Am häufigsten tritt dabei das kleinzellige Lungenkarzinom (SCLC) mit einem Anteil von 15-20 % auf, gefolgt vom großzelligen neuroendokrinen Karzinom (LCNEC) mit rund 3 %. Die pulmonalen neuroendokrinen Tumoren (NET) nehmen einen Anteil von etwa 1 bis 2 % ein, wobei rund 10 % dieser Fälle atypische Karzinoide (AC) darstellen (5).

1.2 NE Zellen in der Lunge

Neuroendokrine Zellen der Lunge (PNECs) werden zum diffusen neuroendokrinen System gezählt (6). Sie finden sich im Gesunden entweder einzeln oder in Ansammlungen von mehreren Dutzend (dann sog. neuroepitheliale Körperchen – neuroepithelial Bodies - NEBs) ubiquitär im Epithel der Atemwege. Die neuroepithelialen Körperchen treten meist an Verzweigungen von Bronchien und Bronchiolen auf. PNEC enthalten Vesikel mit Serotonin, ATP sowie unterschiedlichen Peptiden. Siehe Abbildungen 1 und 2. Man geht davon aus, dass PNEC als Chemosensoren zur Erfassung des Sauerstoffgehalts der eingeatmeten Luft und/oder als Mechanosensoren zur Wahrnehmung der Wandspannung dienen. Zur Reizweitergabe stehen sie in Kontakt mit sensorischen Fasern des Nervus Vagus (7). Neben den sensorischen Eigenschaften scheinen sie auch eine immunmodulatorische Rolle zu spielen. Wenn die Lunge durch chemische Einwirkungen oder Virusinfektionen geschädigt wird, schaltet das Epithel der Atemwege dieses Reservesystem ein (8). Darüber hinaus haben PNECs auch Stammzeleigenschaften, da sie eine wichtige Rolle bei der regenerativen Reaktion auf schwere Atemwegsschäden zu spielen scheinen (9). Jüngste Analysen der Einzelzell-RNA-Sequenzierung (scRNA-seq) ergaben, dass PNECs 0,01 % aller Lungenzellen ausmachen (10). Die genaue Verteilung in der Lunge beim Menschen ist schwer zu ermitteln. Im Mausmodell waren die NEBs erstmals elektronenmikroskopisch als Vertiefungen im Epithel inmitten der Mikrovilli und mit Luftwegekontakt nachweisbar (11). NEBs besiedeln

häufig diametral entgegengesetzte Positionen zu den Bifurkationen verzweigter Atemwege. NEBs an Bifurkationen werden als „nodale“ NEBs bezeichnet, während NEBs zwischen Bifurkationen als „internodal“ bezeichnet werden. Während der Entwicklung überwiegen mehrheitlich die nodalen NEBs im Gegensatz zu internodalen NEBs. Die NEBs wachsen zentrifugal, von den proximalen zu den distalen Bronchien. Dreidimensionale (3D) geometrische Analysen zeigten nodale NEBs an stereotypischen Positionen in den Verzweigungsstrukturen der Atemwege (12). Als physiologische Vorgänge der Ausbildung von NEBs wurden Zellmigration oder selektive Apoptose als Entwicklungsvorgänge spekuliert.

Kuo und Krasnow et al. zeigten in einer embryonalen Lungenschnittkultur, dass einzelne PNECs an den Bifurkationsstellen der Atemwege migrieren und aggregieren. PNECs zeigen migrierende Zelleigenschaften wie apikale Erweiterungen, eine fibroblastenähnliche Morphologie und dünne zelluläre Erweiterungen, die während der Migration zur Basalmembran konvergieren (13).

Noguchi et al. berichteten unter Verwendung von 3D-Zeitrafferaufnahmen eines ganzen embryonalen Lungenlappens über die gerichtete Migration einzelner PNECs zu den Verzweigungsstellen und die anschließende Bildung von NEBs in den Knoten. Einige PNECs führten während der Migrationsphase eine periodische Expansions- und Kontraktionsbewegung ihrer vorstehenden Strukturen durch. Die hochauflösende 3D-Bildgebung zeigte außerdem, dass die solitären PNECs an der Basalmembran haften bleiben, selbst wenn sie ihre zytoplasmatischen Prozesse ausdehnen, was das Modell unterstützt, dass PNECs auf der Basalmembran in einer gerichteten Weise von distalen Bereichen zu Verzweigungspunkten wandern. Wenn einzelne PNECs auf andere PNECs treffen, ändern sie dynamisch ihr Verhalten, einschließlich wiederholter vorübergehender Kontakte mit anderen PNECs, des Ruhens und der Ausbreitung (12). Schließlich gehen die einzelnen PNECs in den gepackten PNEC-Cluster über (13).

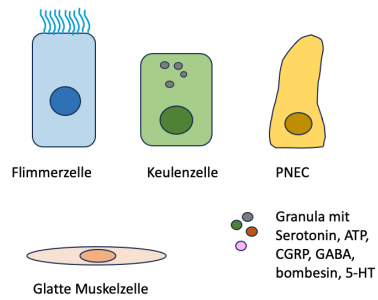


Abbildung 1: Legende mit Zelltypen

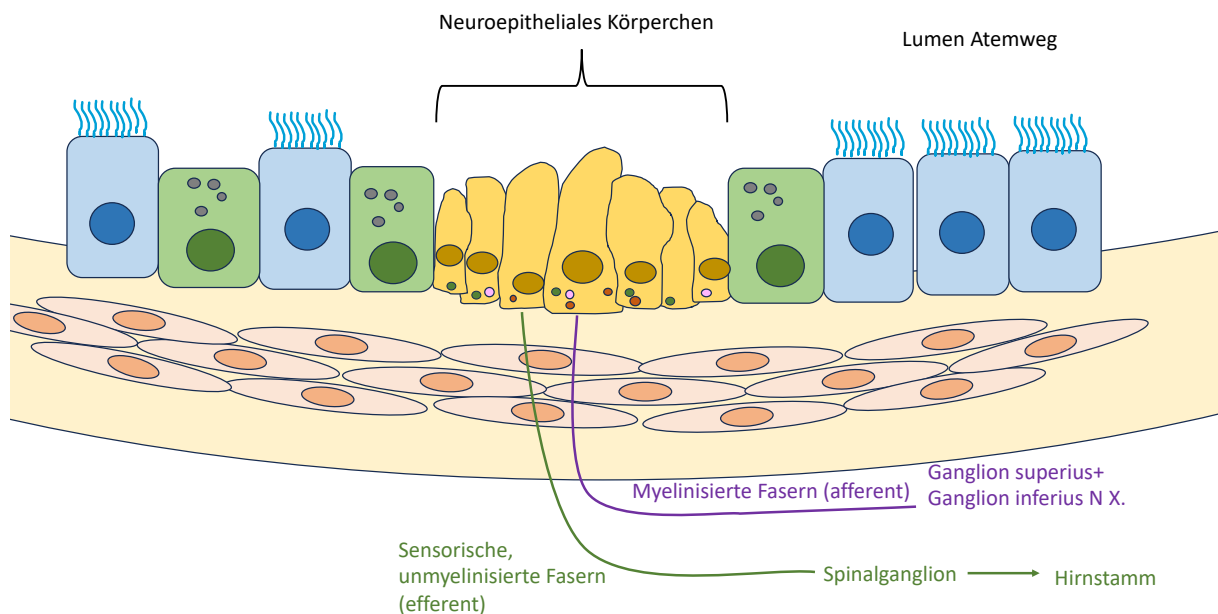


Abbildung 2: Neuroepitheliales Körperchen (NEB), Abbildung adaptiert von Noguchi et al. (8)

1.2.1 Embryonale PNEC Differenzierung

Bei der PNEC-Differenzierung spielen *Ascl1* und *Hes1* eine wichtige Rolle bei der Selektion (8).

Im sich entwickelnden Lungenepithel exprimieren Nicht-PNEC-Zellen, im Gegensatz zu *Ascl1*-exprimierenden PNECs, das repressive *Hes1*. Die PNEC-Differenzierung ist bei *Hes1*-defizienten Mäusen verstärkt, was darauf hindeutet, dass *Hes1* die PNEC-Differenzierung begrenzt (12). Im sich entwickelnden Lungenepithel exprimieren PNECs die Notch-Liganden *Dll1*, *Dll4*, *Jag1* und *Jag2* (14, 15).

Bei Mäusen, bei denen der Notch1-, Notch2- und Notch3-Rezeptor dreifach ausgeschaltet ist, sind Anzahl und Größe der NEBs deutlich erhöht. Der Schluss

hieraus war wiederum, dass Notch-Rezeptoren die PNECs während der Lungenentwicklung begrenzen. Außerdem sind Dll-Liganden - nicht aber Jagged-Liganden - an der Regulierung der Größe von NEBs beteiligt (15). Was wiederum darauf hindeutet, dass die Auswahl des PNEC-Schicksals aus multipotenten Vorläuferzellen durch die Notch-vermittelte laterale Inhibition gesteuert wird. In einem Modell von Noguchi et al. bedecken naive epitheliale Vorläuferzellen, die sowohl den Notch-Rezeptor als auch den Liganden exprimieren, zunächst das gesamte Epithel der primordialen Atemwege. Im Stadium der Verzweigung der Atemwege verstärkt *Ascl1* die Hochregulierung in den Vorläuferzellen. Die Expression des Notch-Liganden aktiviert dann die Notch-Rezeptoren auf den benachbarten Vorläuferzellen. Die PNEC-Induktion erfolgt proximal-distal, während sich die distalsten Lungenknospen weiter ausdehnen; siehe Abbildung 3. Die Notch-Signalisierung induziert die Expression von *Hes1*, die die Expression von *Ascl1* in einer zell-PNEC autonomen Weise hemmt, was zu einem Nicht-PNEC-Schicksal der *Ascl1*-negativen Zellen führt; siehe Abbildung 4. Diese Notch-vermittelte laterale Hemmung führt zu solitären PNECs. Diese solitären PNECs durchlaufen einen vorübergehenden epithelialen-mesenchymalen Übergang. Dies macht sie beweglich um zu Verzweigungspunkten der Atemwege zu wandern („gleiten“), wo Cluster von ~20-30 NE-Zellen entstehen und neuroepitheliale Körper (NEBs) bilden (8). Nach der PNEC-Spezifizierung über *Ascl1* hält das Zink-Finger-Protein *Insm1* die *Ascl1*-Expression und damit die Differenzierung zu PNECs aufrecht. *Insm1* reguliert die terminale Differenzierung von endokrinen Zellen in verschiedenen Geweben. In Mäusen mit *Insm1*-Mutation exprimieren PNECs nicht die reifen PNEC-Marker *UCHL1* und *CGRP*, während sie *Ascl1* während ihrer frühen Entwicklung beibehalten. Daraus lässt sich schließen, dass PNECs während ihrer Reifungsphase nach der Auswahl des Zellschicksals durch *Ascl1* von *Insm1* abhängig sind. *Ascl1* aktiviert die Expression von *Insm1*, anschließend unterdrückt *Insm1* die *Hes1*-Expression durch direkte Bindung einer cis-regulatorischen Sequenz (16).

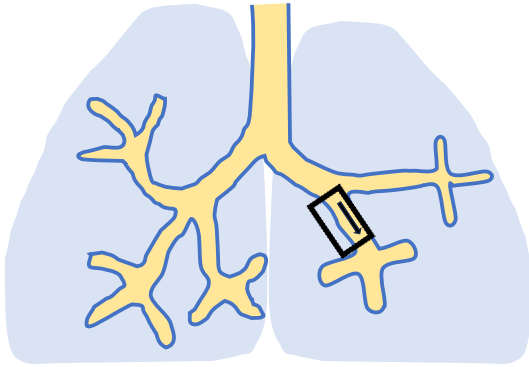
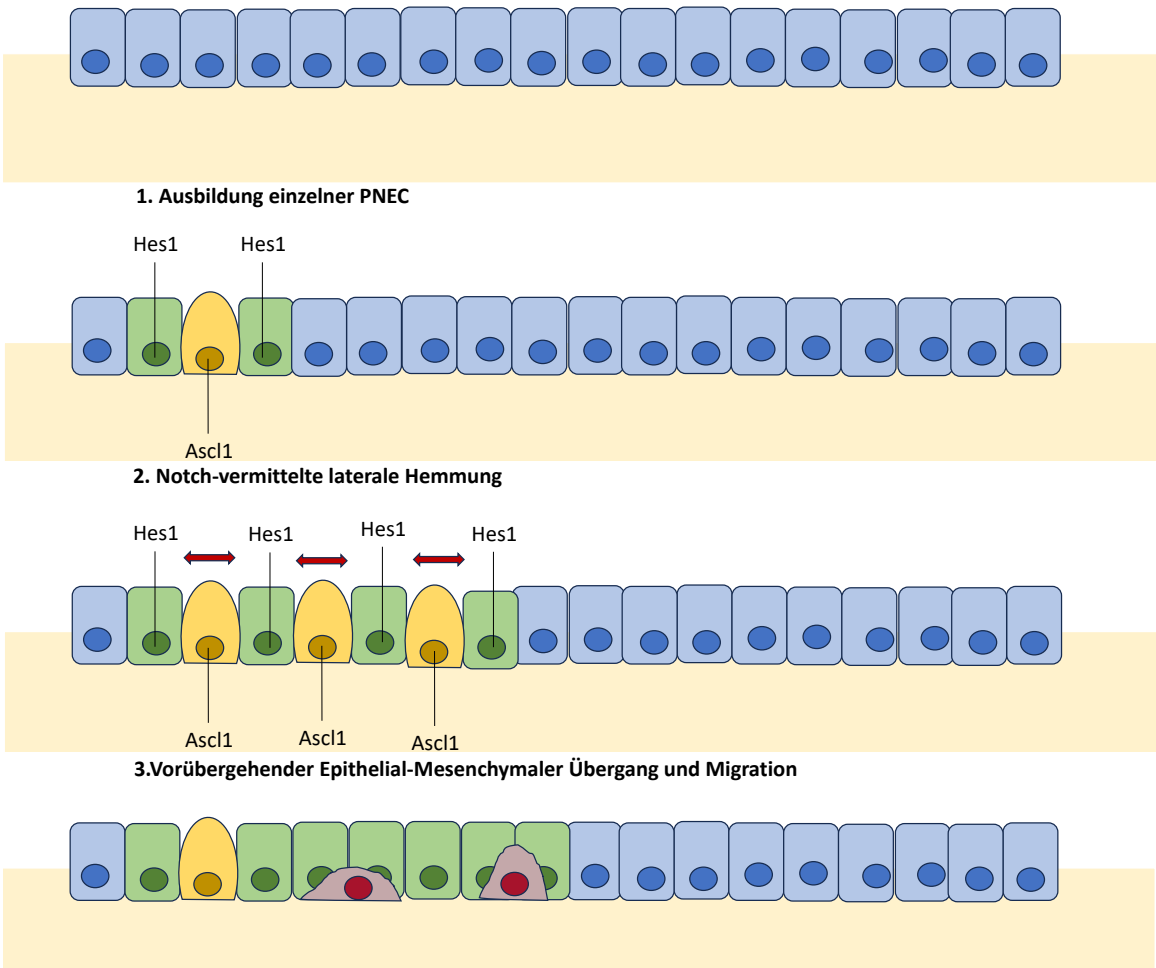


Abbildung 3: Lungenknospenausprossung und Epithelausbildung von proximal nach distal

Lungenepithelbildung von proximal nach distal



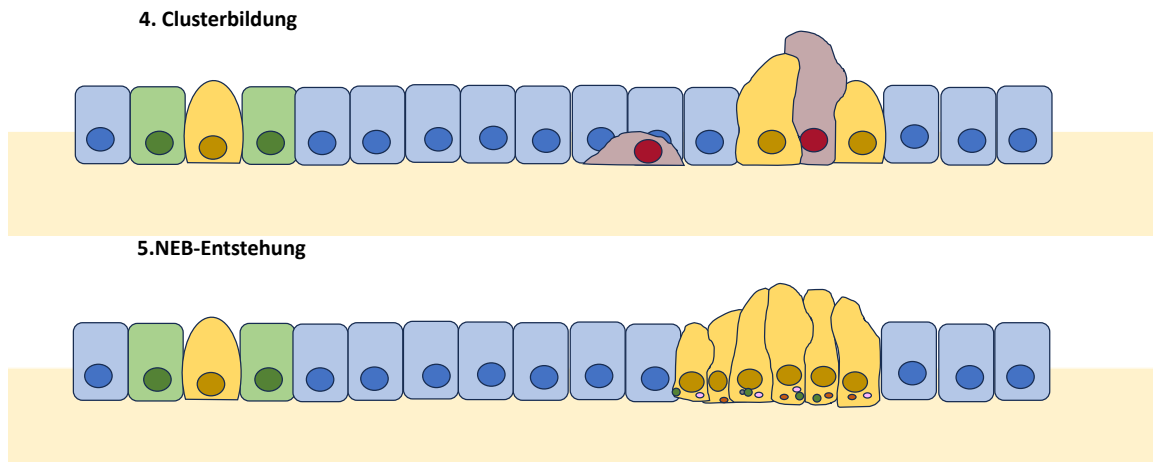


Abbildung 4: Embryonale Lungenentwicklung mit NEB Entstehung, Abbildung adaptiert von Noguchi et al.(8)

1.2.2 Stammzeleigenschaften bei Epithelschäden

Laut Oudah et al. haben PNECs nach Epithelschäden eine Steuerungsfunktion der Epithelregeneration. Zwei bis vier Zellen pro Cluster von 20-30 Zellen – scheinen ihre Stammzeleigenschaften zu behalten, um zur Geweberegeneration nach Verletzungen beizutragen. Die als PNECstem benannten Stammzellen durchlaufen eine Dedifferenzierung und wandeln sich schließlich durch Notch-Signalisierung in „Übergangszellen“ um. Übergangszellen differenzieren dann entweder zu Keulen-, Flimmer-, Alveolar-Typ-2- oder Stromazellen. Obwohl Notch für die Deprogrammierung von PNEC notwendig zu sein scheint, erfordert die Reprogrammierung zusätzliche, noch nicht verstandene Signalwege. Die Dedifferenzierung und Proliferation wird höchstwahrscheinlich von Rb/p53 kontrolliert. Oudah et al. konnten durch Rb/p53-Inaktivierung die spontane Proliferation der NE Zellen im Gegensatz zum Rb/p53-Wildtyp beweisen. Neben der Spontanproliferation desensibilisieren intakte Rb/p53-Gensequenzen die Zellen auch gegen Dispersions- und Reprogrammierungssignale (14).

1.2.3 Pathogenese neuroendokriner Tumoren

Bisher ist die Pathogenese der neuroendokrinen Tumoren wenig verstanden beziehungsweise sehr kompliziert. Selbst die genauen Ursprungszellen sind noch

nicht bei jeder Tumorentität bekannt. Mit der genetischen Analyse von Tumor-DNA wurden deskriptive Analysen häufig vorkommender Mutationen durchgeführt. Die genaue Einordnung in den pathophysiologischen Kontext mit den zahlreichen Signalwegen ist jedoch komplex. Einigkeit herrscht beim SCLC: hier sind TP53 und RB1 obligatorisch deaktivierte Tumorsuppressorgene (17, 18). Außerdem ist der Notch-Pathway beim SCLC ein Tumorsuppressor und dessen genetische Herunterregulierung bzw. Deaktivierung geht mit steigender Malignität einher (18). Die TP53 und RB1-Deaktivierungen sind auch bei LCNEC häufig. Dieser SCLC-ähnliche genetische LCNEC-Typ weist außerdem – wie auch viele SCLC – eine Amplifizierung der MYC-Gene auf. Die Dedifferenzierung von neuroendokrinen Zellen mit steigender Malignität von DIPNECH über Karzinoide zu high-grade neuroendokrinen Tumoren ist eine Möglichkeit der Tumorentstehung. Es gibt jedoch auch Hinweise zu alternativen LCNEC- und SCLC-Entstehungen aus nicht-neuroendokrinen Tumoren. Im klinischen Kontext wurde die Entwicklung von LCNEC und SCLC bei Patient*innen mit Adenokarzinomen unter EGFR-Therapie beobachtet (19, 20). Dieser Pathogeneseweg wurde auch im Maus-Modell provoziert (21, 22). Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass high-grade neuroendokrine Lungentumore eine hohe Mutationslast in ihrer Entität vereinen und dessen Pathogenese schwer nachvollziehbar ist.

1.3 Neuroendokrine Tumoren der Lunge

1.3.1 DIPNECH

Die Bezeichnung DIPNECH geht als Abkürzung aus „diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia“ hervor. Die DIPNECH ist eine seltene, aber zunehmend anerkannte Entität. Am häufigsten tritt sie bei Frauen mittleren Alters und älteren Frauen auf. Sie ist durch eine abnorme Proliferation pulmonaler neuroendokriner Zellen (PNEC) gekennzeichnet und gilt als präinvasive Läsion für Karzinoid-Tumorlets/Tumore. Die Unterscheidung in der Literatur zwischen Karzinoid-Tumorlets und Tumoren basiert rein auf der Größe: Tumorlets messen <5 mm, während Tumoren ≥ 5 mm groß sind (23). Teils wird DIPNECH von einer konstriktiven Bronchiolitis begleitet, die sich in der Regel als chronischer Husten und/oder Dyspnoe sowie als Einengung der Luftwege bei der Spirometrie äußert

(24). Diese Symptome werden häufig jahrelang vor der Diagnose als Asthma und/oder chronische obstruktive Lungenerkrankung (COPD) fehlinterpretiert (25-27). Zur Diagnosestellung erfolgt eine chirurgische Biopsie, welche – wenn nicht unbedingt benötigt – wegen der Invasivität vermieden wird. Das Zeichen der DIPNECH in der Bildgebung ist das Vorhandensein multipler, nicht verkalkter Lungenknötchen und einer mosaikartigen Attenuierung im CT. Diese klinisch-radiologischen Merkmale sind zwar charakteristisch aber unspezifisch. Wie zuvor beschrieben ist eine histopathologische Bestätigung erforderlich. Die DIPNECH hat einen indolenten Verlauf und führt nur selten zu Ateminsuffizienz oder Tod. Eine Progression zu einem offenen neuroendokrinen Tumor (Karzinoid) der Lunge tritt bei wenigen Patient*innen auf. Von den verfügbaren Therapien sind Somatostatin-Analoga und Mechanistic Target of Rapamycin-Inhibitoren die vielversprechendsten (24).

Bei pulmonalen neuroendokrinen Tumoren (Karzinoid) ist DIPNECH weit verbreitet. In drei Studien, die 311 (Hayes et al. 2022) (26), 172 (Prieto et al. 2021) (28), und 105 (Sazonova et al. 2020) (29) Patient*innen mit resezierten pulmonalen Karzinoiden umfassten, hatten 61 (20%), 25 (15%) und 22 (21%) DIPNECH. In der letztgenannten Studie (Sazonova et al. 2020) (29) wurde bei 16 (15%) weiteren Patient*innen eine „wahrscheinliche“ oder „mögliche“ DIPNECH festgestellt. In einer anderen Studie mit 151 konsekutiven Patient*innen mit resezierten pulmonalen Karzinoiden (Mengoli et al. 2018) (23) erfüllten 72 (48%) die strengen histopathologischen Kriterien vorgeschlagen von Marchevsky et al. (30), 19 (13%) hatten symptomatische DIPNECH.

Symptomatische Patient*innen weisen chronische Atemwegssymptome auf, d. h. Husten, Dyspnoe oder beides. Andere sind asymptomatisch und die Diagnose wird bei der Auswertung zufälliger Lungenknötchen gestellt. Das Karzinoid-Syndrom und endokrine Syndrome (z. B. Akromegalie, Cushing-Syndrom) sind äußerst selten (25, 31).

Die Spirometrie ist in den meisten Fällen abnormal, und obwohl jedes beliebige Muster beobachtet werden kann, ist die Atemwegsobstruktion die häufigste, oft in Verbindung mit Air-Trapping (31).

Ein Ansprechen auf Bronchodilatoren wurde häufig beobachtet (31-33), in einer Studie wurde dies bei 52% der Patient*innen mit Luftstromobstruktion festgestellt (31). Die Unterscheidung gegenüber schwerem Asthma kann über die periphere

Eosinophilenzahl erfolgen (32). Diese ist bei DIPNECH im Normbereich, beim eosinophilen Typ des Asthmas nicht (34).

Patient*innen mit DIPNECH können sich zunächst mit respiratorischen Symptomen vorstellen, während andere Fälle zufällig bei der Abklärung anderer Erkrankungen entdeckt werden. Die endgültige Diagnose von DIPNECH erfordert eine histopathologische Untersuchung des Lungengewebes. Es gibt nur begrenzte Erkenntnisse über die Behandlung, derzeit wird ein individuelles Vorgehen empfohlen (35). Laut der WHO NE Tumor-Klassifikation soll sie von der lokalen reaktiven Hyperplasie der neuroendokrinen Zellen unterschieden werden, welche auf verschiedene nicht-neoplastische Erkrankungen zurückzuführen ist (36).

1.3.2 Karzinoide

Die Karzinoide sind mit weniger als 2% der Gesamtlungentumore eine eher seltene Entität (37). Sie treten mit 80% überwiegend in den zentralen Luftwegen auf, 20% wachsen peripher (38). Wenn in den zentralen oder lobären Bronchien wachsen, können sie Symptome wie Husten, Hämoptysen, abnorme Atemgeräusche, Kurzatmigkeit und Brustschmerz auslösen (39). Bei ausgedehntem Wachstum ins Bronchiallumen können sie diese verlegen, Atelektasen und bei Infektion auch Pneumonien bedingen. Ungefähr 8% der neuroendokrinen Lungentumore produzieren Peptidhormone im Überfluss, ein kleiner Teil kann durch Nebennierenhormonproduktion auch ein Cushing-Syndrom auslösen (40). Der generell durch karzinoide Hormonproduktion ausgelöste Symptomenkomplex aus Keuchen, Flush und Diarrhoe wird als Karzinoidsyndrom gehandelt (41). Dieses tritt jedoch nur bei etwa 1% der Patient*innen auf, hier als Folge der Sekretion vasoaktiver Substanzen, insbesondere Serotonin (42). 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) kann als Metabolit des Serotonins auch ohne die klassischen Anzeichen eines klassischen Karzinoidsyndroms im Urin nachgewiesen werden (43). Chromogranin A (CgA), das im Serum nachgewiesen werden kann, zeigt bei neuroendokrinen Tumoren eine Sensitivität von 85 % und eine Spezifität von 96 %. Die CgA-Bestimmung eignet sich vorrangig zur Verlaufskontrolle bei (metastasierten) Erkrankungen und spielt eine untergeordnete Rolle in der Primärdiagnostik. Bei Verdacht auf Morbus Cushing

sind typischerweise sowohl die Serumkortisolwerte als auch das freie 24-Stunden-Kortisol im Urin sowie die Konzentrationen des ACTH erhöht (43).

Immunhistochemisch sind Karzinoide durchweg und diffus positiv für alle Standard-NE-Marker (Synaptophysin, Chromogranin A, CD56) und INSM1. Eine schwache oder fehlende Markierung für NE-Marker, insbesondere wenn es sich um mehrere handelt, kann als schwacher Hinweis dienen, in diesen Fällen diagnostisch NECs gegenüber Karzinoiden zu bevorzugen. TTF-1 ist in ~30-50 % der Karzinoide positiv und kann als Marker für die Herkunft aus der Lunge bei Metastasen dienen (44). Gegensätzlich hierzu wird bei kleinzelligen oder großzelligen NEC TTF-1 unabhängig vom Ursprungsort exprimiert (45, 46).

Neben Ki-67 können auch OTP (Orthopaedia Homeobox Protein) und CD44 als immunhistochemisch anfärbbare Marker zur Prognoseabschätzung bei Karzinoiden genutzt werden. OTP ist ein Transkriptionsfaktor für die neurologische Entwicklung, der fast ausschließlich in Lungenkarzinoiden exprimiert wird, nicht aber in NEC, NSCLC oder NETs nicht-pulmonalen Ursprungs (47-49). Die Auswertung von OTP allein oder in Kombination mit CD44 ermöglicht die Identifikation von Patient*innen mit hohem Rezidiv-Risiko (47, 48, 50). In einer Arbeit zur Untersuchervariabilität bei Karzinoiden verbesserte die Anwendung dieser Marker die Vorhersagegenauigkeit der Prognose bei Patient*innen ohne histopathologische Konsensdiagnose (51). Weitere Untersuchungen des prognostischen Wertes von OTP bei Karzinoiden in größeren Serien zeigte eine schlechtere Prognose bei Verlust der Expression dieses Markers (52-55).

Alle Karzinoide der Lunge sind maligne mit Potential zur Metastasierung(56). Klassifiziert werden sie nach dem TNM-Stadienmodell für Lungenkarzinome. Während die meisten typischen Karzinoide bereits im Stadium IA diagnostiziert werden, erfolgt die Entdeckung atypischer Karzinoide häufig erst in fortgeschrittenen Krankheitsstadien (57). Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung zeigen 5–15 % der Patient*innen mit typischen Karzinoiden bereits eine Beteiligung der Lymphknoten, bei etwa 3 % liegen Fernmetastasen vor. Im Vergleich dazu ist die Metastasierungsrate bei atypischen Karzinoiden deutlich höher: Bei 40–50 % der Betroffenen finden sich zum Diagnosezeitpunkt Lymphknotenmetastasen, und rund 20 % weisen bereits Fernmetastasen auf (57).

Sie haben eine charakteristisch neuroendokrine Histologie: ihre Zellen sind uniform mit unscheinbaren Nukleolen und granuliertem „salt and pepper“ Chromatin, die Wachstumsmuster sind trabekulär, organoid in Nestern und Rosetten papillär, follikulär, paragangliomartig und pseudodrüsenartig (45, 58). Das Stroma der Karzinoide ist gut vaskularisiert, was bei Biopsien betreffend Blutungskomplikationen beachtet werden sollte. Die genetischen Abberationen sind bei Karzinoiden in bis zu 40 % der Fälle durch Chromatin-remodellierende Genanomalien und in einem geringeren Anteil der Fälle durch MEN1-, PSIP1- und ARID1A-Genmutationen gekennzeichnet, ohne dass die klassischen SCLC-Genveränderungen (TP53/RB1-Mutationen) vorliegen (59-61).

Die typischen Karzinoide sind mit 70-90% die häufigeren der Gruppe. Sie weisen eine geringere Proliferation (< 2 Mitosen pro 2 mm^2) und ein nekrosefreies Stroma auf. Das Tumorwachstum erfolgt langsam über Jahre (62). Metastasierungen bei Diagnosestellung sind mit 15% bei den typischen Karzinoiden noch weniger häufig, das 10-Jahres-Überleben unter Therapie beträgt 47% (63).

Die atypischen Karzinoide haben definitionsgemäß mit (≥ 2 und ≤ 10 Mitosen pro 2 mm^2) eine höhere Proliferationsaktivität und weisen kleinherdige Nekrosen auf. Der Ki-67 Proliferationsindex (Ki-67 PI) der atypischen Karzinoide ist kleiner 20%, bei typischen Karzinoiden ist die Tendenz zu einem KI-67 PI von kleiner 2% in der Literatur vermerkt, jedoch kann der Indexwert bei typischen Karzinoiden auch bis zu 8% betragen (64). Somit kann der Index als Unterscheidungshilfe gegenüber SCLCs (Ki-67 PI Rate 60%-100%) bei Crush-Artefakten genommen werden (45), jedoch gibt es eine Grauzone des Ki-67 PI in der es sich sowohl um typische als auch atypische Karzinoide handeln kann. In der WHO-Klassifikation 2021 für neuroendokrine Tumoren wurde eine neue Kategorie von thorakalen Karzinoiden mit erhöhter Mitosezahl, einem erhöhtem Ki-67 PI oder beidem definiert. Sie haben bei den gleichen Merkmalen wie die atypischen Karzinoide mit >10 Mitosen pro 2 mm^2 eine höhere Mitoserate, was auf einen aggressiveren Phänotyp hindeutet (analog zu gut differenzierten NETs des Gastrointestinaltrakts vom Grad III) (37). Die Klassifikation dieser in der Pathologie und die Aufnahme von Ki-67 in Klassifizierungen wird in der Fachliteratur diskutiert (65). In der WHO-Klassifikation von 2021 werden diese lediglich als eine Beobachtung beschrieben, ohne genauere Klassifizierung. Die Empfehlung ist, diese Tumoren als LCNEC zu klassifizieren und in der Beschreibung die karzinoide Morphologie und den Ki-67

PI anzugeben (36). Bei klinischen Patient*innen die in diese Kategorie der atypischen Karzinoide fallen, können zur Unterscheidung zwischen atypischen Karzinoiden und hochgradigen neuroendokrinen Lungenkarzinomen [¹⁸F]Fluorodesoxyglucose ([¹⁸F]FDG)-PET-Scans angefertigt werden (66).

Aufgrund der Metastasierungstendenz - 50% der atypischen Karzinoide werden in Stadium IV mit Fernmetastasen diagnostiziert - ist die Prognose schlechter als bei den typischen Karzinoiden (62, 63).

Die empfohlene Therapie der Stadien I-III und ausgewählter radikal operabler Stadien IV ist die chirurgische Resektion (33). Häufig erfolgt diese in Form einer Lobektomie, je nach Fall auch sublobäre oder Keilresektionen (38). Obwohl die meisten pulmonalen Karzinoide durch eine chirurgische Resektion kurativ behandelt werden können, kommt es bei 10 % der Patient*innen zu einem Rezidiv durch späteres Auftreten von Fernmetastasen (~1 %-6 % der Patient*innen mit TC und 14 %-29 % mit AC) (67-71).

Die 5-Jahres-Überlebensrate bei Lungenkarzinoiden hängt maßgeblich vom Krankheitsstadium zum Zeitpunkt der Diagnose ab und fällt bei frühzeitiger Erkennung deutlich besser aus. Die geschätzten Überlebensraten nach fünf Jahren betragen für die Stadien I bis IV etwa 93 %, 84 %, 75 % bzw. 57 %. Typische Karzinoide weisen insgesamt eine günstigere Prognose auf als atypische. Bei typischen Karzinoiden liegen die 5-Jahres-Überlebensraten zwischen 87 % und 100 %, die 10-Jahres-Raten zwischen 82 % und 87 %. Atypische Karzinoide hingegen verlaufen häufig aggressiver, was sich in deutlich niedrigeren Überlebensraten widerspiegelt: Die 5-Jahres-Überlebensraten betragen hier lediglich 50 % bis 95 %, die 10-Jahres-Raten 38 % bis 75 % (72, 73). Ein Befall hilärer oder mediastinaler Lymphknoten wird als ungünstiger prognostischer Faktor angesehen. Bei typischen Karzinoiden mit Lymphknotenmetastasen liegt die 5-Jahres-Überlebensrate zwischen 92 % und 100 %, während die 10-Jahres-Überlebensrate auf etwa 50 % sinkt. Atypische Karzinoide mit Lymphknotenbeteiligung zeigen deutlich schlechtere Prognosen: Die 5-Jahres-Rate liegt zwischen 25 % und 78 %, die 10-Jahres-Rate zwischen 25 % und 59 % (74, 75).

Bei Verdacht auf pulmonale Karzinoide sollten immer auch Differentialdiagnosen in Betracht gezogen werden. Als benigne Differentialdiagnosen kommen ein Granulom, arteriovenöse Malformationen, Lungenabszesse/Mykobakteriosen oder

septische Embolien infrage. Maligne Tumoren können sein: NSCLC, SCLC, pulmonale Metastasen oder Sarkome der Lunge (76, 77).

1.3.2.1 Diagnostik

Die meisten Lungenkarzinoide werden zufällig im thorakalen Röntgenbild entdeckt. Obwohl die Unterscheidung zwischen typischen und atypischen Karzinoiden oft schwierig ist, lassen sich charakteristische Merkmale für typische Karzinoide erkennen. Sie treten überwiegend zentral auf und befinden sich häufig in den Haupt-, Lappen- oder Segmentbronchien. Nur etwa 15 % zeigen eine periphere Lokalisation und erscheinen dabei typischerweise als ovale, homogene Rundherde. In rund 60 % der Fälle sind typische Karzinoide in der rechten Lunge zu finden, bevorzugt im Mittellappen. Zudem weisen etwa 30 % der Patient*innen radiologische Hinweise auf isolierte oder diffuse Verkalkungen auf (78).

Zur Ausbreitungsdiagnostik kann eine PET/CT-Untersuchung durchgeführt werden. Hierbei ist es wichtig, zwischen typischem und einem atypischem Karzinoid zu unterscheiden. Bei typischen Karzinoiden kann die diagnostische Aussagekraft von ^{18}F -Fluordesoxyglucose (^{18}F -FDG) eingeschränkt sein, da diese Tumoren häufig nur eine geringe Traceraufnahme aufweisen. Daher wird heute bevorzugt ein Tracer eingesetzt, der gezielt an Somatostatin-Rezeptoren (SSTR) bindet (79). Atypische Karzinoide hingegen zeigen in der Regel eine deutlich erhöhte ^{18}F -FDG-Aufnahme, allerdings mit teils schwankender Affinität zu radioaktiv markierten Somatostatin-Analoga (80). Bei neuroendokrinen Tumoren hat sich insbesondere das Somatostatin-Analogon ^{68}Ga -Gallium-DOTATOC (^{68}Ga -DOTATOC) als effektiver PET/CT-Tracer etabliert. Die diagnostische Genauigkeit liegt bei typischen Karzinoiden bei über 95 % (80, 81). Während ^{68}Ga -DOTATOC einen hohen negativen Vorhersagewert für den Ausschluss typischer Karzinoide bietet, ist seine Aussagekraft bei atypischen Karzinoiden begrenzt (81).

Bronchoskopisch können in etwa 75% der Fälle endobronchial gut vaskularisierte, rundliche, himbeerrote Läsionen nachgewiesen werden. Aufgrund der zentralen endoluminalen Lokalisierung sind diese für transbronchiale Biopsien gut erreichbar (82). Im Vorfeld einer Operation sollte bei erhöhter Wahrscheinlichkeit einer Lymphknotenbeteiligung eine ultraschallgezielte transbronchiale Nadelaspiration (EBUS-TBNA) durchgeführt werden. Bei suspekten Läsionen in vermutetem

Zusammenhang mit der Lungenneoplasie kann eine sonografische Diagnostik mit anschließend Ultraschall-gezielter Punktion erfolgen (83).

1.3.2.2 Therapie

Die Therapie kann in einzelnen Fällen kleininvasiv endobronchial mittels Lasertherapie, Kryotherapie oder Argon-Plasma-Koagulation erfolgen und hat auch laut Dalar et al. keine negativen Auswirkungen auf eine eventuell anschließende chirurgische Therapie (84).

Bei Lungenzinoiden der UICC-Stadien I-III A ist die minimalinvasiv operative Resektion aktueller Standard (85, 86). Bei typischen Karzinoiden kann in ausgewählten, anatomisch günstig liegenden Fällen eine extraanatomische Keilresektion durchgeführt werden. Da bei atypischen Karzinoiden eine höhere Wahrscheinlichkeit einer Lymphknotenmetastasierung vorliegt, sollte hier eine radikale anatomische Resektion und eine systematische Lymphknotendissektion durchgeführt werden (87, 88). Mit dem Ziel des weitestgehenden Lungenerhalts werden bei zentral wachsenden Tumoren broncho- und angioplastische Manschettenresektionen durchgeführt (89).

Die Bedeutung der mediastinalen Lymphknotendissektion bei pulmonalen Karzinoiden ist weiterhin Gegenstand kontroverser Diskussionen. Derzeit liegen nur begrenzte Evidenzen vor, die auf einen Nutzen hinsichtlich der Verringerung lokaler Rezidive oder einer Verbesserung der Überlebensrate hinweisen. Dennoch sollte bei allen Patient*innen mit pulmonalen Karzinoiden eine mediastinale Lymphknotendissektion – analog zur Vorgehensweise beim NSCLC – in Erwägung gezogen werden, da sie ein exaktes Staging ermöglicht und entscheidend zur Planung adjuvanter Therapieoptionen beitragen kann (76, 77).

Wird bei resezierten Karzinoid-Tumoren postoperativ eine Lymphknotenmetastasierung festgestellt, erfolgt in der Regel nach interdisziplinärer Falldiskussion die Empfehlung zur adjuvanten Systemtherapie, insbesondere mit dem Ziel, das Risiko eines Rezidivs zu reduzieren. Für atypische Karzinoide im Stadium III sprechen sich sowohl die European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS) als auch das National Comprehensive Cancer Network (NCCN) für eine adjuvante systemische Therapie mit Cisplatin und Etoposid aus (90). Demgegenüber liegt seitens der ENETS keine Befürwortung einer

ergänzenden systemischen Behandlung bei typischen Karzinoiden mit Lymphknotenbefall vor (78).

Aufgrund der geringen Strahlenempfindlichkeit pulmonaler Karzinoid-Tumoren ist der therapeutische Nutzen der Radiotherapie bei dieser Tumorentität eingeschränkt. In bestimmten Fällen kann eine Strahlenbehandlung jedoch als unterstützende Option in Erwägung gezogen werden. Bei lokal fortgeschrittenen, nicht operablen Tumoren wird in der Regel eine kombinierte Radio-Chemotherapie empfohlen. Für diese Therapieform kommt üblicherweise eine Gesamtdosis von 60 Gy zur Anwendung (90). Für nicht operable Patient*innen mit einzelnen Lungenkarzinomen kann die stereotaktische Strahlentherapie (SBRT) eine therapeutische Alternative darstellen. Die verfügbare Evidenz zu diesem Ansatz ist jedoch begrenzt. In den bisherigen Studien lag die median verordnete Dosis bei 50 Gy, appliziert in 5 bis 10 Fraktionen (Spanne: 40–60 Gy). Die Behandlung erfolgte mittels SBRT bzw. hypofraktionierter Radiotherapie unter täglicher bildgestützter Strahlenführung (IGRT) mit einem Linearbeschleuniger und Atemkontrolle (91).

Die Nachsorge bei Patient*innen mit Lungenkarzinoiden (LC) sollte lebenslang erfolgen, da im Krankheitsverlauf häufig Rezidive auftreten können. Nach einer radikalen Resektion wird eine dauerhafte Nachsorge empfohlen, bei der strahlungsarme bildgebende Verfahren in individuell angepassten, zunehmend verlängerten Intervallen eingesetzt werden. Diese Intervalle sollten unter Berücksichtigung prognostischer Faktoren festgelegt werden. Die Nachsorge von Patient*innen mit Lungenkarzinoiden fokussiert sich sowohl auf die Beurteilung des Tumorverlaufs und möglicher funktioneller Syndrome als auch auf die Erfassung potenzieller Langzeit-Toxizität sowie spezifischer Begleiterkrankungen wie DIPNECH oder dem MEN-1-Syndrom (multiple endokrine Neoplasie Typ 1). Bei fortgeschrittenen Tumorstadien wird eine bildgebende Verlaufskontrolle im Abstand von 2 bis 12 Monaten empfohlen, abhängig von der WHO-Histologie, der Tumorproliferationsrate sowie dem klinischen Verlauf des Funktionssyndroms. Patient*innen mit disseminierter Erkrankung können zusätzlich von der Anbindung an spezialisierte palliativmedizinische Einrichtungen profitieren, insbesondere im Hinblick auf die Schmerztherapie, die psychosoziale Betreuung sowie rehabilitative Maßnahmen (92).

Die WHO-Klassifikation 2021 hat die unverbindlichen Bezeichnungen „carcinoid tumour/NET not otherwise specified“ (NOS) - für Biopsien von primären Lungentumoren, bei denen TC nicht von AC unterschieden werden kann- und „metastatic carcinoid NOS“ – für Zytologie oder Biopsieproben von Metastasen, die auf gut differenzierte Neoplasmen hinweisen, eingeführt (33, 93, 94).

Aktuelle Untersuchungen unterstützen die These der genaueren Stratifizierung von pulmonalen Karzinoiden durch das OTP/CD44/KI-67-Marker-Panel und zeigten die Überlegenheit dieser verglichen mit der traditionellen WHO-Typisierung (95).

1.3.3 LCNEC

LCNECs sind schlecht differenzierte Tumoren der Lunge. Sie machen etwa 3% der Malignome der Lunge aus (96). Gemeinsamkeiten mit dem SCLC sind das Auftreten im fortgeschrittenen Alter bei Raucher*innen (97), der klinische Verlauf und das aggressive Verhalten der Tumore (98). LCNECs weisen eine hohe Mitoserate von mehr als 10 Mitosen pro 2 mm² (durchschnittlich 60-80 Mitosen pro 2 mm²) und ausgedehntere Nekrosen als niedriggradige NETs auf (99). Diagnostische Kriterien von LCNEC sind eine endokrine Morphologie (Trabekel, Palisaden, organoide Nester und Rosettenanordnungen), eine hohe Proliferationsrate mit >10 Mitosen pro 2mm² (Median 70 Mitosen pro 2mm²), ausgeprägte Nekrosen und mindestens ein immunhistochemisch anfärbarer neuroendokriner Marker (Chromogranin A, Synaptophysin oder CD56) (36, 100). Eigenschaften der Tumorzellen von LCNEC die sie von SCLC unterscheidbar machen können sind große Zellen mit eosinophilem Zytoplasma, viele prominente Nucleoli und eine niedrige Zellkern-Zytoplasma-Relation (99).

LCNECs sind molekular heterogen mit mindestens drei Untergruppen. Die kleinste beinhaltet MEN1-mutierte Fälle, die höchstwahrscheinlich Karzinoide mit hohen Proliferationsraten darstellen. Die beiden anderen Untergruppen umfassen die meisten LCNECs: eine Gruppe mit TP53- und RB1-Genmutationen wie sie bei SCLC beobachtet werden und eine Untergruppe mit KRAS- und STK11/KEAP1-Mutationen wie sie bei NSCLC vorkommen (36). In einer Studie aus New York wurden 42 chirurgisch entfernte und von drei Patholog*innen histopathologisch nach der WHO-Klassifikation 2015 als LCNEC klassifizierte Tumoren auf 241

Krebs-Genome mittels Next-Generation-Sequencing untersucht. Zu den am häufigsten veränderten Genen gehörten TP53 (78%), STK11 (33%), KEAP1 (31%) und KRAS (22%). Anhand der genomischen Profile wurden die LCNEC in drei Untergruppen eingeteilt: je nach ihrer Ähnlichkeit zum SCLC, NSCLC oder Karzinoid. Die SCLC-ähnlichen zeichneten sich durch eine TP53 und RB1 – Co-Mutation und eine MYCL-Amplifikation aus. Bei den NSCLC-ähnlichen waren TP53 und RB1 nicht gleichzeitig verändert, gleichzeitig gab es hier die NSCLC-typischen Mutationen in STK11, KRAS oder KEAP1. Die Karzinoid-ähnlichen zeichneten sich durch eine MEN1-Mutation und eine geringe Mutationslast aus. Klinisch-pathologisch unterschieden sich die SCLC-Ähnlichen durch eine höhere proliferative Aktivität. Die NSCLC-Ähnlichen zeigten ausschließlich eine Expression von Differenzierungsmarkern des Adenokarzinoms, unterschieden sich jedoch auch charakteristisch durch genomische Veränderungen, die als wichtige Regulatoren der neuroendokrinen Differenzierung gelten: z.B. häufigere Mutationen in der NOTCH-Familie. Somit sind LCNEC eine sehr heterogene Tumorgruppe die verschiedene genomische Signaturen von SCLC, NSCLC und selten auch hochgradig proliferative Karzinome umfasst (59).

Biopsien mit Crush-Artefakten und damit Verlust der Zellmorphologie können die definitive Unterscheidung zwischen LCNEC und SCLC erschweren oder unmöglich machen: Die Zellen können klein erscheinen und die artefaktbedingte Überlappung zwischen den Zellen kann das beim SCLC vorkommende nukleare Molding imitieren. Diese Merkmale, in Kombination mit immunhistochemischer NE-Marker-Anfärbbarkeit und einem hohen (50-100%) Ki-67 PI lassen in diesen Fällen keine definitivere Aussage zu als die eines high-grade neuroendokrinen Lungentumors (99). LCNECs können neben SCLCs auch fälschlicherweise als schlecht differenzierte NSCLCs oder atypische Karzinoide fehldiagnostiziert werden; hinzu kommt die Sonderform der mixed LCNEC, die neben den genannten Eigenschaften auch Foci anderer Tumor-Entitäten wie Plattenepithel- oder Adenokarzinome beinhalten (100, 101). Retrospektive Analysen im Netherlands Cancer Registry und der SEER-Database lassen darauf schließen, dass LCNECs in niedrigen Stadien weniger häufig metastasieren als SCLCs und deshalb Patient*innen eine größere Chance haben in niedrigeren Stadien diagnostiziert zu werden (102, 103). Im Falle einer Metastasierung scheinen sie jedoch ein ähnliches Ausprägungsmuster zu haben wie SCLCs (102).

1.3.4 SCLC

Histopathologische Charakteristika von SCLC sind in der WHO-Klassifikation beschrieben: Die Tumorzellen haben wenig Zytoplasma, schlecht definierte Zellgrenzen und fein granuläres Kernchromatin. Die Zellen sind oval bis spindelförmig und in der Regel kleiner als der Durchmesser von drei kleinen ruhenden Lymphozyten. Nukleoli sind entweder nicht vorhanden oder unauffällig. Die Verformung von Zellkernen ist häufig. Die Tumorzellen sind in der Regel dicht gepackt und wachsen meist in einem blattartigen Muster. Nekrosen sind typisch und apoptotische Zellen oft zahlreich vorhanden. Crush-Artefakte und Verkrustungen basophiler Kern-DNA um Blutgefäße herum (Azzopardi-Effekt) können vorkommen. Neuroendokrine Wachstumsmuster wie organoide, trabekuläre oder rosettenartige Formation sind typischerweise in Biopsien nicht sichtbar, können aber in resezierten Tumoren auffällig sein (104). Größere Zellen wie z.B. pleomorphe Tumorroriesenzellen können beigemischt sein, sollten aber nicht mehr als zehn Prozent des Tumors ausmachen. Die Mitosezahl ist hoch. Per Definition soll die Mitoserate > 10 Mitosen/ 2mm^2 sein. Der Durchschnitt sind jedoch 60, der Median sogar 80 Mitosen/ 2mm^2 (104).

Aufgrund dieser Merkmale kann die Diagnose von SCLCs häufig ohne Immunhistochemie gestellt werden. Dennoch können immunhistochemische Tests die diagnostische Genauigkeit erhöhen (105). Etwa 15-20 % der SCLCs negativ für Synaptophysin und Chromogranin A (44). Darüber hinaus exprimieren die meisten SCLCs CD56 und/oder INSM1 (106-108). In seltenen Fällen, in denen alle diese Marker negativ sind (106), aber die Diagnose SCLC morphologisch immer noch favorisiert wird, wird die endgültige Diagnose durch Ausschluss von Mimikern mit Hilfe anderer Marker wie CD45 für Lymphome oder p40 für die basaloide Version des Plattenepithelkarzinoms gestellt (44). Der relativ neue Marker POU2F3 kann in SCLCs vorhanden sein, in denen die Expression der bestehenden neuroendokrinen Marker fehlt (109, 110). In den letzten Jahren wurden mehrere Subtypen von SCLC diskutiert, definiert nach Expression von bestimmten Transkriptionsfaktoren. Achaete-scute homologue 1 (ASCL1; auch bekannt als ASH1), neurogenic differentiation factor 1 (NeuroD1), yes-associated protein 1 (YAP1) und POU class 2 homeobox 3 (POU2F3) (111). Während ASCL1 (SCLC-A), NeuroD1 (SCLC-N) und POU2F3 (SCLC-P) weiterhin als Subtypen

anerkannt werden, hat sich dies für YAP1 nicht durchgesetzt (112). YAP1 wird nun als Prognosemarker untersucht (113). Stattdessen wurde ein vierter Subtyp definiert, bei dem alle 4 vorherig genannten Marker negativ sind. Im vierten Subtyp zeigt sich keine streng vorherrschende Transkriptionssignatur, jedoch gehören zahlreiche Immun-Checkpoints und humane Leukozyten-Antigene (HLAs) zu den häufig exprimierten Genen. Daher wurde dieser vierte Subtyp als entzündet; SCLC-inflamed oder SCLC-I bezeichnet (114).

1.3.4.1 Kombinierte SCLCs

Kombinierte SCLCs sind Tumore die aus einer SCLC und einer zusätzlichen Komponente von NSCC, einschließlich LCNEC bestehen. In den meisten Fällen handelt es sich bei der zweiten Komponente um ein LCC, Adenokarzinom oder SCC, selten jedoch auch aus Spindel- oder Riesenzellkarzinom (104). Bei der Diagnose eines kombinierten SCLC sollte jede der vorhandenen NSCC-Komponenten erwähnt werden. Um als kombinierter Tumor diagnostiziert zu werden (SCLC/LCNEC oder SCLC/LCC) sollten in diesem Fall die großen Zellen mehr als zehn Prozent des Tumors ausmachen. Diese prozentuale Anforderung gilt nicht für andere nicht-kleinzelligen Elemente wie z.B. Adenokarzinom oder SCC. Bei Vorhandensein von Adenokarzinom-Komponenten in einem kombinierten SCLC oder eine Erstdiagnose bei Nichtraucher*innen sollte molekularbiologisch in Hinblick auf Driver-Mutationen wie z.B. EGFR-Mutationen oder ALK-Rearrangement untersucht werden. Dies tritt meist als Manifestation einer Resistenz gegen eine targeted-therapy bei bekannten Mutationen von EGFR oder ALK-Rearrangements auf, kann aber auch de novo bei noch unbehandelten Patient*innen gefunden werden. Tumoren mit einer Mischung aus SCLC und gleichen oder größeren Mengen Spindelzell- und/oder Riesenzellkarzinom oder heterologe sarkomatöse Komponenten sollten als kombiniertes SCLC klassifiziert werden, wobei die verschiedenen Histologietypen zu erwähnen sind (104).

Das SCLC ist wie das Plattenepithelkarzinom stark mit dem Tabakrauchen assoziiert. Nachdem fast nur Raucher*innen und Exraucher*innen erkranken korreliert die SCLC-Inzidenz stark mit den Konsumgewohnheiten von Tabak. Während weibliche Raucher*innen ein um 20-fach erhöhtes Risiko haben an

einem SCLC zu erkranken steigt das Risiko für Männer sogar auf das 45-fache(115, 116).

Neben dem Tabakkonsum können SCLC auch durch neuroendokrine Entdifferenzierung EGFR-mutierter Adenokarzinome unter EGFR-TKI entstehen (117). Studien zufolge liegt die SCLC-Transformationsrate von Adenokarzinomen mit EGFR-gezielter Therapie bei 3%-15%(117, 118). Generell führt die gleichzeitige Inaktivierung von RB1 und TP53 in NSCLCs zur neuroendokrinen Entdifferenzierung (119-121). In einer Studie von Ding et al. mit 1474 NSCLC-Patient*innen von denen elf eine NSCLC zu SCLC-Transformation dokumentiert hatten wurde attestiert, dass die Transformation unabhängig vom EGFR-Status ablaufen könne und mit dem Gen SMAD4 zusammenhänge (122).

1.4 Immunhistochemische Marker

1.4.1 Synaptophysin

Synaptophysin wurde erstmals 1985 als Protein in präsynaptischen Vesikeln von Neuronen des Gehirns, des Rückenmarks und der Netzhaut, an neuromuskulären Verbindungen und im Nebennierenmark beschrieben und im Jahr darauf als immunhistochemisch anfärbbares Markerprotein für neuroendokrine Zellen und Neoplasien vorgeschlagen (123, 124). Die Vesikel, die Synaptophysin enthalten, können mit Neurofilamenten oder epithelialen Filamenten vorkommen und kann eine von anderen neuronalen Differenzierungsmarkern unabhängige Expression zeigen. Ein beträchtlicher Anteil der neuroendokrinen Neoplasmen weist Chromogranin A (CgA), aber kein Synaptophysin auf, und auch der umgekehrte Fall trifft zu. Daher sollten Antisynaptophysin und Antichromogranin als komplementäre Reagenzien betrachtet werden (125). Synaptophysin kann bei DIPNECH, Karzinoiden, meist bei SCLC, detektiert werden.

1.4.2 Chromogranin A

Granine gehören zur Gruppe der sauren Proteine, die einen Hauptbestandteil der sekretorischen Granula verschiedener endokriner und neuroendokriner Zellen bilden, die sowohl Bestandteil der klassischen endokrinen Drüsen als auch des diffusen neuroendokrinen Systems sind. Diese Zellen sind eine potenzielle Quelle

für die Umwandlung in neuroendokrine Tumore. Die Familie besteht aus acht Graninproteinen: Chromogranin A, B, C (Sekretogranin II), Sekretogranin III, IV, V, VI und VEGF. Granine spielen möglicherweise eine wesentliche Rolle bei der Bildung, Reifung und Exozytose von sekretorischen Vesikeln, die biologisch aktive Neuropeptide, Neurotransmitter und Hormone enthalten. Ihre molekulare Struktur ist durch eine Reihe von charakteristischen Stellen gekennzeichnet, die für die proteolytische Aktivität von Enzymen anfällig sind, was zur Bildung einer Reihe von biologisch aktiven Peptiden führt. Vermutlich dienen sie als Vorläufer aktiver Proteine (126). Chromogranin A (CgA) war der erste identifizierte Vertreter der Granine und hat seinen Namen von dem Ort, an dem es primär nachgewiesen wurde (chromaffine Vesikel des Nebennierenmarks, die Katecholamine enthalten) (127, 128). Es wird von dem Gen CgA kodiert, das auf Chromosom 14 lokalisiert ist. Die Expression von Chromogranin korreliert mit der Menge der sekretorischen Vesikel in neuroendokrinen Zellen. Die Peptidkette wird durch biochemische Veränderungen zu einem Vorläufer biologisch aktiver Proteine mit einem breiten Aktivitätsspektrum. Aus der 439-Aminosäuren-Kette von Chromogranin A entstehen eine Reihe von Peptiden (126): Vasostatin I - mit antiadrenerger Wirkung (129), Parastatin - hemmt die Sekretion von Parathormon als Reaktion auf einen niedrigen Kalziumspiegel (130), Pankreastatin - zeigt eine starke hemmende Wirkung auf die Insulinsekretion, die durch eine Erhöhung der Glukosekonzentration im Blut ausgelöst wird (131), Catestatin - hemmt die Sekretion von Katecholaminen aus den chromaffinen Zellen (132). Über die anderen Produkte der Chromogranin-A-Proteolyse (Vasostatin II, Chromostatin, GE-25, EC-14) ist bisher nur wenig bekannt, und ihre biologische Wirkung ist nicht gesichert (133). Interessanterweise scheint die Proteolyse von Chromogranin organspezifisch zu sein. So fehlt beispielsweise das in den α -Zellen der Bauchspeicheldrüse vorkommende Pankreastatin in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks (134). CgA wird von einer Reihe von neuroendokrinen Tumoren gebildet und abgesondert. Das Phäochromozytom, das medulläre Schilddrüsenkarzinom, parathyreoidale Adenome, gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumore (GEP-NETs) und pulmonale neuroendokrine Tumoren einschließlich SCLC gehören zu CgA-absondernden Tumoren (126).

1.4.3 CD56

CD56 ist ein neurales Zelladhäsionsmolekül (NCAM) und Mitglied einer Immunglobulin-Superfamilie. Je nach Zelltyp und Umgebung können aus einem einzigen Gen durch alternatives Spleißen drei Hauptisoformen gebildet werden. Aufgrund ihres scheinbaren Molekulargewichts werden sie als NCAM-120, NCAM-140 und NCAM-180 bezeichnet (135). Während NCAM-140 und NCAM-180 Transmembranproteine sind, ist NCAM-120 Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankert und besitzt keine intrazellulären Reste (136). Die höchsten CD56-Konzentrationen finden sich im zentralen und peripheren Nervensystem, wo es eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der intrazellulären Signaltransduktion und der Stabilisierung synaptischer Kontakte spielt (137). Neben der physiologischen Expression im hämatopoetischen System und im Knochenmark finden sich auch abnorme Expressionen bei hämatologischen Malignomen sowie bei soliden Tumoren wie z.B. Lungenkrebs, Eierstockkrebs und Neuroblastomen (137-141). Vor der breiten Verwendung von INSM1 als NE-Marker in der Thoraxpathologie wurde CD56 neben Chromogranin A und Synaptophysin traditionell angewandt, da sich CD56 als besonders sensitiv für neuroendokrine Lungentumore bewiesen hat. Aufgrund der geringen Spezifität ist CD56 jedoch nicht als NE-Marker bei nicht-pulmonalen Tumoren empfohlen. Letztendlich sollte CD56 mit Vorsicht verwendet werden, gerade wenn es isoliert positiv ist, da es auch von einer Reihe von nicht-NE-Neoplasmen und exprimiert werden kann (44, 46, 104). Auch natürliche Killerzellen sind je nach Subtyp und Tumorumgebung mit variabler Intensität durch CD56 anfärbbar (142).

1.4.4 TTF-1

TTF-1, auch thyroider Transkriptionsfaktor 1, ist ein Master-Transkriptionsfaktor der Lungen-Morphogenese und der Differenzierung von Lungenepithelzellen (143, 144). In der Lungenpathologie wird TTF-1 bei abwesender neuroendokriner Morphologie und damit Verdacht auf Lungen-Adenokarzinome angefärbt, zusammen mit p40, um vom Plattenepithelkarzinom zu unterscheiden (46). In 75-80% der Adenokarzinome wird TTF-1 exprimiert (145). TTF-1 ist bei der Mehrheit der SCLC (ca. 80%) positiv, geht dann allerdings mit einer hohen NE-Marker-Expression einher. Bei SCLC mit geringer oder abwesender Expression

klassischer NE-Marker (15-20% der SCLC) ist TTF-1 meist auch negativ. Somit kann auch TTF-1 in diesen seltenen Fällen die Diagnose nicht sichern, vielmehr muss die Tumor-Entitätssuche dann durch ein Ausschlussverfahren anderer Tumorentitäten stattfinden. Insgesamt sollte bei einem TTF-1-diffusen/Napsin A-negativen (oder schwachen) Profil an ein neuroendokrines Karzinom (kleinzellig oder großzellig) gedacht werden, da die meisten Adenokarzinome mit starker TTF-1-Expression auch stark positiv für Napsin A sind (44). DIPNECH sind positiv für TTF-1. Periphere Karzinoide ebenso, bei zentralen Karzinoiden ist die Färbung jedoch häufig negativ. Karzinoide aus dem Gastrointestinaltrakt sind normalerweise negativ für TTF-1 (146).

1.4.5 Ki-67

Ki-67 wurde erstmals als Antigen in Zellkernen von Hodgkin-Lymphomen identifiziert: in zyklischen Zellen wird es stark exprimiert während es in ruhenden G₀-Zellen stark herunterreguliert ist (147). Es ist ein zellzyklusreguliertes Protein, das von Zellen in der Interphase und solchen die eine Mitose durchlaufen, exprimiert wird und als eine Art Surfactant fungiert, um eine Chromosomenaggregation während der Mitose und Meiose zu verhindern (148-151). In einer Untersuchung von Mrouj et al. (152) mit verschiedenen menschlichen und murinen Krebszelltypen konnte eine krebsfördernde Rolle von Ki-67 nachgewiesen werden. Während Ki-67 zwar für die Proliferation von Krebszellen in vitro oder in vivo in keinem der getesteten Zelltypen dringend erforderlich war, beeinflusste seine Expression jedoch entscheidend alle Schritte der Tumorentstehung. Bei Ki-67-Knockout-Zellen waren die Tumorzellen unfähig, andere Gewebe zu kolonisieren und Metastasen zu bilden, hatten eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Medikamenten sowie eine eingeschränkte Interaktion mit dem Immunsystem. Diese Phänotypen korrelierten mit Veränderungen der Genexpression in Bereichen wie EMT (epithelial-mesenchymale Transition), Antigenpräsentation, Medikamentenmetabolismus und weiteren krebsassoziierten Merkmalen. Es gibt Hinweise darauf, dass Ki-67 generelle Chromatin-Zustände reguliert, die sich auf die Genexpression in grundlegenden biologischen Prozessen auswirken. Somit wirkt Ki-67 nicht über einen einzelnen Mechanismus, sondern vermutlich durch Koordination multipler Transkriptionsprogramme. Diese

These wird von Mrouj et al. als plausible Erklärung für die allgegenwärtige Expression von Ki-67 in fast allen Krebsarten angeführt.

Der Ki-67-Index ist nützlich, um Karzinoide von hochgradigen Tumoren abzugrenzen, einschließlich SCLC und LCNEC in Biopsien mit ausgedehnten Crush-Artefakten (153). Ein weiterer Nutzen abseits der Differentialdiagnostik wurde für Ki-67 in der NEN-Klassifizierung der WHO 2021 nicht anerkannt, da es keine validierten Regeln für die Bewertung von Lungentumoren gab, die Literatur über den prognostischen Nutzen von Ki-67 widersprüchlich war und es keine reproduzierbaren Grenzwerte für TC versus AC und Karzinoide versus LCNEC und SCLC gab (36). In der NEN-Klassifizierung der WHO 2021 wird Ki-67 als wünschenswertes Kriterium geführt, dessen Aufnahme in den pathologischen Befund sinnvoll sein kann (36). Bei der pathologischen Begutachtung von neuroendokrinen Tumoren kann Ki-67 bei Einschätzung der mitotischen Aktivität und damit auch der Aggressivität des Tumors unterstützen. Dies findet beispielsweise bei der Bewertung eines metastasierten Karzinoid-Präparats Anwendung: da medizinische Onkolog*innen an die Verwendung des Ki-67-Indexes zur Stratifizierung der therapeutischen Optionen bei fortschreitenden NEN des Verdauungstrakts und der Bauchspeicheldrüse gewöhnt sind, kann die Angabe des Ki-67 bei der Therapieentscheidung unterstützend wirken (36). Bei den pulmonalen Karzinoiden könnte Ki-67 in Kombination mit OPT und CD44 zur Einschätzung der Rezidivwahrscheinlichkeit genutzt werden. Patient*innen mit einem sehr geringen Rezidiv-Risiko könnten eine reduzierte Nachsorge bekommen (95). Derzeit veröffentlichte Daten berichten über durchschnittliche Ki-67-Werte im Allgemeinen unter 5% für TC und zwischen 9% und 18% für AC, wobei seltene Karzinoid-Fälle diese Werte überschreiten (37, 154). In den seltenen Fällen, in denen der Ki-Index eines metastasierten Karzinoids die Standardkriterien überschreitet, kann es zu Problemen der differentialdiagnostischen Unterscheidung zu hochgradigen LCNEC und damit auch zu schwierigen therapeutischen Entscheidungsfindungen kommen (155). Ein Ki-67-Index von mehr als 30 % ist in der Regel ein Anzeichen für ein hochgradiges LCNEC oder SCLC (155-159).

Bisher wurde der Proliferationsindex unterschiedlich bestimmt. Im klinischen Alltag wird der Anteil der positiven Zellen von Untersucher*innen geschätzt. Somit waren

die Werte nicht exakt und schlecht Untersucher*innen - unabhängig vergleichbar. Einen Ansatz zur Berechnung des Index definierten Fulawka et al. (160):

Die Proliferationsaktivität wird als das Verhältnis der Ki-67-positiven Zellen (angegeben als Prozentsatz) bestimmt, allgemein bekannt als Proliferationsindex (PI) (160). Wie unten (Formel 1) ersichtlich wird der PI berechnet aus der Anzahl der Ki-67-positiven Zellkerne dividiert durch die Gesamtzahl der Kerne im definierten Bereich.

$$PI = \frac{N_{Ki-67(positiv)}}{N_{Ki-67(positiv)} + N_{Ki-67(negativ)}} \times 100\%$$

Formel 1: Formel zur Berechnung des Ki-67 PI, Formel adaptiert von Fulawka et al. (160)

1.4.6 ASCL1

ASCL1 steht für achaete-scutecomplex homologue 1. Andere Bezeichnungen für dieses Protein sind HASH1 oder MASH1. ASCL1 ist einer der häufigsten Transkriptionsfaktoren des SCLC (109, 111). Er spielt als ein proneuronaler Basic Helix-loop-helix Transkriptionsfaktor eine wichtige Rolle für das Zellschicksal bei der Neurogenese (161). 1997 wurde die Bedeutung von ASCL1 bei der NE-Differenzierung des fötalen Lungenepithels der Maus und beim humanen SCLC nachgewiesen (162). Die Expression von ASCL1 wird durch Notch-Signale reguliert (163, 164). Osada et al., Fujino et al. und Meder et al zeigten, dass durch ASCL-Gen-Transfektion in Adenokarzinomzellen eine neuroendokrine Differenzierung stattfindet (165-167). Neben der Induktion der neuroendokrinen Differenzierung durch das ASCL1-Gen könnte ASCL1 auch noch eine Rolle beim Wachstum, beim Zellüberleben, der Migration, dem epithelial-mesenchymalen Übergang und der Modulation von Tumor-auslösenden Zellen spielen (165, 168-175). In SCLC zeigen ASCL1 und DLL3 in mehreren Untersuchungen eine positive Korrelation (112). In der WHO-Klassifikation von 2021 wird ASCL1 als weiterer neuroendokriner Marker erwähnt, der Nutzen bei SCLC wird jedoch noch mit der Notwendigkeit von mehr Daten relativiert (146).

1.4.7 NEUROD1

NEUROD1 ist ein proneuraler Basic Helix-loop-Helix Transkriptionsfaktor welcher ektodermale Zellen in Neuronen umprogrammieren kann (176). Er ist zum Beispiel essentiell für die Differenzierung von enteroendokrinen Zellen im Darm (177). Unter Anderem findet diese Differenzierung durch die Unterdrückung alternativer Zellschicksale statt (178-180). NEUROD1 induziert den Zellzyklusarrest mitunter durch eine erhöhte Expression von p21 (einem Inhibitor zyklin-abhängiger Kinasen) und durch die direkte oder indirekte Regulierung von ungefähr 3000 Genen (181, 182). Im Mausmodell führt ein Mangel an NeuroD1 zu einer verminderten Proliferation der Lungenepithelzellen, infolge zur reduzierten Bildung von Alveolarsepten und damit zu einer anhaltenden Vergrößerung der distalen Lufträume bei erhaltener epithelialer Differenzierung (183). Eine hohe Prävalenz von NEUROD1-dominanten Tumoren in kombinierten SCLC deutet laut Jimbo et al. darauf hin, dass NEUROD1 zur Entstehung kombinierter Tumoren beitragen könnte (184).

1.4.8 POU2F3

POU2F3 steht für POU class 2 homeobox 3, alternativ bekannt als SKN-1a/OCT-11. POU2F3 ist ein Transkriptionsfaktor, der für die Bildung eines seltenen chemosensorischen Zelltyps im Magen-Darm-Trakt und in den Atemwegen erforderlich ist (185-188). Diese Zellen sind in der englischen Literatur unter verschiedenen Namen bekannt: tuft, brush, caveolated, multivesicular oder microvillous – der Einfachheit halber werden sie aber meist unter dem Begriff „Bürstenzellen“ engl. „tuft cells“ beschrieben (110). Bürstenzellen reagieren wie neuroendokrine Zellen auf äußere Reize indem sie bioaktive Substanzen freisetzen um lokale Epithel- und Immunzellfunktionen zu regulieren (189, 190). Doch trotz ihrer ähnlichen Funktionen und anatomischen Lage unterscheiden sich die Bürstenzellen von der neuroendokrinen Zelllinie (191). POU2F3 aktiviert Enhancer in der Nähe der Bürstenzellmarker-Gene, wie z.B. GFI1B, CHAT, ASCL2 und AVIL. Dies deutet darauf hin, dass POU2F3 eine Reihe von Enhancern aktiviert um die Expression von Genen der Bürstenzelllinie bei einer Variante des SCLCs zu fördern (110). Diese Variante wird als neuroendocrine-low gehandelt, da bei SCLC-Tumoren und -Zelllinien mit hohem POU2F3 Gehalt die

Expression klassischer Marker der neuroendokrinen Zelllinien fehlt und stattdessen Bürstenzellmarker exprimiert werden (110).

1.4.9 INSM1

INSM1 wurde erstmals 1992 bei der Erstellung einer genetischen Subtraktionsbibliothek zur Bestimmung von Insulinom- und/oder Typ-1-Diabetes assoziierten Genen beschrieben. INSM1, war das erste dort beschriebene Gen, zuerst noch als IA-1 bezeichnet und später in der GenBank Datenbank in INSM1 umbenannt (192). Physiologisch im menschlichen Körper ist INSM1 ein Protein, das als Transkriptionsfaktor eine zentrale Rolle bei der Differenzierung embryonaler neuroendokriner Zellen spielt. INSM1-Transkripte konnten in In-Situ-Hybridisierungsstudien in verschiedenen Hirnregionen sowie in endokrinen Organen wie der Bauchspeicheldrüse, der Nebenniere, dem Thymus, der Schilddrüse und den endokrinen Zellen des Gastrointestinaltrakts nachgewiesen werden (193). INSM1 wird in neuronalen Vorläuferzellen und entstehenden Neuronen vorübergehend exprimiert, verschwindet jedoch bei gereiften Neuronen und somit auch generell im Erwachsenenalter weitestgehend (194, 195). In der Lunge kann INSM1 als Biomarker für neuroendokrine Tumoren angefärbt und zur pathologischen Diagnose verwendet werden (108, 196, 197). Besonders für SCLCs hat sich INSM1 als ein zuverlässiger Marker mit hoher Spezifität und Sensitivität ohne statistisch signifikanten Unterschied zu Synaptophysin, Chromogranin A und CD56 etabliert(198). Zudem vermag INSM1 die diagnostische Lücke bei NE-Marker-negativen SCLC zu verkleinern: in einer Untersuchung von 141 chirurgisch resezierten NE-Lungentumoren durch Sakakibara et al zeigten neun von zwölf NE-Marker (Chromogranin A, Synaptophysin, CD56)-negativen SCLC eine Expression von INSM1. In der gleichen Untersuchung hatten die klinischen Verläufe der SCLC mit niedriger INSM1-Expression eine signifikant bessere Prognose als solche mit hoher INSM1-Expression- womit INSM1 auch als Tool zur Prognoseeinschätzung genutzt werden könnte (106). In einer Untersuchung von 116 Lungenbiopsien im Tangshan Gongren Hospital in China wies INSM1 die statistisch signifikant gleiche Sensitivität wie Synaptophysin und CD56 auf und war sensitiver als Chromogranin A (198).

1.4.10 DLL3

DLL3 gehört mit DLL1 und DLL4 zur Familie der delta-ähnlichen Liganden. Diese ist eine von zwei Ligandenfamilien zu den 4 NOTCH-Familien (NOTCH1 bis NOTCH4) bei Säugetieren, die zweite ist die Jagged-Familie (JAG1 und JAG2). Der NOTCH-Signalweg steuert viele grundlegende Prozesse der normalen Entwicklung: zum Beispiel die Kontrolle der Zelldifferenzierung, des Zellüberlebens, der Proliferation und der Angiogenese (199). Je nach zellulärem Kontext spielt die NOTCH-Signalübertragung eine onkogene oder tumorsuppressive Rolle in der Tumorentstehung (200, 201). DLL3 ist ein Ligand der die Notch-Signalübertragung hemmt (202). Hierbei bindet DLL3 nicht an NOTCH sondern inaktiviert die NOTCH-Signalübertragung in cis (202). Aufgrund dieser Inaktivierung und die Verhinderung der Lokalisierung von NOTCH1 oder DLL1 auf die Zelloberfläche durch intrazelluläre Retention wird DLL3 als zellautonomer Inhibitor der Notch-Signalübertragung angesehen (203, 204). DLL3 ist auch einer von mehreren NOTCH-Liganden die eine direkt nachgeschaltetes Ziel von ASCL1 sind: Einem Transkriptionsfaktor, der mit der Entwicklung von neuroendokrinen Lungenzellen in Verbindung gebracht wird (205-208). In physiologischem Mengen ist DLL3 intrazellulär am Golgi-Apparat lokalisiert, signifikante Mengen von DLL3 an der Zelloberfläche sind nur bei starker Überexpression nachweisbar (209). So zum Beispiel an der Zelloberfläche von NECs der Lunge. 80% der SCLC (210), etwa 75% der LCNEC (211) und 80% der extrapulmonalen neuroendokrinen Karzinome (epNEC) (212) sind DLL3-positiv. Aufgrund dieser Häufigkeit wird DLL3 als Ziel für neue Therapieansätze untersucht. Derzeit wird eine Therapiestudie mit gegen DLL3 gerichteten T-Zell-Engager (T-Cell Engager-TCE) durchgeführt. Der Antikörper Obrixtamig ist ein IgG-ähnlicher TCE, der einerseits an DLL3 auf Tumorzellen und andererseits an CD3 von T-Zellen bindet. Somit werden T-Zellen in der Mikroumgebung aktiviert, was zu einer DLL3-anhängigen Zytolyse von Tumorzellen führen soll. Die Phase-I-Studie zur Dosisescalation von Obrixtamig bei Erwachsenen mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem DLL3 positivem SCLC, epNEC oder LCNEC-L wurde rezent im Juli 2025 veröffentlicht (213).

1.4.11 YAP1

YAP1 wurde ursprünglich als ein Protein identifiziert, das mit der non-Rezeptor-Kinase c-Yes interagiert (214). Heute wird es als nukleärer Effektor des Hippo-Signalwegs betrachtet, welcher das Zellwachstum als Co-Aktivator in der Transkription fördert (215). Somit ist YAP1 durch Modulation von Zellproliferation und Apoptose ein wesentlicher Regulator der Organgröße und des Tumorwachstums (216). Es gibt mehrere Hinweise, dass die YAP1-Expression zur Vorhersage von Tumor-Progression oder Therapieansprechen hergenommen werden könnte (217). Beispielsweise wird die Expression von YAP1 mit einer erhöhten Chemo-Resistenz bei Eierstock- und NSCLC-Tumoren in Verbindung gebracht (217, 218). Bei einer YAP1 Knockdown-Therapie beschrieben Cheng H. et al eine Zunahme der Sensitivität von NSCLC für Therapien mit Cisplatin, Strahlentherapie und Erlotinib (217). Unter nicht-proliferativen Bedingungen liegt YAP1 phosphoryliert im Cytoplasma, während es nach Aktivierung im Zellkern akkumuliert und dann mit Transkriptionsfaktoren assoziiert, um die Expression von Genen für Zell-Proliferation zu fördern (216, 217, 219, 220).

Die Bedeutung der YAP1-Expression war die letzten Jahre viel Thema in der SCLC-Forschung. Anfangs als eigener SCLC-Subtyp gehandelt, wurde nun davon Abstand genommen und an dessen Stelle der quadrupel-negative SCLC (SCLC-QN) Subtyp gesetzt (221). Derzeit wird YAP1 als Prognosemarker untersucht. Go et al konstatieren YAP1 als einen positiven prognostischen Marker. Die YAP1-positive Gruppe zeigte in der LD(limited disease)-Untergruppe ein verbessertes progressionsfreies Überleben (PFS) sowie Gesamtüberleben (OS) und in der ED(extensive disease)-Untergruppe ein verbessertes Gesamtüberleben (113).

2 Material und Methoden

Bei dieser Diplomarbeit handelt es sich um eine narrative Auswertung der vorhandenen Literatur. Um den aktuellen Wissensstand bezüglich des Ki-67-Index, mit Fokus auf die neuroendokrine Lungentumore, zu erfassen wurde im Zeitraum März-Juli 2025 eine umfassende Literaturrecherche mithilfe der medizinischen Datenbank Pubmed und der Google Scholar durchgeführt. Dabei wurden sowohl englische als auch deutsche Reviews, Fachjournale, Expert*innenmeinungen, Studien und Publikationen als Quellen herangezogen. Zur Verwaltung der recherchierten Literatur wurde das Programm EndNote 20 verwendet.

Ein Schwerpunkt wurde auf neuere Arbeiten gelegt, nach Möglichkeit ab dem Jahr 2021 (der letzten Aktualisierung der WHO-Klassifikation). Die Mehrheit der Studien stammt aus den USA und Europa, eine Arbeit aus China ist inkludiert, Daten aus Afrika, Südamerika und weitere Teile Asiens sind unzureichend berücksichtigt.

Die allgemeine Recherche erfolgte unter „neuroendocrine“, „lung“ und „lung cancer“. Während der Suche zu Ki-67 wurden der Mesh-Term „Antigen Ki-67[MeSH]“ und anschließend die Synonyme „Ki-67“, „Ki67“ und „MIB-1“ bzw. „MIB1“ verwendet. Für die Suche zur digitalen Bildanalyse wurde „DIA“, „digital pathology“ und „image analysis“ in den Such-String aufgenommen. Zum Thema Deep learning wurden „deep learning“, „artificial intelligence“ und „convolutional neural networks“ ausgewählt.

3 Die Bedeutung von Ki-67 in der Diagnostik von neuroendokrinen Lungentumoren

3.1 Hintergrund und Zielsetzung

Die Einstufung neuroendokriner Neoplasien (NEN) der Lunge erfolgt nach den Kriterien der Weltgesundheitsorganisation (WHO) aus dem Jahr 2021. Grundlage dieser Klassifikation sind die Mitosezahl pro 2 mm², das Vorhandensein von Nekrosen sowie bestimmte zytologische und immunhistochemische Merkmale.

Dementsprechend zählen das typische und das atypische Karzinoid zu den niedrig- bis mittelgradigen neuroendokrinen Tumoren (NETs), während das großzellige neuroendokrine Karzinom (LCNEC) und das kleinzellige Lungenkarzinom (SCLC) als hochgradige neuroendokrine Karzinome (NECs) eingestuft werden.

Bei kleinvolumigen Untersuchungsmaterialien wie Biopsien oder zytologischen Präparaten werden teilweise unverbindliche Begriffe wie „Karzinoid-Tumor/NET, nicht näher spezifiziert (NOS)“ bzw. „metastasierendes Karzinoid, NOS“ verwendet. Diese Begriffe dienen der vorläufigen diagnostischen Einordnung, insbesondere wenn eine genauere Subtypisierung nicht möglich ist.

Das Ki-67-Antigen, ein etablierter Marker für die Zellproliferation wird diskutiert, hier genauere Informationen liefern zu können. Er wurde in die WHO-Klassifikation 2021 als optionales aber empfohlenes Kriterium aufgenommen. Es kann vor allem dabei helfen, NETs von hochgradigen NECs abzugrenzen und jene Tumoren zu identifizieren, die Merkmale beider Gruppen aufweisen – etwa eine erhöhte Mitosezahl von über 10 Mitosen pro 2 mm² und/oder einen Ki-67-Index von ≥ 30 %.

Die Rolle von Ki-67 in der Diagnostik und Klassifikation pulmonaler NEN wird weiterhin kontrovers debattiert. Während viele Expert*innen den Marker als wertvolles Hilfsmittel betrachten, gibt es auch kritische Stimmen, die vor einer Überbewertung warnen. Daher wird in der Fachliteratur regelmäßig über Nutzen und Grenzen des Ki-67-Index in der klinischen Praxis berichtet und debattiert.

In diesem Literaturreview sollen die aktuellen Empfehlungen, der aktuelle Stand der Forschung sowie Grenzen des Markers Ki-67 aufgezeigt werden. Da die

Verwendung von Ki-67 nicht explizit auf die Verwendung in der Lungenpathologie begrenzt ist, sollen hier auch Forschungsergebnisse aus anderen Organen mit einfließen.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Internationale Empfehlungen und Leitlinien

3.2.1.1 S3-Leitlinie

In der S3-Leitlinie zum Lungenkarzinom ist der Expert*innenkonsens, dass im Falle einer histologischen Begutachtung eines nicht kleinzelligen Karzinoms die histologische Typisierung anhand der von der WHO-Klassifikation empfohlenen Strategie vorgenommen werden soll. Bei der histologischen Begutachtung eines neuroendokrinen Lungentumors (typisches Karzinoid, atypisches Karzinoid, kleinzelliges Karzinom, großzelliges, neuroendokrines Karzinom) soll die Diagnose immunhistochemisch bestätigt und die Proliferationsfraktion des Tumorgewebes immunhistochemisch bestimmt werden. Außerdem ist zur Absicherung der Diagnose – beispielsweise zur Differenzierung zwischen durch Artefakte veränderten Infiltraten eines typischen Karzinoids und einem kleinzelligen Karzinom – bei sämtlichen neuroendokrinen Tumoren die Zellproliferationsrate des Tumorgewebes mittels immunhistochemischer Marker (z. B. Ki-67, MIB-1) zu erfassen und im Befundbericht explizit anzugeben (222).

3.2.1.2 ENETS-Guideline

In dem ENETS Expert*innenkonsens (33) zu pulmonalen Karzinoiden von 2015 wurde Ki-67 als Hilfe zur Unterscheidung von pulmonalen Karzinoiden von hochgradigen NETs in crushed biopsies genannt. Alleinig mit der Ki-67 Expression könne jedoch nicht zuverlässig sowohl zwischen TC und AC als auch zwischen SCLC und LCNEC unterschieden werden. Ki-67 könne eine Rolle bei der Vorhersage der Prognose bei resezierten PC-Proben spielen; es wurden damals jedoch mehr Daten gefordert, um den Nutzen bei Lungen-NETs zu bestimmen. Es wurden auch die GI-NETs erwähnt, bei denen der Ki-67-Markierungsindex bereits ein integraler Bestandteil des aktuellen Einstufungssystems darstellte.

Ein Konsens hinsichtlich der optimalen Methoden zur Bewertung des Ki-67-Markierungsindex (digitale Bildanalyse, manuelle Zählung, Schätzung durch Eyeballing) stand noch aus, auch wenn einige Studien auf eine manuelle Zählung von mindestens 2000 Zellen in histologischen Hotspot-Feldern als genaueste Methode hinwiesen. In Untersuchungen von Rindi et al. und Warth et al. wurde damals schon eine hohe Gesamtübereinstimmung zwischen der manuellen Bewertung des Ki-67-Markierungsindex und einer automatisierten Auswertung auf gescannten Objektträgern bezüglich die Reproduzierbarkeit gefunden (157, 223). Der Ki-67-Index soll neben Mitosezahl und Nekrose in den Pathologieberichten chirurgischer oder Biopsieproben angegeben werden. Grund seien mögliche studienübergreifende Vergleiche und die Prognoseabschätzung durch Ki-67 und Mitosezahl innerhalb AC.

Empfehlungen zu vier zentralen Fragestellungen zum Ki-67-Index wurden wie folgt formuliert:

1. Ki-67 ist in der Biopsie hilfreich um TC und AC von SCLC zu unterscheiden (Evidenzgrad 4; Empfehlungsgrad 4)
2. Ki-67 ermöglicht keine zuverlässige Unterscheidung zwischen TC und AC – unabhängig vom verwendeten Material (Biopsie oder chirurgisch) (Evidenzgrad 4; Empfehlungsgrad C)
3. Ki-67 kann zur Prognoseabschätzung beitragen (Evidenzgrad 4; Empfehlungsgrad C)
4. Das optimale Verfahren für die Durchführung der Ki-67 Immunhistochemie und die Kriterien für die Bildung des relevanten Markierungsindex (igitale Bildanalyse, manuelle Zählung, Eyeball-Auswertung, Hotspot-Bereiche gegen randomly selected field gegen entire tumor area und Anzahl der Zellen) müssen noch geklärt werden (Evidenzgrad 4/5; Empfehlungsgrad C) (33)

3.2.1.3 NANETS Guideline

Die NANETS Guideline (224) orientiert sich größtenteils an der ENETS-Guideline, so auch in der Guideline beschrieben. Die NANETS-Erklärung wurde aktualisiert, um neuen Standards für die Klassifizierung Rechnung zu tragen und die Empfehlungen für die Stadieneinteilung zu präzisieren.

Der Vergleich von LNETs und GEP NETs wurde mit der Begründung mangelnder Vergleichbarkeit in der NANETS Guideline ausgelassen.

In der Probengewinnung zur Unterscheidung von TC und AC wurde in der NANETS Guideline neben dem empfohlenen chirurgischen Präparat auch eine endobronchiale Biopsie als potentiell ausreichend beschrieben.

Die Routinebestimmung von Chromogranin A im Plasma wurde in ihrer Bedeutung herabgesetzt und mit geringem klinischen Nutzen in der Diagnostik von LNETS beschrieben.

Bezüglich Ki-67 wurde keine Änderung in der derzeitigen klinischen Praxis empfohlen. Als Begründung wurde die unzureichende Beweislage als Prognosemarker bei multivarianten Analysen und der fehlende genaue Cutoff-Wert für die Unterscheidung von TC zu AC genannt.

3.2.1.4 WHO Klassifikation

Karzinoid NOS (Not otherwise specified)

Der Begriff “carcinoid tumour / NET NOS“ soll in drei Fällen verwendet werden, in denen die Unterscheidung zwischen TC und AC nicht möglich oder sinnvoll ist. Anstatt sich auf eine Entität festzulegen soll in diesen Fällen die Mitosezahl, das Vorhandensein von Nekrosen und (wenn bestimmt) der Ki-67-Index angegeben werden (155). Der erste Fall sind kleine Proben wie small biopsies oder Zytologie: hier ist wenig Material zur Prüfung zur Verfügung und die Qualität der Probe kann unzureichend für genaue Diagnostik sein. Der zweite Anwendungsfall sind Metastasen von Karzinoiden: Die diagnostischen Kriterien für TC und AC wurden für chirurgisch resezierte Präparate aus der Lunge festgelegt. Die Übertragung auf Metastasen soll nicht erfolgen. Die Behandlung der Metastasen erfolgt durch klinische Onkolog*innen, welche den Ki-67-Index aufgrund der gängigen Praxis in GI-NETs meist in ihre therapeutischen Entscheidungen einbeziehen. Im dritten Fall gibt es Situationen in denen nur einzelne repräsentative Schnitte des Tumors den Patholog*innen vorliegen. Anstatt des ganzen Tumors können also nur einzelne Schnitte interpretiert werden. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass eine erhöhte Mitosezahl oder Nekrosen auf den nicht eingesehenen Tumorschnitten vorhanden sind, ist die Festlegung auf eine endgültige Diagnose – entweder TC oder AC – nicht sinnvoll (93).

In der WHO-Klassifikation von 2021 wird der Hauptnutzen von Ki-67 zur Unterscheidung von Karzinoiden von LCNEC und SCLC benannt. Insbesondere bei kleinen Biopsien (small biopsies) mit Quetschungsartefakten (crush artifacts), bei denen Karzinoide fälschlicherweise für SCLC gehalten werden können.

Obwohl der Ki-67-Index bei chirurgisch resezierten NEN der Lunge im Allgemeinen mit der Prognose korreliert, empfanden die Autor*innen der WHO-Klassifikation bis dato vorliegende Daten als nicht ausreichend, um Ki-67 eine größere Bedeutung in der Klassifikation beizumessen. Folgende drei Gründe wurden gegen die Etablierung des Markers in ähnlicher Form wie bei den GI-NENs genannt:

1. Zusätzlich zu den sehr unterschiedlichen Methoden für die Färbung und Interpretation von Ki-67 in den veröffentlichten Studien wurde kein gleichbleibender Schwellenwert für den Ki-67-Proliferationsindex gefunden, um TC (G1 NET) von AC (G2 NET) zu unterscheiden.

2. Es gibt sowohl Studien für den prognostischen Nutzen von Ki-67 bei der Einstufung von Lungenkarzinoiden (157, 225), als auch solche, die aussagen, dass Ki-67 kein besserer Prognosemarker ist als die Mitosezahl (156, 226, 227).

3. Es war schwierig, definitive Cut-off-Punkte für den Ki-67-Proliferationsindex festzulegen, um TC von AC und Karzinoide von SCLC oder LCNEC zu unterscheiden, da die veröffentlichten Daten keine einheitlichen Ergebnisse zeigen. Bei Karzinoiden reichen die Cut-off-Punkte von 2,3 % bis 4,15 % für TC und 9 % bis 17,8 % für AC (156, 157). Auch für die Abgrenzung der Karzinoide von SCLC oder LCNEC liegen die veröffentlichten Cut-off-Punkte weit auseinander und reichen von 2,5 % bis 30 % (156).

Die damals vorliegenden Daten ließen keine endgültigen Grenzwerte zu. Daher wurde basierend auf Expert*innenmeinungen beschlossen, dass Tumore mit einem Ki-67-Proliferationsindex $> 5\%$ eher AC sind als TC und solche mit einem Index $> 30\%$ eher hochgradig (LNEC oder SCLC) als AC (Abbildung 4).

Basierend auf Studien von Rekhtman und Pelosi et al könne der Ki-67-Index bei Metastasen diese Werte jedoch auch überschreiten (155, 158).

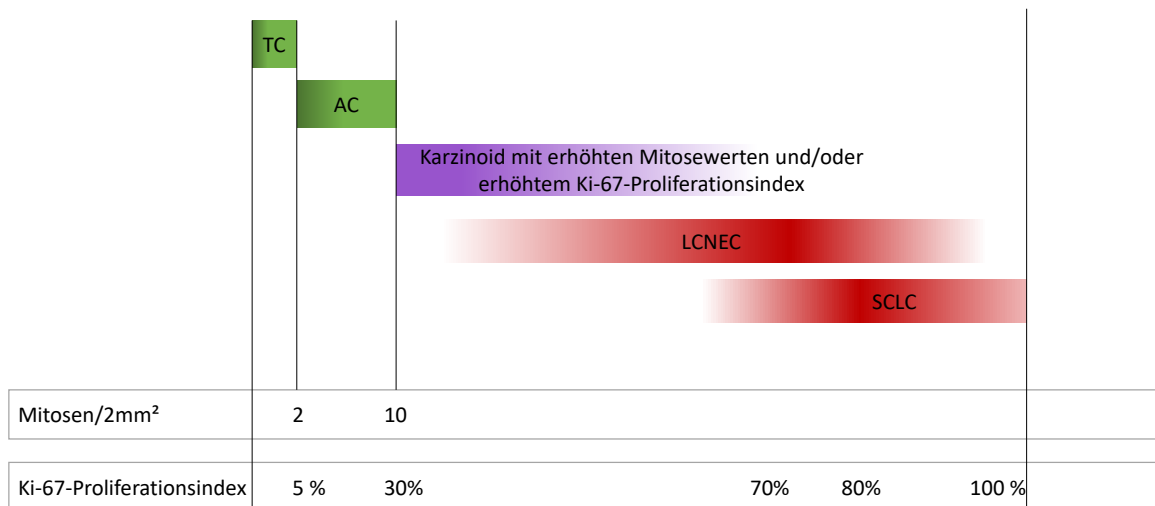


Abbildung 5: Cutoff-Werte der WHO von Mitosezahl und Ki-67 PI der NE Tumoren der Lunge

Obwohl der Ki-67-Wert bei NEN in der Lunge nützlich sein kann und es als wünschenswert benannt wurde, dies in Berichten zu dokumentieren, beließ man das primäre diagnostische Kriterium für die Unterscheidung dieser Tumoren als die Mitosezahl pro 2 mm².

Definitivere Cut-off-Punkte sollten in künftigen Studien weiter validiert werden.

Die Studienlage war zum damaligen Zeitpunkt heterogen – einige nur mit Karzinoiden (225, 228, 229), einige das gesamte Spektrum neuroendokriner Lungentumore einschließend – und mit verschiedenen Vorschlägen wie der Ki-67-Proliferationsindex und die Mitosezahl interpretiert und angewandt werden sollen. Letztendlich gab es keinen Konsens über den einen optimalen Ansatz (33, 156, 157, 230).

Ki-67 hat sich bei metastasierenden Karzinoiden der Lunge als nützlich erwiesen, um diese Tumore von SCLC oder LCNEC zu unterscheiden (155). Für die Unterscheidung zwischen TC und AC in metastasierten Arealen wird der Ki-67-Index jedoch nicht empfohlen, da diese Kriterien nur bei Resektionspräparaten festgelegt wurden.

Bei Metastasen wird die Bezeichnung „metastasierendes Karzinoid NOS“ empfohlen, wobei die Hauptmerkmale Mitosen pro 2 mm², Nekrose und Ki-67-

Proliferationsindex angegeben werden (155). In diesem Zusammenhang sind weitere Untersuchungen erforderlich, bevor Ki-67 in die Klassifizierung von resezierten Lungen-NETS aufgenommen werden kann.

Die Existenz von Lungen-NETS mit morphologischen Merkmalen von AC, aber höherer Mitosezahl (> 10 Mitosen/ 2 mm^2) als in den derzeit definierten WHO-Kriterien von 2015 und/oder mit Ki-67-Proliferationsindexwerten, die höher sind, als zu erwarten wäre ($> 30 \%$), wurde dokumentiert (229) und in der aktuellen WHO-Klassifikation anerkannt.

Solche Tumoren seien an Primärstandorten sehr selten, aber im metastasierten Stadium nicht ungewöhnlich. Diese Tumoren wurden in der WHO-Klassifikation von 1999 anerkannt, aber mangels ausreichender Daten aufgrund der Seltenheit der Tumorentität wurde damals vorgeschlagen, sie als LCNEC zu bezeichnen (231).

3.2.1.5 Empfohlene Technik der Mitosenzählung (WHO)

Mitosen sollten in Bereichen mit der höchsten mitotischen Aktivität sowie in Arealen gezählt werden, in denen das gesamte mikroskopische Sichtfeld ausschließlich aus Tumorzellen besteht und nicht aus fibrotischem oder entzündlichem Stroma oder Nekrose. Bei Tumoren mit Mitosezahlen nahe dem Schwellenwert von 2 bzw. 10 Mitosen pro 2 mm^2 sollte der Mittelwert aus mindestens drei Zählfeldern mit je 2 mm^2 angegeben werden, anstatt den höchsten Einzelwert zu berichten – auch wenn dieser aus einem Hotspot stammt. Merkmale, die eher auf eine mitotische Figur als auf eine pyknotische Zelle hinweisen, umfassen das Fehlen einer Kernmembran, das Fehlen einer zentralen Aufhellung, das Vorhandensein faseriger statt dreieckiger oder stacheliger Fortsätze sowie eine basophile statt einer eosinophilen Färbung des umgebenden Zytoplasmas. Es sollten ausschließlich eindeutig identifizierbare Mitosen gezählt werden; fragliche Mitosen sind auszuschließen. Die Mitosezahl sowie das Vorhandensein oder Fehlen von Nekrosen sind im pathologischen Befund zu dokumentieren (146).

Die Mitosezählung erfordert mehr Können als die Identifikation von angefärbten Ki-67-positiven Zellkernen. In der Literatur sind die Unterschiede in der Identifikation bei Patholog*innen gut dokumentiert. Die Erkennung der

Mitosefiguren kann durch Training verbessert werden, weitere Hilfen können der Vergleich mit einer schwächeren Färbung und Phosphohiston-H3-Immunhistochemie sein (232). Die Mitosezählung mittels digitaler Bildanalyse in der digitalen Pathologie ist in der einfachen Form nicht möglich.

3.2.2 Ki-67 bei NEN der Lunge

Im Jahr 2004 veröffentlichten Prof. Rosai und Giuseppe Pelosi als Erstautor*innen eine Fallserie von sieben präoperativen fiberoptischen bronchoskopischen Karzinoid-Biopsien, die ursprünglich als SCLC fehldiagnostiziert worden waren (153). Diese nicht übereinstimmenden Biopsiediagnosen wurden aus allen chirurgisch resezierten Karzinoiden ausgewählt, die über einen Zeitraum von 12 Jahren am Europäischen Institut für Onkologie (Mailand, Italien) diagnostiziert wurden oder aus den Konsultationsakten von Prof. Rosai entnommen. Darüber hinaus wurden Bronchialbiopsien von neun Patient*innen mit einer klinisch bestätigten SCLC-Diagnose als Kontrollgruppe für den histologischen und immunhistochemischen (IHC) Vergleich verwendet. Die Ausgangsidee war, dass sich das Ki-67-Antigen als ein bekannter Marker für die Zellproliferation in der neuroendokrinen Pathologie bei der Differenzialdiagnose zwischen Karzinoiden und SCLC als überlegen erweisen würde. Hier sollte es als Single-Shot-Marker im Vergleich zu anderen tumorbeschreibenden Merkmalen wie der anatomischen Lage oder anderen IHC-Markern verwendet werden. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die Tumorposition in der Lunge, histologische Merkmale und die Anfärbbarkeit für Cytokeratine, Chromogranin A, Synaptophysin und TTF1 zum Vergleich analysiert. Die mikroskopische Untersuchung von Karzinoid-Biopsien (aus zentralen oder peripheren Tumoren) zeigte in vier der sieben untersuchten Fälle bei 50 % oder mehr der Gewebefragmente umfangreiche Quetschungsartefakte. Die Erkennung von SCLC-markierenden Details wie Mitosezahl, Nekrosen und Kernverformung waren somit erschwert. Die IHC-Studie zeigte eine variable Expression epithelialer und neuroendokriner Marker. TTF-1 war der einzige, der bei SCLC erwartungsgemäß bei weitem überwiegt (46). Der Ki-67-PI betrug durchschnittlich 4,6 % bei Karzinoid-Biopsien und 10,6 % bei den gepaarten chirurgischen Proben (dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant), während er bei den neun untersuchten SCLC-Biopsien sogar 81,2 %

betrug. Der Nachweis von Ki-67 war in stark zertrümmerten Bereichen leicht zu erkennen, während dort die Feininspektion auf Zellgröße, Chromatinmuster, Nekrosen und mitotische Zahlen eine Herausforderung darstellte. Die Schlussfolgerung der Studie war, dass der Ki-67 PI sehr nützlich ist, um Karzinoide mit Crush-Artefakten von SCLC zu unterscheiden. In dieser Studie war der Ki-67 PI bei Karzinoiden gering bis mäßig (bis zu 20 %) und bei SCLC stark ausgeprägt (50 % oder mehr) (153).

Bei den verschiedenen Subtypen von NEN der Lunge, insbesondere bei Karzinoiden, sind jedoch statistisch signifikante Unterschiede bei den Ki-67 PI festzustellen (156). Die Herausforderung, die Ki-67-Proliferationsraten in diagnostische Kriterien einzubeziehen, ist größtenteils auf die Überschneidungen zwischen den NEN der Lunge zurückzuführen (TC vs. AC; AC vs. LCNEC; LCNEC vs. SCLC) (93, 156). Dies liegt größtenteils an den nichtlinearen Beziehungen zwischen dem Ki-67 PI und den wichtigsten histologischen Kriterien: Mitosen, Nekrosen und Zellgröße (156). Eine weitere Quelle der Inkonsistenz ist wahrscheinlich auf die Breite der für die Klassifizierung verwendeten diagnostischen Intervalle zurückzuführen, insbesondere bei AC (2-10 Mitosen pro 2 mm² oder punktförmige Nekrose) und NEC (über 10 Mitosen pro 2 mm² ohne Obergrenze, ausgeprägtere Nekrose und eine Konstellation von morphologischen Merkmalen der Tumorzellen und IHC-Befunden). Aus diesen Gründen gibt es bisher keine einheitlichen Schwellenwerte zur Unterscheidung von TC (G1 NET) gegenüber AC (G2 NET) oder LCNEC gegenüber SCLC.

Die Beobachter*innenvariabilität bei der Bewertung des Ki-67 PI, auch wenn sie sich auf die Bereiche mit der stärksten Färbung beschränken (methodisch durch Berücksichtigung der so genannten Hot Spots), und das Fehlen vereinbarter Standards bei den entsprechenden Quantifizierungen (interpretativ durch manuelle oder automatische Zählung) sind weitere Bedenken hinsichtlich der systematischen Verwendung des Ki-67 PI als Klassifizierungsmerkmal von NETs und NECs der Lunge (156, 233).

Die Beziehung zwischen dem numerischen Wert des Ki-67 PI (ausgedrückt als Mittelwert, Median oder kontinuierliche Variable) für die Prognose von Tumorsubtypen und seine fehlende konsistente Demonstration als unabhängiger Prädiktor in der multivariablen Analyse führen zu einer limitierten

Anwendungsmöglichkeit (227). Bisher war nicht erwiesen, dass Ki-67 die bestehenden diagnostischen histologischen Kriterien verbessert, die nach wie vor den Goldstandard und das Rückgrat für die WHO-Klassifikation darstellen. Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass ein Ki-67 PI von mehr als 5 % der Diagnose AC entspricht und ein Index von mehr als 30 % auf NECs (entweder LCNEC oder SCLC) hinweist (Tabelle 1). Es wurden Versuche unternommen, die histologischen Standardkriterien mit Ki-67 zu kombinieren, um die prognostischen Kategorien von NE-Tumoren zu verfeinern, aber die Beweise wurden nicht als ausreichend angesehen, um die derzeitigen Kriterien für die Unterscheidung dieser Tumoren zu ersetzen, die in erster Linie allein auf histologischen Merkmalen beruhen (157, 225, 228, 229, 234-236).

	TC	AC	LCNEC	SCLC
Mitosen pro 2 mm²	<2	2-10	>10 (median: 70)	>10 (Median: 80)
Nekrosen	keine	sporadisch	häufig	häufig
NE Morphologie	Ja	Ja	Ja	Ja
Ki-67 PI	bis 5%	Bis 30%	30-100%	30-100%
Kombination mit NSCC (non-small-cell-carcinoma)	Sehr selten	Sehr selten	Bis zu 25% der resezierten LCNEC	Bis zu 25% der resezierten SCLC

Tabelle 1: Diagnostische Kriterien der WHO für Neuroendokrine Neoplasien der Lunge: Morphologische Kriterien grau hinterlegt Adaptiert von Pelosi et al. (65)

3.2.3 NET G3 und Äquivalenz bei Lungen-NETs

Basierend auf Untersuchungen zu den Proliferationsraten in Kombination mit der Prognose wurde ein neues Konzept von Lungentumoren mit gut differenzierter Morphologie jedoch hohen Mitosezahlen und Ki-67-Proliferationsraten –

vergleichbar mit G3-NETs des Verdauungstrakts – entwickelt (237, 238). Diese Kategorie ist aber in der WHO-Klassifikation nicht offiziell anerkannt. Daher werden solche Tumore als NECs klassifiziert (37). Ähnlich wie NECs weisen diese Tumoren mehr als 10 Mitosen/2 mm² und einen Ki-67 Index > 20% in Hotspot-Bereichen auf (237). Dennoch deuten molekulare Studien darauf hin, dass diese Tumoren eher mit Karzinoiden als mit NECs verwandt sind. Sie weisen charakteristische Mutationen für Karzinoide (MEN1) auf und ihnen fehlen die für NECs charakteristischen Mutationen (Rb1 und TP53) (155, 229, 239). Aus klinischer Sicht ist es wichtig, die Existenz von gut differenzierten Lungen-NETs mit hohen Proliferationsraten anzuerkennen, da sie ein besonderes klinisch-prognostisches Verhalten vorweisen. Obwohl sie eher dem klinischen Verlauf von Karzinoiden als von NECs ähneln, sind sie tendenziell aggressiver und haben eine hohe Rezidivrate (238, 240). Es wird daher in der Literatur gewünscht, dass der Ki-67-Index zu einem obligatorischen Merkmal für die Einstufung von Lungen-NETs wird; analog zu solchen die im Verdauungstrakt lokalisiert sind (225, 229).

3.2.4 Technische Aspekte der Ki-67-Bestimmung

3.2.4.1 Antikörper-Klon

Es gibt keine einheitliche Methodik für die Ki-67 IHC und die Auswertung der Ergebnisse. Die meisten Studien wählen den monoklonalen Antikörper MIB-1 auf Paraffinschnitten nach Antigen-Retrieval-Verfahren. Der MIB1-Anti-Ki-67-Klon wurde außerdem für die Einstufung von GEP-NETs validiert und seine Eignung wird in den NET-Leitlinien ausdrücklich erwähnt (37). Alternative Anti-Ki-67-Klone werden routinemäßig in klinischen Pathologielabors verwendet. Studien an Brustkrebs und Tonsillengewebe haben jedoch gezeigt, dass verschiedene Anti-Ki-67-Klone keine gleichwertigen Ki-67 PIs produzieren (241, 242). Das Angebot von alternativen Klonen kann aber auch ein Vorteil bei Anwendung von bestimmten Fixiermitteln sein, mit denen der Routine-Klon nicht kompatibel ist: Beispielsweise ist der Antikörper MIB-1 bei der Cytolyt-Fixierung von Zytologie-Proben nicht verwendbar (65).

3.2.4.2 Anfärbemethode

Die Bewertung des Ki-67-Markierungsindex (LI) ist die am weitesten verbreitete und durch langjährige Laborerfahrung optimierte Methode. Selbst bei dem gleichen verwendeten Antikörper kommen je nach Forschungsgruppe unterschiedliche Antikörperverdünnungen und Antigen-Retrieval-Verfahren in den unterschiedlichen Laboren zum Einsatz. Laut eines Reviews von Pelosi et al. wird sich normalerweise an die jeweiligen Herstelleranweisungen für den jeweiligen Antikörper gehalten, jedoch fehlen bei den Studien teilweise genaue Angaben zu Antikörperverdünnungen und Antigen-Retrieval-Verfahren (156).

3.2.4.3 Schichtdicke

Die Schichtdicke (engl. section thickness) variiert in der Pathologie von ca 2-5µm. Je dicker der histologische Schnitt, desto mehr Zellen sind auf der gleichen Schnittfläche sichtbar. Das kann zum einen die Zahl der Ki-67-positiven Zellkerne, zum anderen auch andere Zellen, wie zum Beispiel Immunzellen oder andere von automatischen Auswertesystemen als falsch-positiv erkannte Zellen steigern. In den zwei Arbeiten zur DIA betrug die Schichtdicke 5µm (243, 244), in der Arbeit zur Auswertung mittels erstelltem Deep Learning-Algorithmus 3,5µm (245). Laut Owens et al. neigt das digitale Auswertungsprogramm QuPath dazu, Tumorzellen als positiv zu bewerten, welche von Patholog*innen als negativ bewertet wurden. Als Ursache wurde von ihnen neben der dichten Anordnung der Zellkerne und einer ausgeprägten Hintergrundfärbung die Schichtdicke als Ursache angegeben (246). Vesterinen et al. berichteten über ähnliche Probleme mit ihrem Deep Learning-basierendem Ki-67 PI Algorithmus KAI (245).

3.2.4.4 Quantifizierung

Die Quantifizierung der Ki-67 Expression wurde bei chirurgischen Präparaten in der Vergangenheit durch manuelle Zählung und automatisierte Bildanalyzesysteme durchgeführt. Insgesamt konnte eine hohe Gesamtübereinstimmung zwischen der manuellen Ki-67 LI-Bewertung und Bildanalyzesystemen nachgewiesen werden. In einer Untersuchung von Warth et al. mit 20 resezierten pulmonalen Karzinoiden zur Unterscheidung zwischen TC

und AC (Ki-67 Index Cutoff 5%) sollte die Reproduzierbarkeit und Untersucher*innenvariabilität von Mitosezählung im Vergleich zu Ki-67 untersucht werden. Hier konnte zum einen die Überlegenheit der Ki-67 Index Bestimmung nachgewiesen werden. Die Gesamtübereinstimmung der manuellen Ki-67-Bewertungen mit einer automatisierten Bewertungsmethode war hoch. Der mediane Korrelationskoeffizient für die acht Auswerter*innen, die in die Analyse mit den berechneten Ergebnissen einbezogen werden konnten, betrug 0,851 (Bereich 0,633 bis 0,899). Alle diese Korrelationen waren statistisch signifikant. Beim Vergleich der gruppierten Scores mit der gruppierten automatischen Auswertung mittels Kappa-Statistik ergab sich ein medianes Kappa von 0,805 (Bereich 0,385 bis 0,875), wobei alle Vergleiche bis auf einen statistisch signifikant waren (247).

Auch bei anderen Untersuchungen der Interobserver-Variabilität bei neuroendokrinen Lungentumoren hat sich gezeigt, dass die automatisierte Zählung eine gute bis ausgezeichnete Übereinstimmung mit der manuellen Zählung aufweist (157, 226, 228).

Aber auch für die Zählung gibt es variierende Methoden. Häufig verwendet ist die Hot-Spot-Methode, bei der Areale mit hoher Ki-67 Konzentration in der Übersicht aufgesucht werden und anschließend der Proliferationsindex in dieser Region bestimmt wird. Die Übersicht und das Aufsuchen der Hot Spots geht aber nur bei chirurgisch resezierten Proben. Bei Biopsien/Small Diagnostic Samples mit wenig Gewebematerial kann zufällig an diesen Hot-Spots vorbeibiopsiert worden sein. Das Areal mit der größten Proliferationsaktivität wäre also nicht in der Biopsie enthalten (248).

Eine weitere Methode ist das Tumor-Tracing, die Zählung aller verfügbaren Tumorzellen auf der Färbung. Die Tumor-Tracing-Methode hat den Vorteil, dass sie einen 'durchschnittlichen' Ki-67-Wert für den gesamten Tumor liefert und daher ein sehr stabiles Maß ist. Gleichzeitig könnte der Ki-67-Wert bei einer kleinen Biopsie überschätzt werden, wenn ein Bereich mit relativ hoher Proliferation entnommen wird (248).

3.2.4.5 Indexberechnung

Kritisch ist auch die Methodik, wie der Ki-67 LI berechnet wird. In einem Review der vorhandenen Ki-67-Literatur durch Pelosi et al. im Jahr 2014 gab es verschiedene Methoden zur Bestimmung der Anzahl der zu zählenden Zellen. Vier bis acht histologische Felder bei $\times 20$ oder $\times 40$ -Vergrößerung, histologische Felder mit durchschnittlicher Anfärbungshäufigkeit, 2-mm^2 -Tumorbereiche bei $\times 25$ -Vergrößerung, 1-mm^2 -Tumorbereiche, die nicht anderweitig spezifiziert wurden oder 400 bis 2000 Tumorzellen, die nacheinander gezählt werden (häufigste Methodik im Review) wurden für die Bewertung des Ki-67 LI verwendet, was einige diskrepante Ergebnisse erklären könnte und einen direkten Vergleich zwischen den Studien erschwert (156).

3.2.4.6 Ergebnisdarstellung

Eine weitere Quelle der Variabilität ist die Ergebnisdarstellung: in dem vorherig genannten Review von Pelosi et al. wurde der Ki-67 LI als Mittelwert (am häufigsten) oder Median ausgewertet, während andere Studien entweder schlecht handhabbare kategorische Variablen oder keine nützlichen Informationen lieferten (156).

3.2.4.7 Manuelle Zählung

Bei der manuellen Zählmethode wird auf einem Bild bei 40-facher Vergrößerung und nach Ki-67-Anfärbung jeder Zellkern einzeln auf Ki-67-Positivität evaluiert. Diese Methode, durchgeführt von ein*er als Expert*in ausgewiesenen Patholog*in wird meist als Goldstandard für die Evaluierung der anderen Quantifizierungstools genutzt (160). Als arbeitserleichternde Tools können ausgedruckte Bilder mit Stift markiert werden oder Annotations-Tools am Computer verwendet werden. Ein Beispiel für ein Annotationstool ist QuPath als Open-Source-Software zur digitalen Bildanalyse (<https://qupath.github.io/>) (249). In einem Vergleich der Zählmethoden von Ki-67 bei neuroendokrinen Karzinomen des Pankreas von Bagci et al wurde diese Methode als effektivste und praktischste Zählmethode angeführt. Sie empfehlen die Auswertung entweder auf einem Computerbildschirm oder auf einer gedruckten Version des aufgenommenen Bildes, wo die gezählten

Zellen für die Zählung hervorgehoben, durchgestrichen und eingekreist werden können. Die Bildaufnahme kann mit einer ans Mikroskop angeschlossenen Digitalkamera durchgeführt werden. Die Ergebnisse waren reproduzierbar und die Untersuchung dauerte im Durchschnitt 6 Minuten (250).

Bei einem Vergleich der verschiedenen Zählmethoden für Ki-67 beim medullären Schilddrüsenkarzinom wurde die manuelle Ki-67-Zählung nach wie vor als nützlich angesehen, wenn ein Tumor mit einem grenzwertigen Ki-67-Proliferationsindex von 3%-7% vorliegt (251).

3.2.4.8 Schätzung/Eyeballing

Beim Eyeballing wird durch die Untersucher*innen der Objektträger wie bei der normalen Morphologie-Untersuchung durchfahren und anschließend die Anzahl Ki-67-positiver Zellen abgeschätzt. Eyeballing ist die schnellste Methode. Sie erfordert kein digitales Bild (Schnappschuss oder Bild des gesamten Objektträgers) und kann problemlos mit einem Mikroskop auf Glasobjektträgern durchgeführt werden. Der Nachteil ist die hohe Untersucherabhängigkeit. Ein Trainingsset mit repräsentativen Bildern mit bekannter positiver und negativer Zellzahl kann nützlich sein, um die Untersuchergenauigkeit beim Eyeballing zu verbessern (251).

3.2.4.9 Bildanalyzesysteme

In der Praxis ist die manuelle Zählmethode sehr aufwändig. Eine Möglichkeit, Zellkerne zu zählen ist die Verwendung von Software. Durch Bildanalyseprogramme ist es möglich einzelne Zellen auf einem digitalen Bild oder einer auf einem virtuellen Objektträger ausgewählten Region von Interesse (Region of Interest - ROI) markieren zu lassen (252). Es gibt Unterschiede zwischen den Hersteller*innen von Färbemitteln und Scannern, was die Reproduzierbarkeit insgesamt beeinträchtigt (253). Hinzu kommen die unterschiedlichen Bildanalyzesysteme. Beispiele für kommerziell erwerbbar Digital Image Analysis (DIA) Systeme zur Zellkernzählung sind: Aperio (Leica Biosystems), TissuemorphKP (Visiopharm), GenASIs (Applied Spectral Imaging), NuclearQuant (3DHISTECH) and Virtuoso (Ventana, Roche) (254). Tang et al. zeigten, dass die digitale Bildanalyse (DIA) und die manuelle Zählung in hohem

Maße übereinstimmten (ICC = 0,98). Der ICC zwischen DIA und der mittleren Schätzung/Eyeballing aller Beobachter*innen betrug 0,88. Der ICC für die Intra-Beobachter*innen-Konsistenz betrug $0,39 \pm 0,26$ (255).

3.2.4.10 Deep Learning gestützte Systeme

Die neuesten modernen Computer-Vision-Systeme basieren meist auf Deep Learning-Modellen, die Teil des bekannten maschinellen Lernens sind. Als Modelle werden die convolutional neural networks (CNN) bei der Segmentierung, Klassifizierung und Erkennung von Bildern verwendet. Mittlerweile werden Deep Learning-Techniken, die größtenteils auf CNN-Modellen beruhen, erfolgreich eingesetzt, um auch die Bewertung des Ki-67-Index zu ermöglichen. Der Erfolg jedes CNN-Modells wird durch die korrekt vorbereiteten Trainingsätze und die verwendeten histologischen Präparate bestimmt (160).

Deep Learning (auch bekannt als deep structured learning) ist ein Teilbereich des maschinellen Lernens, der auf künstlichen neuronalen Netzen (artificial neural networks) basiert, bei denen die statistischen Modelle aus den eingegebenen Trainingsdaten erstellt werden (256). Deep Learning-Algorithmen können mit großen Mengen medizinischer Bilddaten trainiert werden, um Ki-67-positive Zellen in Gewebeproben anhand digitaler Pathologiebilder genau zu identifizieren und zu quantifizieren (257). Der Einsatz von KI bei der Ki-67-Erkennung hat das Potenzial, die Genauigkeit und Konsistenz der Ki-67-Quantifizierung zu verbessern und die Beobachter*innenvariabilität in ihrer bisherigen Form aufzuheben. Darüber hinaus kann KI auch den Zeit- und Ressourcenaufwand für die manuelle Ki-67-Quantifizierung verringern, was eine schnellere und effizientere Auswertung einer großen Anzahl von Gewebeproben ermöglicht (258). Deep Learning-Algorithmen können auch zur Vorhersage von Behandlungsergebnissen und des Ansprechens auf die Behandlung verwendet werden. Mit der Analyse von bildgebenden und klinischen Daten können potentiell prädiktive Merkmale identifiziert werden, die mit dem Fortschreiten der Krankheit und dem Überleben in Verbindung stehen. Dies kann die Entwicklung von personalisierten Behandlungsplänen für Patient*innen ermöglichen. Es ist jedoch zu beachten, dass sich Deep Learning-Algorithmen für die NET-Analyse noch in der Entwicklungsphase befinden und validiert werden müssen. Außerdem sind weitere

Vergleiche der KI-basierten Ki-67-Quantifizierung mit herkömmlichen manuellen Methoden erforderlich, um die Genauigkeit und Zuverlässigkeit zu gewährleisten (256, 259-261).

3.2.5 Standardisierbarkeit

Wie oben angeführt sind die verschiedenen Arbeiten zur Ki-67 schwer vergleichbar. Die vielen Variablen in der Indexerstellung müssten standardisiert werden. Es müsste eine Einigung auf einen Antikörper-Klon, eine Verdünnung und ein Antigen-Retrieval-Verfahren erfolgen. Hinzu kommt die vergleichbare Bildaquirierung. Die Optiken sollten vergleichbar sein, eine Auflösung und ein gleicher Bildausschnitt sind vergleichsweise einfach zu erreichen. Als nächstes kommt die Auswertung. Es gibt diverse kommerzielle DIA-Systeme (siehe Absatz Bildanalyse-Systeme) oder auch Open-Source-Varianten (beispielsweise Qupath). Die Einigung auf ein System wäre zumindest vereinfachend für den Vergleich. Hinzu kommt die Anwendung bei verschiedenen Malignomen wieder verschiedener Organe. Die Bestimmung von Ki-67 ist bei allen neuroendokrinen und auch nichtneuroendokrinen Tumoren der Mamma, der Bauchspeicheldrüse, des GI-Trakts, der Hypophyse und der Lunge im Gespräch. Je nach Organsystem auch schon in die Klassifikation aufgenommen (siehe GI-NETs) oder auch nicht (siehe Lunge). Die Inter-Organsystem-Vergleiche werden vorsichtig vorgenommen, beispielsweise bei Lunge und GI-Trakt. Hinzu kommt die Probengewinnung des zu untersuchenden Tumors. In einer Vergleichsstudie bei Ki-67-Bestimmungen im Brustkrebs von Acs et al. zeigten sich bei Core Biopsies höhere Ki-67-Werte als bei chirurgischen Biopsien desselben Präparats (262).

Die standardisierte Ki-67 Bestimmung wurde bei gastrointestinalen/pankreatischen neuroendokrinen Tumoren (GI/Pan NET) bereits in deren WHO-Klassifikation bereits etabliert: Der Ki-67-Index wird hier durch das Zählen von mindestens 500 Tumorzellen in Bereichen mit der höchsten mitotischen Aktivität bestimmt (263). Diese sogenannten Hotspots werden bei geringer Vergrößerung identifiziert. Die optimale Methode zur Zählung bei GI/Pan NET besteht darin, ein kamerabasiertes bzw. ausgedrucktes Bild zu verwenden (264).

3.2.5.1 Herangehensweisen zur Standardisierung in der Literatur

Acs et al (262) versuchten in einer Multioperator- und Multiinstitutionellen Studie zu Ki-67 bei Brustkrebs einen Weg diese Standardisierungshürden zu bewältigen. Für die Erstellung automatisierter Bewertungsalgorithmen nutzten sie die Open-Source-Plattform QuPath (249). Den teilnehmenden Labors wurde ein detaillierter Leitfaden für die Einrichtung und Erstellung eines automatischen Ki-67-Bewertungsalgorithmus zugesandt. Alle teilnehmenden Labors wurden gebeten, ihren eigenen Ki-67-Bewertungsalgorithmus entsprechend der Anleitung zu erstellen und auf 60 Objektträger anzuwenden. Die Erstellung eines des eigenen Bewertungsalgorithmus durch jedes Labor separat wurde gewählt, um die klinische Praxis nachzuahmen. Zum Zeitpunkt der Studie war kein verallgemeinerbarer Ki-67-Bewertungsalgorithmus für die Bewertung ganzer Objektträger verfügbar. Theoretisch müssten daher alle Labore einen solchen DIA-Ansatz an ihre Laboreigenschaften anpassen/optimieren (unterschiedliche Fixierung, unterschiedliche Antikörper und IHC-Protokolle usw.), was einen laborspezifischen DIA-Ansatz erforderlich machte. Es wurde als eine Schritt-für-Schritt-Anleitung für die Erstellung eines jeweils eigenen Bewertungsalgorithmus herausgegeben. Die Kalibrierung der DIA-Methode/des Leitfadens wurde in früheren Studien durchgeführt und auf Reproduzierbarkeit überprüft (265, 266). Nach Einstellung der optimalen Farbentfaltung und Zellsegmentierung wurden zwei unabhängige Klassifikatoren an einer zufällig ausgewählten, vordefinierten Kernbiopsie (CB-Klassifikator) und einem Resektionspräparat (WSI-Klassifikator) trainiert. Sowohl der CB- als auch der WSI-Klassifikator wurden jeweils auf den Objektträgern der Kernbiopsie und auf den Objektträgern der Resektionsprobe ausgeführt, um die potenziell unterschiedlichen Merkmale der beiden Probentypen zu berücksichtigen. Es wurden systematische Diskrepanzen in den Ki-67-Werten zwischen Kernbiopsien und den entsprechenden chirurgischen Proben gefunden, wenn diese mit einem automatischen Lesesystem ausgewertet wurden (262). Diese Untersuchung konnte die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen mit unterschiedlichen Bewertungsalgorithmen in unterschiedlichen Laboren mit demselben Bewertungsprogramm zumindest im Rahmen dieser Studie beweisen. Die klinische Validierung müsste jedoch noch im Vergleich zum Goldstandard der Manual-Count-Method in einer erneuten Vergleichsstudie nachgewiesen werden.

3.2.6 Arbeiten zur Ki-67 Auswertung mittels digitaler Bildanalyse

3.2.6.1 Methoden Arbeit I

In der Studie von Wang et al (267) wurden 159 chirurgische Resektate von pNETs analysiert. Die Entitäten waren mit 35 TC, zwei AC, 28 LCNECs und 94 SCLC vertreten, welche alle zwischen den Jahren 2010 und 2015 am Peking Cancer Hospital (Peking, China) diagnostiziert wurden. Alle Fälle wurden von zwei erfahrenen Patholog*innen überprüft, um die Diagnose anhand der aktuellen WHO-Kriterien (WHO-Klassifikation 2015) für neuroendokrine Lungentumoren zu bestätigen. Ein typisches Karzinoid (TC) wurde als gut differenzierter neuroendokriner Tumor mit 0 bis 1 Mitose pro 2 mm² und ohne Nekrose definiert. Ein atypisches Karzinoid (AC) galt als mittelgradiger neuroendokriner Tumor, gekennzeichnet durch 2 bis 10 Mitosen pro 2 mm² und/oder fokale Nekrose. Großzellige neuroendokrine Karzinome (LCNEC) und kleinzellige Lungenkarzinome (SCLC) wiesen mehr als 10 Mitosen pro 2 mm² auf, typischerweise mit ausgedehnten Nekrosearealen. Beide zeigten eine neuroendokrine Morphologie mit Kernpalisaden sowie nester-, rosetten- oder bänderförmig angeordneten Zellen.

Ki-67 wurde mit einem automatischen Immunostainer (Link 48; Dako, Carpinteria, CA, USA) mit dem monoklonalen Antikörper MIB-1; Dako immunhistochemisch angefärbt.

Die Quantifizierung der Ki-67-Expression erfolgte entweder mit der manuellen konventionellen Methode (MCM) oder mittels eines mit CIAM (computer assisted image analysis method) entwickelten Algorithmus zur Ki-67-Analyse. Die Analyse durch CIAM wurde mithilfe eines validierten nuklearen Algorithmus (Aperio; Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL, USA) durchgeführt. Dazu wurden die Objektträger bei 20-facher Vergrößerung mit der Aperio Scanscope Console gescannt. Die Auswertung erfolgte mit der Software ImageScope Nuclear v9, die sowohl die Gesamtanzahl der Zellkerne als auch den Anteil der positiv gefärbten Zellkerne angibt. Bei der digitalen Bildanalyse wurden mindestens sechs repräsentative, gleich große (500 × 500 µm) nicht-nekrotische Tumorfelder bei 10-facher Vergrößerung manuell markiert. Diese Felder mussten zusammen mindestens 2000 Tumorzellen enthalten (oder alle verfügbaren Zellen, falls weniger als 2000). In diesen 2000 Zellen fand anschließend die automatische Analyse statt. Eine

positive Ki-67-Färbung wurde als schwache oder stärkere Kernpositivität ($\geq 1+$) gewertet. Besonderes Augenmerk wurde darauf gelegt, Felder mit einem hohen Anteil an Nicht-Tumorzellen – wie Endothelzellen oder intratumoralen Lymphozyten – auszuschließen. Dies erfolgte durch visuelle Kontrolle der automatisch ausgewählten digitalen Bilder sowie durch Abgleich mit den entsprechenden Hämalaun-Eosin-gefärbten gescannten Präparaten.

Alle statistischen Analysen wurden mit der Statistiksoftware SPSS Version 17.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) durchgeführt. Die Korrelation zwischen den beiden Ki-67-Methoden (MCM und CIAM) wurde mit dem Pearson-Korrelationskoeffizienten berechnet. Ein zweiseitiger p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen, und ein r-Wert $> 0,8$ als starke Korrelation bewertet.

3.2.6.2 Methoden Arbeit II

In der Studie von Behrman et al.(243) wurden 85 primäre medulläre Schilddrüsenkarzinom-(MTC)-Resektate aus den Jahren 2000 bis 2021 analysiert. Diese wurden der Pathologiedatenbank des Emory University Hospital, des Emory University Hospital Midtown und des Saint Joseph Hospital (alle in Atlanta, GA) entnommen. Für die immunhistochemische Untersuchung auf Ki-67-PI wurden 5 μm dicke Schnitte aus formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeblöcken verwendet. Die Färbung erfolgte mit dem Leica Bond Max III-System (Leica Microsystems, Bannockburn, IL) unter Verwendung des MIB-1-Klons (1:80, Agilent Dako). Die verfügbaren H&E-Objektträger aller Fälle wurden von zwei Patholog*innen begutachtet und die histologischen Befunde dokumentiert. Anschließend wurden die Objektträger mit dem Aperio® CS2 Diascanner (Leica Biosystems, San Diego, CA, USA) bei 40-facher Vergrößerung gescannt und als .svs-Dateien gespeichert. Für die Quantifizierung wurden in allen Fällen die „Hotspots“ mit maximaler Ki-67-Immunreaktion ausgewählt. In jedem Fall wurde ein einheitlicher quadratischer Ausschnitt verwendet. Die Auswertung erfolgte mithilfe der QuPath®-Bildanalyseplattform (<https://qupath.github.io/>) durch einen Hauptanwender*innen. Die Standardeinstellungen von QuPath® blieben erhalten, mit folgenden Ausnahmen: Die minimale Kernfläche wurde auf 27 gesetzt (ermittelt durch Versuch und Irrtum, um normale Strukturen möglichst

auszuschließen), und die DAB 1+-Schwelle wurde geringfügig zwischen 0,1 und 0,2 variiert, um die Erkennung Ki-67-positiver Kerne zu optimieren.

Die gleichen Hotspot-Bereiche, die für QuPath verwendet wurden, wurden als Screenshots farbig ausgedruckt und nach einer mehrwöchigen Auswaschphase blind von mindestens ein*er Patholog*in sowie ein*er Pathologie-Assistenzärzt*in manuell ausgezählt. Dabei wurde jeder Grad an Ki-67-Färbung im Tumorkern als positiv gewertet. In jedem Fall wurden mindestens 500 MTC-Zellen innerhalb der markierten Hotspots mit mindestens einer der beiden Methoden gezählt.

Die medullären Schilddrüsenkarzinome wurden basierend auf zuvor festgelegten Kriterien in die IMTCGS-Kategorien „niedrig“ oder „hoch“ eingestuft. Eine zufällige Untergruppe aus 16 niedriggradigen und 8 hochgradigen Fällen wurde unter standardisierten Bedingungen von D.B.B. und K.V. erneut ausgewertet. Die statistische Analyse erfolgte mit SPSS Version 27.0 (IBM, New York, NY) unter Anwendung des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests für verbundene Stichproben bei nichtparametrischen Verteilungen.

3.2.6.3 Methoden Arbeit III

In der Studie von Dawe M et al.(244) wurde eine Teilkohorte aus einer vorangegangenen randomisiert kontrollierten Studie untersucht, in der Patient*innen über 50 Jahre mit lymphknotennegativem Brustkrebs nach brusterhaltender Operation entweder Tamoxifen allein oder in Kombination mit Radiotherapie erhielten. Für die Analyse wurden 278 Fälle ausgewählt, aus denen Tissue Microarrays (TMAs) mit jeweils drei Tumorkernen erstellt wurden. Die TMA-Blöcke wurden in 5 mm große Schnitte geschnitten, mit dem rekombinanten monoklonalen Kaninchen-Antikörper SP6 (ThermoFisher Scientific) in einer Verdünnung von 1:500 angefärbt und mit Hämatoxylin gegengefärbt, wobei der Ventana Autostainer (BenchMark XT; Ventana Medical Systems) verwendet wurde. Fälle mit <300 auswertbaren Tumorzellen wurden aus der Studie ausgeschlossen.

Die manuelle Zählung (MCM) erfolgte durch geschulte Untersucher*innen, die in Hotspot-Bereichen je 300 Zellen pro Fall auswerteten. Die Gesamtzahl der Zellkerne sowie der Ki-67-positiv gefärbten Kerne aus den drei Stanzzyllindern wurde addiert, um für jeden Fall den Ki-67-Markierungsindex zu berechnen. Zur

Qualitätssicherung wurden etwa 10 % der Proben nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und von zwei erfahrenen Brustpatholog*innen erneut bewertet. Die Übereinstimmung zwischen allen manuellen Bewerter*innen lag bei 90 %. Da die Ergebnisse dieser manuellen Auswertung klinisch signifikant mit dem Risiko eines ipsilateralen Brustkrebsrezidivs korrelierten, wurden sie als Referenzstandard herangezogen und mit den Resultaten weiterer Bewertungsmethoden auf denselben gefärbten Objektträgern verglichen. Ergänzend wurden fünf digitale Bildanalysen (DIA) eingesetzt und mit den manuellen Ergebnissen verglichen: Aperio ePathology, Definiens Tissue Studio, QuPath, Immunohistochemical Color Histogram (IHCCH) (268) und piNET(254). Das Aperio-System nutzte anpassbare Schwellenwerte zur Erkennung positiv gefärbter Zellkerne. Die Definiens-Software ermöglichte eine halbautomatische Segmentierung von Tumor- und Stromabereichen mit konstanten Parametern. QuPath wurde mit einheitlich optimierten Einstellungen zur automatisierten Erkennung von Zellkernen verwendet. Zwei weitere Methoden, IHCCH und piNET, basierten auf fortschrittlichen Bildverarbeitungsansätzen: IHCCH verwendete ein schwellenwertbasiertes Verfahren im Lab-Farbraum zur Differenzierung von DAB- und Hämatoxylin-Färbung, während piNET ein Deep Learning-Modell nutzte, das auf annotierten Tumorzellen trainiert wurde.

Die statistische Auswertung umfasste Scatterplots, Bland-Altman-Diagramme sowie Pearson-Korrelation, Intraklassenkorrelation (ICC) und Cohen's Kappa. Insbesondere ein Kappa-Wert über 0,80 wurde als Indikator für eine klinisch verwertbare Übereinstimmung gewertet. Alle Verfahren wurden hinsichtlich ihrer Genauigkeit, Reproduzierbarkeit und praktischen Anwendbarkeit im Vergleich zur etablierten manuellen Zählung bewertet.

3.2.6.4 Ergebnisse Arbeit I

Zur Bestimmung des Ki-67-Indexes kamen sowohl die manuelle konventionelle Methode (MCM) als auch der CIAM-Algorithmus zum Einsatz. Die Abweichungen in den Ki-67 PI-Werten zwischen den beiden Methoden ließen sich in vier Gruppen einteilen: $\leq 5\%$, 6–10 %, 11–15 % und $>15\%$. Über die Hälfte der Fälle (57,2 %) wiesen eine Differenz von maximal 5 % auf. Zudem nahm der Anteil der Fälle mit zunehmender Differenzgröße stetig ab. In den meisten Fällen (77,4 %;

123 von 159) lag der mit CIAM berechnete Ki-67-Wert leicht über dem durch MCM ermittelten. Zwischen den beiden Methoden zeigte sich eine starke positive Korrelation ($r = 0,975$; $P = 0,000$).

Probleme der Studie waren die kleine Studienkohorte, die Fälle von schwacher Positivität von Ki-67 bei der CIAM Analyse und die erschwerte Differenzierung von Ki-67 positiven Zellen von eventuellen Lymphozyten, Stromazellen, oder Endothelzellen. Generell hat Ki-67 aber im Interobserver-Agreement bezüglich Karzinoiden in dieser Studie besser als die Mitosenzählung abgeschnitten.

3.2.6.5 Ergebnisse Arbeit II

Der Unterschied zwischen den Ki-67-Proliferationsindizes, gemessen mittels manueller Zählung (MCM) und digitaler Bildanalyse (DIA) mit QuPath, war sowohl für die gesamte MTC-Kohorte als auch für die niedriggradige Untergruppe statistisch signifikant (jeweils $p < 0,001$). Für die hochgradige Untergruppe war der Unterschied hingegen statistisch nicht signifikant ($p = 0,101$). Im Vergleich zur manuellen Zählung zeigte die QuPath DIA eine sehr gute Übereinstimmung über die gesamte Kohorte hinweg ($R^2 = 0,9891$). Bei weiterer Stratifizierung der Fälle gemäß dem IMTCGS-System korrelierte QuPath stärker mit der manuellen Zählung bei hochgradigen Fällen ($R^2 = 0,99$) als bei niedriggradigen Fällen ($R^2 = 0,7071$). Insgesamt zeigte sich, dass der histologische Grad gemäß IMTCGS nicht von der verwendeten Methode zur Ki-67 PI-Messung (MCM oder DIA) beeinflusst wurde. Alle Fälle, die in der manuellen Zählung den Schwellenwert von $\geq 5\%$ erreichten, wurden auch durch die DIA korrekt als hochgradig erkannt. Ebenso lagen alle niedriggradigen Fälle – unabhängig von der Methode – unterhalb des 5%-Schwellenwerts.

Zu den Herausforderungen bei der Anwendung von QuPath DIA zählte die Notwendigkeit, die Parameter zur Erkennung positiver Zellkerne für jeden Fall individuell anzupassen – wenn auch meist nur mit minimalen Änderungen. Weitere Schwierigkeiten ergaben sich bei der Kernsegmentierung, insbesondere durch Zellüberlappungen sowie durch Artefakte wie Gewebefaltungen, Schnittfehler, Pigmentablagerungen, Amyloid oder Kalzifizierungen. Diese Faktoren führten gelegentlich zu falsch-positiven Ergebnissen.

Auch die manuelle Zählung (MC) von Ki-67-positiven Kernen war mit Herausforderungen verbunden. Dazu gehörten unspezifische oder schwache Hintergrundfärbungen, die Abgrenzung von Endothelzellen gegenüber spindelförmigen Tumorzellen sowie der zeitliche Aufwand für die Auszählung.

In einer Untergruppe zeitlich dokumentierter MC-Fälle (n = 16 niedrig gradige und n = 8 hochgradige Fälle) betrug die durchschnittliche Dauer der manuellen Zählung 8 Minuten und 39 Sekunden (Spanne: 4 Minuten bis 32 Minuten und 46 Sekunden). Im Vergleich dazu benötigte die digitale Analyse (DIA) weniger als 10 Sekunden pro Fall.

3.2.6.6 Ergebnisse Arbeit III

Jede Durchführung (insgesamt drei Durchläufe) der digitalen Bildanalyse (DIA) wurde anschließend mit einem als Goldstandard geltenden Set manueller Zählungen verglichen. Alle drei Aperio-Auswertungen zeigten eine geringe Korrelation und Übereinstimmung mit den manuellen Ergebnissen; die dritte Auswertung schnitt dabei am besten ab (R = 0,28; ICC = 0,148) (Tabelle 2).

Die erste Auswertung mit Definiens erzielte eine moderate Korrelation und Übereinstimmung (R = 0,67; ICC = 0,665), während die zweite und dritte Auswertung eine hohe Übereinstimmung mit den manuellen Zählungen erreichten (R = 0,76 bzw. 0,78; ICC = 0,750 bzw. 0,756).

Alle drei QuPath-Auswertungen zeigten eine starke Korrelation mit den manuellen Zählungen. Der Korrelationskoeffizient lag bei 0,782 für den ersten, 0,82 für den zweiten und 0,723 für den dritten Durchlauf. Die Zuverlässigkeit der QuPath-Ergebnisse wurde als „moderat“ bis „gut“ eingestuft (ICC = 0,782, 0,821 bzw. 0,723). Der Deep Learning-Algorithmus piNET schnitt besser ab als die vorherige, unüberwachte IHCCH-Methode und erzielte die höchste Korrelation und Übereinstimmung mit den manuellen Zählungen (R = 0,85; ICC = 0,850). Die 95%-Konfidenzintervalle für die Grenzen der Übereinstimmung sowie die durchschnittliche Differenz wurden auf Basis eines Alpha-Niveaus von 0,05 berechnet. Zwei Methoden galten als nicht verzerrt, wenn die durchschnittliche Differenz nahe bei 0 lag. Aperio zeigte die höchste Varianz und eine deutliche Überschätzung der Zellzahlen Differenz = 21,78; 9,68; 16,87). QuPath war über

alle drei Durchgänge hinweg am konstantesten, tendierte jedoch zu einer leichten Unterschätzung (mittlere Differenz = $-1,48$; $-1,20$; $-2,47$). Zwei Definiens-Durchgänge überschätzten die Zellzahlen geringfügig (mittlere Differenz = $+0,10$ bzw. $+1,77$). piNET unterschätzte die Zellzahlen leicht mit einer mittleren Differenz von $-0,71$, lag jedoch nahe bei 0 und schnitt damit besser ab als der IHCCH-Algorithmus, bei dem eine systematische Unterschätzung festgestellt wurde. Zur Bewertung der Zuverlässigkeit der digitalen Bildanalyse (DIA) bei der korrekten Klassifizierung in prognostisch relevante Gruppen wurde Cohens Kappa verwendet. Damit eine Methode als klinisch relevant gelten kann, muss gemäß Definition ein Kappa-Wert von über 0,8 erreicht werden, was einer „nahezu perfekten Übereinstimmung“ entspricht. Keine der getesteten DIA-Methoden erreichte diesen Schwellenwert. Wie bereits zuvor schnitt Aperio am schlechtesten ab: Die meisten Kappa-Werte lagen im Bereich keiner bis geringer Übereinstimmung. Der höchste mit Aperio erzielte Wert von 0,22 entspricht bestenfalls einer „mäßigen Übereinstimmung“. Die höchste Kappa-Statistik wurde mit dem Deep Learning-Algorithmus piNET erzielt – mit einem Wert von 0,73 bei Cutoffs von 20 % und 25 %. Obwohl dieser Wert unter der klinischen Relevanzschwelle blieb, zeigten sowohl piNET als auch QuPath eine hohe Konsistenz mit über 90 % Übereinstimmung bei Cutoff-Werten von ≥ 20 %.

DIA- Modell	Korrelation (R)	ICC	Bland-Altman: Mittlere Differenz	Tendenz	Bemerkungen
Aperio	R = 0,28 (schwach)	0,148 (niedrig)	21,78 / 9,68 / 16,87	Deutliche Überschätzung	Schwächste Leistung, höchste Varianz, keine klinische Verlässlichkeit
Definiens	R = 0,67 / 0,76 / 0,78	0,665 / 0,750 / 0,756	+0,10 / +1,77	Leichte Überschätzung	Zunehmend bessere Übereinstimmung mit MC, gute Stabilität bei späteren Läufen
QuPath	R = 0,782 / 0,82 / 0,723	0,782 / 0,821 / 0,723	-1,48 / -1,20 / - 2,47	Geringe Unterschätzung	Konsistenteste Methode, gute Korrelation und Zuverlässigkeit
piNET	R = 0,85	0,850	-0,71	Sehr geringe Unterschätzung	Beste Gesamtleistung, höchste Übereinstimmung mit manueller Zählung
IHCCH	Nicht quantifiziert	Nicht angegeben	Systematische Unterschätzung	Deutlich weniger genau	Frühere unüberwachte Methode, durch piNET klar übertroffen

Tabelle 2: Vergleich DIA Modelle

3.2.7 Ki-67 Auswertung mittels Deep Learning Algorithmus

3.2.7.1 Methoden

Vesterinen et al. (245) erstellten in ihrer Arbeit einen Deep Learning (DL)-basierten Algorithmus zur Berechnung des Ki-67-PI bei neuroendokrinen Tumoren. Anschließend wurde dieser anhand einer unabhängigen Objektträgerserie vergleichend zu drei Pathologen mit manueller Auswertung an ihren eigenen Bildschirmen validiert.

Für die Erstellung des Algorithmus wurden drei Serien mit pathologischen Proben erstellt: eine DL-Trainings-, eine DL-Test- und eine DL-Validierungsserie. Die Tumorproben der DL-Trainingsreihe bestanden aus pulmonalen und pankreatischen NETs. Die pulmonalen NETs stammten aus einer vorherigen Studie, gesammelt aus finnischen Biobanken, die pankreatischen NETs wurden aus dem Archiv der Abteilung für Pathologie des Universitätskrankenhauses Helsinki (HUH) entnommen. Die DL-Testserie umfasste 124 bereits dokumentierte pulmonale NETs, von denen keiner Teil der DL-Trainingsserie war. Die DL-Validierungsserie bestand aus vollständigen Objektträgern von 60 NETs, ebenfalls nicht in der Trainings- oder Testserie enthalten. Diese Tumoren wurden zwischen 2015 und 2019 am HUH chirurgisch entfernt, in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die originalen Ki-67-markierten Objektträger wurden aus dem Archiv der Pathologieabteilung entnommen und digitalisiert.

Die immunhistochemische Färbung für Ki-67 erfolgte in der Pathologieabteilung des HUH. Dabei wurden 3,5 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und entparaffiniert. Das Antigen-Retrieval wurde mit dem CC1-Reagenz (Ventana Medical System, Roche, Tucson, AZ, USA) durchgeführt. Anschließend wurde der Primärantikörper Ki-67 (Klon MIB-1, Verdünnung 1:100, Dako, Agilent Pathology Solutions, Santa Clara, CA, USA) 32 Minuten lang inkubiert. Die Reaktion wurde mithilfe des OptiView Universal DAB Detection Kits (Ventana Medical System) sichtbar gemacht und mit Hämatoxylin gegengefärbt.

Die Ki-67-markierten Objektträger wurden mit einem Panoramic 250 FLASH III Scanner (3DHISTECH, Budapest, Ungarn) bei 20-facher Vergrößerung und einer Auflösung von 0,242 µm/Pixel digitalisiert. Die digitalisierten Bilder wurden auf Aiforia_ (Aiforia Technologies, Helsinki, Finnland) hochgeladen: einer

kommerziellen, cloudbasierten Plattform zur Verwaltung und Analyse digitaler Dias sowie zum Training neuronaler Netzwerke für die automatische Bildauswertung. In Aiforia_Create wurde ein deep convolutional neural network trainiert, um Gewebe auf den Objektträgern zu erkennen und zwischen Ki-67-positiven und -negativen Tumorzellen in 14 pulmonalen NET-Proben zu unterscheiden. Die Trainingsdaten des Ki-67-PI-Algorithmus (KAI) basierten auf 354 manuell markierten Ki-67-positiven und 3003 Ki-67-negativen Tumorzellen. Da der Fokus auf den Tumorzellkernen lag, wurde eine Objektgröße von 7 µm verwendet, die sich an der Kernstruktur orientierte. Zur Erhöhung der Modellrobustheit wurden die Trainingsbilder durch gezielte Bildtransformationen wie Skalierung, Seitenverhältnisänderung, Scherung, Kontrast- und Luminanzanpassung, sowie geringe Anteile von Rauschen, Unschärfe und Kompression variiert. Zur Bewertung der Genauigkeit des KAI wurden dessen Ergebnisse mit der „Ground Truth“ – den als richtig eingeordneten NETs der DL-Testserie bestehend aus 124 pulmonalen NETs verglichen. Nach erfolgreichem Testen wurde der KAI um 25 Pankreas-NETs erweitert, für die 327 Ki-67-positive und 1301 Ki-67-negative Zellen manuell markiert wurden.

Die Leistungsfähigkeit des KAI wurde anhand manueller Ki-67 PI-Schätzungen von drei unabhängigen, auf endokrine Pathologie spezialisierten Patholog*innen überprüft. Analysiert wurden jeweils 20 NETs des Pankreas, des Ileums und der Lunge – alle unabhängig von der DL-Trainings- oder Testserie. Die Pathologen berechneten den Anteil positiver Tumorzellen manuell in jeweils drei vorab markierten Hotspot-Regionen pro Tumor an ihren eigenen Bildschirmen. Die drei Ergebnisse pro Tumor wurden anschließend gemittelt, um einen Gesamtwert für Ki-67 PI zu erhalten.

Zur Vorbereitung der KAI-Validierung wurde aus der DL-Validierungsserie je ein zufälliger Schnitt pro NET-Typ ausgewählt, um technische Variationen wie Schnittdicke oder Färbeintensität im Algorithmus zu berücksichtigen. Diese Schnitte wurden von der Validierung ausgeschlossen. Insgesamt wurden 109 Ki-67-positive und 1719 Ki-67-negative NET-Zellen für die Vorbereitung genutzt. Danach analysierte der KAI die gleichen Hotspot-Regionen, die zuvor von den Pathologen beurteilt worden waren. Die Ergebnisse aus drei Regionen pro Tumor wurden – wie bei der manuellen Analyse – gemittelt.

Die Übereinstimmung zwischen den Patholog*innen und dem KAI wurde mittels Intraklassenkorrelationskoeffizient (ICC) bestimmt und mithilfe von SPSS Version 25.0 (Chicago, IL, USA) ausgewertet.

3.2.7.2 Ergebnisse

Der Intraklassenkorrelationskoeffizient (ICC) zur Messung der Übereinstimmung zwischen dem KAI und der zuvor berichteten Ground Truth in der DL-Testserie betrug 0,90 (95 %-Konfidenzintervall: 0,85–0,94).

In der DL-Validierungsserie interpretierten alle drei Patholog*innen jeweils drei Hotspot-Regionen pro Tumor, die im Durchschnitt 225 Tumorzellen pro Hotspot enthielten (Median: 223, Spannweite: 182–279, berechnet mit dem KAI). Der ICC zur Messung der Übereinstimmung zwischen den Patholog*innen bei der Bewertung des Ki-67 PI betrug 0,84 (95 %-Konfidenzintervall: 0,66–0,91).

Wurden die Ki-67 PI-Werte der drei Patholog*innen gemittelt und mit den Ergebnissen des KAI verglichen, ergab sich ein ICC von 0,89 (95 %-Konfidenzintervall: 0,78–0,94).

Bei 46 % der Tumoren (26 von 57) bestand kein Unterschied zwischen dem Mittelwert der drei Patholog*innen und dem KAI. Bei sieben Tumoren (12 %) war der vom KAI berechnete Ki-67 PI um 1 % niedriger. Bei den übrigen 24 Tumoren (42 %) lag der Wert des KAI höher, mit einem durchschnittlichen Unterschied von 3 % (Median: 2 %, Spannweite: 1–9 %).

Der KAI ermittelte bei 46 % der Tumoren denselben Ki-67 PI-Wert wie die Patholog*innen, bei 12 % einen um ein Prozent niedrigeren Wert und bei 42 % der Tumoren einen im Durchschnitt um 3 % höheren Ki-67 PI. Letzteres betraf Tumoren mit leichten Fokussierungsproblemen beim Scannen und überlappenden Zellen, wodurch der KAI weniger Ki-67-negative Tumorzellen identifizierte als die Patholog*innen. Zusätzlich erkannte der KAI einige nur schwach gefärbte Tumorzellen als Ki-67-positiv. Diese Faktoren führten insgesamt zu einem höheren Ki-67 PI im Vergleich zur pathologischen Auswertung. In einzelnen Fällen identifizierten die Patholog*innen weniger negative Tumorzellen als der KAI, was zu einem höheren Ki-67-PI-Wert seitens der Patholog*innen führte. Im Gegensatz dazu erkannte der KAI keine nicht-tumoralen Ki-67-positiven Zellen oder Zellen mit

Hintergrundpigment, da sein Training ausschließlich auf Tumorzellen ausgerichtet war.

Nach Einschätzung der Autor*innen können KI-gestützte Bildanalysealgorithmen bei Integration in die Praxis die Bestimmung des Ki-67 PI objektiver und genauer machen und Patholog*innen unterstützen, jedoch nicht ersetzen. Der webbasierte Ansatz könnte in multizentrischen klinischen Studien nützlich sein, in denen eine objektive Bestimmung des Ki-67 PI entscheidend ist.

4 Diskussion

4.1 Trennschärfe

Wie in der WHO-Klassifikation 2021 beschrieben, liegt eine Stärke von Ki-67 in der Diagnostik der Tumorentität in kleinen Biopsien und Proben mit Quetschungsartefakten. Mit der zerstörten Gewebearchitektur und den schwer erkennbaren Mitosefiguren bietet Ki-67 hier großen Mehrwert in der Unterscheidung zwischen low-grade Karzinoiden und high-grade Karzinomen. Auch in der S3-Leitlinie wird die Angabe der Zellproliferationsrate in Form des Ki-67 Index empfohlen (222).

Ki-67 PI-Werte für genaue, definitive Cutoffs zwischen TC, AC, LCNEC und SCLC konnten bei der Erstellung der WHO-Klassifikation 2021 nicht gefunden werden. Stattdessen wurde basierend auf Expert*innenmeinungen beschlossen, dass Tumore mit einem Ki-67-Proliferationsindex $> 5\%$ eher AC sind als TC und solche mit einem Index $> 30\%$ eher hochgradig (LNEC oder SCLC) als AC (93). Die Studienlage hat sich aufgrund heterogener Herangehensweisen und fehlender Standardisierung nicht geändert. Die Differenzierung zwischen TC und AC ist aufgrund der Seltenheit von AC schwer mit Studien zu bewerten. Die Mitosezahl ist langjährig in den diagnostischen Kriterien etabliert, die Erfahrungswerte sind groß. In chirurgischen Resektaten steht die Mitosezahl der Proliferationsindexbestimmung in der Häufigkeit der Fälle in nichts nach.

4.2 Prognoseerstellung

Es wurde gezeigt, dass ein höherer Ki-67-Index mit einer ungünstigeren Prognose und einem kürzeren Überleben assoziiert ist (226). Swarts et al konnten jedoch keine signifikant unabhängige Prognosekraft von Ki-67 nachweisen, wenn Tumorstadium und Resektionsstatus berücksichtigt wurden. Moonen et al. beschrieben wiederum, dass Ki-67 in Kombination mit weiteren immunhistochemischen Markern (z. B. CD44, OTP, p16) eine verbesserte diagnostische und prognostische Aussagekraft bei chirurgisch resezierten neuroendokrinen Lungentumoren bieten kann (95).

4.3 Standardisierung

Ein wiederkehrender Schwachpunkt der Studienlage sind die Unterschiede in der Methodik. Ein zentraler Aspekt ist die Zählweise: Während in manchen Arbeiten die manuelle Zählung durch Patholog*innen erfolgt, nutzen andere Studien moderne Verfahren wie die digitale Bildanalyse. Hinzu kommt die Auswahl der Tumorareale. Einige Autor*innen fokussieren sich auf sogenannte „hot-spots“, also Bereiche mit besonders hoher Proliferationsrate, während andere den Durchschnittswert über verschiedene Tumorareale hinweg berechnen.

Wie von Versterinen et al. (245) in ihrer Studie gezeigt, können digitale, KI-basierte Auswertungssysteme eingesetzt werden, um die manuelle Zählung durch Patholog*innen zu ergänzen oder zu ersetzen. Diese Systeme bieten den Vorteil einer höheren Reproduzierbarkeit und können die Interobserver-Variabilität reduzieren.

Es bestehen Unterschiede zwischen verschiedenen Softwarelösungen, und es fehlen standardisierte Verfahren für den klinischen Alltag. Jedoch konnten die Anwendbarkeit mit Reproduzierbaren Ergebnissen und Zeitersparnis gezeigt werden.

4.4 Zukunftsausblick

Herangehensweisen wie von Acs et al. (265) mit detailliertem Leitfaden und Programmen für die Erstellung von Ki-67-Bewertungsalgorithmen, angepasst an die jeweiligen Institutionellen Gegebenheiten könnten in Zukunft die Interobserver-Variabilität herabsetzen. Mit einmal eingerichteten und regelmäßig kalibrierten Systemen könnten für jeden Fall Ki-67 PI-Bestimmungen durchgeführt werden. Wie von Dawe et al.(244) in ihrer Arbeit belegt sind DIA-Systeme mit großer Zeitersparnis verbunden. Der Mehrwert wären also zum einen nach der Methodik vergleichbarere und aufgrund der häufigeren KI-67 PI-Bestimmung umfassendere Daten.

4.5 Fazit

Ki-67 ist ein Entitäten-übergreifender immunhistochemischer Marker, dessen Bedeutung in der Klassifizierung von neuroendokrinen Lungentumoren historisch

stetig zugenommen hat. Wie jedes Diagnosewerkzeug hat er seine Grenzen. Die Literatur zeigt erfolgsversprechende Zugewinne bei der Auswertung von Ki-67 mittels digitaler Auswertprogramme und künstlicher Intelligenz. Für eine mehrwertbringende universelle Anwendung in der Klinik wäre eine Standardisierung der Ki-67 PI-Erstellung sinnvoll. Die Bedeutung einzelner Marker könnte abnehmen und stattdessen die Kombination verschiedener Marker, prozessiert durch maschinelles Lernen, die Zukunft der Pathologie sein. Hier könnte Ki-67 als Marker im Panel der Mustererkennung seinen Platz finden. Inwiefern dieser Mehrwert in der klinischen Praxis von Relevanz ist und ob dieser erstrebenswert ist, wird durch zukünftige Expert*innengremien und Leitlinien entschieden werden.

4.6 Limitationen

Das atypische Karzinoid ist sehr selten, dementsprechend sind die Studien zu Karzinoiden von sehr kleinen Fallzahlen geprägt. Hierunter leidet die Aussagekraft.

Des Weiteren wurde diese Arbeit von einem Studenten mit keiner praktischen Erfahrung im pathologischen Alltag geschrieben. Die Schlussfolgerungen konnten also nur auf rein theoretischer Basis und durch Studium vorliegender Literatur getroffen werden.

5 Literaturverzeichnis

1. Hackl M IP. Zahl der Krebskranken steigt bis 2030 um 15 %. Statistik Austria. 2024.
2. Hackl M W-FS. Lungenkrebs: die zweithäufigste Krebserkrankung bei Männern und Frauen. krebs:hilfe!DIGITAL [Internet]. 2023 [cited 2025 07.07.2025]. Available from: <https://www.medmedia.at/krebs-hilfe/krebshilfe/lungenkrebs-die-zweithaeufigste-krebserkrankung-bei-maennern-und-frauen/>.
3. Pirker R, Prosch H, Popper H, Klepetko W, Dieckmann K, Burghuber OC, et al. Lung Cancer in Austria. *Journal of Thoracic Oncology*. 2021;16(5):725-33.
4. Koning HJd, Aalst CMvd, Jong PAd, Scholten ET, Nackaerts K, Heuvelmans MA, et al. Reduced Lung-Cancer Mortality with Volume CT Screening in a Randomized Trial. *New England Journal of Medicine*. 2020;382(6):503-13.
5. Travis WD. Advances in neuroendocrine lung tumors. *Annals of Oncology*. 2010;21:vii65-vii71.
6. Modlin IM, Champaneria MC, Bornschein J, Kidd M. Evolution of the Diffuse Neuroendocrine System – Clear Cells and Cloudy Origins. *Neuroendocrinology*. 2006;84(2):69-82.
7. Lüllmann-Rauch R, Asan E. Epithel der Luftwege. In: Lüllmann-Rauch R, Asan E, editors. *Taschenlehrbuch Histologie*. 7., vollständig überarbeitete Auflage ed: Thieme; 2024.
8. Noguchi M, Furukawa KT, Morimoto M. Pulmonary neuroendocrine cells: physiology, tissue homeostasis and disease. *Disease Models & Mechanisms*. 2020;13(12).
9. Hogan BL, Barkauskas CE, Chapman HA, Epstein JA, Jain R, Hsia CC, et al. Repair and regeneration of the respiratory system: complexity, plasticity, and mechanisms of lung stem cell function. *Cell Stem Cell*. 2014;15(2):123-38.
10. Travaglini KJ, Nabhan AN, Penland L, Sinha R, Gillich A, Sit RV, et al. A molecular cell atlas of the human lung from single-cell RNA sequencing. *Nature*. 2020;587(7835):619-25.
11. Cutz E, Chan W, Sonstegard KS. Identification of neuro-epithelial bodies in rabbit fetal lungs by scanning electron microscopy: a correlative light, transmission and scanning electron microscopic study. *Anat Rec*. 1978;192(3):459-66.
12. Noguchi M, Sumiyama K, Morimoto M. Directed Migration of Pulmonary Neuroendocrine Cells toward Airway Branches Organizes the Stereotypic Location of Neuroepithelial Bodies. *Cell Rep*. 2015;13(12):2679-86.
13. Kuo CS, Krasnow MA. Formation of a Neurosensory Organ by Epithelial Cell Slithering. *Cell*. 2015;163(2):394-405.
14. Ouadah Y, Rojas ER, Riordan DP, Capostagno S, Kuo CS, Krasnow MA. Rare Pulmonary Neuroendocrine Cells Are Stem Cells Regulated by Rb, p53, and Notch. *Cell*. 2019;179(2):403-16.e23.
15. Stupnikov MR, Yang Y, Mori M, Lu J, Cardoso WV. Jagged and Delta-like ligands control distinct events during airway progenitor cell differentiation. *Elife*. 2019;8.
16. Jia S, Wildner H, Birchmeier C. Insm1 controls the differentiation of pulmonary neuroendocrine cells by repressing Hes1. *Dev Biol*. 2015;408(1):90-8.
17. Rudin CM, Durinck S, Stawiski EW, Poirier JT, Modrusan Z, Shames DS, et al. Comprehensive genomic analysis identifies SOX2 as a frequently amplified gene in small-cell lung cancer. *Nat Genet*. 2012;44(10):1111-6.

18. Schaffer BE, Park KS, Yiu G, Conklin JF, Lin C, Burkhart DL, et al. Loss of p130 accelerates tumor development in a mouse model for human small-cell lung carcinoma. *Cancer Res.* 2010;70(10):3877-83.
19. Hernández de Córdoba I, Mielgo-Rubio X, Cejas P, Palomar Ramos J, Garrido-Rubiales B, Falagán Martínez S, et al. Transformation to Neuroendocrine Phenotype in Non-Small-Cell Lung Carcinoma: A Literature Review. *Int J Mol Sci.* 2025;26(11).
20. Liu X, Zhang L, Cao G, Xu K, Wang J, Zhang H. Heterogeneity and co-occurrence of resistance mechanisms in EGFR-TKI-induced NSCLC to SCLC transformation: a case report. *AME Case Rep.* 2025;9:85.
21. Lázaro S, Pérez-Crespo M, Lorz C, Bernardini A, Oteo M, Enguita AB, et al. Differential development of large-cell neuroendocrine or small-cell lung carcinoma upon inactivation of 4 tumor suppressor genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(44):22300-6.
22. Akeno N, Reece AL, Callahan M, Miller AL, Kim RG, He D, et al. TRP53 Mutants Drive Neuroendocrine Lung Cancer Through Loss-of-Function Mechanisms with Gain-of-Function Effects on Chemotherapy Response. *Mol Cancer Ther.* 2017;16(12):2913-26.
23. Mengoli MC, Rossi G, Cavazza A, Franco R, Marino FZ, Migaldi M, et al. Diffuse Idiopathic Pulmonary Neuroendocrine Cell Hyperplasia (DIPNECH) Syndrome and Carcinoid Tumors With/Without NECH: A Clinicopathologic, Radiologic, and Immunomolecular Comparison Study. *Am J Surg Pathol.* 2018;42(5):646-55.
24. Samhouri BF, Halfdanarson TR, Koo CW, McCarthy C, Yi ES, Thomas CF, et al. DIPNECH: pragmatic approach, uncertainties, notable associations, and a proposal for an improved definition. *Endocr Relat Cancer.* 2023;30(10).
25. Carr LL, Chung JH, Duarte Achcar R, Lesic Z, Rho JY, Yagihashi K, et al. The clinical course of diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia. *Chest.* 2015;147(2):415-22.
26. Hayes AR, Luong TV, Banks J, Shah H, Watkins J, Lim E, et al. Diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia (DIPNECH): Prevalence, clinicopathological characteristics and survival outcome in a cohort of 311 patients with well-differentiated lung neuroendocrine tumours. *J Neuroendocrinol.* 2022;34(10):e13184.
27. Samhouri BF, Ryu JH. Underappreciated causes of obstructive lung disease. *Lancet Respir Med.* 2023;11(2):e14.
28. Prieto M, Chassagnon G, Lupo A, Charpentier MC, Cabanne E, Groussin L, et al. Lung carcinoid tumors with Diffuse Idiopathic Pulmonary NeuroEndocrine Cell Hyperplasia (DIPNECH) exhibit pejorative pathological features. *Lung Cancer.* 2021;156:117-21.
29. Sazonova O, Manem V, Béland C, Hamel MA, Lacasse Y, Lévesque MH, et al. Development and Validation of Diffuse Idiopathic Pulmonary Neuroendocrine Hyperplasia Diagnostic Criteria. *JTO Clin Res Rep.* 2020;1(4):100078.
30. Marchevsky AM, Wirtschafter E, Walts AE. The spectrum of changes in adults with multifocal pulmonary neuroendocrine proliferations: what is the minimum set of pathologic criteria to diagnose DIPNECH? *Hum Pathol.* 2015;46(2):176-81.
31. Samhouri BF, Azadeh N, Halfdanarson TR, Yi ES, Ryu JH. Constrictive bronchiolitis in diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia. *ERJ Open Res.* 2020;6(4).
32. Hurabielle C, Taillé C, Prévot G, Russier M, Didier A, Girodet PO, et al. De-labelling severe asthma diagnosis: the challenge of DIPNECH. *ERJ Open Res.* 2022;8(1).
33. Caplin ME, Baudin E, Ferolla P, Filosso P, Garcia-Yuste M, Lim E, et al. Pulmonary neuroendocrine (carcinoid) tumors: European Neuroendocrine Tumor Society expert

consensus and recommendations for best practice for typical and atypical pulmonary carcinoids. *Ann Oncol.* 2015;26(8):1604-20.

34. Heaney LG, Perez de Llano L, Al-Ahmad M, Backer V, Busby J, Canonica GW, et al. Eosinophilic and Noneosinophilic Asthma: An Expert Consensus Framework to Characterize Phenotypes in a Global Real-Life Severe Asthma Cohort. *Chest.* 2021;160(3):814-30.

35. Swied MY, Azhar W, Alkhabaz A, Zaidi F. Diffuse Idiopathic Pulmonary Neuroendocrine Cell Hyperplasia: A Blanked Out Pulmonary Neuroendocrine Tumor. *Case Rep Oncol.* 2024;17(1):581-6.

36. Nicholson AG, Tsao MS, Beasley MB, Borczuk AC, Brambilla E, Cooper WA, et al. The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since 2015. *J Thorac Oncol.* 2022;17(3):362-87.

37. Rindi G, Klimstra DS, Abedi-Ardekani B, Asa SL, Bosman FT, Brambilla E, et al. A common classification framework for neuroendocrine neoplasms: an International Agency for Research on Cancer (IARC) and World Health Organization (WHO) expert consensus proposal. *Mod Pathol.* 2018;31(12):1770-86.

38. Gosain R, Mukherjee S, Yendamuri SS, Iyer R. Management of Typical and Atypical Pulmonary Carcinoids Based on Different Established Guidelines. *Cancers (Basel).* 2018;10(12).

39. Öberg K, Hellman P, Ferolla P, Papotti M. Neuroendocrine bronchial and thymic tumors: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2012;23 Suppl 7:vii120-3.

40. Halperin DM, Shen C, Dasari A, Xu Y, Chu Y, Zhou S, et al. Frequency of carcinoid syndrome at neuroendocrine tumour diagnosis: a population-based study. *Lancet Oncol.* 2017;18(4):525-34.

41. Lococo F, Margaritora S, Cardillo G, Filosso P, Novellis P, Rapicetta C, et al. Bronchopulmonary Carcinoids causing Cushing Syndrome: Results from a Multicentric Study Suggesting a More Aggressive Behavior. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2016;64(2):172-81.

42. Hage R, de la Rivière AB, Seldenrijk CA, van den Bosch JM. Update in pulmonary carcinoid tumors: a review article. *Ann Surg Oncol.* 2003;10(6):697-704.

43. Telega A, Kos-Kudła B, Foltyn W, Blicharz-Dorniak J, Rosiek V. Selected neuroendocrine tumour markers, growth factors and their receptors in typical and atypical bronchopulmonary carcinoids. *Endokrynol Pol.* 2012;63(6):477-82.

44. Rekhtman N. Lung neuroendocrine neoplasms: recent progress and persistent challenges. *Mod Pathol.* 2022;35(Suppl 1):36-50.

45. Rekhtman N. Neuroendocrine tumors of the lung: an update. *Arch Pathol Lab Med.* 2010;134(11):1628-38.

46. Yatabe Y, Dacic S, Borczuk AC, Warth A, Russell PA, Lantuejoul S, et al. Best Practices Recommendations for Diagnostic Immunohistochemistry in Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2019;14(3):377-407.

47. Swartz DR, Henfling ME, Van Neste L, van Suylen RJ, Dingemans AM, Dinjens WN, et al. CD44 and OTP are strong prognostic markers for pulmonary carcinoids. *Clin Cancer Res.* 2013;19(8):2197-207.

48. Papaxoinis G, Nonaka D, O'Brien C, Sanderson B, Krysiak P, Mansoor W. Prognostic Significance of CD44 and Orthopedia Homeobox Protein (OTP) Expression in Pulmonary Carcinoid Tumours. *Endocr Pathol.* 2017;28(1):60-70.

49. Moonen L, Derks J, Dingemans AM, Speel EJ. Orthopedia Homeobox (OTP) in Pulmonary Neuroendocrine Tumors: The Diagnostic Value and Possible Molecular Interactions. *Cancers (Basel)*. 2019;11(10).
50. Centonze G, Maisonneuve P, Simbolo M, Lagano V, Grillo F, Fabbri A, et al. Lung carcinoid tumours: histology and Ki-67, the eternal rivalry. *Histopathology*. 2023;82(2):324-39.
51. Swarts DR, van Suylen RJ, den Bakker MA, van Oosterhout MF, Thunnissen FB, Volante M, et al. Interobserver variability for the WHO classification of pulmonary carcinoids. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(10):1429-36.
52. Roy M, Buehler DG, Zhang R, Schwalbe ML, Baus RM, Salamat MS, et al. Expression of Insulinoma-Associated Protein 1 (INSM1) and Orthopedia Homeobox (OTP) in Tumors with Neuroendocrine Differentiation at Rare Sites. *Endocr Pathol*. 2019;30(1):35-42.
53. Viswanathan K, Borczuk AC, Siddiqui MT. Orthopedia homeobox protein (OTP) is a sensitive and specific marker for primary pulmonary carcinoid tumors in cytologic and surgical specimens. *J Am Soc Cytopathol*. 2019;8(1):39-46.
54. Hanley KZ, Dureau ZJ, Cohen C, Shin DM, Owonikoko TK, Sica GL. Orthopedia homeobox is preferentially expressed in typical carcinoids of the lung. *Cancer Cytopathol*. 2018;126(4):236-42.
55. Yoxtheimer LM, Heymann JJ, Cohen C, Rao RA, Goyal A, Siddiqui MT. Immunohistochemical analysis of OTP and NKX6.1 in neuroendocrine tumors of the lung and pancreas. *Diagn Cytopathol*. 2018;46(12):1010-4.
56. Rosado de Christenson ML, Abbott GF, Kirejczyk WM, Galvin JR, Travis WD. Thoracic carcinoids: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics*. 1999;19(3):707-36.
57. Travis WD, Giroux DJ, Chansky K, Crowley J, Asamura H, Brambilla E, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the inclusion of broncho-pulmonary carcinoid tumors in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2008;3(11):1213-23.
58. Vocino Trucco G, Righi L, Volante M, Papotti M. Updates on lung neuroendocrine neoplasm classification. *Histopathology*. 2024;84(1):67-85.
59. Rekhtman N, Pietanza MC, Hellmann MD, Naidoo J, Arora A, Won H, et al. Next-Generation Sequencing of Pulmonary Large Cell Neuroendocrine Carcinoma Reveals Small Cell Carcinoma-like and Non-Small Cell Carcinoma-like Subsets. *Clin Cancer Res*. 2016;22(14):3618-29.
60. Derks JL, Leblay N, Lantuejoul S, Dingemans AC, Speel EM, Fernandez-Cuesta L. New Insights into the Molecular Characteristics of Pulmonary Carcinoids and Large Cell Neuroendocrine Carcinomas, and the Impact on Their Clinical Management. *J Thorac Oncol*. 2018;13(6):752-66.
61. Simbolo M, Barbi S, Fassan M, Mafficini A, Ali G, Vicentini C, et al. Gene Expression Profiling of Lung Atypical Carcinoids and Large Cell Neuroendocrine Carcinomas Identifies Three Transcriptomic Subtypes with Specific Genomic Alterations. *J Thorac Oncol*. 2019;14(9):1651-61.
62. Savic Prince S, Jonigk D, Bubendorf L. Lunge. In: Höfler G, editor. *Lehrbuch Pathologie* 2024. p. 489-527.
63. Yoon JY, Sigel K, Martin J, Jordan R, Beasley MB, Smith C, et al. Evaluation of the Prognostic Significance of TNM Staging Guidelines in Lung Carcinoid Tumors. *Journal of Thoracic Oncology*. 2019;14(2):184-92.

64. Patané AK, Guma G, Rayá M, Rosales A, Astorino W, Rosenberg M. Pulmonary neuroendocrine carcinoid tumors: Is there a predictive role to the Ki 67 index? *Ann Thorac Med.* 2021;16(3):274-9.
65. Pelosi G, Travis WD. Head-to-head: Should Ki67 proliferation index be included in the formal classification of pulmonary neuroendocrine neoplasms? *Histopathology.* 2024;85(4):535-48.
66. Soldath P, Binderup T, Kjaer A, Knigge U, Langer SW, Petersen RH. Prognostic thresholds of fluorine-18 fluorodeoxyglucose-positron emission tomography mean and maximum standardized uptake values for survival and nodal involvement in lung neuroendocrine neoplasms. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery.* 2024;65(2).
67. Lou F, Sarkaria I, Pietanza C, Travis W, Roh MS, Sica G, et al. Recurrence of pulmonary carcinoid tumors after resection: implications for postoperative surveillance. *Ann Thorac Surg.* 2013;96(4):1156-62.
68. Rea F, Rizzardì G, Zuin A, Marulli G, Nicotra S, Bulf R, et al. Outcome and surgical strategy in bronchial carcinoid tumors: single institution experience with 252 patients. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2007;31(2):186-91.
69. García-Yuste M, Matilla JM, Cañizares MA, Molins L, Guijarro R. Surgical treatment of low and intermediate grade lung net. *J Thorac Dis.* 2017;9(Suppl 15):S1435-s41.
70. Cusumano G, Fournel L, Strano S, Damotte D, Charpentier MC, Galia A, et al. Surgical Resection for Pulmonary Carcinoid: Long-Term Results of Multicentric Study-The Importance of Pathological N Status, More Than We Thought. *Lung.* 2017;195(6):789-98.
71. Cañizares MA, Matilla JM, Cueto A, Algar J, Muguruza I, Moreno-Mata N, et al. Atypical carcinoid tumours of the lung: prognostic factors and patterns of recurrence. *Thorax.* 2014;69(7):648-53.
72. Kayser K, Kayser C, Rahn W, Bovin NV, Gabius HJ. Carcinoid tumors of the lung: immuno- and ligandohistochemistry, analysis of integrated optical density, syntactic structure analysis, clinical data, and prognosis of patients treated surgically. *J Surg Oncol.* 1996;63(2):99-106.
73. De Giorgi U, Fanini F, Amadori D, Cancellieri A, Fiorentini G, Poletti V, et al. Tumorlets in familial history of bronchopulmonary carcinoid. *J Thorac Oncol.* 2011;6(9):1613-4.
74. Detterbeck FC. Management of carcinoid tumors. *Ann Thorac Surg.* 2010;89(3):998-1005.
75. Filosso PL, Rena O, Donati G, Casadio C, Ruffini E, Papalia E, et al. Bronchial carcinoid tumors: surgical management and long-term outcome. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002;123(2):303-9.
76. Klöppel G. Oberndorfer and his successors: from carcinoid to neuroendocrine carcinoma. *Endocr Pathol.* 2007;18(3):141-4.
77. Grapatsas K, Dörr F, Bölükbas S. [Pulmonary Carcinoids: Clinical Approach to a Rare Tumor Entity]. *Zentralbl Chir.* 2025;150(3):307-16.
78. Kaifi JT, Kayser G, Ruf J, Passlick B. The Diagnosis and Treatment of Bronchopulmonary Carcinoid. *Dtsch Arztebl Int.* 2015;112(27-28):479-85.
79. Jeung MY, Gasser B, Gangi A, Charneau D, Ducroq X, Kessler R, et al. Bronchial carcinoid tumors of the thorax: spectrum of radiologic findings. *Radiographics.* 2002;22(2):351-65.

80. Venkitaraman B, Karunanithi S, Kumar A, Khilnani GC, Kumar R. Role of 68Ga-DOTATOC PET/CT in initial evaluation of patients with suspected bronchopulmonary carcinoid. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2014;41(5):856-64.
81. Lococo F, Treglia G. Which is the best strategy for diagnosing bronchial carcinoid tumours? The role of dual tracer PET/CT scan. *Hell J Nucl Med*. 2014;17(1):7-9.
82. Papaporfyriou A, Domayer J, Meilinger M, Firlinger I, Funk GC, Setinek U, et al. Bronchoscopic diagnosis and treatment of endobronchial carcinoid: case report and review of the literature. *Eur Respir Rev*. 2021;30(159).
83. Queiroz RM, Santana DBF, Nastri Filho R, Landell GAM, Félix PR, Valentin MVN. Endobronchial carcinoid tumor: Radiological findings of a clinical case. *Rev Assoc Med Bras (1992)*. 2018;64(1):15-8.
84. Dalar L, Ozdemir C, Abul Y, Sokucu SN, Karasulu L, Urer HN, et al. Endobronchial Treatment of Carcinoid Tumors of the Lung. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2016;64(2):166-71.
85. García-Yuste M, Matilla JM, Cueto A, Paniagua JM, Ramos G, Cañizares MA, et al. Typical and atypical carcinoid tumours: analysis of the experience of the Spanish Multi-centric Study of Neuroendocrine Tumours of the Lung. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2007;31(2):192-7.
86. Leivaditis V, Grapatsas K, Ehle B, Dahm M, Chatzimichalis A, Margaritis E, et al. Modified pericostal suture technique to reduce postoperative pain and provide optimum anatomic restoration after conversion of minimally invasive thoracic surgery to thoracotomy. *Kardiochir Torakochirurgia Pol*. 2023;20(3):193-9.
87. Bölükbas S, Schirren J. Parenchyma-sparing bronchial sleeve resections in trauma, benign and malign diseases. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2010;58(1):32-7.
88. Neuberger M, Hapfelmeier A, Schmidt M, Gesierich W, Reichenberger F, Morresi-Hauf A, et al. Carcinoid tumours of the lung and the 'PEPPS' approach: evaluation of preoperative bronchoscopic tumour debulking as preparation for subsequent parenchyma-sparing surgery. *BMJ Open Respir Res*. 2015;2(1):e000090.
89. Zhang Z, Zhang Y, Feng H, Yao Z, Teng J, Wei D, et al. Is video-assisted thoracic surgery lobectomy better than thoracotomy for early-stage non-small-cell lung cancer? A systematic review and meta-analysis. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2013;44(3):407-14.
90. Limaiem F, Tariq MA, Ismail U, Wallen JM. Lung Carcinoid Tumors. *StatPearls*. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Muhammad Ali Tariq declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Uzma Ismail declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Jason Wallen declares no relevant financial relationships with ineligible companies.: StatPearls Publishing
Copyright © 2025, StatPearls Publishing LLC.; 2025.
91. Singh D, Chen Y, Cummings MA, Milano MT. Inoperable Pulmonary Carcinoid Tumors: Local Control Rates With Stereotactic Body Radiotherapy/Hypofractionated RT With Image-Guided Radiotherapy. *Clin Lung Cancer*. 2019;20(3):e284-e90.
92. Baudin E, Caplin M, Garcia-Carbonero R, Fazio N, Ferolla P, Filosso PL, et al. Lung and thymic carcinoids: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up(☆). *Ann Oncol*. 2021;32(4):439-51.
93. Borczuk AC. WHO Classification of Tumours: thoracic Tumours: International Agency for Research on Cancer; 2021.

94. Reuling E, Naves DD, Daniels JMA, Dickhoff C, Kortman PC, Broeckaert M, et al. Diagnosis of atypical carcinoid can be made on biopsies >4 mm(2) and is accurate. *Virchows Arch*. 2022;480(3):587-93.
95. Moonen L, Derks JL, den Bakker MA, Hillen LM, van Suylen RJ, von der Thüsen JH, et al. OTP, CD44, and Ki-67: A Prognostic Marker Panel for Relapse-Free Survival in Patients with Surgically Resected Pulmonary Carcinoid. *Mod Pathol*. 2025;38(3):100677.
96. Steuer CE, Behera M, Kim S, Chen Z, Saba NF, Pillai RN, et al. Atypical carcinoid tumor of the lung: a surveillance, epidemiology, and end results database analysis. *J Thorac Oncol*. 2015;10(3):479-85.
97. Deng C, Wu SG, Tian Y. Lung Large Cell Neuroendocrine Carcinoma: An Analysis of Patients from the Surveillance, Epidemiology, and End-Results (SEER) Database. *Med Sci Monit*. 2019;25:3636-46.
98. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol*. 2015;10(9):1243-60.
99. Baine MK, Rekhtman N. Multiple faces of pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma: update with a focus on practical approach to diagnosis. *Transl Lung Cancer Res*. 2020;9(3):860-78.
100. Sen T, Dotsu Y, Corbett V, Puri S, Sen U, Boyle TA, et al. Pulmonary neuroendocrine neoplasms: the molecular landscape, therapeutic challenges, and diagnosis and management strategies. *Lancet Oncol*. 2025;26(1):e13-e33.
101. Li M, Yang L, Lu H. Pulmonary Combined Large Cell Neuroendocrine Carcinoma. *Pathol Oncol Res*. 2022;28:1610747.
102. Kinslow CJ, May MS, Saqi A, Shu CA, Chaudhary KR, Wang TJC, et al. Large-Cell Neuroendocrine Carcinoma of the Lung: A Population-Based Study. *Clin Lung Cancer*. 2020;21(2):e99-e113.
103. Derks JL, Hendriks LE, Buikhuisen WA, Groen HJ, Thunnissen E, van Suylen RJ, et al. Clinical features of large cell neuroendocrine carcinoma: a population-based overview. *Eur Respir J*. 2016;47(2):615-24.
104. Beasley MB, Brambilla E, MacMahon H, Osamura R, Papotti M, Rekhtman N, et al. Small cell lung carcinoma. WHO classification of tumours. 5 ed: IARC; 2021. p. 139-43.
105. Thunnissen E, Borczuk AC, Flieder DB, Witte B, Beasley MB, Chung JH, et al. The Use of Immunohistochemistry Improves the Diagnosis of Small Cell Lung Cancer and Its Differential Diagnosis. An International Reproducibility Study in a Demanding Set of Cases. *J Thorac Oncol*. 2017;12(2):334-46.
106. Sakakibara R, Kobayashi M, Takahashi N, Inamura K, Ninomiya H, Wakejima R, et al. Insulinoma-associated Protein 1 (INSM1) Is a Better Marker for the Diagnosis and Prognosis Estimation of Small Cell Lung Carcinoma Than Neuroendocrine Phenotype Markers Such as Chromogranin A, Synaptophysin, and CD56. *Am J Surg Pathol*. 2020;44(6):757-64.
107. Rooper LM, Sharma R, Li QK, Illei PB, Westra WH. INSM1 Demonstrates Superior Performance to the Individual and Combined Use of Synaptophysin, Chromogranin and CD56 for Diagnosing Neuroendocrine Tumors of the Thoracic Cavity. *Am J Surg Pathol*. 2017;41(11):1561-9.
108. Mukhopadhyay S, Dermawan JK, Lanigan CP, Farver CF. Insulinoma-associated protein 1 (INSM1) is a sensitive and highly specific marker of neuroendocrine

differentiation in primary lung neoplasms: an immunohistochemical study of 345 cases, including 292 whole-tissue sections. *Mod Pathol.* 2019;32(1):100-9.

109. Baine MK, Hsieh MS, Lai WV, Egger JV, Jungbluth AA, Daneshbod Y, et al. SCLC Subtypes Defined by ASCL1, NEUROD1, POU2F3, and YAP1: A Comprehensive Immunohistochemical and Histopathologic Characterization. *J Thorac Oncol.* 2020;15(12):1823-35.

110. Huang YH, Klingbeil O, He XY, Wu XS, Arun G, Lu B, et al. POU2F3 is a master regulator of a tuft cell-like variant of small cell lung cancer. *Genes Dev.* 2018;32(13-14):915-28.

111. Rudin CM, Poirier JT, Byers LA, Dive C, Dowlati A, George J, et al. Molecular subtypes of small cell lung cancer: a synthesis of human and mouse model data. *Nature Reviews Cancer.* 2019;19(5):289-97.

112. Zhu Y, Li S, Wang H, Ren W, Chi K, Wu J, et al. Molecular subtypes, predictive markers and prognosis in small-cell lung carcinoma. *J Clin Pathol.* 2024;78(1):42-50.

113. Go SI, Yang JW, Jeong EJ, Lee WJ, Park S, Song DH, et al. Redefining YAP1 in small cell lung cancer: shifting from a dominant subtype marker to a favorable prognostic indicator. *Transl Lung Cancer Res.* 2024;13(8):1768-79.

114. Gay CM, Stewart CA, Park EM, Diao L, Groves SM, Heeke S, et al. Patterns of transcription factor programs and immune pathway activation define four major subtypes of SCLC with distinct therapeutic vulnerabilities. *Cancer Cell.* 2021;39(3):346-60.e7.

115. Kraywinkel K, Barnes B. Epidemiologie des kleinzelligen Lungenkarzinoms in Deutschland. *Der Onkologe.* 2017;23(5):334-9.

116. Pesch B, Kendzia B, Gustavsson P, Jöckel KH, Johnen G, Pohlabeln H, et al. Cigarette smoking and lung cancer--relative risk estimates for the major histological types from a pooled analysis of case-control studies. *Int J Cancer.* 2012;131(5):1210-9.

117. Marcoux N, Gettinger SN, O'Kane G, Arbour KC, Neal JW, Husain H, et al. EGFR-Mutant Adenocarcinomas That Transform to Small-Cell Lung Cancer and Other Neuroendocrine Carcinomas: Clinical Outcomes. *J Clin Oncol.* 2019;37(4):278-85.

118. Zhang S-L, Zhang C-Y, Chen Y-Q, Li Y-F, Xie Z, Zhang X-C, et al. Expression of EGFR-mutant proteins and genomic evolution in EGFR-mutant transformed small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Disease.* 2023;15(9):4620-35.

119. Offin M, Chan JM, Tenet M, Rizvi HA, Shen R, Riely GJ, et al. Concurrent RB1 and TP53 Alterations Define a Subset of EGFR-Mutant Lung Cancers at risk for Histologic Transformation and Inferior Clinical Outcomes. *J Thorac Oncol.* 2019;14(10):1784-93.

120. Oser MG, MacPherson D, Oliver TG, Sage J, Park KS. Genetically-engineered mouse models of small cell lung cancer: the next generation. *Oncogene.* 2024;43(7):457-69.

121. Shaurova T, Zhang L, Goodrich DW, Hershberger PA. Understanding Lineage Plasticity as a Path to Targeted Therapy Failure in EGFR-Mutant Non-small Cell Lung Cancer. *Front Genet.* 2020;11:281.

122. Ding X, Shi MX, Liu D, Cao JX, Zhang KX, Zhang RD, et al. Transformation to small cell lung cancer is irrespective of EGFR and accelerated by SMAD4-mediated ASCL1 transcription independently of RB1 in non-small cell lung cancer. *Cell Commun Signal.* 2024;22(1):45.

123. Wiedenmann B, Franke WW. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell.* 1985;41(3):1017-28.

124. Wiedenmann B, Franke WW, Kuhn C, Moll R, Gould VE. Synaptophysin: a marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(10):3500-4.
125. Wick MR. Immunohistochemical approaches to the diagnosis of undifferentiated malignant tumors. *Ann Diagn Pathol*. 2008;12(1):72-84.
126. Gut P, Czarnywojtek A, Fischbach J, Bączyk M, Ziemnicka K, Wrotkowska E, et al. Chromogranin A - unspecific neuroendocrine marker. Clinical utility and potential diagnostic pitfalls. *Arch Med Sci*. 2016;12(1):1-9.
127. Banks P, Helle K. The release of protein from the stimulated adrenal medulla. *Biochem J*. 1965;97(3):40c-1c.
128. Blaschko H, Comline RS, Schneider FH, Silver M, Smith AD. Secretion of a chromaffin granule protein, chromogranin, from the adrenal gland after splanchnic stimulation. *Nature*. 1967;215(5096):58-9.
129. Gallo MP, Levi R, Ramella R, Brero A, Boero O, Tota B, et al. Endothelium-derived nitric oxide mediates the antiadrenergic effect of human vasostatin-1 in rat ventricular myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292(6):H2906-12.
130. Fasciotto BH, Trauss CA, Greeley GH, Cohn DV. Parastatin (porcine chromogranin A347-419), a novel chromogranin A-derived peptide, inhibits parathyroid cell secretion. *Endocrinology*. 1993;133(2):461-6.
131. Helman LJ, Ahn TG, Levine MA, Allison A, Cohen PS, Cooper MJ, et al. Molecular cloning and primary structure of human chromogranin A (secretory protein I) cDNA. *J Biol Chem*. 1988;263(23):11559-63.
132. Taylor CV, Taupenot L, Mahata SK, Mahata M, Wu H, Yasothornsrikul S, et al. Formation of the catecholamine release-inhibitory peptide catestatin from chromogranin A. Determination of proteolytic cleavage sites in hormone storage granules. *J Biol Chem*. 2000;275(30):22905-15.
133. Bílek R, Šafařík L, Ciprová V, Vlcek P, Lisá L. Chromogranin A, a member of neuroendocrine secretory proteins as a selective marker for laboratory diagnosis of pheochromocytoma. *Physiol Res*. 2008;57 Suppl 1:S171-s9.
134. Cetin Y, Aunis D, Bader MF, Galindo E, Jörns A, Bargsten G, et al. Chromostatin, a chromogranin A-derived bioactive peptide, is present in human pancreatic insulin (beta) cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(6):2360-4.
135. Van Acker HH, Capsomidis A, Smits EL, Van Tendeloo VF. CD56 in the Immune System: More Than a Marker for Cytotoxicity? *Front Immunol*. 2017;8:892.
136. Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, Prediger EA, Brackenbury R, Edelman GM. Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science*. 1987;236(4803):799-806.
137. Ditlevsen DK, Povlsen GK, Berezin V, Bock E. NCAM-induced intracellular signaling revisited. *J Neurosci Res*. 2008;86(4):727-43.
138. Skog MS, Nystedt J, Korhonen M, Anderson H, Lehti TA, Pajunen MI, et al. Expression of neural cell adhesion molecule and polysialic acid in human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7(1):113.
139. He H, Luthringer DJ, Hui P, Lau SK, Weiss LM, Chu PG. Expression of CD56 and WT1 in ovarian stroma and ovarian stromal tumors. *Am J Surg Pathol*. 2008;32(6):884-90.
140. Teicher BA. Targets in small cell lung cancer. *Biochem Pharmacol*. 2014;87(2):211-9.

141. Pressey JG, Adams J, Harkins L, Kelly D, You Z, Lamb LS, Jr. In vivo expansion and activation of $\gamma\delta$ T cells as immunotherapy for refractory neuroblastoma: A phase 1 study. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(39):e4909.
142. Platonova S, Cherfils-Vicini J, Damotte D, Crozet L, Vieillard V, Validire P, et al. Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Res*. 2011;71(16):5412-22.
143. Kimura S, Hara Y, Pineau T, Fernandez-Salguero P, Fox CH, Ward JM, et al. The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes Dev*. 1996;10(1):60-9.
144. Minoo P, Su G, Drum H, Bringas P, Kimura S. Defects in tracheoesophageal and lung morphogenesis in Nkx2.1(-/-) mouse embryos. *Dev Biol*. 1999;209(1):60-71.
145. Yatabe Y, Mitsudomi T, Takahashi T. TTF-1 expression in pulmonary adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2002;26(6):767-73.
146. Tsao MS, Asamura H, Borczuk AC, Dacic S, Devesa SS, Kerr KM, et al. WHO classification of tumours. 5 ed. Lyon: IARC; 2021. p. 20-8.
147. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983;31(1):13-20.
148. Booth DG, Earnshaw WC. Ki-67 and the Chromosome Periphery Compartment in Mitosis. *Trends Cell Biol*. 2017;27(12):906-16.
149. Cuylen S, Blaukopf C, Politi AZ, Müller-Reichert T, Neumann B, Poser I, et al. Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature*. 2016;535(7611):308-12.
150. Takagi M, Ono T, Natsume T, Sakamoto C, Nakao M, Saitoh N, et al. Ki-67 and condensins support the integrity of mitotic chromosomes through distinct mechanisms. *J Cell Sci*. 2018;131(6).
151. Traut W, Endl E, Scholzen T, Gerdes J, Winking H. The temporal and spatial distribution of the proliferation associated Ki-67 protein during female and male meiosis. *Chromosoma*. 2002;111(3):156-64.
152. Mrouj K, Andrés-Sánchez N, Dubra G, Singh P, Sobiecki M, Chahar D, et al. Ki-67 regulates global gene expression and promotes sequential stages of carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(10).
153. Pelosi G, Rodriguez J, Viale G, Rosai J. Typical and atypical pulmonary carcinoid tumor overdiagnosed as small-cell carcinoma on biopsy specimens: a major pitfall in the management of lung cancer patients. *Am J Surg Pathol*. 2005;29(2):179-87.
154. Pelosi G, Sonzogni A, Harari S, Albin A, Bresaola E, Marchiò C, et al. Classification of pulmonary neuroendocrine tumors: new insights. *Transl Lung Cancer Res*. 2017;6(5):513-29.
155. Rekhtman N, Desmeules P, Litvak AM, Pietanza MC, Santos-Zabala ML, Ni A, et al. Stage IV lung carcinoids: spectrum and evolution of proliferation rate, focusing on variants with elevated proliferation indices. *Mod Pathol*. 2019;32(8):1106-22.
156. Pelosi G, Rindi G, Travis WD, Papotti M. Ki-67 antigen in lung neuroendocrine tumors: unraveling a role in clinical practice. *J Thorac Oncol*. 2014;9(3):273-84.
157. Rindi G, Klersy C, Inzani F, Fellegara G, Ampollini L, Ardizzoni A, et al. Grading the neuroendocrine tumors of the lung: an evidence-based proposal. *Endocr Relat Cancer*. 2014;21(1):1-16.

158. Pelosi G, Massa F, Gatti G, Righi L, Volante M, Birocco N, et al. Ki-67 Evaluation for Clinical Decision in Metastatic Lung Carcinoids: A Proof of Concept. *Clin Pathol.* 2019;12:2632010x19829259.
159. Oka N, Kasajima A, Konukiewitz B, Sakurada A, Okada Y, Kameya T, et al. Classification and Prognostic Stratification of Bronchopulmonary Neuroendocrine Neoplasms. *Neuroendocrinology.* 2020;110(5):393-403.
160. Fulawka L, Blaszczyk J, Tabakov M, Halon A. Assessment of Ki-67 proliferation index with deep learning in DCIS (ductal carcinoma in situ). *Sci Rep.* 2022;12(1):3166.
161. Guillemot F, Lo LC, Johnson JE, Auerbach A, Anderson DJ, Joyner AL. Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell.* 1993;75(3):463-76.
162. Borges M, Linnoila RI, van de Velde HJ, Chen H, Nelkin BD, Mabry M, et al. An achaete-scute homologue essential for neuroendocrine differentiation in the lung. *Nature.* 1997;386(6627):852-5.
163. Ito T, Udaka N, Yazawa T, Okudela K, Hayashi H, Sudo T, et al. Basic helix-loop-helix transcription factors regulate the neuroendocrine differentiation of fetal mouse pulmonary epithelium. *Development.* 2000;127(18):3913-21.
164. Morimoto M, Nishinakamura R, Saga Y, Kopan R. Different assemblies of Notch receptors coordinate the distribution of the major bronchial Clara, ciliated and neuroendocrine cells. *Development.* 2012;139(23):4365-73.
165. Osada H, Tomida S, Yatabe Y, Tatematsu Y, Takeuchi T, Murakami H, et al. Roles of achaete-scute homologue 1 in DKK1 and E-cadherin repression and neuroendocrine differentiation in lung cancer. *Cancer Res.* 2008;68(6):1647-55.
166. Fujino K, Motooka Y, Hassan WA, Ali Abdalla MO, Sato Y, Kudoh S, et al. Insulinoma-Associated Protein 1 Is a Crucial Regulator of Neuroendocrine Differentiation in Lung Cancer. *Am J Pathol.* 2015;185(12):3164-77.
167. Meder L, König K, Ozretić L, Schultheis AM, Ueckerth F, Ade CP, et al. NOTCH, ASCL1, p53 and RB alterations define an alternative pathway driving neuroendocrine and small cell lung carcinomas. *Int J Cancer.* 2016;138(4):927-38.
168. Sriuranpong V, Borges MW, Ravi RK, Arnold DR, Nelkin BD, Baylin SB, et al. Notch signaling induces cell cycle arrest in small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* 2001;61(7):3200-5.
169. Osada H, Tatematsu Y, Yatabe Y, Horio Y, Takahashi T. ASH1 gene is a specific therapeutic target for lung cancers with neuroendocrine features. *Cancer Res.* 2005;65(23):10680-5.
170. Jiang T, Collins BJ, Jin N, Watkins DN, Brock MV, Matsui W, et al. Achaete-scute complex homologue 1 regulates tumor-initiating capacity in human small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2009;69(3):845-54.
171. Demelash A, Rudrabhatla P, Pant HC, Wang X, Amin ND, McWhite CD, et al. Achaete-scute homologue-1 (ASH1) stimulates migration of lung cancer cells through Cdk5/p35 pathway. *Mol Biol Cell.* 2012;23(15):2856-66.
172. Li Y, Linnoila RI. Multidirectional differentiation of Achaete-Scute homologue-1-defined progenitors in lung development and injury repair. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012;47(6):768-75.
173. Ito T, Kudoh S, Ichimura T, Fujino K, Hassan WA, Udaka N. Small cell lung cancer, an epithelial to mesenchymal transition (EMT)-like cancer: significance of inactive Notch

- signaling and expression of achaete-scute complex homologue 1. *Hum Cell*. 2017;30(1):1-10.
174. Tenjin Y, Kudoh S, Kubota S, Yamada T, Matsuo A, Sato Y, et al. Ascl1-induced Wnt11 regulates neuroendocrine differentiation, cell proliferation, and E-cadherin expression in small-cell lung cancer and Wnt11 regulates small-cell lung cancer biology. *Lab Invest*. 2019;99(11):1622-35.
175. Kudoh S, Tenjin Y, Kameyama H, Ichimura T, Yamada T, Matsuo A, et al. Significance of achaete-scute complex homologue 1 (ASCL1) in pulmonary neuroendocrine carcinomas; RNA sequence analyses using small cell lung cancer cells and Ascl1-induced pulmonary neuroendocrine carcinoma cells. *Histochem Cell Biol*. 2020;153(6):443-56.
176. Lee JE, Hollenberg SM, Snider L, Turner DL, Lipnick N, Weintraub H. Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science*. 1995;268(5212):836-44.
177. Li HJ, Kapoor A, Giel-Moloney M, Rindi G, Leiter AB. Notch signaling differentially regulates the cell fate of early endocrine precursor cells and their maturing descendants in the mouse pancreas and intestine. *Dev Biol*. 2012;371(2):156-69.
178. Kim WY, Fritsch B, Serls A, Bakel LA, Huang EJ, Reichardt LF, et al. NeuroD-null mice are deaf due to a severe loss of the inner ear sensory neurons during development. *Development*. 2001;128(3):417-26.
179. Jahan I, Pan N, Kersigo J, Fritsch B. Neurod1 suppresses hair cell differentiation in ear ganglia and regulates hair cell subtype development in the cochlea. *PLoS One*. 2010;5(7):e11661.
180. Li HJ, Ray SK, Singh NK, Johnston B, Leiter AB. Basic helix-loop-helix transcription factors and enteroendocrine cell differentiation. *Diabetes Obes Metab*. 2011;13 Suppl 1(01):5-12.
181. Mutoh H, Naya FJ, Tsai MJ, Leiter AB. The basic helix-loop-helix protein BETA2 interacts with p300 to coordinate differentiation of secretin-expressing enteroendocrine cells. *Genes Dev*. 1998;12(6):820-30.
182. Pataskar A, Jung J, Smialowski P, Noack F, Calegari F, Straub T, et al. NeuroD1 reprograms chromatin and transcription factor landscapes to induce the neuronal program. *Embo j*. 2016;35(1):24-45.
183. Neptune ER, Podowski M, Calvi C, Cho JH, Garcia JG, Tudor R, et al. Targeted disruption of NeuroD, a proneural basic helix-loop-helix factor, impairs distal lung formation and neuroendocrine morphology in the neonatal lung. *J Biol Chem*. 2008;283(30):21160-9.
184. Jimbo N, Ohbayashi C, Fujii T, Takeda M, Mitsui S, Tanaka Y, et al. The expression of YAP1 and other transcription factors contributes to lineage plasticity in combined small cell lung carcinoma. *J Pathol Clin Res*. 2024;10(5):e70001.
185. Matsumoto I, Ohmoto M, Narukawa M, Yoshihara Y, Abe K. Skn-1a (Pou2f3) specifies taste receptor cell lineage. *Nat Neurosci*. 2011;14(6):685-7.
186. Yamaguchi T, Yamashita J, Ohmoto M, Aoudé I, Ogura T, Luo W, et al. Skn-1a/Pou2f3 is required for the generation of Trpm5-expressing microvillous cells in the mouse main olfactory epithelium. *BMC Neurosci*. 2014;15:13.
187. Gerbe F, Sidot E, Smyth DJ, Ohmoto M, Matsumoto I, Dardalhon V, et al. Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature*. 2016;529(7585):226-30.

188. Yamashita J, Ohmoto M, Yamaguchi T, Matsumoto I, Hirota J. Skn-1a/Pou2f3 functions as a master regulator to generate Trpm5-expressing chemosensory cells in mice. *PLoS One*. 2017;12(12):e0189340.
189. von Moltke J, Ji M, Liang HE, Locksley RM. Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit. *Nature*. 2016;529(7585):221-5.
190. Howitt MR, Lavoie S, Michaud M, Blum AM, Tran SV, Weinstock JV, et al. Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. *Science*. 2016;351(6279):1329-33.
191. Kaske S, Krasteva G, König P, Kummer W, Hofmann T, Gudermann T, et al. TRPM5, a taste-signaling transient receptor potential ion-channel, is a ubiquitous signaling component in chemosensory cells. *BMC Neurosci*. 2007;8:49.
192. Maleki Z, Nadella A, Nadella M, Patel G, Patel S, Kholová I. INSM1, a Novel Biomarker for Detection of Neuroendocrine Neoplasms: Cytopathologists' View. *Diagnostics (Basel)*. 2021;11(12).
193. Lan MS, Breslin MB. Structure, expression, and biological function of INSM1 transcription factor in neuroendocrine differentiation. *Faseb j*. 2009;23(7):2024-33.
194. Duggan A, Madathany T, de Castro SC, Gerrelli D, Guddati K, García-Añoveros J. Transient expression of the conserved zinc finger gene INSM1 in progenitors and nascent neurons throughout embryonic and adult neurogenesis. *J Comp Neurol*. 2008;507(4):1497-520.
195. Ames HM, Rooper LM, Laterra JJ, Eberhart CG, Rodriguez FJ. INSM1 Expression Is Frequent in Primary Central Nervous System Neoplasms but Not in the Adult Brain Parenchyma. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2018;77(5):374-82.
196. Mahalakshmi B, Baskaran R, Shanmugavadivu M, Nguyen NT, Velmurugan BK. Insulinoma-associated protein 1 (INSM1): a potential biomarker and therapeutic target for neuroendocrine tumors. *Cell Oncol (Dordr)*. 2020;43(3):367-76.
197. Staaf J, Tran L, Söderlund L, Nodin B, Jirström K, Vidarsdottir H, et al. Diagnostic Value of Insulinoma-Associated Protein 1 (INSM1) and Comparison With Established Neuroendocrine Markers in Pulmonary Cancers. *Arch Pathol Lab Med*. 2020;144(9):1075-85.
198. Yan L, Zhao X, Chang L, Jiang H, Zhang Z. The Significance of Insulinoma-Associated Protein 1 in the Pathological Diagnosis of Small-Cell Lung Cancer in Biopsy Specimens. *Int J Surg Pathol*. 2024;32(6):1082-8.
199. Fiúza UM, Arias AM. Cell and molecular biology of Notch. *J Endocrinol*. 2007;194(3):459-74.
200. Lobry C, Oh P, Aifantis I. Oncogenic and tumor suppressor functions of Notch in cancer: it's NOTCH what you think. *J Exp Med*. 2011;208(10):1931-5.
201. Previs RA, Coleman RL, Harris AL, Sood AK. Molecular pathways: translational and therapeutic implications of the Notch signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res*. 2015;21(5):955-61.
202. Ladi E, Nichols JT, Ge W, Miyamoto A, Yao C, Yang LT, et al. The divergent DSL ligand Dll3 does not activate Notch signaling but cell autonomously attenuates signaling induced by other DSL ligands. *J Cell Biol*. 2005;170(6):983-92.
203. Chapman G, Sparrow DB, Kremmer E, Dunwoodie SL. Notch inhibition by the ligand DELTA-LIKE 3 defines the mechanism of abnormal vertebral segmentation in spondylocostal dysostosis. *Hum Mol Genet*. 2011;20(5):905-16.

204. Deng SM, Yan XC, Liang L, Wang L, Liu Y, Duan JL, et al. The Notch ligand delta-like 3 promotes tumor growth and inhibits Notch signaling in lung cancer cells in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;483(1):488-94.
205. Furuta M, Kikuchi H, Shoji T, Takashima Y, Kikuchi E, Kikuchi J, et al. DLL3 regulates the migration and invasion of small cell lung cancer by modulating Snail. *Cancer Sci.* 2019;110(5):1599-608.
206. Furuta M, Sakakibara-Konishi J, Kikuchi H, Yokouchi H, Nishihara H, Minemura H, et al. Analysis of DLL3 and ASCL1 in Surgically Resected Small Cell Lung Cancer (HOT1702). *Oncologist.* 2019;24(11):e1172-e9.
207. Henke RM, Meredith DM, Borromeo MD, Savage TK, Johnson JE. Ascl1 and Neurog2 form novel complexes and regulate Delta-like3 (Dll3) expression in the neural tube. *Dev Biol.* 2009;328(2):529-40.
208. Augustyn A, Borromeo M, Wang T, Fujimoto J, Shao C, Dospoy PD, et al. ASCL1 is a lineage oncogene providing therapeutic targets for high-grade neuroendocrine lung cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(41):14788-93.
209. Geffers I, Serth K, Chapman G, Jaekel R, Schuster-Gossler K, Cordes R, et al. Divergent functions and distinct localization of the Notch ligands DLL1 and DLL3 in vivo. *J Cell Biol.* 2007;178(3):465-76.
210. Matsuo K, Taniguchi K, Hamamoto H, Inomata Y, Komura K, Tanaka T, et al. Delta-like canonical Notch ligand 3 as a potential therapeutic target in malignancies: A brief overview. *Cancer Sci.* 2021;112(8):2984-92.
211. Hermans BCM, Derks JL, Thunnissen E, van Suylen RJ, den Bakker MA, Groen HJM, et al. DLL3 expression in large cell neuroendocrine carcinoma (LCNEC) and association with molecular subtypes and neuroendocrine profile. *Lung Cancer.* 2019;138:102-8.
212. Yao J, Bergsland E, Aggarwal R, Aparicio A, Beltran H, Crabtree JS, et al. DLL3 as an Emerging Target for the Treatment of Neuroendocrine Neoplasms. *Oncologist.* 2022;27(11):940-51.
213. Wermke M, Gambardella V, Kuboki Y, Felip E, Sanmamed MF, Alese OB, et al. Phase I Dose-Escalation Results for the Delta-Like Ligand 3/CD3 IgG-Like T-Cell Engager Obrixtamig (BI 764532) in Patients With Delta-Like Ligand 3+ Small Cell Lung Cancer or Neuroendocrine Carcinomas. *J Clin Oncol.* 2025:Jco2500363.
214. Sudol M. Yes-associated protein (YAP65) is a proline-rich phosphoprotein that binds to the SH3 domain of the Yes proto-oncogene product. *Oncogene.* 1994;9(8):2145-52.
215. Bertini E, Oka T, Sudol M, Strano S, Blandino G. YAP: at the crossroad between transformation and tumor suppression. *Cell Cycle.* 2009;8(1):49-57.
216. Johnson R, Halder G. The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(1):63-79.
217. Cheng H, Zhang Z, Rodriguez-Barrueco R, Borczuk A, Liu H, Yu J, et al. Functional genomics screen identifies YAP1 as a key determinant to enhance treatment sensitivity in lung cancer cells. *Oncotarget.* 2016;7(20):28976-88.
218. Zhang X, George J, Deb S, Degoutin JL, Takano EA, Fox SB, et al. The Hippo pathway transcriptional co-activator, YAP, is an ovarian cancer oncogene. *Oncogene.* 2011;30(25):2810-22.
219. Pan D. The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev Cell.* 2010;19(4):491-505.

220. Staley BK, Irvine KD. Hippo signaling in Drosophila: recent advances and insights. *Dev Dyn.* 2012;241(1):3-15.
221. Kumar S, Singh N, Gupta P, Kumar R, Mitra S, Bal A. Prognostic Significance of Immunohistochemical Surrogate Molecular Sub-Typing of Small Cell Lung Carcinoma. *Apmis.* 2025;133(6):e70035.
222. DKH LOAD. S3-Leitlinie Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms. Berlin; 2024.
223. Warth A, Fink L, Fisseler-Eckhoff A, Jonigk D, Keller M, Ott G, et al. Interobserver agreement of proliferation index (Ki-67) outperforms mitotic count in pulmonary carcinoids. *Virchows Arch.* 2013;462(5):507-13.
224. Singh S, Bergsland EK, Card CM, Hope TA, Kunz PL, Laidley DT, et al. Commonwealth Neuroendocrine Tumour Research Collaboration and the North American Neuroendocrine Tumor Society Guidelines for the Diagnosis and Management of Patients With Lung Neuroendocrine Tumors: An International Collaborative Endorsement and Update of the 2015 European Neuroendocrine Tumor Society Expert Consensus Guidelines. *Journal of Thoracic Oncology.* 2020;15(10):1577-98.
225. Dermawan JKT, Farver CF. The Role of Histologic Grading and Ki-67 Index in Predicting Outcomes in Pulmonary Carcinoid Tumors. *Am J Surg Pathol.* 2020;44(2):224-31.
226. Swartz DR, Rudelius M, Claessen SM, Cleutjens JP, Seidl S, Volante M, et al. Limited additive value of the Ki-67 proliferative index on patient survival in World Health Organization-classified pulmonary carcinoids. *Histopathology.* 2017;70(3):412-22.
227. Walts AE, Ines D, Marchevsky AM. Limited role of Ki-67 proliferative index in predicting overall short-term survival in patients with typical and atypical pulmonary carcinoid tumors. *Mod Pathol.* 2012;25(9):1258-64.
228. Joseph MG, Shibani A, Panjwani N, Arab A, Shepherd J, Stitt LW, et al. Usefulness of Ki-67, Mitoses, and Tumor Size for Predicting Metastasis in Carcinoid Tumors of the Lung: A Study of 48 Cases at a Tertiary Care Centre in Canada. *Lung Cancer Int.* 2015;2015:545601.
229. Marchiò C, Gatti G, Massa F, Bertero L, Filosso P, Pelosi G, et al. Distinctive pathological and clinical features of lung carcinoids with high proliferation index. *Virchows Arch.* 2017;471(6):713-20.
230. van Velthuisen ML, Groen EJ, van der Noort V, van de Pol A, Tesselaar ME, Korse CM. Grading of neuroendocrine neoplasms: mitoses and Ki-67 are both essential. *Neuroendocrinology.* 2014;100(2-3):221-7.
231. Travis M. World Health Organization international histological classification of tumors. Histological typing of lung and pleural tumors. collaboration with Sobin LH and pathologists from 14 countries. 1999.
232. Cree IA. From Counting Mitoses to Ki67 Assessment: Technical Pitfalls in the New WHO Classification of Endocrine and Neuroendocrine Tumors. *Endocrine Pathology.* 2022;33(1):3-5.
233. Pelosi G, Papotti M, Rindi G, Scarpa A. Unraveling tumor grading and genomic landscape in lung neuroendocrine tumors. *Endocr Pathol.* 2014;25(2):151-64.
234. Garg R, Bal A, Das A, Singh N, Singh H. Proliferation Marker (Ki67) in Sub-Categorization of Neuroendocrine Tumours of the Lung. *Turk Patoloji Derg.* 2019;35(1):15-21.

235. Grimaldi F, Muser D, Beltrami CA, Machin P, Morelli A, Pizzolitto S, et al. Partitioning of bronchopulmonary carcinoids in two different prognostic categories by ki-67 score. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2011;2:20.
236. Marchevsky AM, Hendifar A, Walts AE. The use of Ki-67 labeling index to grade pulmonary well-differentiated neuroendocrine neoplasms: current best evidence. *Mod Pathol*. 2018;31(10):1523-31.
237. Hermans BCM, Derks JL, Moonen L, Habraken CHJ, der Thüsen JV, Hillen LM, et al. Pulmonary neuroendocrine neoplasms with well differentiated morphology and high proliferative activity: illustrated by a case series and review of the literature. *Lung Cancer*. 2020;150:152-8.
238. Quinn AM, Chaturvedi A, Nonaka D. High-grade Neuroendocrine Carcinoma of the Lung With Carcinoid Morphology: A Study of 12 Cases. *Am J Surg Pathol*. 2017;41(2):263-70.
239. Kasajima A, Konukiewitz B, Oka N, Suzuki H, Sakurada A, Okada Y, et al. Clinicopathological Profiling of Lung Carcinoids with a Ki67 Index > 20. *Neuroendocrinology*. 2019;108(2):109-20.
240. Clay V, Papaxoinis G, Sanderson B, Valle JW, Howell M, Lamarca A, et al. Evaluation of diagnostic and prognostic significance of Ki-67 index in pulmonary carcinoid tumours. *Clin Transl Oncol*. 2017;19(5):579-86.
241. Ács B, Kulka J, Kovács KA, Teleki I, Tóké AM, Meczker Á, et al. Comparison of 5 Ki-67 antibodies regarding reproducibility and capacity to predict prognosis in breast cancer: does the antibody matter? *Hum Pathol*. 2017;65:31-40.
242. Lindboe CF, Torp SH. Comparison of Ki-67 equivalent antibodies. *J Clin Pathol*. 2002;55(6):467-71.
243. Behrman DB, Lubin DJ, Magliocca K, Shi Q, Viswanathan K. Exploration of Digital Image Analysis for Ki67 Quantification in the Grading of Medullary Thyroid Carcinoma: A Pilot Study with 85 Cases. *Head Neck Pathol*. 2023;17(3):638-46.
244. Dawe M, Shi W, Liu TY, Lajkosz K, Shibahara Y, Gopal NEK, et al. Reliability and Variability of Ki-67 Digital Image Analysis Methods for Clinical Diagnostics in Breast Cancer. *Lab Invest*. 2024;104(5):100341.
245. Vesterinen T, Säilä J, Blom S, Pennanen M, Leijon H, Arola J. Automated assessment of Ki-67 proliferation index in neuroendocrine tumors by deep learning. *Apmis*. 2022;130(1):11-20.
246. Owens R, Gilmore E, Bingham V, Cardwell C, McBride H, McQuaid S, et al. Comparison of different anti-Ki67 antibody clones and hot-spot sizes for assessing proliferative index and grading in pancreatic neuroendocrine tumours using manual and image analysis. *Histopathology*. 2020;77(4):646-58.
247. Warth A, Fink L, Fisseler-Eckhoff A, Jonigk D, Keller M, Ott G, et al. Interobserver agreement of proliferation index (Ki-67) outperforms mitotic count in pulmonary carcinoids. *Virchows Archiv*. 2013;462(5):507-13.
248. Boland JM, Kroneman TN, Jenkins SM, Terra S, Xie H, Molina J, et al. Ki-67 Labeling Index in Pulmonary Carcinoid Tumors: Comparison Between Small Biopsy and Resection Using Tumor Tracing and Hot Spot Methods. *Arch Pathol Lab Med*. 2020.
249. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep*. 2017;7(1):16878.

250. Bagci P, Ohike N, Dursun N, Jang K, Tajiri T, Basturk O, et al., editors. Comparative analysis of different counting methodologies for Ki-67 in pancreatic neuroendocrine tumors. LABORATORY INVESTIGATION; 2012: NATURE PUBLISHING GROUP 75 VARICK ST, 9TH FLR, NEW YORK, NY 10013-1917 USA.
251. Nadeem S, Hanna MG, Viswanathan K, Marino J, Ahadi M, Alzumaili B, et al. Ki67 proliferation index in medullary thyroid carcinoma: a comparative study of multiple counting methods and validation of image analysis and deep learning platforms. *Histopathology*. 2023;83(6):981-8.
252. Fulawka L, Halon A. Proliferation Index Evaluation in Breast Cancer Using ImageJ and ImmunoRatio Applications. *Anticancer Res*. 2016;36(8):3965-72.
253. Polley MY, Leung SC, McShane LM, Gao D, Hugh JC, Mastropasqua MG, et al. An international Ki67 reproducibility study. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(24):1897-906.
254. Geread RS, Sivanandarajah A, Brouwer ER, Wood GA, Androutsos D, Faragalla H, et al. piNET—An Automated Proliferation Index Calculator Framework for Ki67 Breast Cancer Images. *Cancers*. 2021;13(1):11.
255. Tang LH, Gonen M, Hedvat C, Modlin IM, Klimstra DS. Objective quantification of the Ki67 proliferative index in neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system: a comparison of digital image analysis with manual methods. *Am J Surg Pathol*. 2012;36(12):1761-70.
256. Cui M, Zhang DY. Artificial intelligence and computational pathology. *Lab Invest*. 2021;101(4):412-22.
257. Satturwar SP, Pantanowitz JL, Manko CD, Seigh L, Monaco SE, Pantanowitz L. Ki-67 proliferation index in neuroendocrine tumors: Can augmented reality microscopy with image analysis improve scoring? *Cancer Cytopathol*. 2020;128(8):535-44.
258. Liu SZ, Staats PN, Goicochea L, Alexiev BA, Shah N, Dixon R, et al. Automated quantification of Ki-67 proliferative index of excised neuroendocrine tumors of the lung. *Diagn Pathol*. 2014;9:174.
259. Uxa S, Castillo-Binder P, Kohler R, Stangner K, Müller GA, Engeland K. Ki-67 gene expression. *Cell Death & Differentiation*. 2021;28(12):3357-70.
260. Cives M, Strosberg JR. Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):471-87.
261. Zehra T, Shams M, Ali R, Jafri A, Khurshid A, Erum H, et al. Use of Novel Open-Source Deep Learning Platform for Quantification of Ki-67 in Neuroendocrine Tumors - Analytical Validation. *Int J Gen Med*. 2023;16:5665-73.
262. Acs B, Leung SCY, Kidwell KM, Arun I, Augulis R, Badve SS, et al. Systematically higher Ki67 scores on core biopsy samples compared to corresponding resection specimen in breast cancer: a multi-operator and multi-institutional study. *Mod Pathol*. 2022;35(10):1362-9.
263. Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P, et al. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology*. 2020;76(2):182-8.
264. Reid MD, Bagci P, Ohike N, Saka B, Erbarut Seven İ, Dursun N, et al. Calculation of the Ki67 index in pancreatic neuroendocrine tumors: a comparative analysis of four counting methodologies. *Modern Pathology*. 2015;28(5):686-94.
265. Acs B, Pelekanou V, Bai Y, Martinez-Morilla S, Toki M, Leung SCY, et al. Ki67 reproducibility using digital image analysis: an inter-platform and inter-operator study. *Lab Invest*. 2019;99(1):107-17.

266. Aung TN, Acs B, Warrell J, Bai Y, Gaule P, Martinez-Morilla S, et al. A new tool for technical standardization of the Ki67 immunohistochemical assay. *Mod Pathol.* 2021;34(7):1261-70.
267. Wang HY, Li ZW, Sun W, Yang X, Zhou LX, Huang XZ, et al. Automated quantification of Ki-67 index associates with pathologic grade of pulmonary neuroendocrine tumors. *Chin Med J (Engl).* 2019;132(5):551-61.
268. Geread RS, Morreale P, Dony RD, Brouwer E, Wood GA, Androutsos D, et al. IHC Color Histograms for Unsupervised Ki67 Proliferation Index Calculation. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7:226.

Zur sprachlichen Optimierung des Textes wurden folgende Werkzeuge verwendet:

1. ChatGPT (Version 5.0)

- Publisher/Provider: Open AI
- Datum der Inhaltserstellung: 10.08.2025
- Uniform Resource Locator (URL): <http://chat.openai.com>

2. DeepL Translator (Version 24.11.4)

- Publisher/Provider: DEEPL SE
- Datum der Inhaltserstellung: 10.08.2025
- Uniform Resource Locator (URL): <http://www.deepl.com>