

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Digitális metszetelemzés az állatorvosi patológiában

Horváth Dávid Géza

Témavezetők: Dr. Balka Gyula



ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

Állatorvostudományi Doktori Iskola

Budapest, 2025

Állatorvostudományi Egyetem
Állatorvostudományi Doktori Iskola

Témavezető:

.....

Dr. Balka Gyula
Állatorvostudományi Egyetem
Patológiai Tanszék

Készült 8 példányban. Ez a n. sz. példány.

.....

Horváth Dávid Géza

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	3
1. A doktori értekezés előzményei és célkitűzései	4
2. Összefoglalás	5
3. Új tudományos eredmények	8
4. Publikációk.....	9

1. A doktori értekezés előzményei és célkitűzései

A digitális patológiát széles körben használják a humán orvostudományi kutatásokban és számos közlemény jelent meg az állatorvosi területen történő alkalmazásáról is. 2017-es megjelenése óta a QuPath számos, állati szöveteket értékelő tanulmányban volt digitális képelemző szoftver. Esetünkben a sertések reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindróma vírusának 1-es típusát (PRRSV-1-et) és a sertés 2-es típusú circovírusát (PCV-2-t) használtam modellként, hogy a módszer lehetőségeit feltérképezsem. A szövettani metszetek Panoramic Midi (3D Histech, Budapest, Magyarország) szövetszkennerral való digitalizálását követően QuPath képelemző szoftver segítségével céloztuk meg elvégezni a:

- PRRSV-1 által malacokban okozott tüdőelváltozásokban az ISH-val jelölt, vírussal fertőzött sejtek arányának meghatározását,
- különböző virulenciájú PRRSV-1-törzsekkel fertőzött kocasüldők endometriumában a gyulladásos és CD163+ sejtek számának megállapítását,
- valamint PCV-2-vel fertőzött, PCV-2-höz köthető szisztémás betegségben (PCV-2-SD-ben) érintett sertések nyirokcsomó szöveteiben az IHC eljárással jelölt fertőzött sejtek számának meghatározását.

Az objektív sejtarányok és sejtszámok birtokában statisztikai elemzésekkel kívántuk meghatározni:

- az RNAscope szemikvantitatív módszerként való használhatóságát,
- valamint a PRRS okozta endometritis elbírálásánál és a PCV-2-SD diagnosztikájánál a digitális módszernek a manuális eljárásokhoz viszonyított hatékonyságát.

2. Összefoglalás

A digitális patológia (DP), más néven virtuális mikroszkópia a hagyományos kórszövettani metszetek digitalizálást követő, monitoron történő megjelenítését és számítógépes elemzését foglalja magába. A technológiának megoldandó problémái és követelményei ellenére számos előnye van a diagnosztikában, az oktatásban és a kutatási tevékenységben is. A digitalizálást elvégző metszetszkennerek a rutin hematoxilinnal és eozinnal (H&E), továbbá speciális kórszövettani eljárásokkal festett, valamint immunhisztokémiai (IHC) és *in situ* hibridizációs (ISH) módszerekkel jelölt tárgylemezeket nagy felbontásban olvassák be. Az így létrejött digitális teljes metszetképek (Whole Slide Images, WSIs) digitális képelemző (digital image analysis, DIA) programok segítségével vizsgálhatók, lehetőség nyílik az elváltozást mutató (a többitől eltérő méretű, alakú, festődésű és egyéb tulajdonságaikban különböző), továbbá különféle specifikus festési eljárásokkal jelölt sejtek számának és arányának, valamint egyéb elváltozásoknak (pl. fibrózis) az objektív és megismételhető meghatározására.

A DP a diagnosztikában egyes patológiai munkafolyamatok felgyorsítására, távmunka végzésére, valamint a szemikvantitatív eljárások helyettesítésére alkalmazható leginkább. Az utóbbi időben a kvantitatív eljárások mellett egyre nagyobb teret kapnak az olyan döntéstámogató digitális patológiai rendszerek is, amelyek az esetek előzetes szűrésében és a végső diagnózis szempontjából releváns régiók azonosításában segítik a patológusok munkáját. Több nagy diagnosztikai szolgáltató, orvos- és állatorvostudományi egyetem, preklinikai vizsgálatokat folytató cég, ill. kórház tért már át teljesen digitalizált munkafolyamatra, a számuk jelenleg is tovább bővül. A szkennelt metszetek megosztása révén a konzultációs lehetőségek is kibővülnek, azaz egy eset kapcsán kért szakértői segítséghez csak internetelérés szükséges a világ bármely pontjáról.

A DP kutatási alkalmazása manapság meglehetősen gyakori. A morfológiai elváltozások és molekuláris eljárásokkal láthatóvá tett szöveti jelek szemikvantitatív elbírálása meglehetősen szubjektív és gyakran nehezen megismételhető. Az objektivitás és reprodukálhatóság mellett a DIA szoftverekkel nyert numerikus adatok statisztikailag könnyebben kezelhetők. A módszer számos paraméter/elváltozás vizsgálatára alkalmas, ilyen többek között a sejtípusok számának és arányának meghatározása, fehérjekifejeződés változásának mérése, sejtelváltozások kimutatása és kvantifikálása, szöveti elváltozások (pl. fibrózis, amyloid-plakkok) kiterjedésének vizsgálata. Gyógyszerfejlesztések mellett leginkább daganatos és egyéb biomarkerek pontos mennyiségi meghatározására használják potenciális prognosztikai markereket vizsgáló kutatásokban. A viszonylag egyszerű sejtszámlálási eljárások mellett egyre több olyan közlemény jelenik meg, amelyekben mesterséges intelligenciát (artificial intelligence, AI) és az ún. mélytanulási (deep learning) rendszereket

felhasználva a programok képesek hatékonyabban felismerni például daganatos, vagy daganatot megelőző elváltozásokat, továbbá a daganat mintázata alapján pontosabb prognosztikai besorolásokat elvégezni.

Az orvosi és állatorvosi oktatásban is egyre elterjedtebb a DP használata. Az oktatási tevékenység sokkal interaktívabb, az oktató képes mindenki számára egyértelműen kijelölni, bemutatni bizonyos elváltozásokat, akár több speciális festési eljárást egy monitoron megjelenítve is. Nincs szükség hallgatónként külön mikroszkópra, az elhasználdott vagy megrongálódott tárgylemezek utánpótlásáról sem kell többé gondoskodni, a hallgatók pedig hozzáférhetnek a digitális metszetekhez bárhol, bármikor. Több publikáció közli a digitális oktatási módszertan pozitív fogadtatását a hallgatók körében. A rendszer ezen túlmenően vizsgáztatásra is alkalmas.

A QuPath (<https://qupath.github.io>) egy felhasználóbarát, nyílt forráskódú asztali alkalmazás, amelyet digitalizált szövettani metszetek elemzésére terveztek. A program rugalmasan fejleszthető, többek között képes elvégezni az azonosított sejttípusok osztályozását az általunk kijelölt terület minden sejtjének részletes fenotípusos leírásával. A szövetrész kvantitatív celluláris térképe is elérhetővé válik, amelyet kiválaszthatunk, lekérdezhetünk és ábrázolhatunk is. Mindez a hagyományos mikroszkópos értékelés során nem látható azonnal, QuPath szoftverrel viszont percek alatt elérhető, anélkül, hogy speciális hardverre lenne szükség.

A DP és a QuPath előnyeinek, valamint széleskörű alkalmazhatóságának bizonyítására vírusos sertésbetegségeket használtam modellként, ahol az endometrium gyulladásos sejtjeit, valamint nyirokcsomókban IHC-val, tüdőkből ISH-val jelölt fertőzött sejteket vizsgáltam. A sertés reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómájának vírusa (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) és a sertés 2-es típusú circovírusa (porcine circovirus type 2, PCV-2) egyaránt nagy gazdasági jelentőségű és világszerte elterjedt kórokozók, amelyek különösen az általuk okozott megbetegedések kórfejlődése tekintetében ma is aktív kutatás tárgyát képezik. DP felhasználásával a PRRSV-1 által okozott reprodukciós és légúti kórkép patológiájáról és kórfejlődéséről is újabb ismereteket szerezhetünk, valamint a PCV-2 esetében előrelépést hozhat a módszer a vírushoz köthető szisztémás betegség (PCV-2-SD) diagnózisában, ahol elengedhetetlen a vírusnak az elváltozott szövetekben való megjelenítése és szemikvantitatív számszerűsítése, egy digitális módszertan pedig objektívebbé és megismételhetőbbé teheti az esetek elbírálását.

Légúti PRRSV-fertőzéses modellünkben 20 db, 7 hetes malacot vad, virulens PRRSV-1 törzzsel fertőztünk. Mérsékelt fokú pozitív korrelációt állapítottunk meg az *in situ* hibridizációval jelölt, vírussal fertőzött sejtek aránya és az azonos tüdőlebenyből elvégzett, kvantitatív

polimeráz láncreakcióval (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) meghatározott víruskópiaszám között. Kísérleti eredményeink bizonyítják, hogy az alkalmazott RNAscope ISH digitális képanalízissel kombinálva értékes szemikvantitatív adatokat szolgáltat a tüdő *in situ* PRRSV-fertőzésére vonatkozóan.

Ezt követően a PRRSV-fertőzés szaporodásbiológiai modelljében vakcinázott és nem vakcinázott vemhes kocaüldőket fertőztek gyenge virulenciájú vagy virulens PRRSV-1-törzzsel és képelemző szoftverrel számszerűsítettem az endometrium lamina propriájának gyulladásos sejtes beszűrődését. A gyulladásos sejtszámok és a manuális súlyossági kategóriák között nagyfokú összefüggést állapítottunk meg. Tehát a DIA hatékonyan alkalmazható az endometrium gyulladásának objektív értékelésére, így a szemikvantitatív manuális pontozás mellett vagy helyett megfelelő módszer szövetszövetvizsgálatra hasonló kutatási eljárásokban.

A PCV-2-modell esetében PCV-2-SD-vel érintett állatokból származó, archivált nyirokcsomó FFPE-blokkokból (formalin fixed, paraffin embedded, formalinban fixált paraffinba ágyazott blokkokból) ismételt PCV-2 IHC-festést, szemikvantitatív manuális pontozást, továbbá DIA-módszerrel sejtszámlálást (fertőzött és nem fertőzött sejtszám meghatározást) végeztünk, valamint a vírus genom-kópiaszámát is meghatároztuk a blokkokból qPCR segítségével. A sejtszámok, a manuális pontozás és a qPCR-eredmények nagyfokú összefüggését állapítottuk meg. Eredményeink igazolják a digitális patológiai módszertanunk egyszerű és hatékony alkalmazhatóságát az IHC-jelek objektív számszerűsítésére PCV-2-SD esetekben.

3. Új tudományos eredmények

1. Először azonosítottuk a PRRSV-1-et RNAscope módszerrel sertés tüdőszövetmintákban és először alkalmaztunk digitális képelemzést az így láthatóvá tett nukleinsav mennyiségi meghatározására. Az RNAscope ISH DIA-vel kombinálva értékes szemikvantitatív adatokkal szolgálhat a tüdő *in situ* PRRSV fertőzésére vonatkozóan.

2. Először alkalmaztunk digitális képelemzést a sertés endometrium gyulladásos sejtszámának számszerűsítésére és hasonlítottuk össze a módszert manuális pontozási eljárással. A DIA hatékony módszer lehet a szövetvizsgálatra hasonló kutatási eljárásokban, ahol az endometrium gyulladását objektíven kell értékelni. Ilyenek lehetnek többek között a vakcinafejlesztési kísérletek, ahol a léziócsökkentés mértékét kívánjuk számszerűsíteni, de módszertanával új ismereteket szerezhethünk a PRRSV-1 reprodukciós patológiájáról is.

3. Először fejlesztettünk ki és alkalmaztunk digitális patológiai rendszert a PCV-2-SD egyedi diagnosztikájára. A jelenleg alkalmazott manuális módszer hatékonysága ellenére egy új, digitális patológiai rendszer potenciálisan javíthatja a betegség diagnosztizálását, ahol elengedhetetlen a vírus vizualizálása a beteg szövetekben, a digitális kvantifikáció pedig objektívebbé és reprodukálhatóbbá teszi az esetértékelést.

4. Publikációk

A disszertáció alapjául szolgáló tudományos közlemények

- Dénes, L., Horváth, D.G., Duran, O., Ratkhjen, P.H., Kraft, C., Ács, B., Szász, A.M., Rümenapf, T., Papp, M., Ladinig, A., Balka, G., 2021. In Situ Hybridization of PRRSV-1 Combined with Digital Image Analysis in Lung Tissues of Pigs Challenged with PRRSV-1. Veterinary Science. 8:235. IF: 2,0
- Horváth, D.G., Abonyi-Tóth, Z., Papp, M., Szász, A.M., Rümenapf, T., Knecht, C., Kreutzmann, H., Ladinig, A., Balka, G., 2023. Quantitative Analysis of Inflammatory Uterine Lesions of Pregnant Gilts with Digital Image Analysis Following Experimental PRRSV-1 Infection. Animals (Basel). 13:830. doi: 10.3390/ani13050830. IF: 2,7
- Horváth, D.G., Dénes, L., Igriczi, B., Papp, M., Hidalgo-Martínez, V., Segalés, J., Balka, G., 2025. Digital quantification of porcine circovirus 2 (PCV-2)-infected cells in lymph nodes of pigs with natural PCV-2 systemic disease shows strong association with manual scoring and quantitative PCR. Vet Pathol. doi: 10.1177/03009858251331121. Epub ahead of print. IF: 2,3
- Horváth, D.G., Balka, G., 2025. Digitális metszetelemzés az állatorvosi patológiában. Magyar Allatorvosok Lapja, közlésre elfogadva. IF: 0,3