

TDK DOLGOZAT

László Fruzsina

2023

Állatorvostudományi Egyetem, Patológiai Tanszék

Kutyák cutan mastocytomáiban az osztódó sejtek kvantitatív vizsgálata digitális képelemző szoftverrel

Quantitative analysis of mitotic cells in canine cutan mast cell tumors with digital pathology software

Szerző: László Fruzsina

Témavezető: Dr. Horváth Dávid Géza egyetemi tanársegéd

Tartalomjegyzék

Absztrakt/ Összefoglaló	2
Rövidítések jegyzéke	4
1 Irodalmi áttekintés	5
1.1 Mastocyták	5
1.2 Mastocytomák	6
1.2.1 Prevalencia	6
1.2.2 Formái	6
1.2.3 Patogenezis	7
1.2.4 Klinikum	7
1.2.5 Staging	8
1.2.6 Cutan MCT-k szövettani osztályozása (grading) és szövettana	9
1.3 A digitális patológia	13
1.3.1 Felépítése, működése	13
1.3.2 Kihívások, limitációk	15
1.3.3 Perspektíva	16
2 Anyag és módszerek	17
2.1 Metszet készítés	17
2.2 Metszet szkennelés	17
2.3 Szoftveres elemzés	17
2.4 Statisztikai elemzés	20
2.5 Célkitűzések	20
3 Eredmények	21
3.1 Metszet szkennelés	21
3.2 Szoftveres elemzés	21
3.3 Statisztikai elemzés	22
4 Megbeszélés, következtetések	24
5 Irodalom jegyzék	26
6 Köszönetnyilvánítás	30

Absztrakt/ Összefoglaló

A mastocytoma kutyákban általában a cutis vagy a subcutis rétegében található hízósejtes tumor, ebben a fajban a leggyakrabban előforduló bőrdaganat típus. A klinikai stage az egyik legfontosabb prognosztikai faktor, mely szoros összefüggést mutat a tumor szövettani grade-jével. A terápia és a sebészi ellátás tervezése szempontjából ezért elengedhetetlen meghatározni a tumor grade-t, melyhez több vizsgálati szempont közül nagy prognosztikai értéke miatt a mitotikus sejtszám tekinthető a leginformatívabbnak. Ennek meghatározásához már elérhetővé váltak digitális patológiai rendszerek is. Vizsgálatunk során a QuPath szoftver osztódó sejtalakok beazonosításával történő grade meghatározási teljesítményét hasonlítottuk össze egy szakértő patológuséval. 39 esetből 19-ben egyezett meg a manuális és a digitális besorolás, tehát az esetek 48,7%-ában. A Cohen's kappa értéke -0,284 volt, tehát az algoritmus és a patológus osztályozása közt összefüggést nem találtunk. Ennek oka feltehetően az, hogy a betanítást nem szakértő végezte, így nem állt rendelkezésre megfelelő minőségű adathalmaz a szoftver számára. A mesterséges intelligencia és a digitális patológiai rendszerek implementációja a diagnosztikába jelentősen megkönnyítheti a patológusok munkáját, de a saját, illetve más tanulmányok eredményei is jól szemléltetik, hogy az emberi tényezőt nem lehet mellőzni. Egy gyakorlott patológus által betanított algoritmus a közeljövőben valószínűleg hatékonyabb diagnosztikai teljesítményre lesz képes, mely esetben a patológusok a diagnózis validálására összpontosíthatnak.

Abstract/ Summary

The mastocytoma or mast cell tumor is the most prevalent skin tumor in dogs, most frequently affecting the cutis or the subcutis. The clinical stage is one of the most relevant prognostic factors which has a strong association with the histological tumor grade. Hence it is vital to determine the tumor grade to adequately plan the therapy and the surgical care. Among the examination aspects of the grade, the mitotic cell count can be considered the most informative, because of its high prognostic value. To define this, digital pathological systems have been made available. During our examination we have compared the performance of the QuPath software's and a pathologist's manual grading by digitally identifying the mitotic cell forms. In 19 of the 39 cases (48.7%) the manual classification was consistent with the digital grading. The Cohen's kappa was -0.284, hence there was no agreement between the algorithm and the manual observer. The algorithm training was not done by an expert, therefore the discrepancy was probably due to the lack of dataset with sufficient quality for the program. The implementation of artificial intelligence and digital pathology systems in diagnostics undoubtedly ease the work of pathologists, nevertheless as it is also shown by our results human professionals cannot be ignored. Most probably an algorithm trained by an experienced pathologist will be able to provide a more efficient performance in diagnostics in the foreseeable future, when the pathologists can focus on the validation of the diagnosis.

Rövidítések jegyzéke

ANN = artificial neural network, mesterséges neurális hálózat

DP = digitális patológia

H&E = hematoxylin és eosin

MC = mastocytoma, hízósejt

MCC = mitotic cell count, mitotikus sejtszám

MCT = mastocytoma, hízósejtes daganat

MI = mesterséges intelligencia

ML = machine learning, gépi tanulás

WSI = whole slide image, digitalizált teljes szövettani metszet

1 Irodalmi áttekintés

1.1 Mastocyták

A mastocyták (MC-k) azaz hízósejtek fiziológias sejtalkotói a bőr alatti, a zsigerekben és az azok közt megtalálható kötőszövetnek, kutyában legnagyobb számban a tüdőben, a bőrben, a belekben és a májban található meg, és központi szerepet töltenek be a gyulladásos és immunológiai folyamatokban [1, 2].

A csontvelőben, valószínűleg a mononukleáris prekursor sejtekből keletkeznek, jellegzetes megjelenésüket a citoplazmában található granulumok adják, melyek heparint, hisztamint és kemotaktikus faktorokat tartalmaznak, illetve proteolitikus enzimeket is (pl. kollagenázt) [1, 3].

Az allergénnel (azaz olyan antigénnel, amely a hízósejtek aktivációját eredményezi) való találkozást követő néhány percn belül alakul ki az azonnali válasz (I-es típusú/ azonnali hiperszenzitivitás) a gyulladásos mediátorok (hisztamin, leukotriének, citokinek, proteázok) hatására, illetve a sejt későbbi kemokin és citokin szekréciója felelős az órákkal ezután kialakuló késői fázisú válaszáért [3]. A mastocyták receptorainak ($Fc\gamma R$) kifejezett affinitása az IgE immunglobulinhoz azt eredményezi, hogy elsősorban olyan antigének aktiválják a hízósejteket, melyek sejtfelszínéhez IgE immunglobulin kötődött [4, 5]. Az IgE ellenanyag Fab doménje felelős az antigén megkötéséért és az Fc domént, vagyis a biológiailag aktív részt képesek felismerni az immunrendszer sejtjei [6]. Azonban az IgE-n túl egyes peptidek (mellitin és ACTH), citokinek (interleukin-1 és IL-3) és anaphylatoxinok (C3a, C4a és C5a) is hisztamin felszabadulást idéznek elő [3]. A degranuláció folyamatát egy gyors kalcium-ion influx előzi meg, a felszabadult hisztamin ezután H1 receptorokhoz kötődve fejt ki hatását a légzőszervi, gastrointestinalis és az erek falában található simaizmokra, vazokonstriktációt okozva [2]. A granulumokban található heparin stabilizálja a hízósejtekben tárolt proteázokat és a vérkeringésbe jutva véralvadást gátló hatással bír [3].

A mastocyták alakja a kerekétől a poligonálisig (három, vagy annál több oldalú sokszög) változatos lehet, citoplazmájuk hematoxylinnal és eosinnal (H&E) festve rózsaszínen (eosinophilan) festődik és lila granulumokat tartalmaz, melyek metachromáziásan festődnek (toluidinkék vagy Giemsa alkalmazásával). Metachromáziás festődés alatt azt a jelenséget értjük, amikor az alkalmazott eljárástól eltérő árnyalatú festődés tapasztalható. A sejtmag kerek és H&E-nal sötét lilán (basophilan) festődik [2, 3, 7].

1.2 Mastocytomák

A mastocytoma (MCT) vagy hízósejtes tumor egy olyan daganat, melyet neoplasztikus mastocyták alkotnak és a klinikai tünetek, illetve a daganat biológiai viselkedése ezeknek a sejteknek a tulajdonságaihoz köthető [2, 8, 7, 9].

1.2.1 Prevalencia

A MCT-k a kutya populáció 0,27%-ában (0,24%- 0,29%) kialakuló neoplasztikus elváltozások [10]. Leggyakrabban a bőrben, a cutis vagy a subcutis rétegében alakulnak ki, és az itt előforduló daganatok 7-20%-át, a rosszindulatú bőrdaganatok 11-27%-át adják [2, 4, 8, 7, 9]. A belekben, májban, lépben és más szervekben ritkábban alakulnak ki hízósejtes tumorok, esetenként a szájüregben és a mediastinumban is előfordulnak [11, 7]. A gastrointestinalis traktusban kialakuló MCT-k az esetek 20,5%-ában a gyomorban, 33,3%-ában a duodenumban, 28,2%-ában a vékonybélben és 10,3%-ában a vastagbélben található meg [11]. Általában szoliter tumorok formájában, ritkán multiplex daganatként fordulnak elő, utóbbi csupán az esetek 5%-ában jellemző [7]. Egy angliai tanulmány rámutatott boxer, golden retriever, amerikai staffordshire terrier és labrador retriever esetén fajtaprediszpozícióra is, illetve sharpei, pit bull terrier, fox terrier, cocker spániel, tascsó, mopsz, beagle és schnauzer fajtákban is magasabb a MCT kialakulásának a kockázata [10, 7]. Azonban minden fajta és mindkét nem érintett lehet, nem figyeltek meg összefüggést a kutya neme és a MCT megjelenésének valószínűsége közt, a kialakulás kockázata viszont a kor előrehaladtával növekszik [2, 7, 9]. A MCT-val diagnosztizált kutyák átlag életkora 8,2-10,5 év [7, 9].

1.2.2 Formái

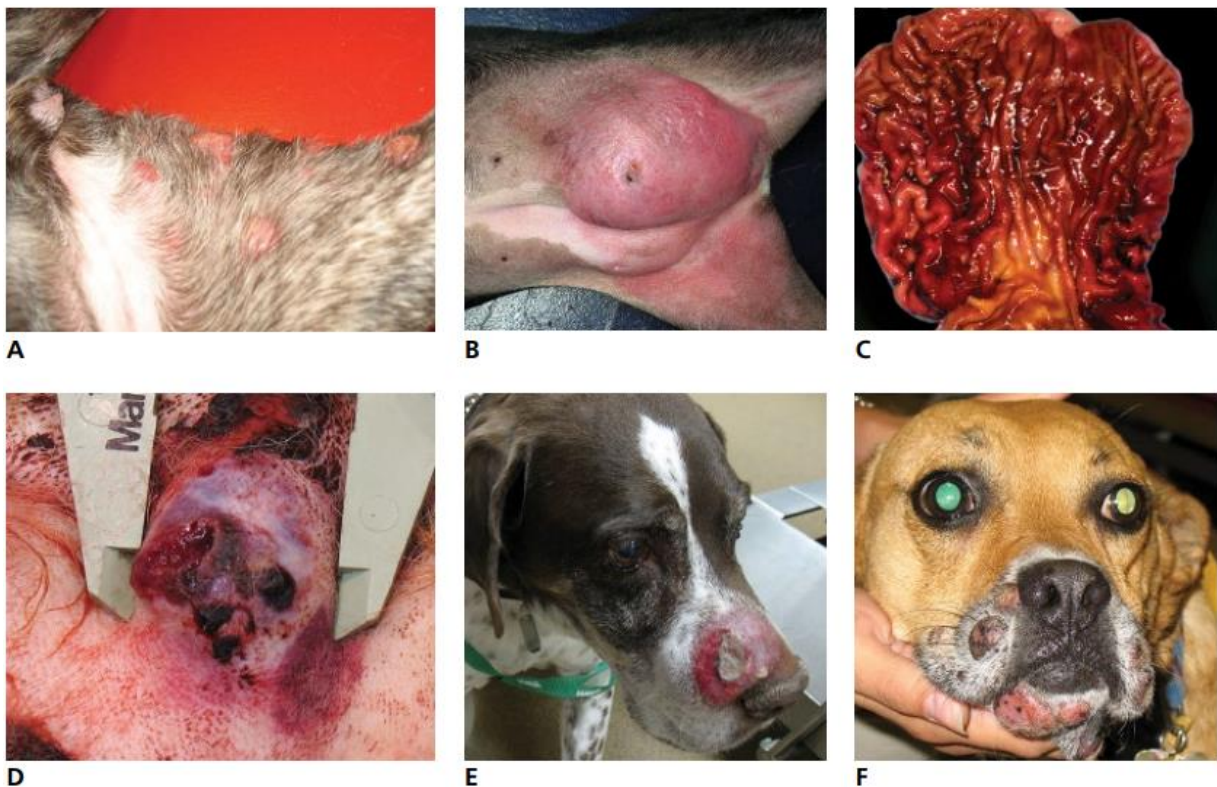
A MCT-k tehát kialakulhatnak a bőrben, a subcutisban, a zsigerekben, a szájüregben és a mediastinumban, azonban nehéz különbséget tenni az elsődleges elváltozás és a metasztatikus tumor között a visceralis formák esetében. A nyálkahártyákban, orrüregben, hasúri szervekben kialakuló hízósejtes daganatokat és a hízósejtes leukémiát agresszív viselkedés jellemzi és szisztémás terápiát igényelnek [2, 7]. 2011 előtti publikációkban még egy kategóriába sorolták a bőrben található MCT-kat, azonban ma a szakirodalom és a klinikai gyakorlat megkülönböztet cutan és subcutan formákat, melyeknek biológiai viselkedése eltér egymástól. A legfontosabb különbség a cutan forma többnyire agresszívebb viselkedése, mely tulajdonság meghatározásának fontos szempontja a dolgozat témájául szolgáló szövettani grade [2, 7].

1.2.3 Patogenezis

A kit receptor III-as típusa egy transzmembrán receptor kináz, ami fiziológias esetben a hematopoetikus és mastocytá sejtken található meg és részt vesz a sejtek differenciálódásának és növekedésének szabályozásában. A kit III receptort a C-kit-proto-oncogen génszakasz kódolja, ennek esetleges mutációja túlzott expressziót okozhat, ami hozzájárulhat a neoplasztikus transzformációhoz [2, 7, 12].

1.2.4 Klinikum

Cutan MCT-k kutyák esetében változatos klinikai megjelenéssel rendelkezhetnek, a nodularis kiütés-szerű elváltozásoktól a diffúz megjelenésű, duzzadt és szörtelen tumorokig (1. ábra). A jól körülhatárolt szoliter daganatok általában lassú növekedésűek, a fekélyes, viszkető MCT-k a legtöbb esetben kevésbé körülhatároltak és gyorsabban növekednek. A subcutan MCT-k a subcutis rétegében alakulnak ki bárhol a testen, de az esetek 60%-ában a végtagok, a hát és a mellkas az érintett területek. Megjelenésük lipomához hasonló (puha, bőrfelszínből kidomborodó), de ritkán fekélyesedik [7].



Ábra 1.: Cutan MCT-k kutyákban. (A) Több cutan MCT egy boxerben. (B) Nagy méretű cutan MCT. (C) Gyomorfal hyperemia és vérzés egy kutyában, amelynél cutan MCT-t diagnosztizáltak (a neoplasztikus mastocyták által kibocsátott hisztamin fekélyképződést idéz elő a gyomorban, a HCl szekréció serkentésén keresztül). (D) Nekrotizáló cutan MCT. (E) Fekélyes MCT az orrháton. (F) Több periorális MCT [7].

A MCT-k predilekciós helyei a mellső végtag proximális része, a perineális és preputialis régiók, de boxerek, mopszok, boston és staffordshire terrieres esetében gyakrabban a hátsó végtagokon, angol szettereknél pedig nagyobb incidenciával a fejen fordulnak elő, ezeken kívül a dermis és subcutis rétegeiben testszerte megtalálható lehet [2, 7]. Továbbá miniatűr fajták kanjaiban nagyobb százalékban alakulnak ki az intestinalis traktusban [11].

A klinikai tünetek többsége a citoplazmatikus granulumokból ürülő biológiailag aktív anyagok hatása miatt alakul ki, mint az anaphylaxia, lokális duzzanat és viszketés. A hisztamin-hatás következményeképpen kialakult gastroduodenalis fekély pedig többek között anorexiát, hányást és hasmenést eredményezhet [2].

1.2.5 Staging

A staging az egyik legfontosabb prognosztikai faktor a kutyák MCT-i esetében, a besorolás klinikai, citológiai és kórszövettani kritériumok alapján történik (1. táblázat).

- Stage 1: Szoliter daganat, mely a dermis rétegére korlátozódik és nem érintettek a regionális nyirokcsomók.
- Stage 2: Szintén a dermis rétegében található a tumor, de a regionális nyirokcsomók is érintettek.
- Stage 3: Több daganat a bőrben, vagy egy nagy, a környező szöveteket infiltráló tumor, nyirokcsomó érintettséggel vagy anélkül.
- Stage 4: Távoli metastasisok jellemzik vagy kiújult MCT [2, 13].

Stage	Érintett szövetek	Nyirokcsomók	Távoli metastasis
Stage 1	kizárólag dermis	nem érintettek	nincs
Stage 2	dermis	regionális nyirokcsomók érintettek	nincs
Stage 3	környező szöveteket is infiltrálja	érintettek vagy nem érintettek	nincs
Stage 4	dermis és a környező szövetek	általában érintettek	van

Táblázat 1.: Az egyes stage besorolások feltételei.

A stage 1-es és 2-es MCT-k besorolása általában grade 1, azaz jól differenciált, a stage 3-as és stage 4-es tumorok besorolása az esetek többségében grade 2 vagy 3, azaz kevésbé vagy rosszul differenciált formák [2].

1.2.6 Cutan MCT-k szövettani osztályozása (grading) és szövettana

Amíg a stage a tumor szervezetben való kiterjedtségéről, a grade a daganat differenciáltságáról szolgáltat információt [13]. A citológiai vizsgálat is megfelelően hatékony a MCT-k és más kerek sejtes daganatok elkülönítésében, viszont a szövettani vizsgálatok teszik lehetővé a definitív diagnózis mellett a sebészi eltávolítás biztonsági zónájának megállapítását [2]. Jelenleg a szövettani osztályozást alkalmazzák leggyakrabban prognosztikai célra és a terápiás terv felállításához is kutyák cutan MCT-i esetében [7].

1.2.6.1 Patnaik-rendszer

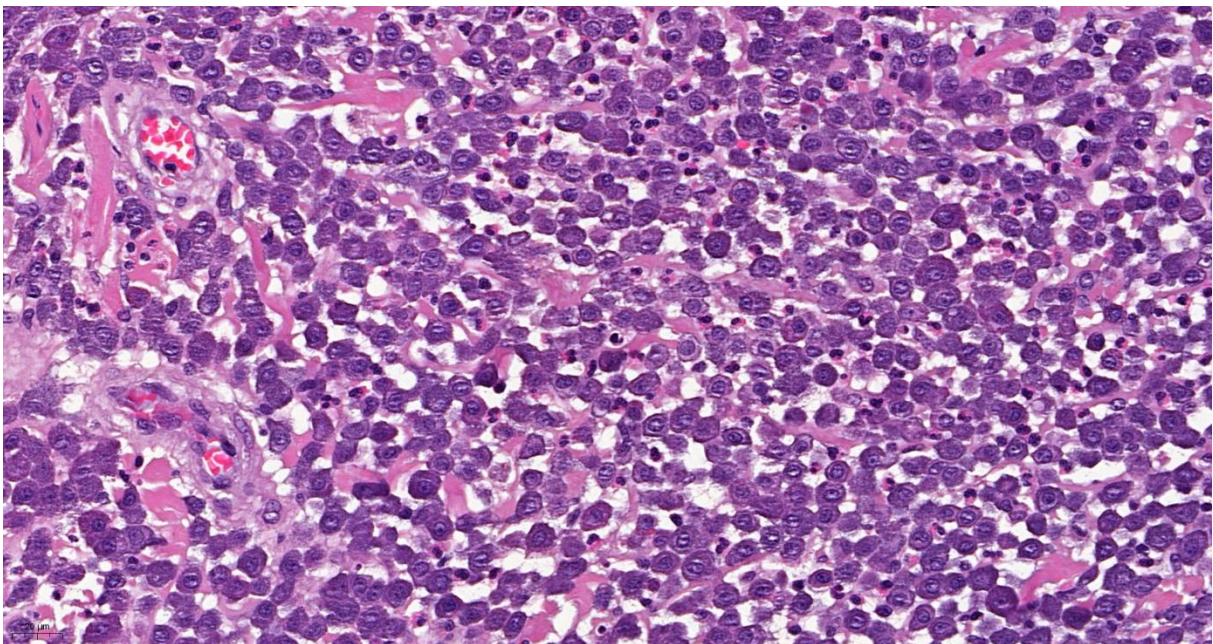
Az egyik erre alkalmas rendszer Patnaik-tól és munkatársaitól származik (1984), akik három osztályba sorolták a cutan MCT-kat: jól differenciált, közepesen differenciált és kevésbé differenciált. Egy tanulmány szerint ez a besorolás szignifikánsan korrelált a túléléssel: azon kutyák esetén, amelyeknél a legalacsonyabb besorolású MCT-t állapítottak meg a túlélési idő akár hatszor hosszabb volt, mint a közepes vagy legmagasabb besorolású tumorok esetében [9]. Egy másik 162 kutyát vizsgáló tanulmány a következő eredményre jutott: a halálozási arány a grade 1-es MCT-val diagnosztizált egyedek esetében (kizárólag a tumorról összefüggő elhullásokat figyelembe véve) 0%, grade 2-es MCT esetén 12%, grade 3-as MCT esetében pedig 83%. A 12 hónapos túlélési idők pedig a következőképpen alakultak: grade 1: 100%, grade 2: 87%, grade 3: 16%, ezzel alátámasztva a Patnaik-rendszer prognosztikai szignifikanciáját [14].

- **Grade 1:** A tumor a dermis rétegére és az interfollikuláris térre korlátozódik, a jól differenciált MC-k sorban vagy kis csoportokban helyezkednek el, melyeket érett kollagén rostok választanak el egymástól. A sejtek monomorphok (morphológiájuk kis mértékben tér el egymástól), kifejezetten éles sejthatárral és nagy mennyiségű citoplazmával rendelkeznek, melyekben közepes méretű intracitoplazmatikus granulumok találhatóak, sejtmagjuk kerek, benne sűrű kromatinnal. Osztódó sejthalakok a tumorban nem figyelhetők meg (2. ábra) [7, 9].
- **Grade 2:** A tumorsejtek nagyobb számban találhatóak meg és infiltrálják a dermis mélyebb rétegeit, illetve a subcutist. Csoportokba rendeződött mérsékelten pleomorf sejtek alkotják, melyeket vékony fibrovascularis stroma vesz körül. A neoplastikus sejtek alakja a kerektől az oválisig változó, a citoplazma jól kivehető és benne láthatók a citoplazmatikus granulumok, melyek nagyobbak és sötét lilán festődnek. A sejtmag

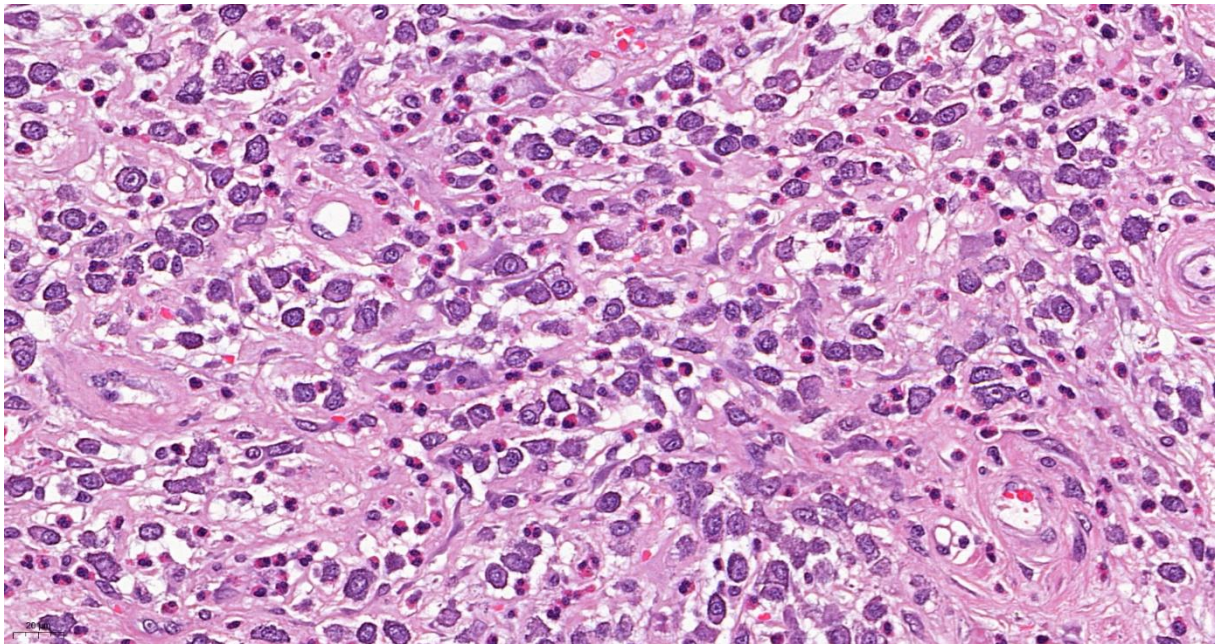
alakja a kerektől a csipkézett szélűig változatos lehet, mitotikus sejtalakok ritkán láthatók (0-2 osztódó MC/ 10 NNL (nagy nagyítású látótér)) (3. ábra) [7, 9].

- **Grade 3:** A MCT sejtgazdag, a benne található mastocyták pleomorphok, kerek, ovoid vagy orsó alakúak és a tumor infiltrálja a subcutist, illetve a mélyebb rétegeket is. A sejtek citoplazmájának mennyisége nem kifejezett, az intracitoplazmatikus granulumok aprók, nehezen felismerhetők. A stroma kötőszövetből (kollagén) és erekből épül fel, melyben elszórtan hyalin lerakódások figyelhetők meg. A sejtmag kerek vagy csipkézett, benne egy vagy több nucleolus látható. Két sejtmaggal rendelkező sejtek és mitotikus sejtalakok is nagy számban fordulnak elő (3-6 osztódó MC/ 10 NNL) (4. ábra) [7, 9].

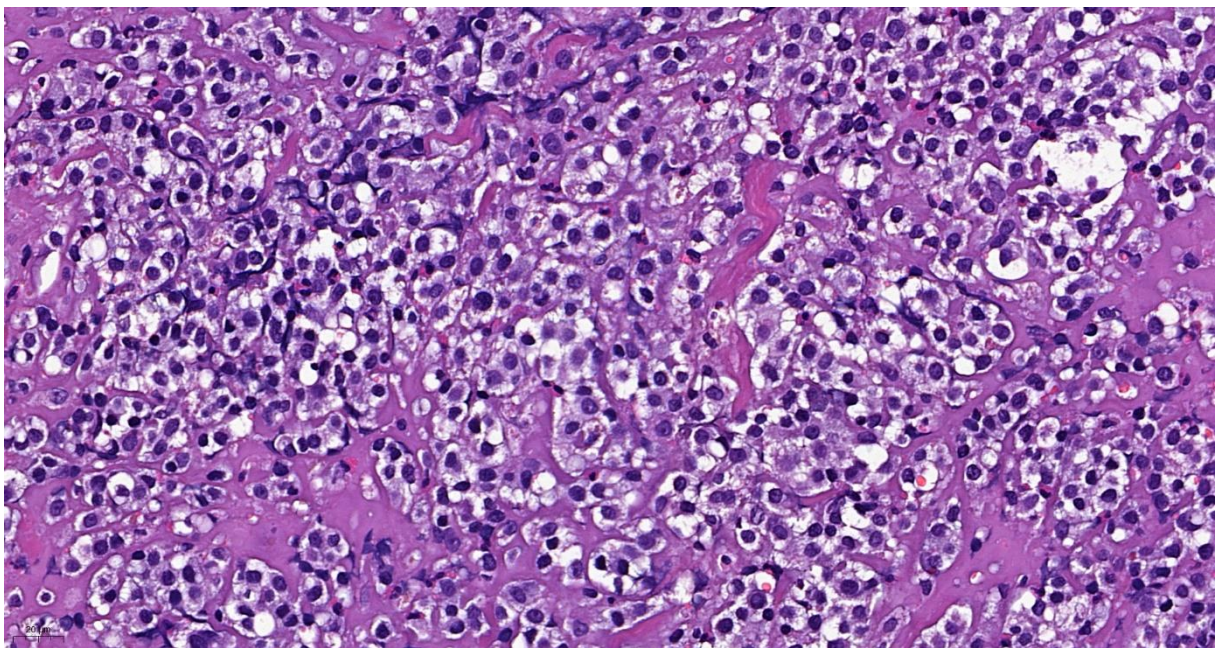
A kritériumok viszonylag szubjektív megítélése miatt bizonyos fokú inkonzisztenciát figyeltek meg egyes patológusok által osztályozott daganatok között, leginkább a grade 2-es MCT-k esetében [8]. A három-fokú osztályozási rendszer használatakor jelentkező variabilitást két-fokú rendszer alkalmazásával próbálták Kiupel és mtsai (2011) kiküszöbölni egy 95 kutyát bevonó tanulmányban. Ez azért volt szükséges, hogy pontosabban tudják azonosítani azokat a MCT-kat, melyek magas kockázatot jelentenek és nagy a metasztatikus képességük [14]. A két-fokú osztályozási rendszer alkalmazásakor szignifikánsan különböző túlélési időket tapasztaltak. Összehasonlítva a Patnaik és mtsai által használt rendszerrel pontosabban tudta megbecsülni a túlélési időt és a metasztázisok képződésének valószínűségét, valamint 96,8 %-os egyezést figyeltek meg a patológusok besorolásai közt [8, 14].



Ábra 2.: Grade 1 cutan MCT kutyában [15].



Ábra3.: Grade 2 cutan MCT kutyában [15].



Ábra 4: Grade 3 cutan MCT kutyában [15].

1.2.6.2 Kiupel-rendszer:

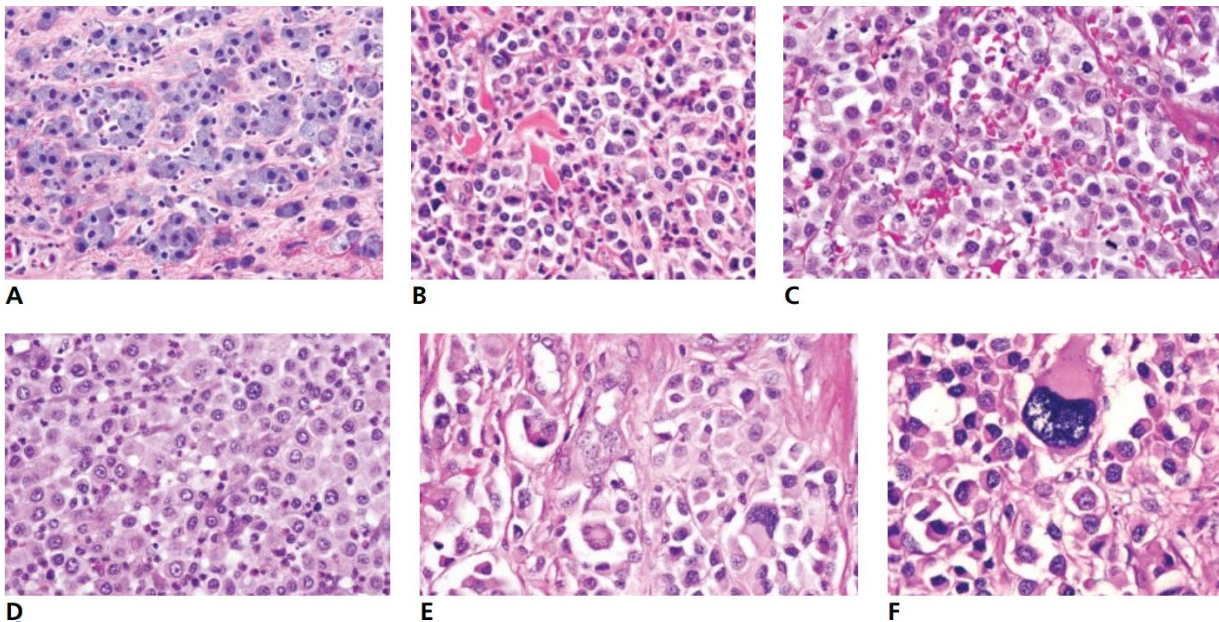
Ebben a rendszerben a tumorokat low-grade és high-grade kategóriákba sorolják. A low-grade MCT-val diagnosztizált kutyák esetében a túlélési idő mediánja több, mint 2 év volt, míg a high-grade daganattal rendelkező pácienseké kevesebb, mint négy hónap [8].

- **Low-grade:** Azok a MCT-k, amelyekre a high-grade kritériumok egyike sem teljesül. A low-grade MCT-k jól differenciált, monomorph sejtekből állnak, melyek

citoplazmájában közepes méretű, benne jól látható granulomok találhatóak és sejtmagjuk kerek (5. ábra) [8, 16].

- **High-grade:** A következő kritériumok közül legalább egy jellemző a vizsgált szövetszaporulatra, tíz NNL-ben (mely standardizált terület mérete 2,37 mm²): Legalább hét mitotikus sejtalak, legalább három multinukleáris sejt (három vagy több sejtmaggal rendelkező sejt), legalább három elváltozott sejtmagvú mastocyt (kifejezetten atipikus csipkézett, szegmentált vagy szabálytalan alakú sejtmaggal), legalább 2 sejt mutat karyomegáliát (azaz a sejtmag a sejt teljes átmérőjének legalább tíz százalékára duzzadt) (5. ábra) [8, 16].

Több tanulmány is alátámasztotta a Kiupel (két-fokú) osztályozási rendszer relevanciáját a prognózis felállítás szempontjából és a besorolások közti kisebb fokú eltéréseket [8, 14, 16]. Az új két-fokú rendszer előnye, hogy megszűnik a Patnaik-féle osztályozás szerinti grade 2-es csoport, mely esetében a prognózis a legtöbb esetben nehezen meghatározható. Ezen okok miatt a hisztopatológiai laboratóriumokban elkezdtek mindkét rendszert alkalmazni addig, amíg be nem bizonyosodik valamelyiknek az egyértelmű elavultsága [14].



Ábra 5: Cutan MCT-k a két-fokú rendszer szerint osztályozva. (A) Low-grade MCT. (B,C) High-grade MCT-k. (D) High-grade MCT, és az erre jellemző karyomegália. (E) High-grade MCT, az erre jellemző multinuclearis sejtekkel. (F) High-grade MCT, mastocyt (elváltozott) sejtmaggal [7].

Szövetani tekintetben a subcutan forma esetén az alábbi kritériumoknak kell teljesülnie: a tumor teljes egészében a bőr alatti kötőszövetben helyezkedik el, illetve a cutis és a daganat

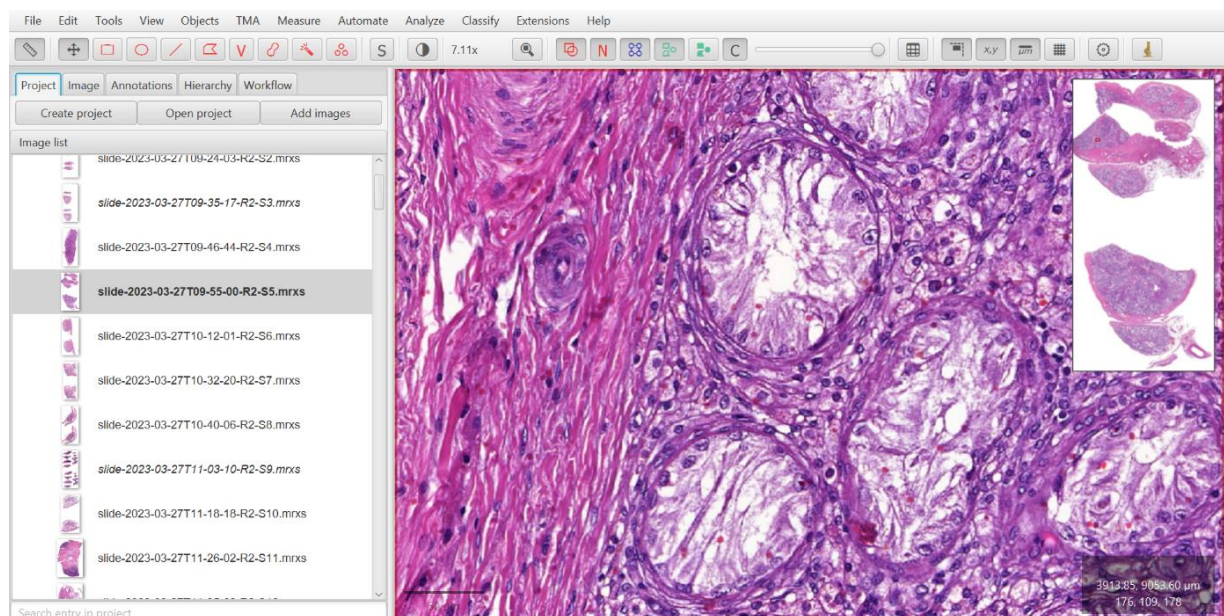
közt annak teljes hosszában zsírszövet található. A cutan forma a subcutis rétegébe is beterjedhet, ezért szükséges a két tumor típus mikroszkópos differenciálása [17].

1.3 A digitális patológia

1.3.1 Felépítése, működése

A digitális patológia (DP) kezdetben teljes szövettani metszetek metszet-szkenneres digitalizációjára terjedt ki, az első szkennert az 1990-es években építették [18, 19]. Ma már egy sokkal összetettebb fogalom, ami a mesterséges intelligencia (MI) patológiai alkalmazását foglalja magába, ezzel új távlatokat nyitva a diagnosztika területén [20]. Egyes tanulmányok szerint a közeljövőben DP módszerek alkalmazásával pontosabb diagnózist lehet majd felállítani, mint a hagyományos vizsgálatok bármelyikével [21]. A módszer a diagnosztikán túl az oktatásban és a kutatásban is széleskörű alkalmazási lehetőséget rejt, és metszet archívumok létrehozását is lehetővé teszi, illetve megkönnyíti a másodvéleményezést a metszetek gyors megosztásán keresztül [21, 22].

A digitalizált teljes szövettani metszetek (WSI-k) a hagyományos tárgylemezek pixelekből álló, digitális formái, felbontásuk a fénymikroszkópéhoz hasonló, azonban ellentétben egy hagyományos metszettel minőségük állandó (6. ábra) [19, 21, 22].

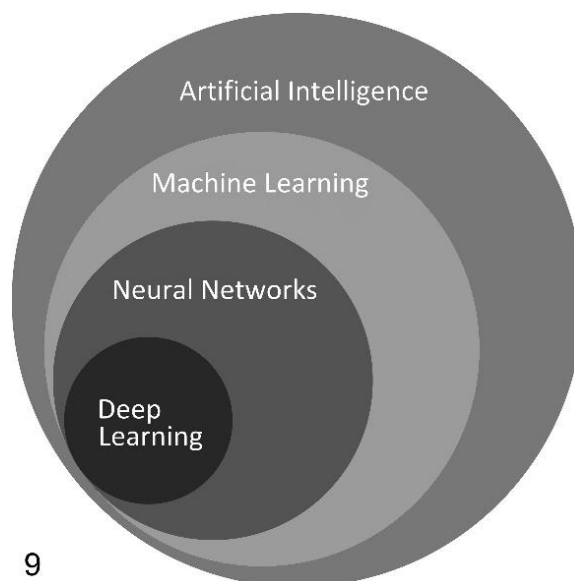


Ábra 6.: Képernyőfelvétel egy WSI részletről a QuPath programban. Bal oldalon a beszkenvelt metszetek listája, a jobb felső sarokban a teljes WSI látható.

A technológiai fejlődés felgyorsította a DP-i rendszerek implementációját a hagyományos patológiába. Az utóbbi két évtizedben növekedett a felbontóképesség, javult a szkennerkapacitás, lerövidült a szkennelési idő és egyre kisebb méretűvé váltak a beszkenelt képek fájljai [18]. Emellett az interneten való megosztás lehetővé tette, hogy két egymástól nagy földrajzi távolságra levő patológus azonos időben vizsgáljon egy metszetet mikroszkóp nélkül [22].

Egy 2018-as 1992 esetet és különböző tumortípusokat vizsgáló tanulmány digitalizált és hagyományos metszetek diagnosztikai értékét hasonlította össze. A digitalizált WSI-k használatával elért diagnosztikai teljesítmény nem volt jelentősen rosszabb, mint a fénymikroszkópiás eljárás (a WSI-k esetében 4,9%-os, a mikroszkópia esetében 4,6%-os volt az eltérés a referenciastandardtól) [23]. Egy másik állatorvosi tanulmány is hasonló megállapításra jutott a kutyák cutan MCT-inak diagnosztikájával kapcsolatban [24].

A gépi tanulás (machine learning, ML) egy MI-n belüli terület, melynek során az algoritmusok taníthatók, és önálló tanulásra képesek, vagyis az új információkat a meglévőkbe illeszthetik és jövőbeli feladatok során felhasználhatják azokat [18, 25]. A mesterséges neurális hálózat (artificial neural networks, ANN) egy fejlett statisztikai algoritmus az MI-n belül, melynek működési elve a biológiai neurális hálózathoz hasonlít (pl. emberi idegrendszer) és fejlődése az utóbbi két évtizedben a deep learning (DL)-nek köszönhetően rohamossá vált [18, 20]. A DL az ML legfejlettebb részhalmaza, mely során az algoritmus többszintű, nem lineáris információkapcsolatokat dolgoz fel és komplex relációkat modellez az adatok között (7. ábra) [25].



Ábra 7.: Az MI (angolul artificial intelligence), ML, ANN és DL összefüggése [26].

A sejt-szegmentáció során a program a sejtmag, citoplazma és sejthalak, illetve ezek relációja alapján detektálja a sejteket és mivel sejtek képezik a szövettani képek legkisebb egységét, a sejt-szegmentáció a legalapvetőbb lépés a digitális képelemzés folyamatában. A digitális képelemzés során tehát az algoritmus felismeri alakja és festődése alapján a sejtmagot, majd a hozzá tartozó citoplazmát és ezt az egységet tekinti egy sejtnek. Továbbá a szoftver megtanítható arra, hogy bizonyos sejttípusokat felismerjen a sejt morfológiája, a sejtmag alakja, festődése, lebonyozottsága és mérete, illetve egyéb jellemzők (pl. citoplazmikus granulumok) alapján [18, 21, 22, 27].

A patológusok szakértelme elengedhetetlen az algoritmusok fejlesztéséhez, technikai tudásuk szükséges a szövetek feldolgozásához, megadják az algoritmus számára szükséges információkat és validálják a program által generált eredményeket. Ezeken felül általában a patológus határozza meg a releváns területeket (region of interest, ROI), amelyeknek mérete egyes esetekben jelentősen eltérhet [18, 20].

1.3.2 Kihívások, limitációk

A DP a munkaerőigény és a diagnózis felállításához szükséges idő csökkentésének, illetve a munkafolyamatok egyszerűsítésének lehetősége mellett számos limitációval is rendelkezik kezdve azzal, hogy egy WSI rendszerbe való investáció és annak fenntartása sokszor meghaladja a kisebb laboratóriumok költség-kapacitását [18, 27]. A technológiai fejlesztéseknek és az egyre növekvő költséghatékonyságnak köszönhetően a WSI-k implementációja már számos orvosi és fogorvosi egyetemen teljes mértékben leváltotta a hagyományos mikroszkópok használatát [21].

A rendszer diagnosztikai folyamatokra korlátozott mértékben használható, azok non-binaritása, azaz nem eldöntendő kérdés jellege megnehezíti az algoritmusok alkalmazását [18, 20]. A legtöbb MI algoritmusnak szüksége van jó felbontású, előzetesen megjelölt képekre, amiket a ML során tudnak hasznosítani [18]. Ez azonban azt jelenti (a rendkívül kis méretű, de folyamatosan gyarapodó erre alkalmas publikus adatbázisnak köszönhetően), hogy az ML-hez szükséges ROI bejelölését szakembernek kell elvégeznie manuálisan [20]. Amellett, hogy ez rendkívül időigényes folyamat, nagy kihívást jelenthet a patológusok számára rossz felbontású képek esetén [27]. Kihívást jelent továbbá az egyes szövetek nagyfokú morfológiai eltérése (pl. epithelium, idegszövet, izomszövet). A különböző szövettípusok jellemzően együttesen vannak jelen (ezzel morfológiai eltérést eredményezve az egyéni szövetből), mely tovább nehezíti az algoritmus fejlesztését [20].

1.3.3 Perspektíva

A WSI rendszerek térhódítása az állatorvosi területen is megkezdődött és 2014-re két nagy állatorvosi laboratórium, az IDEXX és az Antech is teljes mértékben leváltotta a hagyományos szövettani diagnosztikai módszereit [26]. A technológia fejlődésének következtében pedig a közeljövőben várhatóan egyre több intézmény fogja követni ezek példáját [21].

2 Anyag és módszerek

2.1 Metszet készítés

A sebészi kimetszést követően beküldött MCT-kból származó minták fixálása 10%-os semleges pufferezt formaldehid-oldatban zajlott 24–48 órán át. Ezt követően a mintákat víztelenítő automatával, etanol és xilol segítségével dehidratáltuk, majd paraffinba ágyasztuk. A paraffinblokkokból üvegtárgylemezre 3–4 μm -es metszeteket készítettünk, amelyeket rutin eljárással H&E-nal festettünk meg.

2.2 Metszet szkennelés

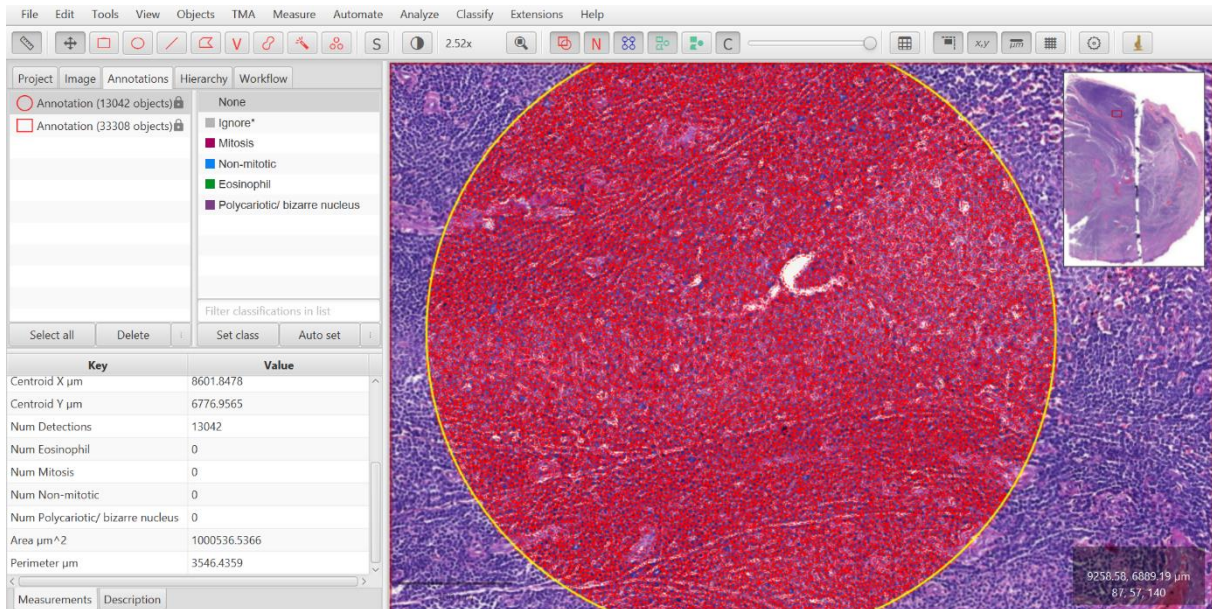
A vizsgálathoz 55, különböző kutyákból származó H&E-nal megfestett hagyományos szövettani metszetet használtunk, melyek high- vagy low-grade besorolású MCT-kból származtak. A minták Patnaik-rendszer szerinti osztályozása jelentősen megnehezítette volna a digitális vizsgálatot, ezért a Kiupel-féle osztályozási rendszert alkalmaztuk. A metszeteket egy Panoramic Midi (3D, Histech, Budapest, Hungary) szkennel segítségével digitalizáltuk 20-szoros nagyítású objektívet használva.

2.3 Szoftveres elemzés

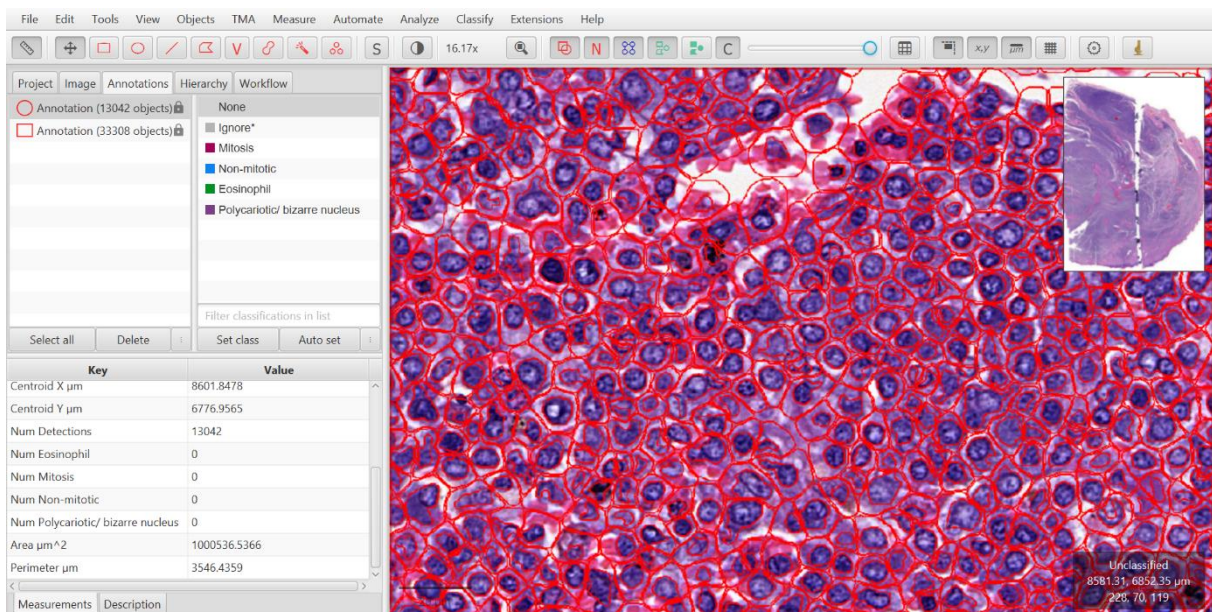
A szkennelés során a metszetekből előállított WSI-eket a QuPath (0.4.3-as verzió) digitális patológiai szoftver segítségével elemeztük [28]. Első lépésként egy üres mappában kialakítottuk a szoftver által igényelt speciális fájlformátumot, az úgynevezett projektet, majd ehhez hozzáadtuk az egyes digitalizált metszeteket. Ezután meghatároztuk a program számára, hogy H&E-nal festett metszeteket analizálunk, ez az optimális képminőség és a sejtek, sejtmagok megfelelő felismerése miatt fontos. Az első kijelölést a WSI-k olyan területein végeztük el, melyeken nagy számú MC és osztódó sejtalak volt látható. A kijelölt 1 mm^2 ($1.000.000 \mu\text{m}^2$)-es metszetrészleteken először a „cell detection” parancsot használtuk, mely során a program felismerte és beazonosította a sejteket és a sejtmagokat (8. és 9. ábra).

Ezt követően az 1 mm^2 -es területen belül manuálisan jelöltünk ki MC-kat, eosinophil granulocitákat és osztódó MC-kat, valamint a high-grade besorolás alá eső MCT-kra jellemző multinukleáris vagy sejtmag elváltozást mutató sejteket. Ezeket a beazonosított, általunk megjelölt sejteket az előzetesen „ad class” paranccsal létrehozott, nevüknek megfelelő csoportokba klasszifikáltuk, melyekhez addig adtunk további sejteket, míg a program szubjektív megítélésünk szerint már jól tudta azokat csoportosítani. A multinukleáris vagy bizarr sejtmagvú mastocytá kategória bevezetésére a nagyfokú morfológiai variabilitás miatt

volt szükség, a program így később nagyobb eséllyel különítette el helyesen ezeket a sejteket. A műtermékek, illetve egyéb nem-sejt struktúrák esetében az „ignore” besorolást használtuk, így az algoritmus megtanulta, hogy mely elemeket kell figyelmen kívül hagyni. Az osztályozó betanítását a ”classify” menüponton és az ”object classification” almenüponton belüli ”train object classifier” parancs segítségével végeztük ANN algoritmus használatával.



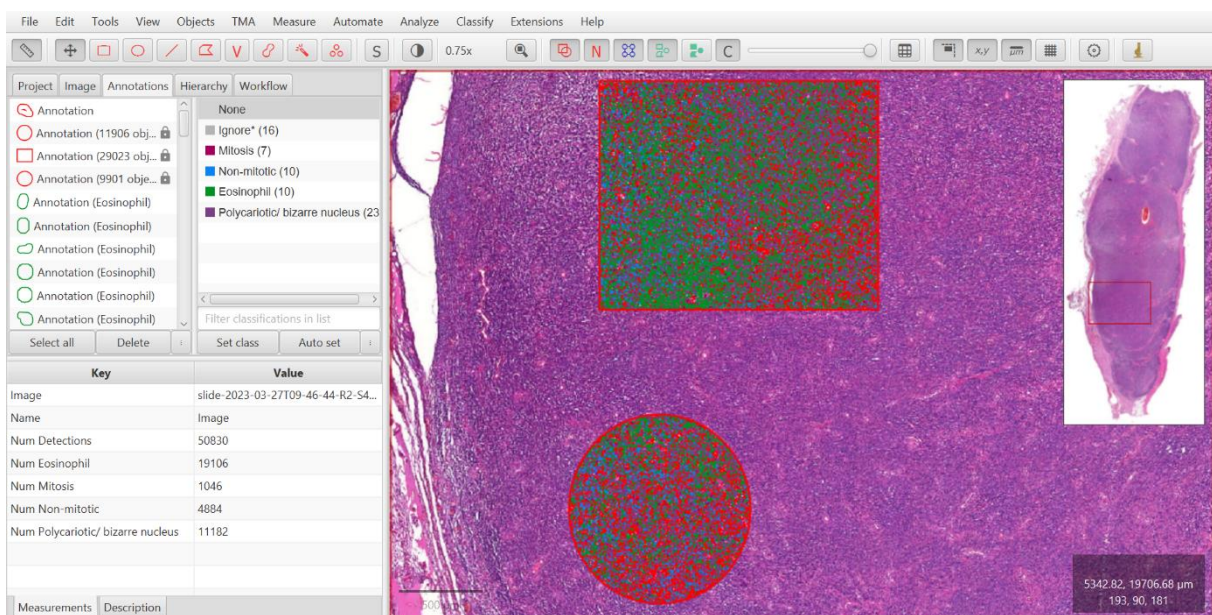
Ábra 8.: A kijelölt 1 mm²-es területen az algoritmus a felismert sejteket piros körvonalal jelöli. A képernyő bal oldalán a kijelölt terület adatai láthatók.



Ábra 9.: A program működése a sejtmag-szegmentáción alapul, ami szerint a szövettani kép alapegysége a sejtmag és az azt körülvevő citoplazma, amiket festődésük és alakjuk alapján ismer fel. A jobb felső sarokban látható, hogy a WSI mely területén helyezkedik el a kinagyított részlet.

Ezt követően elneveztük és elmentettük a kész osztályozó algoritmusokat, amiket az adott metszeten, illetve a későbbiekben bármelyik másik WSI elemzésekor is alkalmazhattunk. Az osztályozó tulajdonképpen egy adatbázis, amit a szoftver a metszet más kijelölt részeinek vagy egyéb WSI-k elemzésekor az ML során alkalmazni tud és ezáltal képes a manuálisan kiválasztott sejtek közös tulajdonságait felismerve azokhoz hasonló sejteket detektálni. Összesen a vizsgálat során nyolc különböző osztályozót tanítottunk be és alkalmaztunk, erre a változatos metszetminőség és az árnyalatbeli különbségek miatt volt szükség.

Következő lépésként a betanításra használt vagy egy másik WSI-n kijelöltünk egy $2,37 \text{ mm}^2$ ($2.370.000 \mu\text{m}^2$) nagyságú területet, ahol először szintén a „cell detection”, majd a „load object classifier” parancsot hajtottuk végre. Az algoritmus ennek során az ML-lel megszerzett adatokat alkalmazva detektálta a különböző sejteket a kiválasztott osztályozónak megfelelően (10. ábra).



Ábra 10.: Az algoritmus betanítása (kör alakú terület) és az osztályozó alkalmazása (négyzet alakú terület), illetve az ezekhez tartozó adatok a képernyő bal oldalán láthatók. A program a különböző sejt-típusokat eltérő színnel jelöli, a színek magyarázata szintén bal oldalt található.

Amennyiben egy új WSI vizsgálatokor az ellenőrzés során egyik meglévő osztályozó sem bizonyult megfelelőnek, teljesen új osztályozót tanítottunk be. Az ellenőrzéskor egy már létező osztályozót alkalmazva végigpásztáztuk a területet és összevetettük az algoritmus által bizonyos csoportba sorolt sejteket azok általunk megfelelőnek tartott besorolásával. Új osztályozót akkor tanítottunk be, ha az algoritmus besorolása jelentősen eltért a miénktől. A

leszámolt osztódó sejtalakok alapján soroltuk be a tumorminta WSI-ket low-grade, illetve több, mint hét mitotikus mastocytá esetén high-grade kategóriába.

2.4 Statisztikai elemzés

A Cohen's kappa a leggyakrabban használt statisztikai eljárás olyan esetekben, amikor két egymástól független értékelő (ember vagy algoritmus) közti egyetértést mértékét kell meghatározni két kategória esetén. Értéke -1 és 1 között mozoghat: $\kappa=1$ amennyiben az átfedés a két értékelő közt teljes, $\kappa=0$ abban az esetben, amikor az átfedés mértéke megegyezik a véletlen valószínűségével és $\kappa=(-1)$ akkor, amikor egyáltalán nincs összefüggés a két értékelő közt [29, 30].

A Cohen's kappa kiszámítása az alábbi képlettel történik:
$$\kappa = \frac{\Pr(a) - \Pr(e)}{1 - \Pr(e)}$$

Ahol $\Pr(a)$ az értékelők közti egyetértés és $\Pr(e)$ a véletlenszerű egyetértés valószínűsége [30].

A Cohen's kappa kiszámítását az alábbi weboldal segítségével végeztük: <https://datatab.net/statistics-calculator/reliability-analysis/cohens-kappa-calculator>.

2.5 Célkitűzések

Munkánk során célkitűzésünk a kutyákban gyakran előforduló cutan mastocytomák kétfokú osztályozási rendszer szerinti grade-jének megállapítása volt az osztódó sejtalakok digitális képelemző szoftver segítségével történő kvantifikációjával, hogy összevegyük a szabadon hozzáférhető, felhasználóbarát QuPath szoftver és így a digitális patológia alkalmazhatóságát és hatékonyságát a manuális grade meghatározásához képest egyszerűbb grading rendszerekben, ami utóbbi viszonylag szubjektív és gyakran kevésbé megismételhető.

3 Eredmények

3.1 Metszet szkennelés

A szoftveres analízist 39 metszet esetében tudtuk elvégezni az 55-ből, vagyis a metszetek 70,9%-ában. A többi esetben feltehetően valamilyen adatátviteli vagy metszetminőségbeli okból kifolyólag a WSI-k felbontása nem volt megfelelő a vizsgálathoz.

3.2 Szoftveres elemzés

A manuális és a digitális besorolás a 39 esetből 19-ben egyezett meg, tehát az esetek 48,7%-ában (2. táblázat). A manuálisan low-grade MCT-k száma 27, az algoritmus ezek közül 10 esetben, vagyis az esetek 37,0%-ában sorolta be a megfelelőnek vélt manuális kategóriába a daganatokat. A manuálisan high-grade mastocytomák száma 12, a program ebből 9 esetben, azaz az esetek 75,0%-ában határozta meg ugyan azt a grade-t (1. és 2. diagram).

metszet sorszám	felismert sejtek	eosinophil granulocytá	mitotikus sejtalak	mastocytá	digitális grade	manuális grade	egyezés
1	18889	4606	34	7612	high	low	nem
2	13635	2799	1	6029	low	low	igen
3	29023	14016	549	1958	high	low	nem
4	4316	1830	3	1079	low	low	igen
5	16986	3665	0	8203	low	low	igen
6	11419	5338	0	2217	low	low	igen
7	16814	2823	0	9739	low	low	igen
8	23858	435	0	19485	low	low	igen
9	15636	3550	0	996	low	low	igen
10	26684	10299	58	7088	high	high	igen
11	16263	3065	292	1006	high	low	nem
12	13582	8527	75	3880	high	low	nem
13	20218	6935	85	8460	high	low	nem
14	34346	1656	0	28800	low	low	igen
15	14499	5660	3	975	low	low	igen
16	21510	7976	174	5842	high	low	nem
17	26465	698	83	13021	high	low	nem

18	22155	330	5	1388	low	high	nem
19	20532	4656	45	13923	high	high	igen
20	29453	6760	86	16273	high	high	igen
21	27720	5226	52	19909	high	high	igen
22	33308	167	25	13531	high	low	nem
23	21366	1577	342	5160	high	low	nem
24	24064	978	85	22404	high	low	nem
25	18978	10145	14	4508	high	low	nem
26	10020	4067	55	3342	high	low	nem
27	22505	13587	6	5739	low	low	igen
28	17049	8040	48	6858	high	low	nem
29	19282	6402	15	12613	high	low	nem
30	14906	3856	191	7076	high	low	nem
31	26762	5119	134	19800	high	low	nem
32	25897	13938	46	10059	high	high	igen
33	25828	5980	7	14351	low	high	nem
34	24663	2703	54	5742	high	high	igen
35	27734	9709	20	7322	high	high	igen
36	25357	13089	3	6651	low	high	nem
37	25245	3744	51	15804	high	high	igen
38	24791	3339	59	20782	high	high	igen
39	7774	1955	11	3048	high	low	nem

Táblázat 2.: A QuPath szoftver szövettani osztályozásának eredményei összevetve egy patológuséval. A számok darabra értendők.

3.3 Statisztikai elemzés

Vizsgálatunk során a Cohen's kappá értéke -0,284 volt.

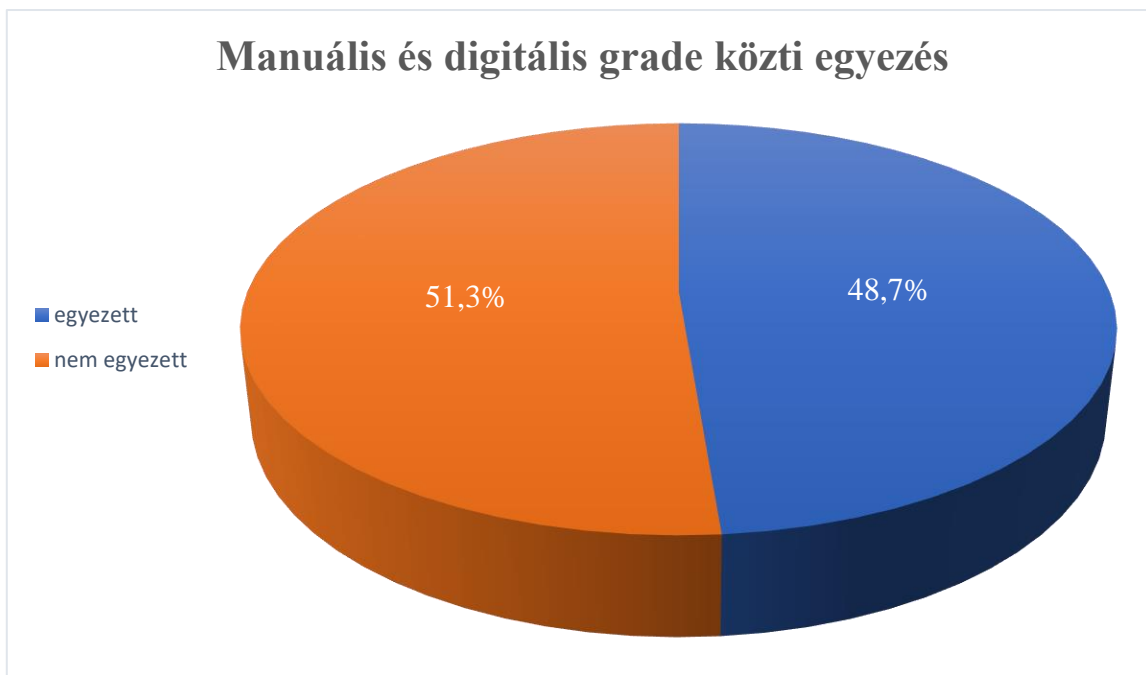


Diagram 1.: A manuális és digitális (QuPath szoftveres) osztályozás (grade) közti megegyezés mértéke. Kék színnel jelölve azon esetek százalékos aránya, amikor egyezett a manuális és digitális grade és narancssárgával, amikor nem.

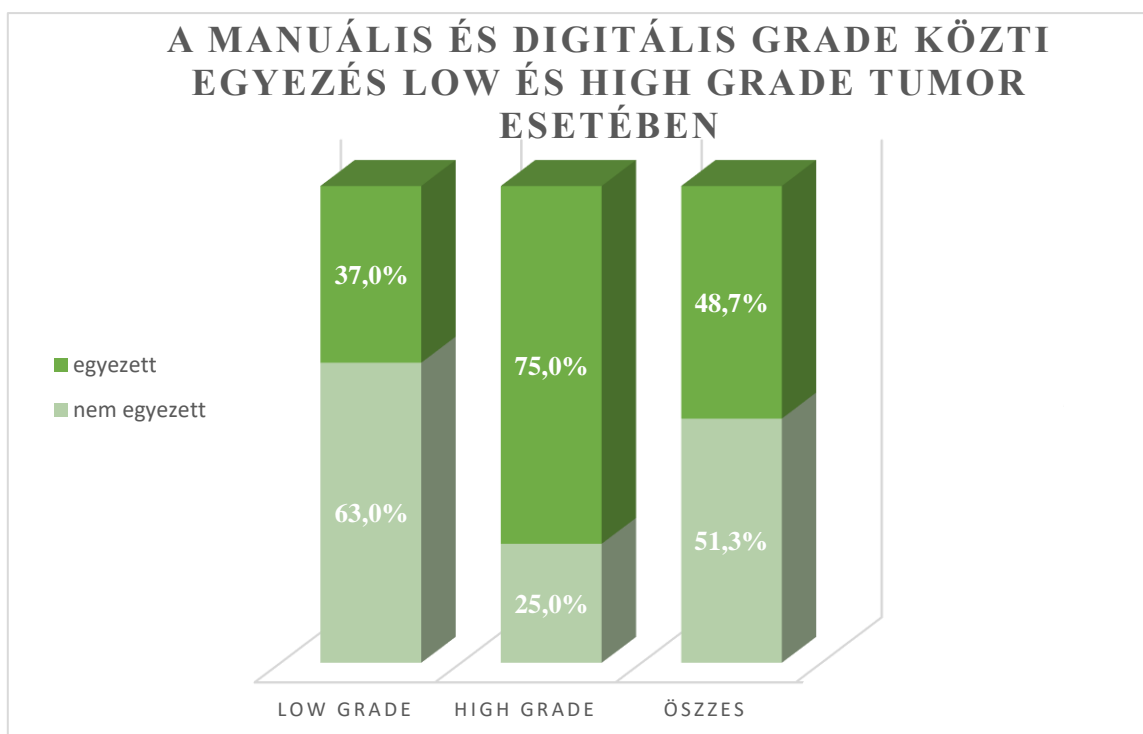


Diagram 2.: A manuális és digitális (QuPath szoftveres) osztályozás (grade) közti megegyezés mértéke low-grade, high-grade és az összes tumor esetében. Sötét zölddel jelölve azon esetek százalékos aránya, amikor a digitális és manuális grade megegyezett és világos zölddel, amikor nem.

4 Megbeszélés, következtetések

A MCT-k vagy hízósejtes tumorok, melyeket neoplasztikus mastocyták alkotnak a leggyakrabban előforduló bőrdaganatok közé tartoznak kutyák esetében, szám szerint a MCT-k teszik ki a bőrben előforduló neoplasztikus elváltozások 7-20%-át és a rosszindulatú bőrtumorok 11-27%-át [2, 4, 7, 8, 9, 31]. Amellett, hogy gyakori előfordulása miatt nagy klinikai jelentőséggel bír, számos fajta esetében igazolódott be fajtapredispozíció (pl. boxer, amerikai staffordshire terrier, shar-pei, mopsz stb.), a kialakulás kockázata pedig a kor előrehaladtával nő (a MCT-val diagnosztizált kutyák átlag életkora kb. 9 év) [2, 7, 9, 10].

A stage az egyik legfontosabb prognosztikai faktor, mely szoros összefüggést mutat az adott tumor grade-jével. A stage 1-es és 2-es MCT-k besorolása általában grade 1, azaz jól differenciált, kedvezőbb prognózisú, a stage 3-as és stage 4-es tumorok besorolása az esetek többségében grade 2 vagy 3, azaz kevésbé vagy rosszul differenciált, kedvezőtlenebb prognózisú [2, 7, 13].

A terápiás terv felállításához és a sebészi beavatkozás során a biztonsági zóna megbecsüléséhez szövettani vizsgálat szükséges, mellyel megállapítható a MCT grade-je. A grading során a patológus mikroszkóppal vizsgálva meghatározza, hogy az adott minta egy 2,37 mm²-es területen hány osztódó sejtalakot tartalmaz és részben ez alapján sorolja be a megfelelő grade-be (low-grade: hétnél kevesebb mitotikus sejtalak, high-grade: legalább 7 mitotikus sejtalak). Ez azonban rendkívül időigényes és monoton feladat, emellett az értékelés patológusonként nagy variabilitást mutathat (17-34%) [2, 7, 13, 31]. Ezen kívül számos technikai nehézséggel is meg kell küzdenie a vizsgáló személynek (pl. a mitotikus sejtalakok morfológiai diverzitása, a hagyományos metszet minőségének romlása a tárolás során stb.) és a tumor heterogenitása miatt területenként jelentősen eltérhet a mitotikus sejtszám. A digitális képelemző szoftverek használata a patológiában potenciális megoldást jelenthet a felmerülő problémákra, és emellett tucatnyi új lehetőséget sorakoztat fel nem csak a diagnosztika, de az oktatás, tudományos konferenciák és az információ tárolás tekintetében is [18, 20, 21, 22, 27, 32].

Egy hasonló témával foglalkozó 32 esetet és 2 szakembert bevonó tanulmány szerint annak ellenére, hogy az algoritmus diagnosztikai teljesítménye elmarad egy szakértő patológusétól a mitotikus sejtszám (mitotic cell count, MCC) meghatározásában, mégis van amiben a szoftver jobban teljesít. A DP rendszerek kétséget kizáróan jobbak az értékelés azon részfolyamatában, amelyben a legnagyobb mitotikus-denzitású részletet kell a WSI-n belül felkutatni. Továbbá az

algoritmus kisebb variabilitással dolgozik, mint a manuális vizsgálók [31]. Egy másik 28 esetet vizsgáló tanulmány is az előzőhöz hasonló konzekvenciát vont le. A bevont szakértő patológusok között az MCC meghatározását tekintve 17%-os volt a variabilitás, azonban ennek oka nem csak az eltérő osztályozás, hanem a tumor heterogenitása miatti területenként eltérő mitotikus denzitás is lehet [32].

A vizsgálatunk során tapasztalt negatív kappá érték azt jelenti, hogy az általunk betanított algoritmus és a szakértő patológus osztályozása közt nincs összefüggés. Ennek oka feltehetően az lehet, hogy ellentétben a fent említett vizsgálatokkal, a mi esetünkben nem egy tapasztalt szakember végezte a szoftver betanítását a sejtek felismerésére. Megfelelő adathalmaz hiányában a program sem tud helyes következtetéseket levonni, azonban ennek létrehozása számos kihívással jár, kezdve az osztódó sejthalakok morfológiai diverzitásával egészen az időfaktorig. Továbbá az általunk használt QuPath DP szoftver működése sem tökéletes, a program folyamatos fejlesztésen esik át [33, 34]. Ez a tényező szintén hozzájárulhatott a végeredményhez. Mindemellett vizsgálatunk során azt találtuk, hogy az algoritmus jelentősen nagyobb arányban ismerte fel megfelelően a high-grade MCT-kat, azaz 75%-ban, szemben a low-grade tumoroknál tapasztalt 37%-kal. Ennek oka a szoftver fokozott szenzitivitása, azonban alacsonyabb specificitása lehet a mitotikus sejthalakok felismerésére, ebből kifolyólag pedig alkalmasabb lehet a nagyobb MCC-ú (tehát high-grade) tumorok osztályozására. Fontos azt is kiemelni, hogy a grade megállapítás osztódó sejt számra való kizárólagos alapozása nem felel meg a tényleges Kiupel-rendszernek, noha a high-grade cutan formák az esetek nagy többségében tíz NNL-ben több mint hét osztódó sejttel rendelkeznek.

A MI integrációja a patológiába jelentősen megkönnyítheti a diagnosztikai munkát, de az emberi tényezőt nem lehet mellőzni. A dolgozatban leírt eredményeket összevetve a korábbi cikkekkel jól szemléltetik a patológus szakértők szerepének fontosságát a folyamatokban. Azonban a digitális képelemző szoftverek kimagaslóan teljesítettek a releváns területek (ROI) felkutatásában, ami a nagy terület tüzetes átvizsgálása miatt rendkívül monoton és időigényes munka. Mindemellett egy patológus által precízen betanított algoritmus a közeljövőben valószínűleg sokkal jobb diagnosztikai teljesítményre lesz képes, mint az eddig tárgyalt szoftverek bármelyike, ebben az esetben a szakemberek feladata a program tanítására és a diagnózis validálására összpontosulhat.

5 Irodalom jegyzék

1. Dean PW. Mast cell tumors in dogs: diagnosis, treatment, and prognosis. *Veterinary Medicine* 1988, 83: 185-188, 190-192 (USA)
2. W. Misdorp. Mast cells and canine mast cell tumours. A review, *Veterinary Quarterly* 2004, 26:4, 156-169, <https://doi.org/10.1080/01652176.2004.9695178>
3. Dean D. Metcalfe, Dana Baram, Yoseph A. Mekori. Mast cells. *Physiological reviews* 77. 4, October 1997 (USA)
4. Takahashi T, Kitani S, Nagase M, Mochizuki M, Nishimura R, Morita Y and Sasaki N. IgG-mediated histamine release from canine mastocytoma-derived cells. *International Archives of Allergy and Immunology* 2001, 125: 228-235, <https://doi.org/10.1159/000053820>
5. Yosuke Amagai, Akane Tanaka, Keitaro Ohmori, Hiroshi Matsuda, Establishment of a novel high-affinity IgE receptor-positive canine mast cell line with wild-type c-kit receptors, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 366, Issue 3, 2008, Pages 857-861, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.12.053>
6. Valkó Anna, Lőrincz Márta, *Immunglobulin. Immunológiai illusztrációk könyve* 2020, első kiadás, 78-79. oldal (Magyarország)
7. Matti Kiupel, Mast cell tumors. *Tumors in domestic animals*, Donald J. Meuten 2007, 5. edition, 176-195 (USA)
8. Matti Kiupel, Melinda Camus, *Diagnosis and Prognosis of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors*, *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, Volume 49, Issue 5, 2019, Pages 819-836, <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.04.002>
9. A. K. Patnaik, W. J. Ehler, E. G. Mavewen. Canine Cutaneous Mast Cell Tumor: Morphologic Grading and Survival Time in 83 Dogs, *Vet. Pathol.* 21:469-474 (1984), <https://doi.org/10.1177/030098588402100503>
10. Stephanie JW Shoop, Stephanie Marlow, David B. Church, Kate English, Paul D. McGreevy, Anneliese J. Stell, Peter C. Thomson, Dan G. Neill, David C. Brodbelt, 2015, Prevalence and risk factors for mast cell tumours in dogs in England, *Canine Genetics and Epidemiology*, 2052-6687, <https://doi.org/10.1186/2052-6687-2-1>
11. (11) Ozaki K, Yamagami T, Nomura K and Narama I. Mast cell tumors of the gastrointestinal tract in 39 dogs. *Veterinary Pathology* 2002; 39: 557-564, <https://doi.org/10.1354/vp.39-5-557>

12. Krzysztof Okoń, Rosa Patruno, Ilaria Marech, Nicola Zizzo, Michele Ammendola, Patrizia Nardulli, Claudia Gadaleta, Marcello Introna, Gennaro Capriuolo, Rosa Angela Rubini, Domenico Ribatti, Cosmo Damiano Gadaleta, Girolamo Ranieri, 2014, C-Kit Expression, Angiogenesis, and Grading in Canine Mast Cell Tumour: A Unique Model to Study C-Kit Driven Human Malignancies, 2314-6133, <https://doi.org/10.1155/2014/730246>
13. M. M. Welle, C. R. Bley, J. Howard, S. Rüfenacht (2008). Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. *Veterinary Dermatology*, 19(6), 321-339. <https://doi.org/10.1111/j.1365>
14. (14) S. Sabattini¹, F. Scarpa¹, D. Berlato², and G. Bettini¹ (2015). Histologic Grading of Canine Mast Cell Tumor: Is 2 Better Than 3?, *Oncology—Original Article*, <https://doi.org/10.1177/0300985814521638>
15. Állatorvostudományi Egyetem Patológiai Tanszék archívum
16. Camus MS, Priest HL, Koehler JW, et al. Cytologic Criteria for Mast Cell Tumor Grading in Dogs With Evaluation of Clinical Outcome. *Veterinary Pathology*. 2016;53(6):1117-1123. [doi:10.1177/0300985816638721](https://doi.org/10.1177/0300985816638721)
17. E. Bellamy, D. Berlato (2021). Canine cutaneous and subcutaneous mast cell tumors: a narrative review. *Journal of small animal practice*, volume 63, issue 7, 497-511. <https://doi.org/10.1111/jsap.13444>
18. Soojeong Nam, Yosep Chong, Chan Kwon Jung, Tae-Yeong Kwak, Ji Youl Lee, Jihwan Park, Mi Jung Rho, Heounjeong Go (2020), Introduction to digital pathology and computer-aided pathology, <https://doi.org/10.4132/jptm.2019.12.31>
19. Hanna MG, Ardon O, Reuter VE, Sirintrapun SJ, England C, Klimstra DS, Hameed MR. Integrating digital pathology into clinical practice. *Mod Pathol*. 2022 Feb;35(2):152-164. Epub 2021 Oct 1. Erratum in: *Mod Pathol*. 2021 Oct 13;; Erratum in: *Mod Pathol*. 2021 Nov 9; PMID: 34599281. [doi: 10.1038/s41379-021-00929-0](https://doi.org/10.1038/s41379-021-00929-0).
20. Hamid Reza Tizhoosh, Liron Pantanowitz, Artificial Intelligence and Digital Pathology: Challenges and Opportunities, *Journal of Pathology Informatics*, Volume 9, Issue 1, 2018, 38, ISSN 2153-3539, https://doi.org/10.4103/jpi.jpi_53_18.
21. Pantanowitz L. Digital images and the future of digital pathology. *J Pathol Inform*. 2010 Aug 10. [doi: 10.4103/2153-3539.68332](https://doi.org/10.4103/2153-3539.68332). PMID: 20922032; PMCID: PMC2941968.

22. Al-Janabi S, Huisman A, Van Diest PJ. Digital pathology: current status and future perspectives. *Histopathology*. 2012 Jul;61(1):1-9. Epub 2011 Apr 11. PMID: 21477260. [doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.03814](https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.03814)
23. Mukhopadhyay S, Feldman MD, Abels E, et al. Whole slide imaging versus microscopy for primary diagnosis in surgical pathology: a multicenter blinded randomized noninferiority study of 1992 cases (pivotal study). *Am J Surg Pathol* 2018; 42: 39-52, [doi:10.1097/PAS.0000000000000948](https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000948)
24. Bertram CA, Gurtner C, Dettwiler M, et al. Validation of Digital Microscopy Compared With Light Microscopy for the Diagnosis of Canine Cutaneous Tumors. *Veterinary Pathology*. 2018;55(4):490-500. [doi:10.1177/0300985818755254](https://doi.org/10.1177/0300985818755254)
25. Deng L, Yu D. Deep learning: methods and applications. *Found Trends Signal Process* 2014; 7: 197-387, <http://dx.doi.org/10.1561/20000000039>
26. Zuraw A, Aeffner F. Whole-slide imaging, tissue image analysis, and artificial intelligence in veterinary pathology: An updated introduction and review. *Veterinary Pathology*. 2022;59(1):6-25. [doi:10.1177/03009858211040484](https://doi.org/10.1177/03009858211040484)
27. Journal Article, Farzad Ghaznavi, Andrew Evans, Anant Madabhushi, Michael Feldman, *Digital Imaging in Pathology: Whole-Slide Imaging and Beyond*, 2013, *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 331-359, <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-pathol-011811-120902>
28. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, McQuaid S, Gray RT, Murray LJ, Coleman HG, James JA, Salto-Tellez M, Hamilton PW. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep*. 2017 Dec 4;7(1):16878. [doi: 10.1038/s41598-017-17204-5](https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5).
29. Warrens MJ (2015) Five Ways to Look at Cohen's Kappa. *Journal of Psychology and Psychotherapy* vol. 5, [doi: 10.4172/2161-0487.1000197](https://doi.org/10.4172/2161-0487.1000197)
30. McHugh ML. Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochemia Medica (Zagreb)*. 2012;22(3):276-82. PMID: 23092060; PMCID: PMC3900052, <https://hrcak.srce.hr/89395>
31. Bertram, C.A., Aubreville, M., Marzahl, C. et al. A large-scale dataset for mitotic figure assessment on whole slide images of canine cutaneous mast cell tumor. *Sci Data* 6, 274 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41597-019-0290-4>
32. Bertram CA, Aubreville M, Gurtner C, et al. Computerized Calculation of Mitotic Count Distribution in Canine Cutaneous Mast Cell Tumor Sections: Mitotic Count

- Is Area Dependent. *Veterinary Pathology*. 2020;57(2):214-226.
[doi:10.1177/0300985819890686](https://doi.org/10.1177/0300985819890686)
33. Morriss, N. J., Conley, G. M., Ospina, S. M., Meehan III, W. P., Qiu, J., & Mannix, R. (2020). Automated quantification of immunohistochemical staining of large animal brain tissue using QuPath software. *Neuroscience*.
[doi:10.1016/j.neuroscience.2020.0](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.0)
34. Cieslak, Cassandra; Mitteldorf, Christina; Krömer-Olbrisch, Tanja; Kempf, Werner; Stadler, Rudolf, *The American Journal of Dermatopathology*, Volume 45, Number 2, February 2023, pp. 93-98(6), doi:
<https://doi.org/10.1097/DAD.0000000000002330>

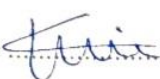
6 Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Horváth Dávid Gézának, hogy motivált hozzáállásával, önzetlen támogatásával és végtelen türelmével nem csak hozzásegített a dolgozat elkészültéhez, de emellett jellemfejlődésemhez is nagy mértékben hozzájárult. Köszönöm az Állatorvostudományi Egyetem Patológiai Tanszék munkatársainak segítőkészségüket és azt, hogy rendelkezésemre bocsátották a Tanszék tulajdonában álló szükséges tárgyi feltételeket. Köszönöm Dr. Balka Gyula egyetemi docensnek a szakmai hozzájárulását. Hálásan köszönöm az odaadó szellemi és emocionális támogatást és a számtalan tanácsot édesanyámnak, édesapámnak, testvéremnek, barátaimnak és a mérhetetlen megértést és türelmet, amit Laczkó Lehel tanúsított ez időszak alatt.



A diplomamunka - a szakra vonatkozóan - a Tanulmányi- és Vizsgaszabályzathoz, valamint az Útmutató a szakdolgozatok diplomamunkák készítéséhez című mellékletében leírt követelményeknek megfelel.

A diplomamunka befogadható, védésre alkalmasnak találtam.

Hallgató aláírása: 


.....
témavezető aláírása

Tanszéki előadó aláírása:  Átvétel dátuma: 2023. 11. 08

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM
Patológiai Tanszék
1078 Budapest, István u. 2.
1400 Budapest, Pf. 2.

A nyomtatvány a hallgatói és a tanszéki ügyintézői aláírás, valamint az átvétel dátuma nélkül nem érvényes. A konzultációs lap a diplomamunka mellékletét képezi!



Diplomamunka konzultációs lap állatorvostan hallgatók részére

A hallgató neve: LINSZLÓ FRUZSINA

Neptun-kódja: AS19966

A témavezető neve és beosztása: DR. HORVÁTH DAVID GÉZA, EGYETEMI TANÁR-SEGÉD

Tanszék: PATOLÓGIAI TANSZÉK

A diplomadolgozat címe: KUTYÁK CUTAN MASTOCYTOMAIBAN AZ OSZTÓDÓ SEJTALAKOK KVANTITATÍV VIZSGÁLATA DIGITÁLIS KÉPELEMZŐ SZOFTVEKREL

Konzultáció - 1. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2023.	03.	07.	megfelelt	<i>RKZ</i>
2.	2023.	03.	16.	megfelelt	<i>RKZ</i>
3.	2023.	04.	03.	megfelelt	<i>RKZ</i>
4.	2023.	04.	19.	megfelelt	<i>RKZ</i>
5.	2023.	04.	27.	megfelelt	<i>RKZ</i>

Érdemjegy az első félév végén: 5

Konzultáció - 2. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2023.	09.	07.	megfelelt	<i>RKZ</i>
2.	2023.	09.	12.	megfelelt	<i>RKZ</i>
3.	2023.	09.	21.	megfelelt	<i>RKZ</i>
4.	2023.	10.	11.	megfelelt	<i>RKZ</i>
5.	2023.	10.	16.	megfelelt	<i>RKZ</i>

Érdemjegy a második félév végén: 5

A nyomtatvány a hallgatói és a tanszéki ügyintézői aláírás, valamint az átvétel dátuma nélkül nem érvényes. A konzultációs lap a diplomamunka mellékletét képezi!

NYILATKOZAT

Alulírott *László Fruzsina* nyilatkozom, hogy diplomamunkám, melynek címe *Kutyák cutan mastocytomaiban az osztódó sejtalakok kvantitatív vizsgálata digitális képelemző szoftverrel* tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2023. évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2023.11.08.



László Fruzsina