

Állatorvostudományi Egyetem, Patológiai tanszék

Kutya lágyyszöveti szarkóma grade meghatározás digitális patológiai módszerekkel

TDK dolgozat



Szerző: Kállai Petra

Témavezető: Dr. Horváth Dávid Géza, egyetemi tanársegéd

Budapest

2023

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
Absztrakt/Összefoglalás.....	4
Abstract/Summary	5
Bevezetés	6
1. Irodalmi áttekintés	7
1.1 Lágyszöveti szarkómák.....	7
1.1.1 Fogalom.....	7
1.1.2 Előfordulás	7
1.1.3 Kóroktan.....	8
1.1.4 Klinikum és patológia.....	8
1.1.5 Gradelés	10
1.1.6 Kezelés, prognózis.....	11
1.2 Digitális patológia	13
1.3 Kutyák, mint modellállatok humán daganatokhoz.....	15
2. Célkitűzések	16
3. Anyag és módszer.....	17
3.1 Metszet készítés	17
3.2 Metszet szkennelés.....	17
3.3 Szoftveres elemzés	17
3.4 Statisztikai elemzés	20
4. Eredmények.....	21
4.1 Metszet szkennelés.....	21
4.2 Szoftveres elemzés	21
4.3 Statisztikai elemzés	23
5. Következtetések.....	24
6. Irodalomjegyzék	26
Köszönetnyilvánítás.....	30

Rövidítések jegyzéke

CAD = számítógép-asszisztált diagnosztika

CT = komputertomográfia

H&E = hematoxinilin és eozin festés

MRI = mágneses magrezonancia képalkotás

NNL = nagy nagyítású látótér

WSI = whole slide image/digitalizált teljes szövettani metszet

Absztrakt/Összefoglalás

Kutyákban a lágyszöveti szarkómák az egyik leggyakrabban diagnosztizált heterogén tumorcsoport. Ezen daganatok várható kiújulása és áttétképzési hajlama szoros összefüggést mutat a szövettani grade-el, amelyet hagyományosan patológus határoz meg a tumor differenciáltsági foka, az osztódó sejtszám és a nekrotikus területek kiterjedése alapján. A grade pontos és reprodukálható prognosztikai faktor kell, hogy legyen, ugyanakkor eltérések lehetnek a vizsgálók közötti szubjektivitásból adódóan. A digitális patológia elterjedésének köszönhetően egyre nagyobb teret nyert a digitalizált metszetek kvantitatív, objektív, reprodukálható analízise. Kutatásunkban 50 hematoxin-eozinnal festett, különböző kutyákból származó szövetmintát digitalizáltunk, továbbá QuPath nyílt felhasználású metszetelemző szoftver segítségével állapítottuk meg az osztódó sejthalakok számát és az elhalásos területek kiterjedését. A digitálisan korrigált grade-et a patológus által hagyományosan megállapítottal összevetve bíráltuk el a szoftver teljesítményét. A vizsgált 50-ből 39 esetben (78%-ban) volt egyezés a grade-k között, a Fleiss kappa értéke 0,669 volt, mely jelentős egyezést mutat a szoftver és a patológus osztályozása között. A jelentős egyetértésben szerepe lehetett a differenciáltság kizárólagos manuális elbírálásának és az elhalásos területek egyszerűbb értékelésének. Bár az osztódó sejthalakok felismerése bizonyult a leginkább bonyolultnak, jelentősen eltérő osztódó sejtszámok sem tudták így nagymértékben befolyásolni a grade-t. Részben digitalizált grading rendszerek potenciálisan gyorsabbá, objektívebbé és reprodukálhatóbbá tehetik a diagnosztikai munkát, de a programok betanítása nem nélkülözheti szakértő patológusok közreműködését.

Abstract/Summary

In dogs, soft tissue sarcomas are one of the most frequently diagnosed heterogeneous tumor groups. The expected recurrence and metastasis tendency of these tumors is closely related to the histological grade, which is traditionally determined by a pathologist based on the degree of tumor differentiation, the mitotic count and the extent of necrotic areas. The grade must be an accurate and reproducible prognostic factor, but at the same time there may be disparities due to the subjectivity between examiners. Due to the spread of digital pathology, the quantitative, objective and reproducible analysis of digitized sections has gained remarkable relevance. In our research, we digitized 50 hematoxylin-eosin-stained tissue slides from different dogs, and the mitotic count together with the extent of necrotic areas were determined using QuPath image analysis software. We evaluated the performance of the program by comparing the digitally corrected grade with the manually determined one. We had agreement between 39 of the 50 examined cases (78%), the Fleiss kappa value was 0.669, which shows a substantial agreement between the software's and the pathologist's classification. The significant accordance may have been due to the exclusive manual evaluation of the differentiation and the simpler evaluation of the necrotic areas. Although the recognition of mitotic cells proved to be the most complicated, significantly different numbers of dividing cells could not influence the grade to a large extent. Partially digitized grading systems can potentially make the diagnostic work faster, more objective and more reproducible, but the training of the programs cannot lack the cooperation of expert pathologists.

Bevezetés

A lágyyszöveti szarkómák heterogén daganatcsoport, hasonló biológiai, de eltérő morfológiai tulajdonságokkal. A lágyyszöveti szarkóma típusát szövettani eredete határozza meg, ide sorolt daganatok a fibroszarkóma, a perivaszkuláris érfaltumor (korábban hemangiopericitóma), a liposzarkóma, a rhabdomioszarkóma, a leiomioszarkóma, a pleomorf szarkóma, a malignus ideghüvelytumorok, a mixoszarkóma, a mixofibroszarkóma és a mesenchimóma.

Közös klasszifikációjuk és grade-lésük alapja a hasonló biológiai tulajdonságaik, többek között, hogy képesek a test bármely, kötőszövetet tartalmazó pontján megjelenni, általában pszeudokapszuláltak, rosszul definiált szövettani szegéllyel rendelkeznek, és képesek fasciákon keresztül infiltrálni a környező szöveteket. Következésképpen jellemző a sebészi eltávolítás utáni lokális rekurrencia, különösen, ha a sebészi szélek nem épek, a hematogén úton történő metasztázis képzés és kiterjedt lágyyszöveti szarkómák esetén pedig a sugár- és kemoterápiára való rezisztencia. Általában alacsony metasztatikus hajlammal rendelkeznek, viszont lokálisan invazívak. Bizonyos kötőszöveti daganatok kívül esnek a klasszifikáción magasabb metasztatikus hajlamuk miatt, ilyenek például a hemangioszarkóma, oszteoszarkóma, kondroszarkóma és limphangioszarkóma.

Leggyakrabban középkorú és idősebb, közepes és nagytestű kutyákban fordulnak elő. Lehet viscerális és nem viscerális formája, kutyáknál a bőrt és a subkutist érintő daganatoknak egyes tanulmányok szerint körülbelül a 15%-át teszik ki.

Definitív diagnózishoz legmegbízhatóbban biopsziával vett minta szövettani elemzésével juthatunk. A szövettan alapján meghatározható a daganat differenciáltságának foka, vagyis a grade, ami segít megbecsülni a neoplazma klinikai agresszivitását, így fontos prognosztikai faktor. Kutyák lágyyszöveti szarkómájának grade meghatározása a tumorsejtek differenciáltságát, az osztódó sejthalakok számát és a daganat állományának elhalását veszi figyelembe. A grade meghatározásával kapcsolatos egyik legfontosabb probléma a reprodukálhatóság és a vizsgálók közötti szubjektivitás. Ez eltérésekhez vezethet a daganat rosszindulatúságának megállapításában és a megfelelő kezelés kiválasztásában. Digitális patológiai módszerekkel növelhető az objektivitás és a reprodukálhatóság a vizsgálók között, elsősorban az elhalásos területek kiterjedésének és az osztódó alakok számának pontosabb meghatározásával, és csökkenthető a diagnózis felállításához szükséges idő is.

1. Irodalmi áttekintés

1.1 Lágyszöveti szarkómák

1.1.1 Fogalom

Az embrionális mezodermából különböző lágyszövetek származtathatók, mint például az izomszövetek, az ínszövetek, a szalagok, az ízületi tok szövetei, a fasciák, az idegek szöveteinek nagy része, valamint a nyirok- és vérerek. Ezek közül bármelyikből eredhet malignus tumor, azaz lágyszöveti szarkóma, de számos mesenchimális eredetű daganatot nem sorolnak a lágyszöveti szarkómák közé az eltérő biológiai tulajdonságaik (például magasabb lokális inváziós képességük és áttétképzési hajlamuk) miatt [1, 2]. A lágyszöveti szarkómák arról a kötőszövet típusról vannak elnevezve, ahonnan feltételezhetően erednek. Ide sorolt daganatok a fibroszarkóma, a perivaszkuláris érfaltumor (korábban hemangiopericitóma), a liposzarkóma, a rhabdomioszarkóma, a leiomioszarkóma, a pleomorf szarkóma, a malignus ideghüvelytumorkok, a mixoszarkóma, a mixofibroszarkóma és a mesenchimóma [3]. Nem lágyszöveti szarkómák közé sorolt mesenchimális daganatok például a hemangioszarkóma, a GIST (gasztrointesztinális strómális tumor), a szájüreget érintő fibroszarkómák és a perifériás ideghüvely tumorok, amik a plexus brachialisból vagy lumbosacralisból eredhetnek. Néhány kötőszöveti eredetű daganatról nem egységes a szakirodalom, egyesek a lágyszöveti szarkómák közé sorolják a lymphangioszarkómát is, míg mások a rhabdomioszarkómát és a leiomioszarkómát sem [1, 2].

1.1.2 Előfordulás

Tierce és munkatársainak kutatása alapján a fejlett országokban a daganatos megbetegedések a vezető elhullási okok társ- és munkakutyák esetében, a 10 év feletti kutyák 40-50%-a érintett [4]. E betegségek prevalencia-növekedésének fő oka, hogy nőtt a kutyák várható élettartama a magasabb minőségű állatorvosi ellátás és annak jobb elérhetősége miatt [5]. A leggyakrabban az emlő daganatok, a benignus epitheliális bőr tumorok, a hízósejtes daganatok, a hisztiocitóma, a lágyszöveti szarkómák, a lipóma és a melanocitás daganatok fordulnak elő [6]. A lágyszöveti szarkómák kutyákban a negyedik leggyakrabban diagnosztizált daganatcsoport [4]. A cutan és subcutan forma a leggyakoribb, a bőrt érintő daganatok 9-15%-a lágyszöveti szarkóma, a macskáknál ez 7 %-ot tesz ki [3]. Egy 2021-es kutatás szerint évente 100 000 kutyából 35-öt, 100 000

macskából 17-et diagnosztizálnak lágyszöveti szarkómával [5]. Általában a középkorú vagy idősebb kutyákat érinti, kivéve a rhabdomioszarkómát, ami ritkán fordul elő és inkább fiatalabb páciensekben. A nagytestű kutyák gyakrabban érintettek, míg a nemnek nincs hajlamosító szerepe a lágyszöveti szarkómák kialakulásának szempontjából [5]. Ezzel szemben a fajtapredispozíció szerepe bizonyított. Egyes fajtatiszta kutyáknál magasabb vagy alacsonyabb bizonyos daganatok kialakulásának esélye keverék kutyákkal összehasonlítva. Általánosságban a beagle, a magyar vizsla, a boxer, a schnauzerek, a spánielek, a francia bulldog és a golden retriever jobban predisponált a daganatos betegségek kialakulására, mint a keverékek. A boxerek, golden retrieverek, rottweilerek és a schnauzerek gyakrabban érintettek malignus neopláziákkal, míg a west highland white terrier, magyar vizslák, chihuahua, tascók és yorkshire terrier a benignus elváltozásokra hajlamosabbak. A hemangioszarkóma rendkívül gyakori német juhászokban, ugyanakkor más malignus daganatok előfordulása ritkább ebben a fajtában [6].

1.1.3 Kóroktan

A lágyszöveti szarkómák kialakulásának számos oka lehet, többek között traumát, sugárzást, idegen testet, ortopédiai implantátumokat és *Spirocerca lupi* fertőzöttséget hoztak vele összefüggésbe, de ezeket csak néhány esetben írták le. Macskákban, illetve emberekben is jelentettek olyan eseteket, amikor injekció, vakcina vagy idegen anyag következtében alakult ki tumorigenesis, de kutyák esetében a szarkóma onkogenesis oka legtöbbször ismeretlen [5].

1.1.4 Klinikum és patológia

A lágyszöveti szarkóma heterogén daganatcsoport, ezért sok a bizonytalanság a biológiai tulajdonságait és kezelését illetően. Közös jellemzőjük, hogy a test bármely anatómiai pontján képesek megjelenni, ahol kötőszövet van [1, 2]. Általában pseudokapszuláltak, vagyis makroszkóposan kapszulának tűnő képlet határolja a szövetszaporulatot, de szövettani vizsgálat során nem igazolható valódi tumorkapszula jelenléte. Általában rosszul definiált szövettani szegéllyel rendelkeznek még ha felületes vizsgálat esetén kapszuláltnak is tűnhetnek [3]. Képesek fasciákon keresztül infiltrálni a környező szöveteket, lokálisan invazívak (1.ábra). Általánosságban alacsony, illetve közepes metasztázis hajlammal rendelkeznek, de nem teljes kimetszés esetén gyakorivá válhat a rekurrencia és a hematogén úton történő metasztázis képzés. Nagy kiterjedésű tumorok

esetén jellemző a kemo- és radioterápiára való rezisztencia [7]. Lassú növekedésűek, tömöttek és a környezetükben nem elmozdíthatóak. Szöveti invázió szempontjából megkülönböztetünk viscerális és nem viscerális formát, ami befolyásolhatja a tünetek jellegét és súlyosságát. A viscerális forma magába olvaszthat különböző szerveket, többek között funkció zavart, pl. hányást, hasmenést és következményesen súlyvesztést okozhat tápcsatorna érintettségénél. Az orálisan helyeződő lágyyszöveti szarkómák halitosishoz, dysphagiához és anorexiához (rossz lehelethez, nyelési nehézséghez, étvágyvesztéshez) vezethetnek. Ha a tumor növekedése perifériás idegeket érint, akkor sántaság, fájdalom és funkció zavar, illetve kiesés figyelhető meg [3].



1.ábra: Lokálisan invazív, a maxillát beolvasztó lágyyszöveti szarkóma kutyában (Dr. Monique Meyer, Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan).

Fizikális vizsgálatnál különösen fontos a szövetszaporulat mellett a környező nyirokcsomók alapos áttapintása is. Ha a regionális nyirokcsomók megnagyobbodtak, javasolt vékonytű aspirációs minta citológiai vizsgálata és a mellkas három irányú röntgenezése tüdőmetasztázisok keresése végett [3]. A röntgen nagyobb,

elmozdíthatatlan szövetszaporulat vizsgálatánál a csontinvázió megállapítására is hasznos lehet. A fejen, nyakon vagy a testüregekben elhelyezkedő lágyszöveti szarkómák esetén pontosabb képet kaphatunk a neopláziáról, illetve a környező szervek, szövetek érintettségéről CT és MRI vizsgálatokkal [1, 2]. A szövetszaporulathoz vett vékonytű aspirációs minta citológiai vizsgálata segíthet a diagnózis felállításában. A lágyszöveti szarkómák gyakran tartalmaznak elhalásos és gyulladásos területeket, tehát, ha citológiai mintában gyulladásos és nekrotikus sejtek mellett nem találunk daganatos sejteket, az nem zárja ki a daganatos elváltozást. A reprezentatív minta érdekében érdemes több helyről venni a képletből. Definitív diagnózishoz biopsziás minta szövettani elemzésével juthatunk, mely segíti a megfelelő kezelés kiválasztását is [3].

1.1.5 Gradelés

A tumor grading olyan paramétereknek a szövettani értékelése és számszerűsítése, amelyek segítenek megbecsülni a neoplazma klinikai agresszivitását. A grading rendszernek egyszerűnek, könnyen használhatónak és reprodukálhatónak kell lennie, információt kell, hogy biztosítson a prognózisról [8]. A legtöbb kutyákra és macskákra használt grading rendszer humán rendszerekből származtatott. A francia grading rendszert széles körben használják humán szarkómák grade-lésére, ezt először Kuntz és munkatársai [9] alkalmazták kutya lágyszöveti szarkómára, azzal a változtatással, hogy a tumornekrózist is figyelembe vették. Állatorvosi területen a gyakran előforduló daganattípusokra fejlesztettek ki grading rendszereket, ilyenek a lágyszöveti szarkómák, oszteoszarkómák, hízósejtes daganatok, lymphoma, emlő- és tüdőkarcinómák, a húgyúti-, vese- és prosztatakarcinómák és a központi idegrendszert érintő daganatok. A gyakorlatban széleskörűen alkalmazott, klinikailag releváns rendszerekből azonban kevés van. A staginggel ellentétben a grading-et nem klinikus, hanem patológus végzi. A grading rendszereket elsősorban malignus daganatokra használják, de az állatorvosi gyakorlatban inkonzisztens, hogy mely daganatokat soroljuk a lágyszöveti szarkómák közé. A specifikus diagnózis hiánya, valamint benignus entitások bevonása vezethetett ahhoz, hogy a grading rendszereket kutya benignus orsósejtes daganatokra is alkalmazzák, ami szignifikáns különbséget képez a humán megközelítéshez képest [10, 11, 12]. A Kuntz-féle grading rendszer három grade-be sorolja a lágyszöveti szarkómákat. Ezt úgy határozzuk meg, hogy önálló pontszámmal értékeljük a szövettani differenciáltságot (jól-1 pont, rosszul-2 pont, differenciálatlan-3 pont), a 10 egybefüggő nagy nagyítású látótérre (NNL) számolt osztódó sejtszámot (9-ig 1 pont, 10 és 19 között

2 pont, 19 felett 3 pont) és a nekrozis százalékos arányát a teljes tumorszövetben (0% 0 pont, 50%-ig 1 pont, 50% felett 2 pont). Ezeknek a pontszámoknak az összege adja meg, hogy az adott daganat milyen grade-be sorolható (3-ig grade I/low grade, 4-5 grade II/intermediate grade, 6 és felette grade III/high grade) [8]. Egyes tanulmányok a grade-ből a túlélési időre próbáltak következtetni, de emellett érdemes más faktorokat is figyelembe venni, például a sebészi szélek szövettani státuszát és a lokális rekurrancia esélyét. A grade alapján következtethetünk a daganat metasztatikus rátájára, grade I tumorok esetén 20%-ot, grade II-es daganatoknál 27%-ot és grade III-as esetekben 60%-ot találtak, de ezt kis esetszámmal dolgozó tanulmányban vizsgálták [8]. Egyes daganatok (például a kutyák állkapocskörnyéki fibroszarkómái) esetében fokozott körültekintéssel kell meghatározni a grade-t, mivel a low grade tumorok akár 50%-a agresszív viselkedést mutat, ami a gyors növekedésben és progresszióban, illetve a rövid időn belüli rekurranciában nyilvánul meg, függetlenül a grade-től. Ezek a daganatok szövettanilag low grade, biológiailag high grade elváltozások. A grade meghatározásával kapcsolatban problémát jelenthet a reprodukálhatóság és a vizsgálók közötti szubjektivitás, illetve, hogy a kutya lágyszöveti szarkóma grade-léssel foglalkozó cikkek összehasonlíthatósága korlátozott [8].

1.1.6 Kezelés, prognózis

Különböző faktorok befolyásolják a terápia kiválasztását, ilyenek a szövettani grade, a klinikai stage, a kezelés célja, aszerint, hogy tüneti kezelést vagy teljes gyógyulást szeretnénk elérni és hogy mennyire kivitelezhető a szövettanilag ép széllel való eltávolítás. A high grade-re jellemző szövettani tulajdonságok szignifikánsan rövidebb túlélési időt jósolnak, mivel kihívást jelent a sebészi eltávolítást követő lokális rekurrancia kezelése [1, 2]. A klinikai stage megállapítását a tumor mérete és lokalizációja, a környező nyirokcsomók érintettsége, valamint a távoli metasztázis jelenléte alapján végzik. [3].

A legtöbb kezelési terv összetett, mivel a multimodális terápia meghosszabbítja a túlélési időt és javítja az életminőséget. Metasztázis és előrehaladott daganat esetében a cél a palliatív kezelés lehet, az élettartam meghosszabítása és az életminőség javítása, teljes gyógyulás általában nem érhető el. A konzervatív terápia részeként a széles biztonsági széllel való sebészi kimetszés a kezelés alapköve (2.ábra). Ennek hátránya, hogy nagy eséllyel maradnak vissza daganatos sejtek, aminek következtében gyakori a lokális

rekurrancia és a visszatérő daganatok kezelése rosszabb prognózisú. A kutyák 40%-a high grade lágyszöveti szarkómával nagy eséllyel képez metasztázist a megfelelő lokális eltávolítás ellenére Bray és munkatársai szerint [1, 2]. Agresszív, mély és széles alapú kimetszés szükséges, minden érintett fascia mélységében a rosszul definiált szélek miatt, így éles határt tudunk biztosítani a tumoros és ép szövetek között. Fontos a daganat eltávolításakor minden korábbi biopsziás mintavételi hely kimetszése is [3]. Inkomplett kimetszés esetén javasolt az ismételt műtét szélesebb biztonsági széllal és kiegészítő radioterápia alkalmazása, melynek hatékonyságáról számos tanulmány beszámolt [1, 2, 13, 14], illetve high grade lágyszöveti szarkómáknál az adjuváns kemoterápia is szükséges a magasabb metasztatikus hajlam miatt [4]. Önmagában végzett kemoterápiára leggyakrabban doxorubicint, mitoxantront használnak, kombinációs kezelésekben vincristint, ciklofoszfamidot és doxorubicint [3]. Radio-, illetve kemoterápiát választanak abban az esetben is, ha a tulajdonos nem vállalja a radikális, kozmetikailag nem elfogadható műtétet. A sugárzás elpusztítja a tumorsejteket vagy gátolja azok szaporodását, ezért nagy kiterjedésű tumoroknál hasznos a preoperatív radioterápia a neoplázia méretének csökkentésére, így biztosítva a megfelelő sebészi széllal való eltávolítás lehetőségét. A preoperatív sugárterápia hátránya viszont, hogy ronthatja a postoperatív sebgyógyulást a besugárzott területen [3]. Egyes tanulmányok szerint jó eredmények érhetők el keskeny biztonsági széllal történő eltávolítás ellenére is low grade lágyszöveti szarkómák esetében, ennek ellenére a szövetszaporulatok biztonsági szél nélküli lefejtését mindenképp el kell kerülni. High grade tumorok esetében a széles sebészi széllal történő eltávolítás sem elegendő a gyógyuláshoz, a betegek akár 30%-ában alakulhat ki metasztázis [1, 2, 9]. A daganatok postoperatív kórszövettani elemzése rendkívül fontos, tájékoztatnia kell a tumor típusáról, grade-jéről és a kimetszés teljességéről [3].

A daganat mérete, szövettani grade-je, fixációja, a metasztázis jelenléte és a sebészi szélek épsége mind fontos prognosztikai faktorok lágyszöveti szarkómák esetében [15]. A kezelés sikertelenségének leggyakoribb oka a sebészi eltávolítás utáni lokális rekurrancia, a betegek 7-75%-ában fordul elő, jelentősen csökkentve a várható túlélési időt [1, 2, 3].



2.ábra: Kutya mellső végtagról széles sebészi széllal eltávolított lágszöveti szarkóma után visszamaradó seb (A) és a második műtét utáni gyógyulás (B) [16].

1.2 Digitális patológia

A digitális patológia legkorábbi használatával foglalkozó első publikációk az 1990-es évekre nyúlnak vissza, csekély esetszámokkal, feltehetően az akkori digitális technológiák korlátozott használhatósága miatt [17]. Azóta számos további tanulmány foglalkozott a WSI-ek (digitalizált teljes szövettani metszetek, whole slide images) és a mesterséges intelligencia orvosi és állatorvosi diagnosztikában való használhatóságával. A 2000-es évek elején már elterjedt volt az Egyesült Államokban a számítógép-asszisztált diagnosztika (CAD) alkalmazása, ugyanakkor sokszor nagy tapasztalattal rendelkező, szakértő patológus által végzett felülvizsgálatra volt szükség a grade pontos megállapításához [18].

A szöveti biomarkerek és a kapcsolódó diagnosztika széleskörű elterjedésének következtében egyre nagyobb teret nyert a szövetminták digitalizálása és a biomarkerek kvantitatív, objektív analízise, valamint ezen folyamatok automatizálása. Ez annak is

köszönhető, hogy a teljes metszetek digitalizálására széles körben elérhetővé váltak metszet szkennerek, melyek rövid idő alatt generálnak nagy felbontású 2D képeket [19]. A gépi tanulási technikák és mesterséges intelligencia segítségével fejleszthetjük a diagnosztika pontosságát, a reprodukálhatóságot és az objektivitást. A digitális patológia előnye, hogy időt spórol meg, könnyen hozzáférhető információt biztosít és egyidőben több munkaállomáson is alkalmazható. Egy tanulmány szerint a manuális sejtszámolás metszetenként akár 100 órát is igénybe vehet, míg automatikus analízis során ez körülbelül 3 perc [5]. A beszkenelt metszeten a szoftverek segítségével könnyen kijelölhetőek az érdekes területek, különböző paraméterek mérhetőek, mint például a tumor mérete vagy a sebési kimetszés szélessége. A grade paramétereinek szubjektív megítélése miatt eltérő grade-t állapíthatnak meg és ennek következtében a beteg nem megfelelő kezelésben részesülhet. A szoftverek által végzett metszet analízis csökkenti a szubjektivitást és a variabilitást, illetve a patológusok között is nagyobb egyetértést figyeltek meg WSI használatakor, illetve új lehetőségeket nyit az oktatásban, kutatásban, továbbképzésekben és a betegek nyomon követésében is [5].

Ugyanakkor számos kihívás nehezíti a mai napig a digitális patológiai módszerek mindennapi diagnosztikában való felhasználását. Az elemző algoritmusoknak rendkívül nagy mennyiségű adatot kell feldolgozniuk a radiológiai vagy egyéb képalkotó eljárásokhoz képest [20]. Madabhushi 2009-ben végzett kutatása szerint elképzelhető, hogy a közeljövőben a digitális képelemző rendszerek elég pontosak lesznek ahhoz, hogy versenyezzenek a drágább, molekuláris prognosztikai tesztekkel a daganatos betegségek kimenetelének előrejelzésében. Rövid- vagy középtávon azonban semmiképp sem pótolhatják az automatizált metszetelemző szoftverek azt a szaktudást, mellyel a patológusok rendelkeznek, céljuk a munkájuk kiegészítése és segítése lehet [21]. Emellett az egyik legnagyobb kihívást a szövetek színintenzitásbeli eltérései, illetve a szkennerek különböző teljesítménye okozza. Ezért a képelemző algoritmusoknak rugalmasan kell tudniuk alkalmazkodni az eltérően festődött mintákhoz. A másik technikai nehézség, hogy a legtöbb metszet szkennerek 2D képet képes előállítani a szövetmintákról, bizonyos alakzatok, például osztódó sejtek viszont nagyobb pontossággal azonosíthatók 3D képek alapján [22].

Bár az elmúlt évtized figyelemreméltó digitális patológiai fejlődésen ment keresztül, annak mindennapi használata problémás maradt. Az analízis nehézsége abból ered, hogy

a minták nagy variabilitást mutatnak biológiai tulajdonságaikban, feldolgozásukban és festésükben, valamint szkennelésükben. A patológusok és szoftverfejlesztők között szoros együttműködésnek kell lennie, hogy az algoritmusok le tudják követni ezt a változatosságot és precíz felismerést tegyenek lehetővé [23].

1.3 Kutyák, mint modellállatok humán daganatokhoz

Az összehasonlító onkológia olyan állatokban természetesen előforduló daganatokat vizsgál, amik humán neoplazmák modelljéül szolgálhatnak [24]. Több okból kifolyólag a kutyák jobb modellnek bizonyulnak, mint a laborállatok. Kutyáknál alapvetően nagyobb a genetikai változatosság, habár bizonyos fajtáknál a fokozott beltenyésztettség miatt egyes daganatok gyakrabban fordulnak elő, mint más fajtákban, ilyen például boxereknél az inzulinóma [5]. Az emberekhez hasonlóan kutyákban is többnyire spontán alakulnak ki a daganatok, ellentétben a kísérleti állatokkal, ahol rendszerint karcinogének által indukáltan fejlődnek. Relatív gyakran fordulnak elő kutyákban ugyanazok a daganattípusok, mint emberekben, például a légyszöveti szarkómák, oszteoszarkómák, emlőcarcinómák, ami nagyobb esetszámú kutatásokat tesz lehetővé [25]. Továbbá alapvetően ugyanazoknak a környezeti tényezőknek vannak kitéve, mint az emberek, ami laborállatok esetében nem, vagy nehezen érhető el. A humán és kutya légyszöveti szarkómák hasonló biológiai és klinikai tulajdonságokkal rendelkeznek, bár a kórszövettani klasszifikációjuk és grade-lésük között vannak eltérések, de tanulmányokban, ahol mindkettőt párhuzamosan vizsgálták azt találták, hogy a kutya tumorokat nagyrészt a humán megfelelőjükkel kongruens grade-be sorolták [24]. A kutyák emberekhez viszonyított rövidebb élettartama gyorsabb és olcsóbb kutatást tesz lehetővé a metasztázisképzés, a rekurrancia és a túlélési idő vizsgálatának tekintetében, ahhoz viszont elegendően hosszú ideig élnek, hogy a lehetséges hosszútávú mellékhatások is vizsgálhatóak legyenek [5].

A kezelési lehetőségek hiányossága miatt a humán gyógyászathoz képest az állatorvosi onkológiában etikailag jobban elfogadott új módszerek kipróbálása, az összes ismert módszer sikertelen végig próbálása helyett. Emellett a társállatok élettani és farmakokinetikai tulajdonságai jobban hasonlítanak az emberekéhez, mint a kísérleti rágcsálóké, illetve a kutyák elég nagy méretűek ahhoz, hogy megfelelő mennyiségű mintát tudjunk gyűjteni és hasonló sebészi kezelési technikákat alkalmazzunk [5].

2. Célkitűzések

Munkánk során az alapvető célkitűzésünk a kutyákban gyakran előforduló, heterogén tumoresoportot képző lágyszöveti szarkóma esetek grade-jének megállapítása, azon belül is az osztódó sejthalakok számának és az elhalásos területek kiterjedtségének kvantitatív, digitális képelemző szoftver segítségével történő meghatározása volt, hogy összevessük 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. Anyag és módszer

3.1 Metszet készítés

A külsős rendelőkől származó, sebészi kimetszést követően beküldött lágyszöveti szarkóma minták fixálása 10%-os semleges puffertelt 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 hematoxilinnel és eozinnal (H&E) festettünk meg.

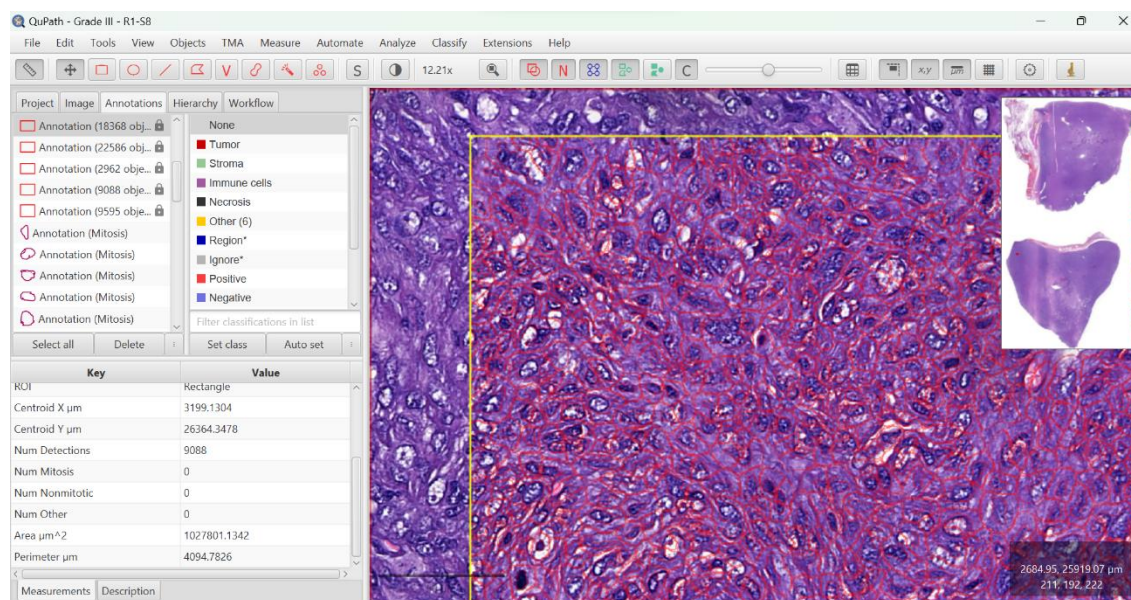
3.2 Metszet szkennelés

A vizsgálathoz 50, különböző kutyákból származó H&E-nal megfestett hagyományos szövettani metszetet használtunk, melyek „low grade/grade I”, „intermediate grade/grade II” vagy „high grade/grade III” besorolású lágyszöveti szarkómákból származtak. A metszeteket egy Panoramic Midi (3D Histech, Budapest, Hungary) szkennel segítségével digitalizáltuk 20-szoros nagyítású objektívet használva.

3.3 Szoftveres elemzés

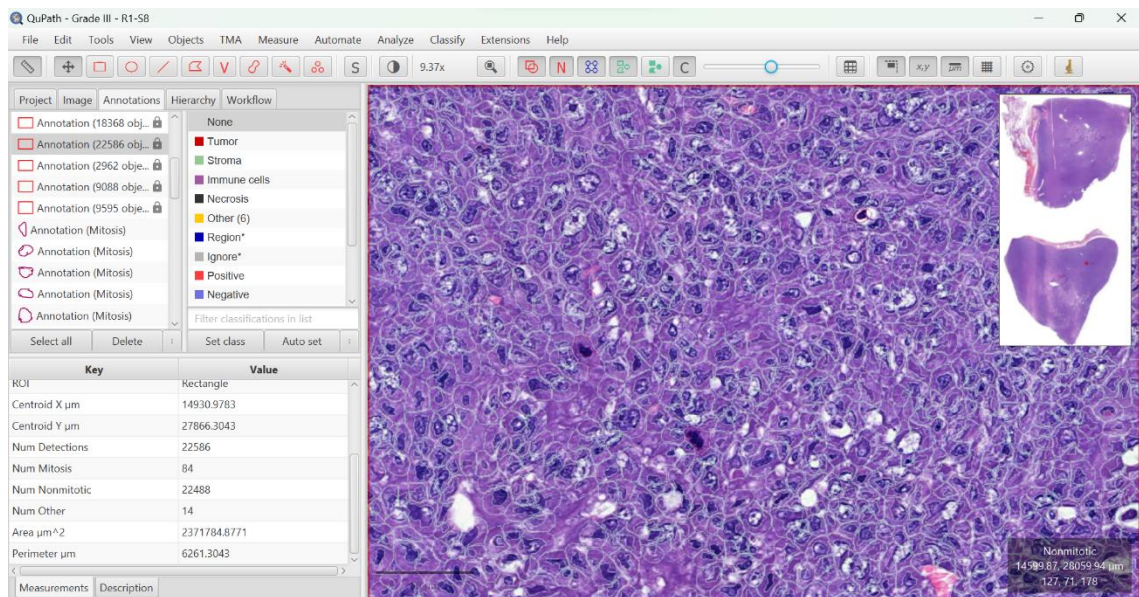
A minták digitalizálását követően a QuPath (0.4.1-es verzió) [19] nyílt felhasználású metszetelemző szoftverrel vizsgáltuk az osztódó sejtek számát és az elhalásos területek kiterjedését. A programban először egy project-et kellett létrehoznunk, melyhez szükséges egy üres mappa, ahova elmentettük. Ezután adhattuk hozzá a projecthez a vizsgálni kívánt 50 metszetet és határoztuk meg a program számára a festési módot, ami a minél jobb képminőség és sejtfelismerés szempontjából fontos. A program betanításához 1 mm² nagyságú területet jelöltünk ki a minta minél sejtűsőbb részén és lefuttattuk rajta a „cell detection” parancsot az „analysis” menüponton belül (3.ábra). Az így kirajzolódó sejtek típusát manuálisan tudjuk beállítani. Esetünkben három csoportba soroltuk a sejteket, osztódó és nem osztódó sejtek, illetve egyéb olyan sejtek, melyeket a kutatás szempontjából figyelmen kívül hagytunk (például fehér- és vörösvérsejtek). Az egyéb kategóriára a pontosabb sejtfelismerés miatt volt szükség, a program annál könnyebben tudja a sejteket besorolni, minél több csoportot biztosítunk, azaz minél több információ áll rendelkezésére a gépi tanuláshoz. Amennyiben elegendő példát mutattunk a szoftvernek, a „classify” menüponton és „object classification” almenüponton belüli

„train object classifier” paranccsal hoztuk létre majd mentettük el az osztályozót („classifier”), a RandomTrees algoritmust használva. Az osztályozó egy olyan algoritmus, melyet bármely másik digitalizált metszeten tudunk alkalmazni, a sejteket a közös tulajdonságaik alapján ismeri fel.



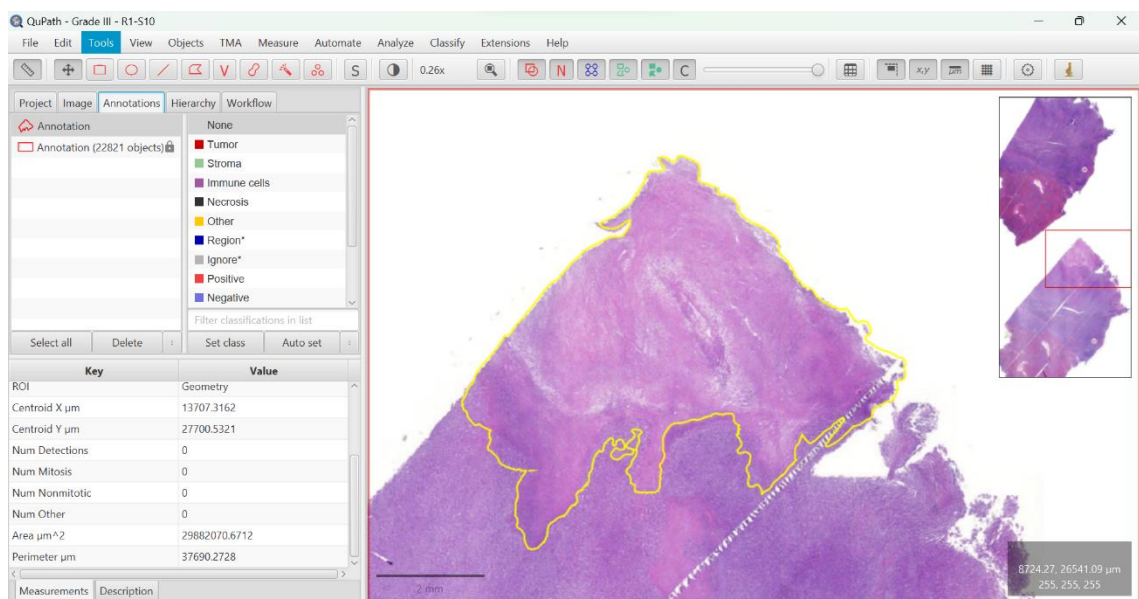
3.ábra: 1 mm²-es kijelölt terület a sejt detekció után (a program pirossal jelöli a sejtek és sejtmagok körvonalaikat) a QuPath szoftverben, melyen a „classifier” betanítása történt.

Az osztódó alakok számát minden metszeten standard 2,37 mm²-es (10 nagy nagyítású látótérrel egyenértékű) területen vizsgáltuk, a minta azon részén, ahol szubjektív bírálat szerint a legtöbb osztódó alak volt megtalálható. A kijelölt területen újabb sejt detekció elvégzése után tudtuk a megfelelő osztályozót lefuttatni a „load object classifier” paranccsal. Ezután manuálisan leellenőriztük az osztályozást és amennyiben jelentősen eltért a sejtek algoritmus által megállapított csoportja az általunk vélttől, abban az esetben új „classifier”-t hoztunk létre. A metszetek minőség- és színintenzitásbeli eltérései miatt egy classifier nem minden mintán volt képes azonos pontossággal felismerni a sejtek típusait, ezért esetenként szükséges volt az osztályozó módosítása és három teljesen új létrehozása. A szoftver által készített elemzésben láthatjuk, hogy összesen hány sejtet detektált az adott területen és abból hányat sorolt az egyes kategóriákba (4. ábra).



4.ábra: Az osztályozó lefuttatása után a program különböző színekkel jelöli az egyes sejttípusokat (piros: osztódó, türkiz: nem osztódó, sárga: egyéb). Bal oldalt az egyes sejttípusok pontos száma is látható.

Az elhalt szövetrészek kiterjedését az elhalt terület és a tumor teljes területének hányadosaként adtuk meg. A területeket legpontosabban a „wand tool” használatával lehetett kijelölni, ami színintenzitás alapján határolja körbe a szöveteket (5.ábra). A program a kijelölés területét automatikusan mérte.



5.ábra: Elhalt terület körülhatárolása és területének meghatározása a „wand tool” segítségével.

3.4 Statisztikai elemzés

Az adatok elemzését a Fleiss kappa kiszámításával végeztük, amely kettőnél több egymással összefüggő kategória közötti egyezést vizsgál két értékelő esetén (patológus és szoftver) (6.ábra). Kutatásunkban online statisztikai szoftver segítségével számoltuk azt ki a következő weboldalon: <https://datatab.net/statistics-calculator/reliability-analysis/fleiss-kappa-calculator>. Értéke 1 és -1 között változhat, $\kappa=1$ esetén maximális a vizsgálók közötti egyetértés, 0-nál az egyezés a véletlen valószínűségével azonos, $\kappa<0$ alatt pedig nincs átfedés a vizsgálók között. Az egyetértés elbírálása a következők szerint történt: 0,00-0,20 csekély, 0,21-0,40 mérsékelt, 0,41-0,60 közepes, 0,61-0,80 jelentős és 0,81-1,00 majdnem tökéletes egyetértés.

$$\kappa = \frac{p_o - p_e}{1 - p_e}$$

6.ábra: A Fleiss kappa kiszámítására használatos formula, ahol p_o a vizsgálók között megfigyelt egyetértés és p_e pedig a véletlenszerűség szerint várható egyezés értéke.

4. Eredmények

4.1 Metszet szkennelés

Mind az 50 általunk vizsgált metszet szkennelése sikeres volt, a WSI-ek minősége és felbontása megfelelő volt az elemzéshez.

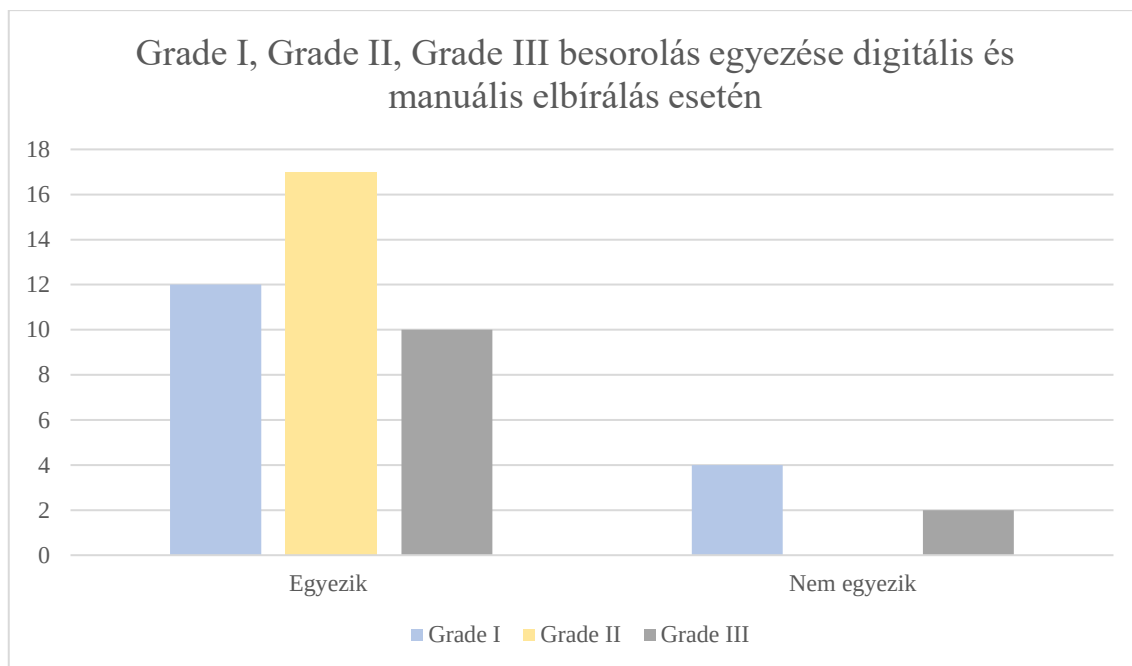
4.2 Szoftveres elemzés

A patológus és a szoftver által végzett grade-be sorolás 50-ből 39 esetben egyezett meg, amely 78%-ot jelent. A manuálisan grade I-be sorolt minták száma 16, grade II-be 17 és grade III-ba 17 volt. A digitálisan korrigált elemzés szerint 12 grade I, 28 grade II és 10 grade III eredmény született, vagyis az esetek 75%-, -65%- és 59%-ban volt egyezés (1.táblázat és 7.ábra).

1.táblázat: A QuPath szoftveres elemzés összevetése a patológus manuális eredményeivel.

Metszet	Egész terület (mm ²)	Elhalt terület (mm ²)	Elhalás aránya	Osztódó sejtek (db)	Manuális grade	Digitális grade	Egyezés
Case 1	384,64	0,00	0,00%	0	1	1	igen
Case 2	189,92	0,34	0,18%	7	1	1	igen
Case 3	689,12	25,18	3,65%	0	1	1	igen
Case 4	65,18	13,54	20,80%	6	1	2	nem
Case 5	599,12	1,21	0,20%	4	1	2	nem
Case 6	148,32	0,80	0,54%	0	1	1	igen
Case 7	94,43	1,35	1,43%	4	1	1	igen
Case 8	40,34	5,44	13,50%	2	1	1	igen
Case 9	293,56	0,91	0,31%	6	1	1	igen
Case 10	583,97	30,61	5,24%	1	1	1	igen
Case 11	412,11	31,80	7,72%	2	1	1	igen
Case 12	552,00	10,54	1,90%	1	1	1	igen
Case 13	374,96	5,04	1,34%	1	1	1	igen
Case 14	375,61	48,93	13,00%	0	1	2	nem
Case 15	199,24	10,62	5,33%	0	1	1	igen
Case 16	157,18	51,49	32,76%	2	1	2	nem
Case 17	48,31	0,95	1,97%	4	2	2	igen

Case 18	401,28	7,78	1,93%	1	2	2	igen
Case 19	378,35	8,79	2,32%	10	2	2	igen
Case 20	218,97	79,19	36,16%	1	2	2	igen
Case 21	126,55	6,87	5,43%	4	2	2	igen
Case 22	201,28	0,00	0,00%	1	2	2	igen
Case 23	205,52	10,22	4,97%	5	2	2	igen
Case 24	51,44	0,41	0,80%	5	2	2	igen
Case 25	181,91	27,59	15,17%	5	2	2	igen
Case 26	522,33	38,57	7,38%	2	2	2	igen
Case 27	214,14	2,53	1,18%	9	2	2	igen
Case 28	321,79	192,52	59,82%	62	2	2	igen
Case 29	386,85	41,34	10,70%	26	2	2	igen
Case 30	441,69	0,50	0,11%	10	2	2	igen
Case 31	246,90	17,86	7,23%	7	2	2	igen
Case 32	297,45	14,80	4,98%	26	2	2	igen
Case 33	153,44	76,09	49,60%	7	2	2	igen
Case 34	234,50	4,10	1,75%	33	3	3	igen
Case 35	527,16	0,00	0,00%	4	3	2	nem
Case 36	431,15	66,71	15,50%	52	3	3	igen
Case 37	394,76	60,00	15,20%	2	3	2	nem
Case 38	644,00	190,00	29,50%	27	3	3	igen
Case 39	20,25	1,55	7,65%	8	3	2	nem
Case 40	319,55	13,48	4,20%	25	3	3	igen
Case 41	188,67	26,99	14,30%	138	3	3	igen
Case 42	276,10	16,70	6,03%	3	3	2	nem
Case 43	293,89	0,12	0,04%	39	3	3	igen
Case 44	304,90	30,48	10,00%	40	3	3	igen
Case 45	292,63	43,08	14,70%	6	3	2	nem
Case 46	337,70	10,85	3,20%	2	3	2	nem
Case 47	278,15	0,63	0,23%	62	3	3	igen
Case 48	144,66	12,17	8,41%	25	3	3	igen
Case 49	295,96	0,32	0,10%	1	3	2	nem
Case 50	288,32	280,11	97,20%	57	3	3	igen



7.ábra: A digitálisan korrigált és a manuálisan meghatározott grade egyezése

4.3 Statisztikai elemzés

A Fleiss kappa értéke 0,669 lett, ami jelentős egyezést mutat a digitálisan korrigált és a patológus által megállapított grade között.

5. Következtetések

A lágyszöveti szarkómák heterogén daganatcsoport, melyek hasonló biológiai tulajdonságokkal rendelkeznek, típusát a szövettani eredete határozza meg. A test bármely pontján megjelenhetnek, ahol lágyszövet található, azonban számos mesenchimális eredetű daganatot nem sorolnak a lágyszöveti szarkómák közé, illetve néhány kötőszöveti eredetű tumorról nem egységes az irodalom. Klinikai jelentőségét mutatja, hogy kutyákban a negyedik leggyakrabban diagnosztizált malignus daganatcsoport [4], elsősorban nagyobb testű, idősebb kutyák érintettek [5], illetve fontos megemlíteni a fajtapredispozíció szerepét is [6]. Lokálisan invazív, alacsony-közepes metasztatikus hajlammal rendelkező daganatok, nagy kiterjedés esetén gyakori a kemo- és radioterápiára való rezisztencia. Szöveti invázió szempontjából viscerális és nem viscerális formát különböztetünk meg, ami nagyban befolyásolhatja a tünetek jellegét és súlyosságát [3].

Diagnosztikájában nagy szerepe van a fizikális vizsgálatnak, a vékonytű aspirációs minták elemzésének és a képalkotó eljárásoknak, ugyanakkor definitív diagnózishoz biopsziás minta szövettani elemzésével juthatunk [3].

A daganatok grade-lése olyan paraméterek szövettani értékelése és számszerűsítése, melyek segítenek a tumor klinikai agresszivitásának megbecslésében és így a megfelelő kezelés kiválasztásában. A grade pontos és reprodukálható prognosztikai faktor, kell, hogy legyen, melynek meghatározását hagyományosan patológus végzi. Lágyszöveti szarkómák esetében a tumor differenciáltsági fokát, a mitotikus sejtszámot és a nekrotikus területek kiterjedését vesszük figyelembe. Kutyáknál leggyakrabban a Kuntz-féle grading rendszert veszik alapul, mely három grade-be sorolja a lágyszöveti szarkómákat. A terápia kiválasztását különböző faktorok befolyásolják úgy, mint a szövettani grade és a klinikai stage, aszerint, hogy a cél a palliatív kezelés vagy a teljes gyógyulás elérése [1, 2]. Ugyanakkor a grade meghatározásával kapcsolatban problémát jelenthet a reprodukálhatóság és a vizsgálók közötti szubjektivitás, illetve, hogy a kutya lágyszöveti szarkóma grade-léssel foglalkozó cikkek összehasonlíthatósága korlátozott [8].

Az automatizált képelemző szoftverek és mesterséges intelligencia segítségével potenciálisan fejleszthető lenne a diagnosztika pontossága, reprodukálhatósága és

objektivitása. A digitális patológia további előnye, hogy sok időt spórolhat meg és könnyen hozzáférhető információt biztosít.

Egy 80 esetszámmal dolgozó, digitális patológiát és hagyományos fénymikroszkópos elemzést összehasonlító tanulmány [26] célja a digitális patológiai módszerek pontosságának, gyorsaságának és megbízhatóságának validálása volt. Azt találták, hogy a szoftveres elemzés önmagában nem pontosabb az epitheliális és mesenchimális daganatok elkülönítése terén. Ugyan rövidebb időt vett igénybe az elemzés, de a WSI-k minőségét gyengébbnek ítélték és a megbízhatóság is rosszabb volt. Összességében megfelelőnek találták a digitális patológia alkalmazását a diagnosztikában, amennyiben figyelembe vesszük a korlátait és manuális vizsgálatokkal is társul.

Morisi és munkatársai 1166 digitalizált metszetet vizsgáltak, melyből 752 volt lágyszöveti szarkóma. Ezeknek a mintáknak a különböző patológusok által elvégzett grade-lése között csak mérsékelt fokú egyezést figyeltek meg ($\kappa=0,36$), ami jól mutatja egy automatizált képelemző rendszer létjogosultságát. Az algoritmus használatával a nekrozis és mitózis detekció pontossága 92,7% és 50,0% volt, ami alátámasztja a digitális patológia potenciális használhatóságát a diagnosztikai grading-ben [5].

Kutatásunk során jelentős egyezést találtunk a patológus által megállapított és a digitálisan korrigált grade között ($\kappa=0,669$). Ennek oka feltehetően, hogy a differenciáltság fokát kizárólag manuálisan állapítottuk meg, továbbá a nekrotikus területek kiterjedésének elbírálása meglehetősen egyszerű, ezek pedig jelentősen eltérő osztódó sejtszámok esetén sem eredményeznek nagy eltérést a grade-k között. Az eltérések abból eredhettek, hogy a szoftver betanítását nem tapasztalt patológus végezte, így kevésbé egységes információk állhattak a program rendelkezésére a pontosabb sejtfelismeréshez. Következtetéseink szerint a digitális patológia és mesterséges intelligencia jelentősen megkönnyítheti a közeljövőben a mindennapi diagnosztikai munkát, amennyiben a szoftverek betanítása megfelelően képzett szakember által történik. Ugyanakkor a grade meghatározása jelenleg nem automatizálható teljes mértékben, bizonyos paraméterek megállapításához vagy felülbírálatához szükséges az emberi tényező. Összességében a grade digitálisan korrigált megállapítása gyorsíthatja, pontosíthatja és reprodukálhatóbbá teheti a patológiai diagnosztikai munkát.

6. Irodalomjegyzék

- [1] Bray, J. P. (2016). Soft tissue sarcoma in the dog - part 1: A current review: Soft tissue sarcoma in the dog. *Journal of Small Animal Practice*, 57(10), 510–519. <https://doi.org/10.1111/jsap.12556>
- [2] Bray, J. P. (2017). Soft tissue sarcoma in the dog - Part 2: Surgical margins, controversies and a comparative review: Soft tissue sarcoma in the dog - controversies. *Journal of Small Animal Practice*, 58(2), 63–72. <https://doi.org/10.1111/jsap.12629>
- [3] Ehrhart, N. (2005). Soft-Tissue Sarcomas in Dogs: A Review. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 41(4), 241–246. <https://doi.org/10.5326/0410241>
- [4] Tierce, R., Martin, T., Hughes, K. L., Harrison, L., Swancutt, K. L., Rao, S., Leary, D., LaRue, S. M., & Boss, M.-K. (2021). Response of Canine Soft Tissue Sarcoma to Stereotactic Body Radiotherapy. *Radiation Research*, 196(6). <https://doi.org/10.1667/RADE-20-00271.1>
- [5] Morisi, A., Rai, T., Bacon, N. J., Thomas, S. A., Bober, M., Wells, K., Dark, M. J., Aboellail, T., Bacci, B., & La Ragione, R. M. (2023). Detection of Necrosis in Digitised Whole-Slide Images for Better Grading of Canine Soft-Tissue Sarcomas Using Machine-Learning. *Veterinary Sciences*, 10(1), 45. <https://doi.org/10.3390/vetsci10010045>
- [6] Aupperle-Lellbach, H., Grassinger, J. M., Floren, A., Törner, K., Beitzinger, C., Loesenbeck, G., & Müller, T. (2022a). Tumour Incidence in Dogs in Germany: A Retrospective Analysis of 109,616 Histopathological Diagnoses (2014–2019). *Journal of Comparative Pathology*, 198, 33–55. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2022.07.009>
- [7] Dennis, M. M., McSporran, K. D., Bacon, N. J., Schulman, F. Y., Foster, R. A., & Powers, B. E. (2011). Prognostic Factors for Cutaneous and Subcutaneous Soft Tissue Sarcomas in Dogs. *Veterinary Pathology*, 48(1), 73–84. <https://doi.org/10.1177/0300985810388820>
- [8] Avallone, G., Rasotto, R., Chambers, J. K., Miller, A. D., Behling-Kelly, E., Monti, P., Berlato, D., Valenti, P., & Roccabianca, P. (2021). Review of Histological Grading Systems in Veterinary Medicine. *Veterinary Pathology*, 58(5), 809–828. <https://doi.org/10.1177/0300985821999831>

- [9] Kuntz, C. A., Dernell, W. S., Powers, B. E., Straw, R. C., Withrow, S. J (1997). Prognostic factors for surgical treatment of soft-tissue sarcomas in dogs: 75 cases (1986-1996). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 211(9):1147-1151. <https://europepmc.org/article/med/9364229>
- [10] McSporran, K. D. (2009). Histologic Grade Predicts Recurrence for Marginally Excised Canine Subcutaneous Soft Tissue Sarcomas. *Veterinary Pathology*, 46(5), 928–933. <https://doi.org/10.1354/vp.08-VP-0277-M-FL>
- [11] Yap, F. W., Rasotto, R., Priestnall, S. L., Parsons, K. J., & Stewart, J. (2017). Intra- and inter-observer agreement in histological assessment of canine soft tissue sarcoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, 15(4), 1553–1557. <https://doi.org/10.1111/vco.12300>
- [12] Chase, D., Bray, J., Ide, A., & Polton, G. (2009). Outcome following removal of canine spindle cell tumours in first opinion practice: 104 cases. *Journal of Small Animal Practice*, 50(11), 568–574. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2009.00809.x>
- [13] Forrest, L. J., Chun, R., Adams, Wm., Cooley, A. J., & Vail, D. M. (2000). Postoperative Radiotherapy for Canine Soft Tissue Sarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 14(6), 578–582. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2000.tb02279.x>
- [14] McKnight, J. A., Mauldin, G. N., McEntee, M. C., Meleo, K. A., & Patnaik, A. K. (2000). Radiation treatment for incompletely resected soft-tissue sarcomas in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 217(2), 205–210. <https://doi.org/10.2460/javma.2000.217.205>
- [15] Livaccari, A. M., Selmic, L. E., Reagan, J. K., Driskell, E. A., Cray, M. T., Lamoureux, L. M., & Garrett, L. D. (2018). Evaluation of information presented within soft tissue sarcoma histopathology reports in the United States: 2012-2015. *Veterinary and Comparative Oncology*, 16(4), 424–430. <https://doi.org/10.1111/vco.12397>
- [16] Prpich, C. Y., Santamaria, A. C., Simcock, J. O., Wong, H. K., Nimmo, J. S., & Kuntz, C. A. (2014). Second intention healing after wide local excision of soft tissue sarcomas in the distal aspects of the limbs in dogs: 31 cases (2005–2012). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 244(2), 187–194. <https://doi.org/10.2460/javma.244.2.187>

- [17] Irshad, H., Veillard, A., Roux, L., & Racoceanu, D. (2014). Methods for Nuclei Detection, Segmentation, and Classification in Digital Histopathology: A Review—Current Status and Future Potential. *IEEE Reviews in Biomedical Engineering*, 7, 97–114. <https://doi.org/10.1109/RBME.2013.2295804>
- [18] Gurcan, M. N., Boucheron, L. E., Can, A., Madabhushi, A., Rajpoot, N. M., & Yener, B. (2009). Histopathological Image Analysis: A Review. *IEEE Reviews in Biomedical Engineering*, 2, 147–171. <https://doi.org/10.1109/RBME.2009.2034865>
- [19] Bankhead, P., Loughrey, M.B., Fernández, J.A. et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep* 7, 16878 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5>
- [20] Rai, T., Morisi, A., Bacci, B., Bacon, N. J., Dark, M. J., Aboellail, T., Thomas, S. A., Bober, M., La Ragione, R., & Wells, K. (2022). Deep learning for necrosis detection using canine perivascular wall tumour whole slide images. *Scientific Reports*, 12(1), 10634. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13928-1>
- [21] Madabhushi, A. (2009). Digital pathology image analysis: Opportunities and challenges. *Imaging in Medicine*, 1(1), 7–10. <https://doi.org/10.2217/iim.09.9>
- [22] Madabhushi, A., & Lee, G. (2016). Image analysis and machine learning in digital pathology: Challenges and opportunities. *Medical Image Analysis*, 33, 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.media.2016.06.037>
- [23] Bankhead, P. (2022). Developing image analysis methods for digital pathology. *The Journal of Pathology*, 257(4), 391–402. <https://doi.org/10.1002/path.5921>
- [24] Rowell, J. L., McCarthy, D. O., & Alvarez, C. E. (2011). Dog models of naturally occurring cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 17(7), 380–388. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.02.004>
- [25] Milovancev, M., Hauck, M., Keller, C., Stranahan, L. W., Mansoor, A., & Malarkey, D. E. (2015). Comparative Pathology of Canine Soft Tissue Sarcomas: Possible Models of Human Non-rhabdomyosarcoma Soft Tissue Sarcomas. *Journal of Comparative Pathology*, 152(1), 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2014.09.005>

- [26] Bertram, C. A., Gurtner, C., Dettwiler, M., Kershaw, O., Dietert, K., Pieper, L., Pischon, H., Gruber, A. D., & Klopffleisch, R. (2018). Validation of Digital Microscopy Compared With Light Microscopy for the Diagnosis of Canine Cutaneous Tumors. *Veterinary Pathology*, 55(4), 490–500. <https://doi.org/10.1177/0300985818755254>

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni a Patológiai Tanszék munkatársainak a segítséget, különösen a témavezetőmnek, Dr. Horváth Dávid Gézának a téma és a szükséges eszközök biztosítását, illetve a dolgozat megírásában nyújtott segítségét.