

Aus dem Department für Pathobiologie
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Pathologie

(Leiter: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Herbert Weissenböck, Dipl.ECPHM)

**Automatisierte nukleäre Morphometrie in caninen Mastzelltumoren
mithilfe künstlicher Intelligenz**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Eda Parlak

Wien, im Juni 2023

Betreuer: Ass. Prof. Dr. Christof Albert Bertram, PhD, DACVP
Institut für Pathologie
Department für Pathobiologie
Veterinärmedizinische Universität Wien

Gutachter: Dr.med.vet. Michael Willmann
Klinische Abteilung für Interne Medizin Kleintiere
Department für Kleintier und Pferde
Veterinärmedizinische Universität Wien

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung	5
1.1	Caniner Cutaner Mastzelltumor	5
1.2	Histologisches Prognostizieren von Mastzelltumoren	6
1.3	Nukleäre Pleomorphie und Morphometrie	8
1.3.1	Nukleäre Pleomorphie und Morphometrie bei cMCT.....	10
1.4	Digitale Pathologie und Künstliche Intelligenz.....	11
1.5	Hypothese	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Entwicklung eines DL-Modells.....	13
2.2	Prognostische Bewertung des DL-basierten Algorithmus	16
2.2.1	Statistische Auswertung	17
2.3	Bestimmung des Mitotic Counts	19
2.4	Heterogenität der Zellkerngröße innerhalb des Tumorschnittes.....	19
3	Ergebnisse	20
3.1	Datensatz und Algorithmus.....	20
3.2	Validierungsdatensatz	20
3.3	Prognostische Aussagekraft des DL-basierten Algorithmus im Vergleich zum Mitotic Count.....	21
3.4	ROC- und Kaplan-Meier-Kurve.....	24
3.5	Korrelationsanalyse	27
3.6	Heterogenität der Zellkerngröße innerhalb des Tumorschnittes.....	28
4	Diskussion.....	30
5	Zusammenfassung.....	33
6	Summary	34
7	Abkürzungsverzeichnis	35

8	Danksagung.....	36
9	Literaturverzeichnis.....	37
10	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	42
10.1	Abbildungsverzeichnis.....	42
10.2	Tabellenverzeichnis.....	42
11	Anhang.....	43

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Caniner Cutaner Mastzelltumor

Mastzelltumore der Hunde (MCT) sind häufig bösartige Tumore, die vor allem in der Haut und Unterhaut auftreten können, und ca. 20 % aller Hauttumore bei Hunden ausmachen. Weiters können Organe wie Lymphknoten, Milz, Leber, Knochenmark oder Schleimhäute der Mundhöhle und des Magen-Darm-Trakts betroffen sein (Kiupel et al. 2011; Misdorp 2004; Patnaik et al. 1984; Willmann et al. 2021).

Die Veränderungen des caninen cutanen Mastzelltumors (cMCT) stellen sich oft als einzelne, oder seltener multiple Knoten in der Dermis dar. Die cMCT werden histologisch von subkutanen MCT unterschieden. Das vielfältige Erscheinungsbild reicht von unbehaarten, erhabenen, erythematösen Massen bis hin zu knotigen Ausschlägen oder diffusen Schwellungen. Eine alters- oder geschlechtsspezifische Prädisposition ist nicht bekannt, einige Hunderassen weisen eine hohe Inzidenz für die Entwicklung von MCT auf, wie Boxer, Boston Terrier und Labrador Retriever (Patnaik et al. 1984; Kiupel und Camus 2019).

Das klinische Bild und der Verlauf von cMCT variieren je nach Patienten und reichen von langsam wachsenden bis hin zu schnell wachsenden, ulzerierenden aggressiven Varianten, die in regionale Lymphknoten und/oder viszerale Organe streuen (Misdorp 2004; Sledge et al. 2016; Kiupel und Camus 2019; Willmann et al. 2021).

Um cMCT zu diagnostizieren, ist eine zytologische Untersuchung einer Feinnadelaspiration zumeist ausreichend. Zytologisch sind MCT oftmals durch violette (metachromatische) Granula in den Rundzellen identifizierbar (Misdorp 2004). Jedoch wird für die Beurteilung des biologischen Verhaltens anhand eines Grading Systems zusätzlich eine histologische Untersuchung einer Gewebeprobe empfohlen (Berlato et al. 2021). Außerdem kann eine histologische Beurteilung die Vollständigkeit einer chirurgischen Exzision (Schnittränder) und weitere prognostische Tests (z.B. immunhistologische Untersuchungen), welche Entscheidungshilfen für den Einsatz zusätzlicher Therapiemaßnahmen darstellen, durchgeführt werden (Misdorp 2004; Sledge et al. 2016; Kiupel und Camus 2019; Willmann et al. 2021).

Die Therapie erfolgt meist chirurgisch, wobei der Tumor mit einem Resektionsabstand idealerweise von mindestens 2 bis 3 cm entfernt wird. Bei unvollständiger Resektion und hochmalignen (high grade) MCT wird eine anschließende Strahlen- und/oder Chemotherapie empfohlen (Misdorp 2004; Sledge et al. 2016; Willmann et al. 2021).

1.2 Histologisches Prognostizieren von Mastzelltumoren

Die Einschätzung des vermutlichen biologischen Verhaltens (Prognostizieren) von cMCT erfolgt anhand verschiedener klinischer und pathologischer Informationen. In der pathologischen Untersuchung wird hierfür der cMCT in erster Linie anhand eines Klassifikationssystems (histologisches Grading System) eingeteilt und, bei Bedarf, mit weiterführenden immunhistochemischen und molekularen Analysen untersucht (Misdorp 2004; Kiupel und Camus 2019). Für cMCT haben sich zwei Grading Systeme – nach Patnaik et al. sowie Kiupel et al. - etabliert (Berlato et al. 2021).

Im Jahr 1984 wurde von Patnaik et al. (Patnaik et al. 1984) ein System erstellt, welches cMCT in drei Grade unterteilt (Tab. 1). Das Grading basiert auf der Anzahl von proliferativen Zellen (Mitosen) mit 400-facher Vergrößerung Gesichtsfeld (HPF), dem Differenzierungsgrad der Zellen und der Infiltration in angrenzendes Gewebe. Gut differenzierte Mastzelltumoren mit wenigen Mitosefiguren und ohne Beteiligung tiefer Gewebeschichten werden als „Grad 1“ mit guter Prognose eingestuft. Tumore mit intermediär differenzierten Mastzellen werden als „Grad 2“ und Tumoren mit schlecht differenzierten Mastzellen, mit vielen Mitosen sowie tiefer Infiltration als „Grad 3“ mit einer schlechten Prognose klassifiziert (Patnaik et al. 1984; Willmann et al. 2021).

Aufgrund einer hohen Inter- und Intraobserver-Variabilität im Patnaik Grading System wurde 2011 ein zweistufiges System von Kiupel et al. (Kiupel et al. 2011) vorgeschlagen. Hierbei erfolgt die Einteilung aufgrund der Mitoseanzahl pro 10 HPF und verschiedenen Kriterien der Zellkernmorphologie in zwei Grade (Tab. 2). Als „low grade“ werden Tumore mit wenig Mitosefiguren pro HPF und weniger als 3 mehrkernigen Zellen bzw. bizarren Zellkernen und unter 10% Karyomegalie beurteilt. Im Gegensatz dazu weisen „high grade“ MCT eine höhere Anzahl an Mitosefiguren (≥ 7), 3 oder mehr mehrkernige Zellen, 3 oder mehr bizarre Kerne in 10 HPF oder 10% oder mehr Karyomegalie auf. (Kiupel et al. 2011; Romansik et al. 2007).

Tab. 1: Bewertungskriterien für das Grading System für cMCT nach Patnaik et al. (Patnaik et al. 1984).

Grad I	Grad II	Grad III
Gut differenzierte Zellen mit deutlicher Granulierung	Unregelmäßig granuliert	Wenig granuliert
Monomorphe Mastzellen	Mittlere Pleomorphie mit ovalen, wenigen Zellen und Riesenzellen	Starke Pleomorphie mit Riesenzellen
Einkernige Zellen	Wenige zweikernige Zellen	Einige zwei- und mehrkernige Zellen
Runde Kerne	Runde, teils gelappte Kerne	Runde, gelappte und vesikuläre Kerne, deutliche Nukleoli
0 Mitosen / HPF	0-2 Mitosen / HPF	3-6 Mitosen / HPF
Keine Stromale Reaktion oder Nekrose	Diffuse Ödeme und Nekrosen	Häufig Ödeme, Blutungen, Nekrosen

Tab. 2: Bewertungskriterien für das Grading System für cMCT nach Kiupel et al (Kiupel et al. 2011).

Low grade	High grade (min. ein Kriterium erfüllt)
< 7 Mitosen / 10 HPF	≥ 7 Mitosen / 10 HPF
< 3 mehrkernige Zellen / 10 HPF	≥ 3 mehrkernige Zellen / 10 HPF
< 3 bizarre Kerne / 10 HPF	≥ 3 bizarre Kerne / 10 HPF
< 10% Karyomegalie	≥ 10% Karyomegalie

Die Zählung der Mitosen ist ein besonders relevanter Parameter zur Prognoseerstellung, der durch die Quantifizierung von Zellteilungen wichtige Einblicke in das Zellwachstum und die Proliferation ermöglicht. Um hierbei Missverständnisse zu vermeiden, wird empfohlen, den klaren Begriff "Mitotic Count" zu verwenden, anstatt auf "Mitotic Index" oder "Mitotic Rate" zurückzugreifen. Der Mitotic Count (MC) bezeichnet die quantitative Erfassung von Mitosefiguren in einem präzise definierten Bereich von 10 HPF oder 2,37 mm² (Meuten et al. 2016). Ein hoher MC deutet somit auf ein aggressiveres Wachstumsverhalten des Tumors hin.

Im Zusammenhang mit der Prognose von cMCT wird häufig das Kiupel-Grading-System in Kombination mit dem Patnaik-System verwendet. Jedoch weisen beide Systeme gewisse Limitationen auf (Berlato et al. 2021). Beispielsweise werden 80% aller cMCT nach Kiupel als „low grade“ klassifiziert, von denen ca. 15% ein aggressiveres biologisches Verhalten aufweisen (Willmann et al. 2021).

1.3 Nukleäre Pleomorphie und Morphometrie

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf der nukleären Pleomorphie als prognostischer Parameter für cMCT. Unter der nukleären Pleomorphie versteht man die Varianz der Erscheinungsbilder eines Zellkernes, bezüglich Größe und Form (Schwab 2012). Wobei der Begriff Anisokaryose die Unterschiede ausschließlich der Kerngrößen beschreibt (Dubitzky et al. 2013). Die nukleäre Pleomorphie bzw. Anisokaryose sind generelle Malignitätskriterien zur Unterscheidung von benignen und malignen Tumoren, inklusive cMCT (siehe Kapitel 1.3.1) und sind für zahlreiche Tumore als prognostisches Kriterium bekannt.

Zur Beurteilung der Pleomorphie gibt es mehrere Möglichkeiten. Einerseits wird die Varianz durch PathologInnen geschätzt; zumeist unterteilt in zwei bis drei vage definierten Kategorien. Andererseits können Zellen zweidimensional gemessen werden, was auch Morphometrie genannt wird. Die Vermessung der Zellkerne erfolgt manuell (computergestützt) von PathologInnen oder automatisiert mittels Bildanalysealgorithmen.

Die verschiedenen Messmethoden haben unterschiedliche Vor- und Nachteile (Tab. 3). Einerseits können PathologInnen möglicherweise die nukleäre Pleomorphie nach langem Training gut einschätzen, jedoch sind hohe Variabilität zwischen PathologInnen beschrieben (Santos et al. 2014; Santos et al. 2015). Mithilfe der computergestützten manuellen Vermessung wird die Fläche, der Umfang, der Durchmesser und/oder die Form

von zahlreichen Zellkernen pro Probe erfasst. Aus diesen Gründen stellt es eine gute Lösung zur Minimierung von Beobachtervariabilität dar (Strefezzi et al. 2003). Zweidimensionale Messungen haben allerdings den Nachteil, dass die Position und die Ausrichtung einer Schnittebene durch ein dreidimensionales Objekt die Größe, Form und Häufigkeit des zweidimensionalen Profils beeinflussen. Dahingegen lassen sich stereologische, d.h. Schätzungen des dreidimensionalen Volumens basierend auf statistischen Prinzipien, Messungen der Kerngröße mittels der "point-sampled intercept"-Methode (PSI) durchführen. Dabei werden die Kerne im Verhältnis zu ihrem Volumen abgetastet, so dass größere Kerne mit größerer Wahrscheinlichkeit erfasst werden als kleinere Zellkerne (Ladekarl 1998; Casanova et al. 2021). Der Nachteil der PSI-Methode ist, dass nur das geschätzte mittlere Volumen der Zellkerne bestimmt wird, nicht jedoch die Varianz der Zellkerngröße oder Eigenschaften der Zellkernform. Daher haben wir uns in der vorliegenden Studie für die klassische zwei-dimensionale Vermessung entschieden.

Mit dem verstärkten Einsatz der Computertechnologie in der medizinischen Diagnostik (siehe Kapitel 1.4) ist es möglich geworden, mit Hilfe der Bildanalyse quantitative Informationen in größerem Umfang zu erhalten, unter anderen eben auch die automatisierte Vermessung von Zellkernen. Während in der Humanmedizin bereits erste Studien vorliegen (Chuang et al. 2022), sind KI-gestützte Algorithmen zur Morphometrie in der Tiermedizin bisher nicht untersucht.

Tab. 3: Gegenüberstellung der verschiedenen Methoden zur Beurteilung der nukleären Pleomorphie

Messmethode	Zeitaufwand	Genauigkeit	Reproduzierbarkeit	Technische Ausstattung
Schätzung durch PathologenInnen	gering	abhängig von Erfahrung der PathologenInnen	hohe Intra- und Inter-observer-Variabilität	Lichtmikroskop
Manuelle Morphometrie	hoch	hoch	hoch	Software und digitalisierte histologische Proben
Algorithmische Morphometrie	gering	hoch	hoch	Algorithmus und digitalisierte histologische Proben

1.3.1 Nukleäre Pleomorphie und Morphometrie bei cMCT

Die nukleäre Pleomorphie ist ein wichtiger Bestandteil der beiden Grading Systeme nach Patnaik et al. (Patnaik et al. 1984) und Kiupel et al. (Kiupel et al. 2011). Eine höhere Pleomorphie weist oft auf eine bösartigere und aggressivere Form von cMCT hin (Patnaik et al. 1984; Kiupel et al. 2011; Willmann et al. 2021). Dennoch wurde dieses Gradingkriterium bei cMCT nicht umfassend untersucht, da verschiedene Herausforderungen eine genaue Beurteilung erschweren. Einerseits kann die Pleomorphie bei cMCT variieren, sowohl zwischen Tumoren als auch innerhalb desselben Tumors. Dies erschwert eine einheitliche und objektive Bewertung durch PathologenInnen.

Ein Ansatz zur objektiven Beurteilung der Pleomorphie ist die Morphometrie. Studien zeigen, dass die nukleäre Morphometrie bei der Beurteilung von cMCT unterstützend wirken kann (Strefezzi et al. 2003; Maiolino et al. 2005; Strefezzi et al. 2009). Die stereologische Methode von Casanova (Casanova et al. 2021) zeigt eine mäßige prognostische Bedeutung für cMCT in histologischen Proben.

Des Weiteren wurde in anderen Studien die Fläche, der Durchmesser und der Umfang von in histologischen Präparaten manuell gemessen und histopathologischen Befunden gegenübergestellt. Die Ergebnisse der Kernmorphometrie zeigen eine Korrelation zwischen aggressiverem Tumorverhalten und größerer Fläche bzw. Umfang. Jedoch konnte nur zwischen dem Grad II und Grad III sowie zwischen Grad I und dem Grad III einen signifikanten Unterschied erkannt werden (Strefezzi et al. 2003; Maiolino et al. 2005). Zudem wurde in einer Arbeit die prognostische Relevanz von morphometrischen Analysen in zytologischen Proben nachgewiesen (Strefezzi et al. 2009).

Zurzeit gibt es aber keine Studien, die Algorithmen für die Morphometrie in histologischen Proben von cMCT untersucht hat, da es umfangreiche Datensätze erfordert, um ein robustes Modell zu trainieren und zu validieren. Außerdem erfordert das Ausmessen der Zellen oft eine manuelle Interaktion und Expertise von PathologenInnen, um spezifische Bereiche von Interesse zu identifizieren und zu markieren. Dies kann aufgrund der heterogenen Natur der cMCT und das Erfordernis einer sorgfältigen Untersuchung schwierig sein.

In dieser Studie erfolgt der Vergleich der nukleären Morphometrie mit dem MC, nicht mit dem histologischen Grad, da ein höherer Grad in der Regel auf einem erhöhten MC basiert (Romansik et al. 2007; Kiupel et al. 2011). Beide Verfahren ermöglichen quantitative

Messungen, wodurch statistische Analysen und Vergleiche zwischen beiden Merkmalen möglich sind.

1.4 Digitale Pathologie und Künstliche Intelligenz

PathologenInnen verwenden seit dem 19. Jahrhundert die Lichtmikroskopie für die Diagnose von Krankheiten in Gewebeschnitten. Die rasante informationstechnologische Entwicklung in den letzten Jahrzehnten hat jedoch neue Möglichkeiten der Speicherung und Visualisierung von histologischen Schnitten sowie eine netzwerkbasierte Kommunikation und den Austausch von Proben erlaubt. Diese neuen Technologien werden üblicherweise unter den Begriffen digitale Pathologie oder virtuelle Mikroskopie zusammengefasst, die die Betrachtung von digitalisierten Gewebeproben auf einem Computerbildschirm mit einer annähernd gleichwertigen optischen Auflösung und Vergrößerung eines Lichtmikroskops beschreiben (Aubreville et al. 2018). Ausgangspunkt für die zunehmende Integration der digitalen Pathologie war die Entwicklung von Whole-Slide-Image-(WSI)Scannern, die ganze Glasobjektträger digitalisieren können. Große pathologische Labore verwenden die digitale Mikroskopie als primäre Technologie für die Auswertung histologischer Proben. Die digitale Mikroskopie wird zunehmend in allen Bereichen der Pathologie eingesetzt und stellt eine einzigartige Chance dar, die Leistung der Diagnostik, Forschung und Lehre zu verbessern (Bertram und Klopffleisch 2017).

Die Fortschritte bei den modernen Bildanalysealgorithmen, insbesondere unter Verwendung der künstlichen Intelligenz (KI), haben zu einem wachsenden Interesse an deren Verwendung für die Forschung und Diagnostik geführt. Durch Deep Learning (DL) können Computer durch künstliche neuronale Netzwerke lernen, Muster in Daten zu erkennen und daraus Vorhersagen zu treffen (Aubreville et al. 2020b). Die DL-basierten Algorithmen wurden entwickelt, um verschiedene Untersuchungen in der Tumorphathologie, durchzuführen, einschließlich, Subtypisierung, Grading, Quantifizierung von diversen Biomarkern und direkte Prognosevorhersage (Aubreville et al. 2020a; Jiang et al. 2020).

Die Anwendungen der KI in der Pathologie bieten ein großes Potenzial zur Verbesserung der Genauigkeit, Objektivität und Reproduzierbarkeit von histopathologischen Befunden. Überdies verringert sich auch die Arbeitsbelastung (Aubreville et al. 2020b).

Es gibt jedoch noch einige Herausforderungen im Zusammenhang mit der Implementierung von KI. Dazu gehören Fragen der Validierung der Algorithmen, Interpretierbarkeit sowie die skeptische Haltung von PathologenInnen, KlinikerInnen, PatientInnen und

Regulierungsbehörden. Trotz der Herausforderungen und Hindernisse ist das Potenzial von Deep-Learning basierten KI-Ansätze für die digitale Pathologie vielversprechend, da die KI eine hohe Fähigkeit zum Erlernen von Merkmalsrepräsentationen hat. Die Anhäufung großer Datenmengen fördert die Entwicklung dieser Innovationen (Bertram et al. 2019; Jiang et al. 2020).

1.5 Hypothese

Die beiden Gradingssysteme nach Kiupel und Patnaik werden als primäre prognostischen Kriterien für die Beurteilung von cMCT verwendet. In diesen Systemen werden qualitative und semiquantitative Bewertungskriterien verwendet, welche relevante Intra- und Interobserver Variabilität aufweisen können. Eines dieser prognostischen Parameter mit bekannter prognostischer Relevanz ist die Variabilität der Zellkerngröße und -form (nukleäre Pleomorphie). Eine Alternative zu der subjektiven Einschätzung der nukleären Pleomorphie durch PathologInnen ist die nukleäre Morphometrie in digitalisierten Proben.

In der vorliegenden Arbeit wird die prognostische Einschätzung der cMCT durch eine automatisierte nukleäre Morphometrie mittels künstlicher Intelligenz überprüft, welches eine schnellere und reproduzierbarere Bewertungsmöglichkeit des Tumors ermöglichen kann. Die Hypothese für diese Diplomarbeit ist, dass die automatisierte nukleäre Morphometrie die Prognose von cMCT Patienten akkurat vorhersagen kann.

2 Material und Methoden

2.1 Entwicklung eines DL-Modells

Für die Entwicklung des Deep Learning (DL) Modells wurden Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Schnitte (HE-Schnitte) von 65 bestätigten cMCT aus dem Archiv verschiedener Pathologieinstitute verwendet. Die Herkunft der Proben aus verschiedenen Laboren stellt die Inklusion einer variablen Probenherstellung (insbesondere hinsichtlich der Färbung) sicher, welche die Robustheit des entwickelten DL-Modells verbessern soll. Sechzehn von den Proben wurden von der Veterinärmedizinischen Universität Wien, 21 von der Michigan State University (Michigan, USA), 14 von Schwarzman Animal Medical Center (New York, USA) und 14 von der Freien Universität Berlin bereitgestellt. Die Fälle setzen sich zusammen aus einer gleichen Anzahl an low und high grade (nach Kiupel Gradingssystem) cMCT. Zuerst wurden die 65 HE-Schnitte mithilfe eines Whole-Slide-Image Scanners (3D Histech Pannoramics SCAN II) mit einer Scanauflösung von 0,25 pixel / μm digitalisiert.

Für den Training-Datensatz wurden repräsentativen Bereichen (ROI) aus den digitalisierten Proben (= Whole Slide Image; WSI) als TIFF-Format mit einer verlustfreien Kompression exportiert. Die Größe eines ROIs (Seitenverhältnis 4:3) entspricht einem halben HPF entsprechend der Definition von Meuten et al. (Meuten et al. 2021), d.h. 0,1185 mm². Von den 21 WSI der Michigan State University wurden jeweils zwei ROIs und von den anderen 44/65 Proben wurde jeweils ein ROI ausgewählt, dementsprechend besteht der Datensatz aus 86 ROI-Bildern. Da die histologischen Präparate der Michigan State University die Zieldomain für die prognostische Bewertung des Algorithmus ist (siehe unten), wurde für dieses Labor in Relation ein hoher Anteil der Bilder erzeugt.

Anschließend wurden die ROI-Bilder mit der Software Slide Runner (Slide Runner 2.0.0) (Aubreville et al. 2018) annotiert und so die Grundwahrheiten (Ground-Truth) für die Entwicklung des DL Modells erstellt. Slide Runner ist eine Open-Source-Softwarelösung für die Annotation und Visualisierung von digitalen histopathologischen Bildern. Das Programm bietet Möglichkeiten (z.B. Tumorumrisse) zu markieren (Abb.1) und ist somit ideal geeignet für die Erstellung dieses Datensatzes (Aubreville et al. 2018). Alle Ränder der Mastzellkerne wurde durch ein Polygon-Werkzeug mit einer Computermaus nachgezogen (Abb. 2) Um Fehler der Annotationen zu verringern, wurden alle Bewertungen von einer Annotatorin mehrmals durch Absprache mit dem Veterinärpathologen Dr. Christof A. Bertram durchgeführt. Insbesondere bei stark granulierten Mastzelltumoren ist die Erkennung der Zellkerngrenzen deutlich erschwert. Wenn die Zellkerngrenzen stellenweise undeutlich

waren, wurden diese entsprechend einer angenommenen runden/ovalen Form vervollständigt. Im Fall, dass die Zellkerngrenze in dem Großteil des Verlaufs undeutlich war, wurden diese Zelle von der Annotation ausgelassen.

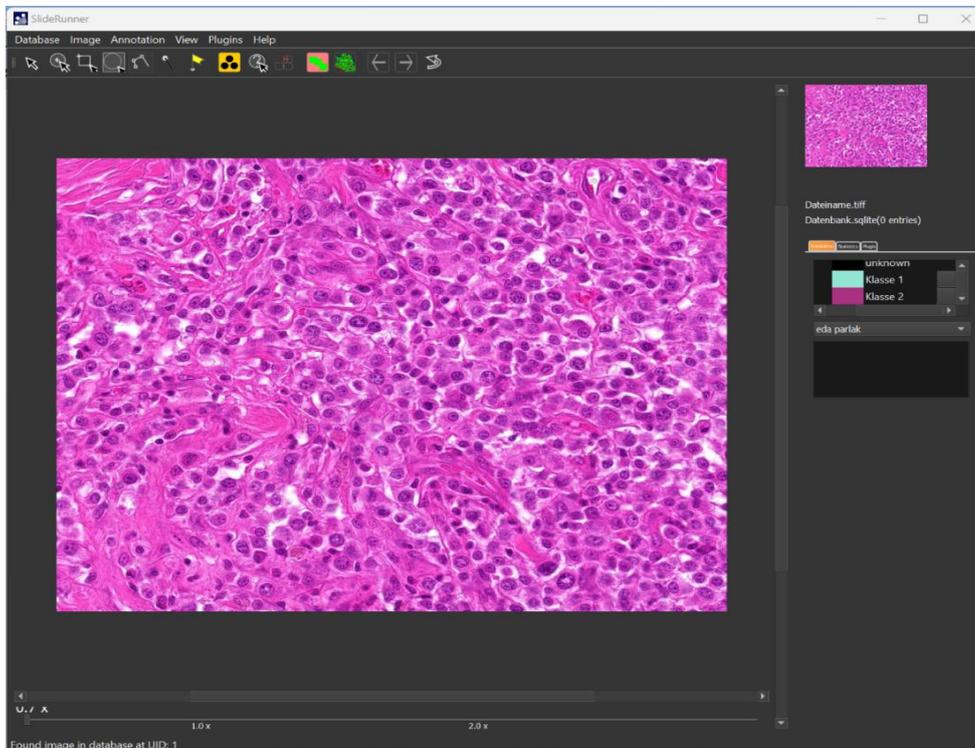


Abb. 2: Benutzeroberfläche der Annotationssoftware Slide Runner 2.0.0. Links oben befindet sich das Menüband mit einer Reihe von verschiedenen Werkzeugen. Rechts sieht man eine kleine Übersicht des Bildes sowie Datei- und Datenbankname. Darunter findet man Annotationsklassen und Name der annotierenden Person. In der Mitte unter dem Bild kann man die Vergrößerung einstellen.

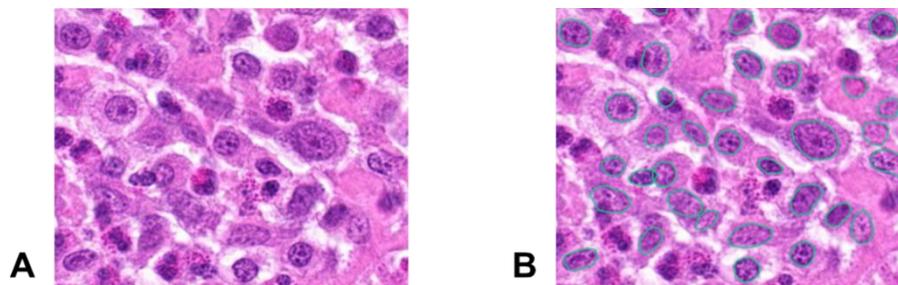


Abb. 1: **A** Mastzellkerne ohne Annotationen. **B** Mastzellkerne mit Polygon-Annotationen (grüne Umrisse).

Daraufhin wurde in Kooperation mit dem Künstliche Intelligenz (KI)-Forscher Andreas Haghofer, M.Sc. (Fachhochschule Oberösterreich) mittels dieser Daten ein künstliches neuronales Netz trainiert. Der Datensatz wurde für das Training (N = 62 Proben), die Validierung (N = 11 Proben) und zum Testen der Leistung (N = 13 Proben) eines UNet++-Modells aufgeteilt. UNet++ ist eine Architektur, im Wesentlichen ein Encoder-Decoder-Netzwerk, welches für die Segmentierung medizinischer Bilder entwickelt wurde. Unter Bildsegmentierung versteht man den Prozess, bei dem ein Bild in sinnvolle zusammenpassende Teile (im vorliegenden Fall Zellkerne) zerlegt wird, welches grundlegend für die Erkennung und Zuordnung von Bildbestandteilen ist (Süße und Rodner 2014; Zhou et al. 2018).

Die Leistungsfähigkeit der Objektsegmentierung bzw. Objekterkennungsmodells wird mit dem Intersection over Union Verhältnis (IoU) bewertet, indem man die Grundwahrheit mit dem DL-basierten Segmentierungs-Modell vergleicht. Ein Wert von IoU = 0 entspricht einer schlechten bzw. keiner Überschneidung der Grundwahrheit und des Overlays (Abb. 3), dahingegen entspricht ein Wert von 1 einer exzellenten Überschneidung.

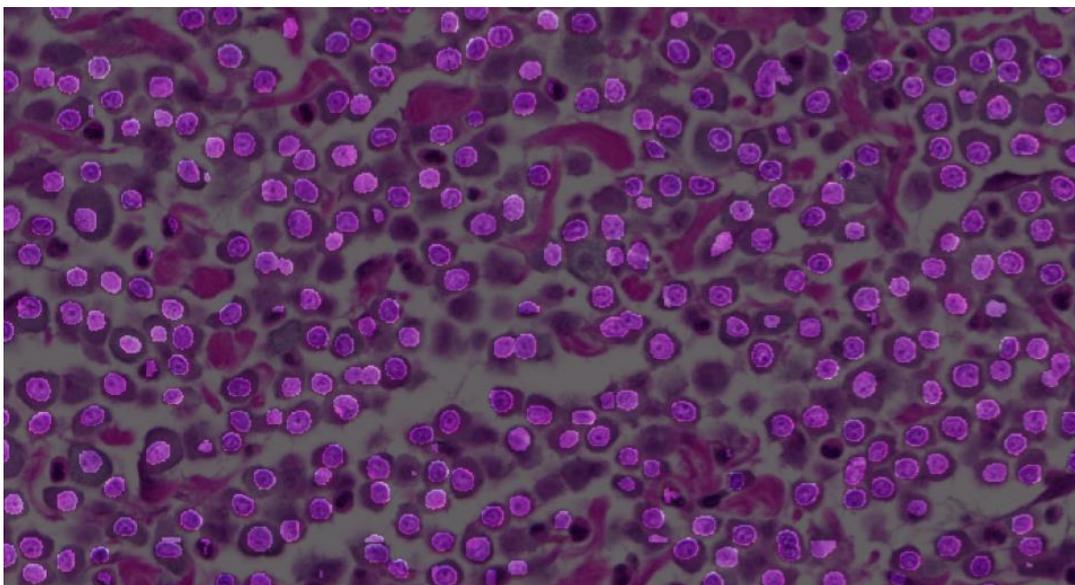


Abb. 3: Beispiel eines Bildsegmentierung-Overlays (hellere Bildausschnitte) über einem histologischen Bild eines cMCT aus dem Testdatensatz.

2.2 Prognostische Bewertung des DL-basierten Algorithmus

Zur Bewertung der prognostischen Aussage dieses Modells wurden zusätzliche HE-Schnitte von 96 cMCT mit bekanntem Überlebenszeiten des Patienten digitalisiert, die von dem Institut für Pathologie von Michigan State University (Prof. Dr. Matti Kiupel) bereitgestellt wurden. Die Patientennachverfolgung wurde mittels Umfrage an die Einsender der Gewebeprobe durchgeführt. Diese 96 Patienten wiesen keinen anderen Tumor auf und wurden lediglich mittels chirurgischer Exzision des cMCT therapiert. Erfragt wurden unter anderem die Überlebenszeit und, im Falle des Todes, die mutmaßliche Todesursache (cMCT-assoziiert oder andere).

Die HE-Schnitte der cMCT wurden analog wie oben digitalisiert. Von jedem WSI wurden bis zu fünf ROIs, insofern die Tumorregion groß genug war, aus verschiedenen Regionen vom Randbereich und Zentrum des Tumors mit einer Größe von 0,1185 mm² ausgeschnitten. Bei kleinen Tumoren (< 5 ROIs) wurden die maximale Anzahl von sich nicht-überlagernden ROIs als TIFF-Bilder extrahiert.

Basierend auf dem DL-Modell (siehe oben) wurde ein Algorithmus entwickelt, der die abgeleitete Kernsegmentierungsmaske (Abb. 4) nachbearbeitet. Das heißt, alle ROI-Bilder der 96 cMCT wurden mit dem DL-Modell berechnet. Aus den hervorgesagten Kernsegmentierungsmasken wurde dann vom Kooperationspartner Andreas Haghofer, M.Sc., die Exzentrizität (beschreibt Abweichung von einer perfekten runden Form) und Kreisförmigkeit (Kernform) sowie Fläche (Kerngröße) für jeden Kern ermittelt. Abschließend wurde dann für jeden der 96 cMCT Fälle (d.h. alle Zellkerne und alle ROIs zusammen) die Standardabweichung (SD), der Mittelwert und der oben erwähnten morphometrischen Messgrößen (Exzentrizität, Kreisförmigkeit, und Fläche) berechnet. Die Werte der Zellkerngröße wurden von Pixel mit einem Faktor von 0,061828822 in μm^2 umgerechnet. Der Faktor ergibt sich aus der Bildauflösung in pixel von x und y berechnen, d.h. $x = 0,248166$ Pixel und $y = 0,249143$ Pixel - $y * x = 0,061828822$.

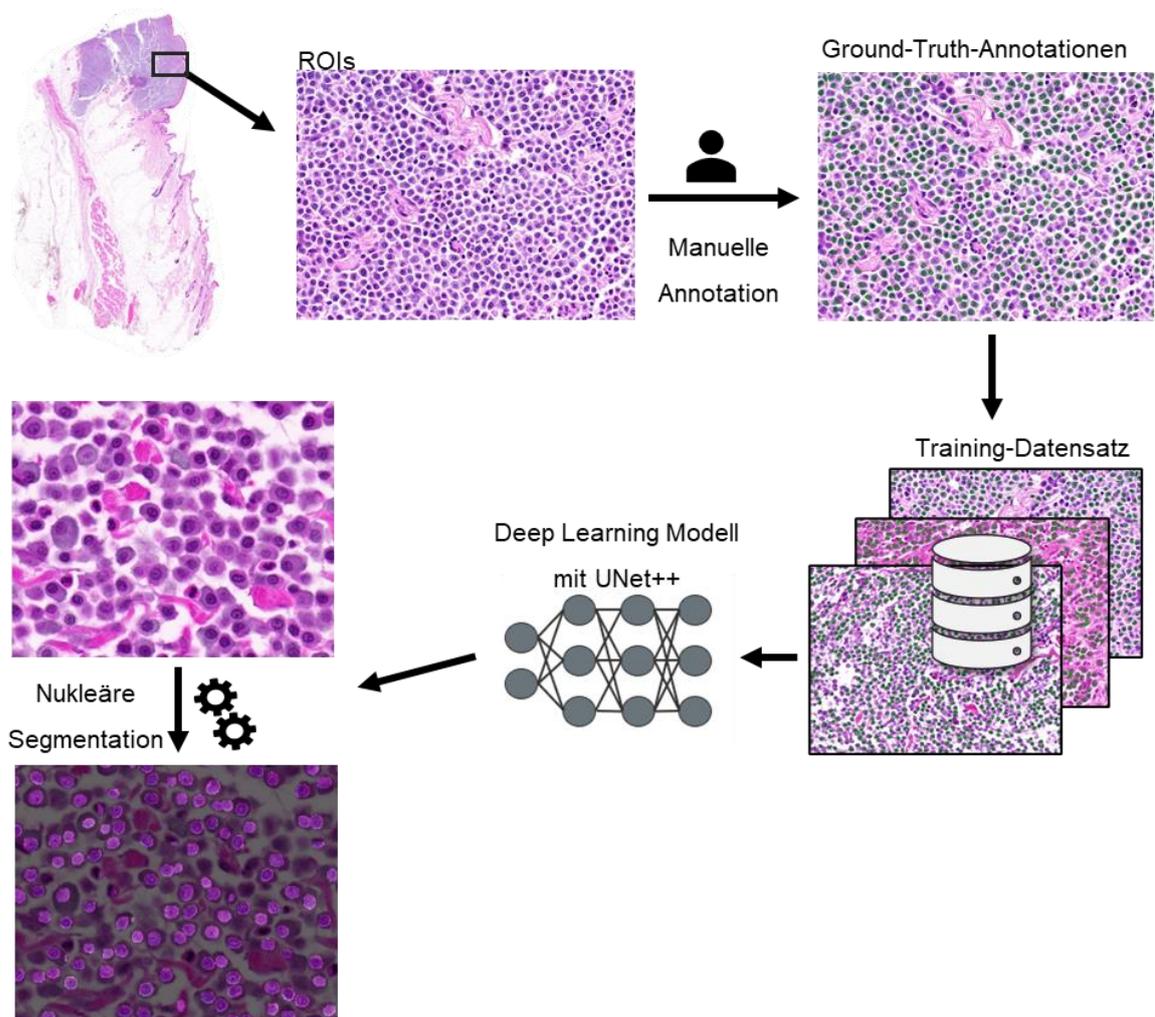


Abb. 4: Schritte zur Entwicklung des Algorithmus.

2.2.1 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der erhobenen Daten wurden mit den Programmen GraphPad Prism (GraphPad Prism version 8.0.0), Microsoft Excel und SPSS (IBM® SPSS Statistics) durchgeführt.

Die Korrelation der morphometrischen Parametern miteinander wurde mittels der Pearson-Methode bestimmt. Die Pearson Korrelation ermöglicht den linearen Zusammenhang zwischen Paaren kontinuierlicher Variablen zu bestimmen. Dabei dient der Korrelationskoeffizient (r) nach Pearson als Maß für die Stärke und Richtung der Korrelation der Parameter und nimmt Werte zwischen -1 und 1 an, wobei das Vorzeichen auf eine

positive oder negative Korrelation hindeutet. Die Signifikanz (Sig 2-seitig) untersucht, ob sich die Korrelation von Null unterscheidet (W.A. Hemmerich).

Unterschiede im Ausmaß der Parameter zwischen Hunden mit Tumor-assoziiertem Tod und anderen Patienten wurde zunächst in Streudiagrammen dargestellt. Es wurden 3 prognostische Grenzwerte für die Unterteilung dieser beiden Gruppen anhand folgender Methoden bestimmt: 1) Medianwert aller Patienten, 2) Medianwert aller Patienten mit Tumor-assoziiertem Tod und 3) der Mittelwert zwischen den 1. und 2. Grenzwert. Anhand der Grenzwerte und den Überlebensangaben wurde die Anzahl der richtig positiven Fälle (TP, Messung oberhalb des Grenzwertes und Tumor-assoziierte Tod), richtig negativen Fälle (TN, Messung unterhalb des Grenzwertes und Tumor-assoziierte Tod), falsch positiven (FP, Messung oberhalb des Grenzwertes aber kein Tumor-assoziierte Tod), und falsch negativen Fälle (FN, Messung unterhalb des Grenzwertes und Tumor-assoziierte Tod) analysiert. Die Sensitivität ($= TP / (TP + FN)$), Spezifität ($= TN / (FP + TN)$), Präzision ($= TP / (TP + FP)$), und Genauigkeit ($= (TP + TN) / \text{Gesamtanzahl der Patienten}$) wurde berechnet. Analog wurde die Sensitivität, Spezifität, Präzision und Genauigkeit für das Gesamtüberleben (Tumor-unabhängiger Tod) berechnet.

Weiterhin wurde für das Tumor-spezifischen Überleben die Receiver Operating Characteristic (ROC) Kurve und dessen einschließende Fläche (area under the curve, AUC) ermittelt. ROC-Kurven schaffen einen guten, Grenzwert-unabhängigen Überblick über die Qualität eines Tests. Es werden die Richtig-Positiv-Rate (Sensitivität) der Falsch-Positiv-Rate (Differenz $1 - \text{Spezifität}$) gegenübergestellt. Ein Maß für die Qualität des Tests ist der AUC-Wert, d.h. die Fläche unter der ROC-Kurve. Der Wert liegt zwischen 0,5 und 1, während ein größerer Wert die höhere Qualität anzeigt. Ein Test ist qualitativ niedriger, wenn Richtig-Positiv-Rate mit der Falsch-Positiv-Rate übereinstimmt. Überdies wurde asymptotische Signifikanz mithilfe von SPSS (IBM® SPSS Statistics) ermittelt.

Die Überlebenszeiten der resultierenden Gruppen (unterteilt anhand des bestimmten Grenzwertes) wurden mit der Kaplan-Meier-Methode analysiert. Die Kaplan-Meier-Kurve ist eine grafische Darstellung der Überlebenszeitanalyse und wird verwendet, um das Überleben aus Daten zu schätzen. Die Kurve zeigt den Anteil der Patienten an, die zu einem bestimmten Zeitpunkt noch leben. Zudem wurde ein Log-Rank-Test durchgeführt. Der Log-Rank-Test ist ein statistischer Test, der verwendet wird, um festzustellen, ob es einen signifikanten Unterschied in den Überlebensraten zwischen Gruppen gibt.

2.3 Bestimmung des Mitotic Counts

Die Anzahl der Mitosefiguren (Mitotic Count) wurden von einem Pathologen (Dr. Christof Bertram) bestimmt. Der Mitotic Count ist ein bekannter prognostischer Test mit hoher Relevanz für cMCT (Romansik et al. 2007) und wurde für diese Studie als Vergleichswert für die morphometrischen Messungen genommen. Die WSI wurden mit der Software Slide Runner untersucht und die Tumorregion mit einer hohen Mitosedichte herausgesucht. Mittels eines Plug-ins wurde die Region mit einer Größe von 2,37 mm² (Seitenverhältnis 4:3) dargestellt und die Mitosefiguren innerhalb dieser Region mittels Punktannotation gezählt, wie von Bertram et al. (Bertram et al. 2020) beschrieben. Für diese Auszählung wurde kein DL-basierter Algorithmus verwendet. Die statistische Auswertung der prognostischen Relevanz erfolgte analog zu den morphometrischen Parametern (siehe oben). Als Grenzwert wurde der etablierte Wert von MC > 5 (Romansik et al. 2007) sowie jeweils ein sensitiver und ein spezifischer Grenzwert basierend auf dem Streudiagramm verwendet.

2.4 Heterogenität der Zellkerngröße innerhalb des Tumorschnittes

Die Unterschiede der Standardabweichung der Zellkerngröße zwischen den 5 ROIs eines jeweiligen Falls des Validierungssatzes wurde untersucht. Die Proben mit weniger als 5 ROIs wurden für diese Auswertung exkludiert. Die Anzahl der ROIs pro Fall die unterhalb bzw. oberhalb des prognostischen Grenzwertes waren wurden gezählt. Weiterhin wurde die Standardabweichung der Messungen von den 5 Regionen im Verhältnis zum Mittelwert aller 5 Regionen des Falls dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Datensatz und Algorithmus

Für die Entwicklung des Training-Datensatzes wurden insgesamt 41.145 Nuclei annotiert. Durchschnittlich wurden 478 Zellkerne pro 0,1185 mm² Bereich umrandet (Tab. 10 im Anhang). Das aus den manuell annotierten Grundwahrheiten trainierte künstliche neuronale Netz hat eine recht genaue Zellkernererkennung und -segmentierung ergeben, wobei eine leichte Untersegmentierung erkennbar ist (Abb. 3). Anhand des Validierung-Datensatzes für die Segmentierung wurde das Modell mit einer IoU von 0,788 beurteilt.

3.2 Validierungsdatensatz

Der Validierungsdatensatz mit bekannten Patientennachverfolgung setzt sich aus 96 Fällen zusammen, davon waren 58 Hunde weiblich und 38 Hunde männlich. Die Studienpopulation enthält 21 Mischlingshunde (21,9 %), 21 Labradoretriever (21,9 %), elf Boxer (11,5 %), zehn Golden Retriever (10,4 %), vier Bassett Hound (4,2 %), drei Bosten Terrier (3,1 %), drei Cocker Spaniel (3,1 %) und 23 andere Rassen (24,0 %). Die Altersverteilung reicht von unter zwei Jahren bis über 10 Jahre, wobei die Mehrheit der Hunde (41,7 %) zum Zeitpunkt der Probenentnahme zwischen sechs und neun Jahre alt waren. Bei 23 (24,0 %) der diagnostizierten Hunde konnten Metastasen und in 73 (76,0 %) konnten keine Metastasen mittels bildgebender Diagnostik festgestellt werden. Überlebensdauer nach initialer Diagnose beträgt zwischen 0 und 45,3 Monaten mit einem Medianwert von 21,9 Monaten. Dreizehn (13,5 %) der Hunde sind laut Einsenderangaben am MCT oder aufgrund von tumorbedingten Komplikationen verstorben. Die Gruppe an Hunden, die wegen anderer Gründe verstorben sind, beträgt elf (11,5 %). Die restlichen 72 (75,0 %) Fälle sind nicht innerhalb des Beobachtungszeitraums verstorben.

3.3 Prognostische Aussagekraft des DL-basierten Algorithmus im Vergleich zum Mitotic Count

Die prognostische Aussagekraft des Algorithmus wurde mit verschiedenen Graphen und statistischen Tests bestimmt und mit dem MC, als vermutlich der relevanteste histologische Test für cMCT, verglichen. Die Streudiagramme in Abb. 5 zeigen auf der x-Achse die Überlebensgruppen und auf der y-Achse den Mittelwert oder die Standardabweichung des morphometrischen Parameters bzw. den MC. Die strichlierten Linien stellen die verschiedenen Grenzwerte dar, deren Spezifität, Sensitivität, Präzision und Genauigkeit in der nachfolgenden Tabelle (Tab. 4 und Tab. 5) aufgelistet werden. Durch die Berechnungen hat sich herausgestellt, dass die Standardabweichung generell sensitiver und spezifischer ist als der Mittelwert für alle untersuchten morphometrischen Parameter.

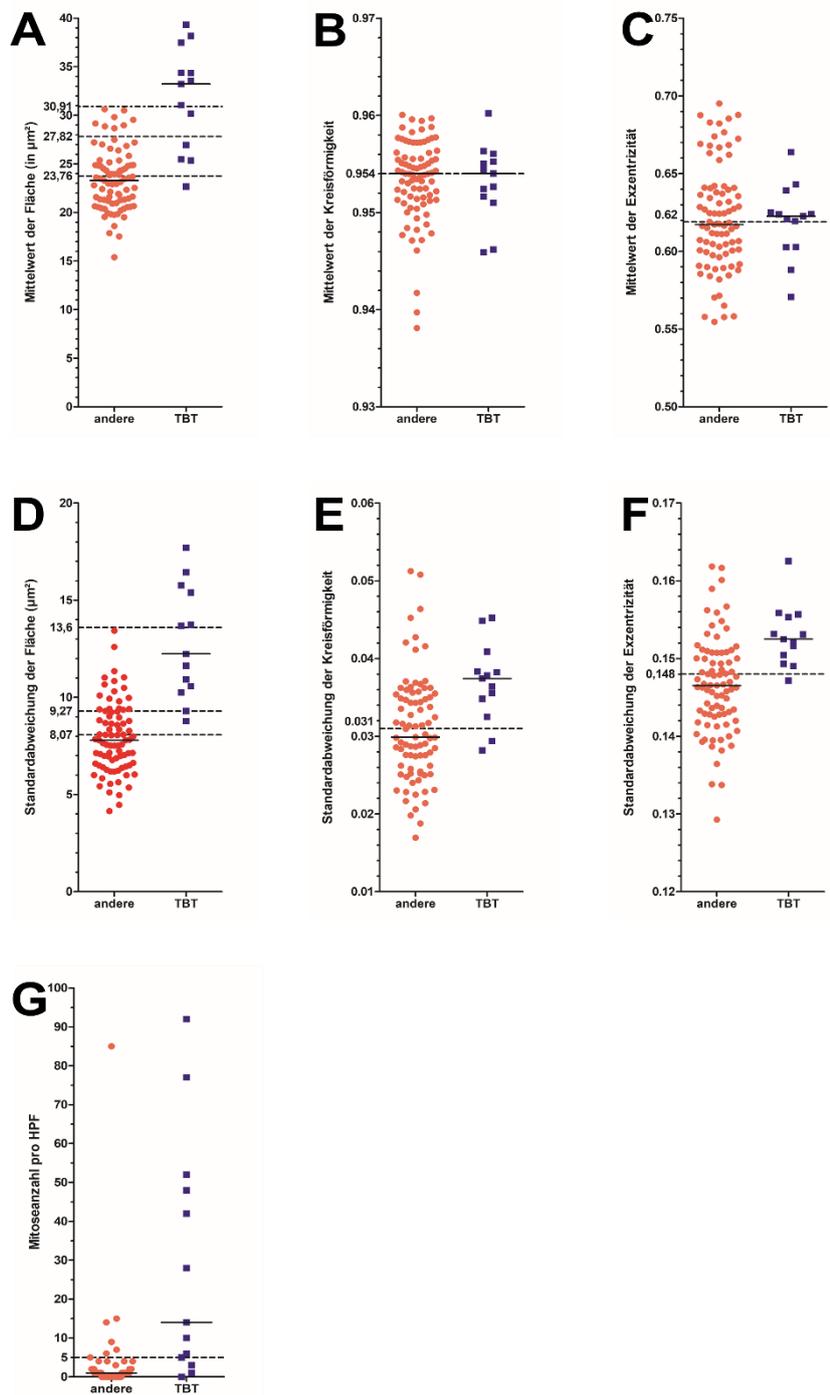


Abb. 5: Streudiagramme der verschiedenen morphometrischen Parameter für Patienten mit tumor-spezifischen Überleben bzw. Tod. **A:** Mittelwert der Fläche, **B:** Mittelwert der Kreisförmigkeit, **C:** Mittelwert der Exzentrizität, **D:** Standardabweichung der Fläche, **E:** Standardabweichung der Kreisförmigkeit, **F:** Standardabweichung der Exzentrizität, **G:** Mitotic Count andere = lebend oder andere Todesursache, TBT = Tumorbedingte Todesursache

Tab. 4: Sensitivität, Spezifität, Präzision und Genauigkeit der verschiedenen Grenzwerte für die morphometrischen Parameter und den Mitotic Count tumorbedingter Tode.

Messung	Grenzwert	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	Präzision (%)	Genauigkeit (%)
Mittelwert der Fläche (µm²)	1,76	92,3	56,6	25,0	61,5
	2,05	69,2	90,4	52,9	87,5
	1,47	53,9	100,0	100,0	93,8
Standardabweichung der Fläche (µm²)	0,63	100,0	57,8	27,1	63,5
	0,76	84,6	89,2	55,0	88,5
	0,50	53,8	97,6	77,8	91,7
Mittelwert der Kreisförmigkeit	0,954	53,8	50,6	14,6	51,0
Standardabweichung der Kreisförmigkeit	0,031	84,6	55,4	22,9	59,4
Mittelwert der Exzentrizität	0,619	69,2	53,0	18,8	55,2
Standardabweichung der Exzentrizität	0,1475	92,3	56,6	25,0	61,5
	0,15	76,9	72,3	30,3	72,9
	0,1525	53,8	85,5	36,8	81,3
	0,034	76,9	69,9	28,6	70,8
	0,037	53,8	90,4	46,7	85,4
Mitotic Count	1	92,3	42,2	20,0	49,0
	5	76,9	91,6	58,8	89,6
	14	53,8	96,4	70,0	90,6

Tab. 5 Sensitivität, Spezifität Präzision und Genauigkeit der verschiedenen Grenzwerte für die morphometrischen Parameter und den Mitotic Count aller Todesursachen.

Messung	Grenzwert	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	Präzision (%)	Genauigkeit (%)
Mittelwert der Fläche (μm^2)	23,76	66,7	55,6	33,3	58,3
	27,82	41,7	90,3	58,8	78,1
	30,91	33,3	100,0	100,0	83,3
Standardabweichung der Fläche (μm^2)	8,07	66,7	55,6	33,3	58,3
	9,27	58,3	76,4	45,2	71,9
	13,60	25,0	100,0	100,0	81,3
Mittelwert der Kreisförmigkeit	0,954	62,5	54,2	31,3	56,3
Standardabweichung der Kreisförmigkeit	0,031	58,3	52,8	29,2	54,2
Mittelwert der Exzentrizität	0,619	50,0	50,0	25,0	50,0
Standardabweichung der Exzentrizität	0,147	58,3	52,8	29,2	54,2
Mitotic Count	1	75	41,7	30,0	50,0
	5	41,7	90,3	58,8	78,1
	14	29,2	95,8	70,0	79,2

3.4 ROC- und Kaplan-Meier-Kurve

Die Ergebnisse der ROC- (Abb. 6) und KM-Kurvenanalyse (Abb. 7) mit den AUC-Werten (Tab. 6) stellen den prognostischen Wert verschiedener Merkmale bei cMCT dar. Die Evaluierung zeigt, dass die Standardabweichung der Fläche einen höheren prognostischen Wert aufwies als der Mittelwert der Fläche, der Mitotic Count und die Standardabweichung der Exzentrizität und Kreisförmigkeit der Zellen.

Insbesondere die Fläche erwies sich als ähnlich gut wie der Mitotic Count bei der Vorhersage des Krankheitsverlaufs.

Interessanterweise ergaben die Analysen jedoch keinen signifikanten prognostischen Wert für den Mittelwert der Exzentrizität und Kreisförmigkeit der Zellen.

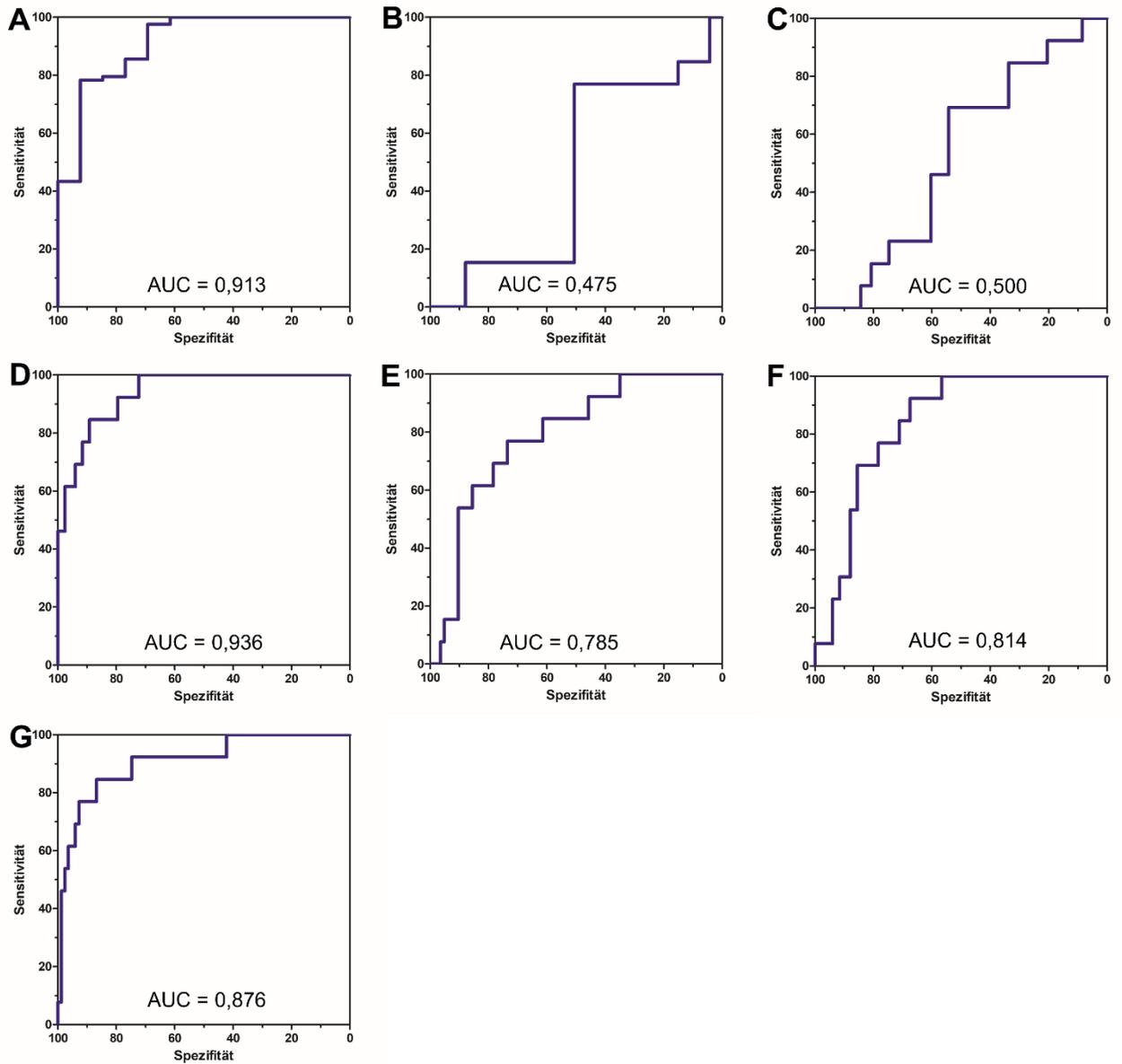


Abb. 6: ROC-Kurven mit AUC-Werten für die morphometrischen Parameter und den Mitotic Count. **A:** Mittelwert der Fläche, **B:** Mittelwert der Kreisförmigkeit, **C:** Mittelwert der Exzentrizität, **D:** Standardabweichung der Fläche, **E:** Standardabweichung der Kreisförmigkeit, **F:** Standardabweichung der Exzentrizität, **G:** Mitotic Count.

Tab. 6: AUC-Werte, 95% Konfidenzintervalle und p-Wert für die morphometrischen Parameter und den Mitotic Count.

Prognostischer Test	AUC-Wert	95% Konfidenzintervall (Ober- und Untergrenze)	p-wert
Mittelwert der Fläche (μm^2)	0,913	0,823 – 1,000	< 0,001
Standardabweichung der Fläche (μm^2)	0,936	0,878 – 0,994	< 0,001
Mittelwert der Kreisförmigkeit	0,475	0,310 – 0,641	0,777
Standardabweichung der Kreisförmigkeit	0,785	0,666 – 0,904	0,001
Mittelwert der Exzentrizität	0,500	0,354 – 0,647	0,996
Standardabweichung der Exzentrizität	0,814	0,720 – 0,908	< 0,001
Mitotic Count	0,876	0,750 – 1,000	< 0,001

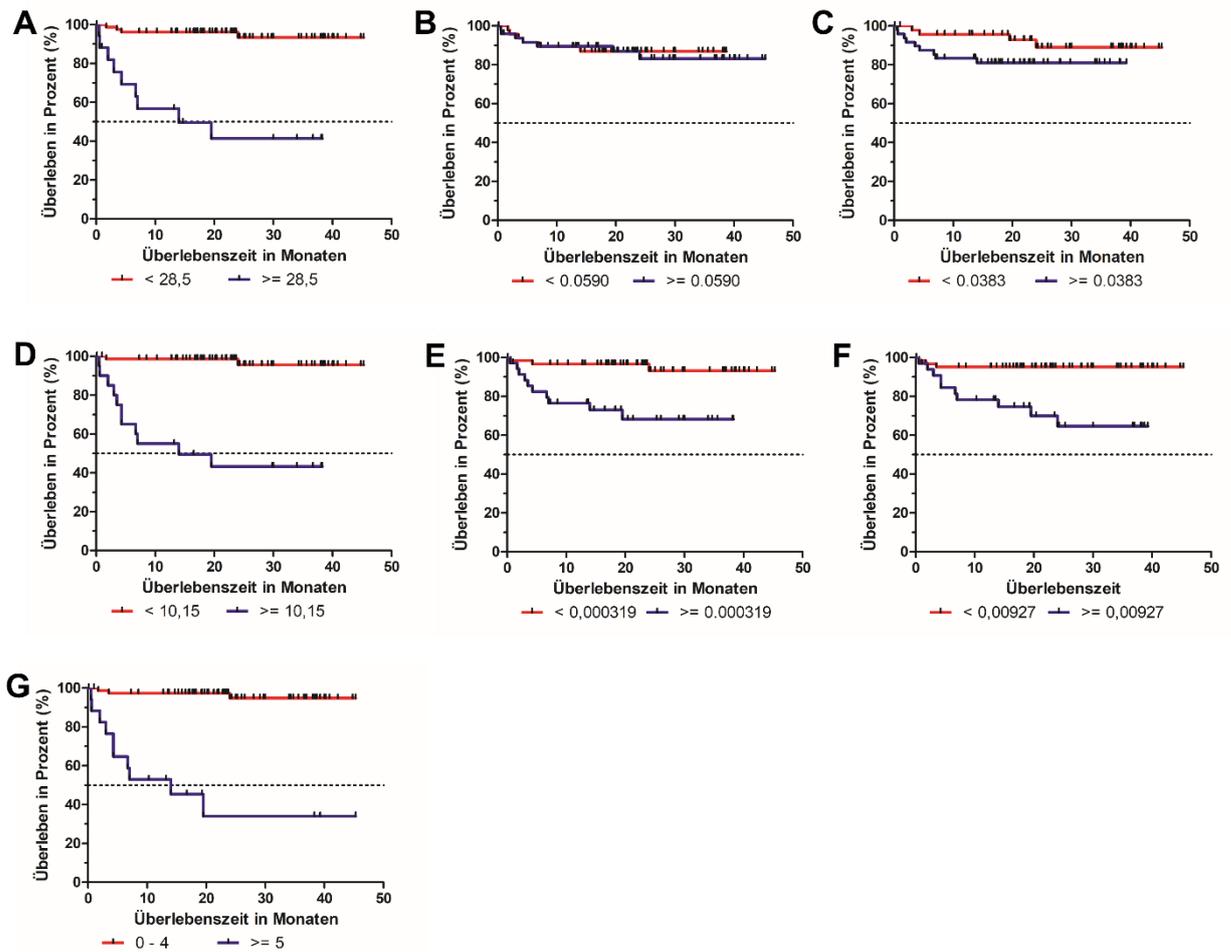


Abb. 7: Kaplan-Meier-Kurve für die verschiedenen morphometrische Parameter und dem Mitotic Count.

A: Mittelwert der Fläche, **B:** Mittelwert der Kreisförmigkeit, **C:** Mittelwert der Exzentrizität, **D:** Standardabweichung der Fläche, **E:** Standardabweichung der Kreisförmigkeit, **F:** Standardabweichung der Exzentrizität, **G:** Mitotic Count.

3.5 Korrelationsanalyse

Die Korrelationsanalyse (Tab. 7) weist eine hohe Korrelation zwischen allen Parametern, einschließlich des Mitotic Counts vor. Besonders interessant waren die Ergebnisse in Bezug auf den Mittelwert und die Standardabweichung der Zellkernfläche. Es wurde festgestellt, dass Tumore mit größeren Zellkernen auch eine größere Variation in der Zellkerngröße aufweisen. Zudem wurde keine ausgeprägte Korrelation zwischen der Fläche und dem Mitotic Count oder der Zellkernform beobachtet.

Tab. 7: Pearson-Korrelation mit SPSS (IBM® SPSS Statistics) ermittelt. MW = Mittelwert, Std = Standardabweichung, KF = Kreisförmigkeit, EX = Exzentrizität, MC = Mitotic Count

Korrelationen mit SPSS	MW-Fläche (µm ²)	Std Fläche (µm ²)	MW KF	Std KF	MW EX	Std EX	MC
MW-Fläche (µm ²)	1	0,922	,0,041	0,440	-0,028	0,563	0,567
Std Fläche(µm ²)	0,922	1	-0,341	0,694	0,197	0,553	0,520
MW KF	-0,41	-0,341	1	-0,846	-0,630	-0,056	0,066
Std KF	0,490	,694	-0,846	1	0,509	0,311	0,219
MW EX	-0,028	0,197	-0,630	0,509	1	-0,397	-0,067
Std EX	0,563	0,553	-0,056	0,311	-0,397	1	0,328
MC	0,567	0,520	0,066	0,219	-0,067	0,328	1

3.6 Heterogenität der Zellkerngröße innerhalb des Tumorschnittes

Die Heterogenität der Standardabweichung der Zellkerngröße wurde für 91/96 Fälle bestimmt. Die anderen 5 Fälle hatten weniger als 5 ROIs. Basierend auf der Auswertung von einzelnen Tumorregionen würden Unterschiede bei ca. 40% der Fälle bei der prognostischen Klassifikation anhand des Grenzwertes von 10,15 µm entstehen (Tab. 8). Unterschiede hinsichtlich der Übereinstimmung zwischen den Fällen mit Tumor-assoziierten Tod oder Überleben waren nicht ersichtlich. Fälle mit einer höheren mittleren Standardabweichung der Zellkerngröße hatten einen höheren Unterschied der Standardabweichung der Zellkerngröße (Abb. 8).

Tab. 8: Übereinstimmung bzw. Unterschiede in der Klassifikation der Fälle anhand der Standardabweichung der Zellkerngröße in den 5 verschiedenen ROI pro Tumorfall anhand des prognostischen Grenzwertes.

Anzahl der ROIs oberhalb oder unterhalb des Grenzwerts	5/5	4/5	3/5
Lebend oder andere Todesursache (N = 78)	45 (57,7%)	20 (25,6%)	13 (16,7%)
Tumorbedingter Tod (N = 13)	7 (53,9%)	3 (23,1%)	3 (23,1%)
Alle Fälle (N = 91)	52 (57,1%)	23 (25,3%)	16 (17,6%)

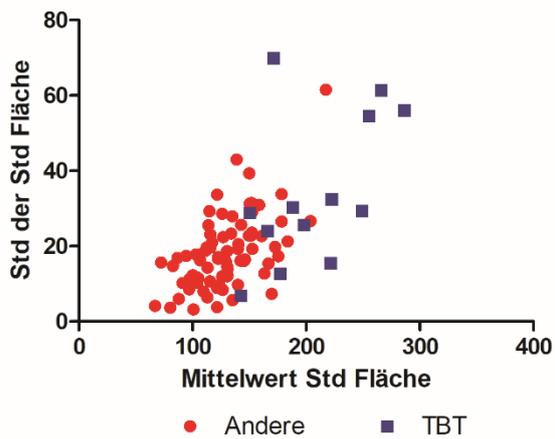


Abb. 8: Heterogenität der Zellkerngrößen; TBT, Tumorbedingter Tod; Andere, lebend oder andere Todesursache

4 Diskussion

Mehrere Diagnostiklabore in der Tiermedizin haben die Umstellung der Histopathologie vom traditionellen Lichtmikroskop auf digitale Mikroskopie mit WSI realisiert und somit den Weg für den Einsatz von Hilfssystemen mit künstlicher Intelligenz gebahnt. Diese Innovationen haben es ermöglicht, dass histologische und immunhistochemische Beurteilungen reproduzierbarer und schneller sind. Ein großes Interesse an der Entwicklung von Algorithmen für tierspezifische Tumore spiegelt sich auch in der umfangreichen Forschung zu diesem Thema wider (Bertram et al. 2018; Aeffner et al. 2018; Bera et al. 2019; Salvi et al. 2021).

In dieser Diplomarbeit wurde gezeigt, dass die automatisierte nukleäre Morphometrie bei cMCT, vor allem die mittlere Flächengröße und dessen Standardabweichung, eine hohe Bedeutung hinsichtlich der Überlebenszeit und der Klassifizierung der Fälle in gute und schlechte Prognosen hat. Somit wurde die Hypothese dieser Arbeit. Wohingegen weisen andere morphometrische Zellkernparameter, wie die Standardabweichung von Exzentrizität und Kreisförmigkeit, einen schwachen prognostischen Wert auf, während deren Mittelwerte in dieser Studie keinen prognostischen Wert aufwiesen. Zudem kann man anhand der Ergebnisse darauf schließen, dass die Fläche möglicherweise einen anderen Aspekt des Tumors als der Mitotic Count und die Zellkernform erfasst und weitere Studien sollten untersuchen, inwiefern eine Kombination dieser Tumoreigenschaften sinnvoll hinsichtlich der Prognose von cMCT ist.

Labore mit digitalen Arbeitsabläufen können ähnliche Algorithmen als Hilfsmittel zur objektiven Prognoseeinschätzung von cMCT einsetzen. Es ist jedoch zu beachten, dass die Erstellung des Algorithmus aufgrund einer begrenzten Probenanzahl erfolgte. Trotz dieser Limitation könnte diese Lösung mit minimalen Arbeits- und Infrastrukturkosten problemlos anwendbar (Bertram und Klopffleisch 2017). Für die untersuchte Anwendung ist nur eine Auswahl einer kleinen Tumorregion im digitalen Bild notwendig und die algorithmische Auswertung des kleinen Bildes erfolgt innerhalb wenigen Sekunden. Im Gegensatz zu der manuellen Vermessung durch PathologenInnen ermöglicht diese computerisierte Messung einen routinemäßigen Einsatz in Diagnostiklaboren. Zukünftige Studien sind notwendig, um die Vorteile der algorithmischen Morphometrie im Vergleich zur subjektiven Einschätzung von cMCT herauszustellen. Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Einschätzung der nukleären Pleomorphie sind klar definierte Kategorien notwendig, welche möglicherweise basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Studie erstellt werden können.

Ein wesentlicher Aspekt des maschinellen Lernens ist das Problem der Generalisierung. Man kann nicht sicherstellen, dass ein Modell auch bei unbekanntem Daten gut abschneidet. Wenn diese unbekanntem Validierungsdaten eine andere Verteilung haben, redet man von einem Domain-Shift. Schon kleine Änderungen im Vergleich zu den Trainingsdaten können dazu führen, dass ein trainiertes neuronales Netz deutliche Leistungseinbrüche aufweist. Zumindest für Deep Learning-basierten Algorithmen zur Erkennung von Mitosefiguren sind vor allem die Bildeigenschaften verschiedener WSI Scanner als wichtige Quelle eines relevanten Domains-Shifts bekannt (Bertram et al. 2022; Aubreville et al. 2023). Die Trainings- und Test-Bilder sind in dieser Studie nur mit einem Scanner (3D Histech Pannoramics SCAN II) digitalisiert worden. Zukünftige Studien sind notwendig, um den Einfluss des Domain-Shift auf die Zellkernsegmentierung von cMCT-Bildern zu untersuchen. Trainingsdatensätze mit WSI, welche mit mehreren Scannern aufgenommen wurden, sind vermutlich notwendig um einen Domain-Shift zu vermeiden (Bertram et al. 2022; Aubreville et al. 2023). Im Rahmen dieser Arbeit ist die Färbearianz zwischen Laboren wahrscheinlich gut abgedeckt, da Fälle von vier verschiedenen Laboren gesammelt wurden. Jedoch wurde die Genauigkeit des Modells in Zusammenhang der Färbung nicht kontrolliert. Es besteht auch die Möglichkeit einen Färbungsnormalisierungsschritt in ein Modell zu integrieren. Auf diese Weise können Strukturen der Ausgangsbilder erhalten bleiben, während gleichzeitig eine hohe gegenseitige chromatische Information mit einer Vorlage erzwungen wird (Salvi et al. 2021).

Ferner wurde der Algorithmus nur mit einem Tumortyp trainiert und getestet. Mastzelltumore haben einige spezifische Eigenschaften, wie die zytoplasmatische metachromatische Granulierung, welche die Übertragbarkeit von diesem Algorithmus auf andere Tumortypen verringern könnte. Diese Granula maskieren oft den Zellkern und erschweren die Erkennbarkeit der Zellkerne, welches sich bei der Erstellung des Ground Truth Datensatzes und vermutlich für die algorithmische Zellkernerkennung problematisch dargestellt hat. Überdies ist die prognostische Relevanz der nukleären Morphometrie in anderen Tumortypen von Tieren nicht bekannt. Deshalb ist das Entwickeln und Validieren gleichartiger Algorithmen für anderen tierspezifischen Tumortypen notwendig.

Weiters kann die räumliche Heterogenität der gemessenen Zellkerngröße in cMCT unterschiedlich sein, entweder weitgehend einheitlich oder mit deutlicher Variation, ähnlich wie bereits für Mitosefiguren in cMCT bekannt (Yuan 2016). Wenn eine Heterogenität festgestellt wird, könnte eine gezielte Regionauswahl bei der Messung der Zellkerngröße die

prognostische Aussagekraft verbessern, im Gegensatz zur willkürlichen Auswahl von mehreren Bereichen. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die Auswirkungen dieser Heterogenität auf die Prognose von cMCT zu verstehen und geeignete Messstrategien zu entwickeln.

In Zukunft ist eine Validierungsstudie mit einer größeren Studienpopulation erforderlich, um die prognostische Relevanz und die bestimmten Grenzwerte zu bestätigen. Die aktuelle Studie basiert auf 96 Fällen mit lediglich 13 Patienten mit einem Tumor-assoziierten Tod. Weiterhin muss die prognostische Aussagekraft des Algorithmus mit weiteren bekannten prognostischen Tests geprüft werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die nukleäre Morphometrie mit dem Mitotic Count, eines der relevantesten prognostischen Tests für cMCT, verglichen. Während die prognostische Aussagekraft des Algorithmus und des Mitotic Count vergleichbar waren, scheint der untersuchte Algorithmus im vorliegenden Probenmaterial deutlich reproduzierbarer und zeiteffizienter zu sein. Zudem sollte die Kombination verschiedener merkmalspezifischer Algorithmen, wie z.B. die Mitoseanzahl, in einem Workflow zur Verbesserung der prognostischen Bewertung untersucht werden. (Bertram et al. 2022).

Wie oben beschrieben, kann es bei einem Domain Shift zum Leistungseinbruch des Algorithmus kommen, der die prognostische Aussagekraft verringert. Daher erscheint zunächst die Überprüfung der algorithmischen Vorhersage, insbesondere der Zellkernsegmentierung, durch PathologenInnen sinnvoll, um mögliche Fehler des Algorithmus erkennen und beheben zu können. Anhand ihrer Fachkenntnisse können pathologische Strukturen werden, die der Algorithmus möglicherweise übersehen hat oder noch nicht erkennen kann. Diese Zusammenarbeit von Menschen und KI gewährleistet eine präzise und zuverlässige Analyse und stärkt das Vertrauen in die automatisierten Methoden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die algorithmische nukleäre Morphometrie, insbesondere hinsichtlich der Zellkerngröße, ein zuverlässiger prognostischer Test und damit eine objektive Beurteilung der Prognose für cMCT ermöglichen könnte. Dafür sind zukünftige Studien mit einer größeren Studienpopulation und weiteren Tumortypen notwendig.

5 Zusammenfassung

Mastzelltumore der Hunde sind häufige bösartige Tumore, die vor allem in der Haut und Unterhaut auftreten können. Um einen caninen kutanen Mastzelltumors (cMCT) zu diagnostizieren sowie zu prognostizieren, ist eine histopathologische Untersuchung einer Gewebprobe notwendig. Für die histologische Beurteilung haben sich zwei Klassifizierungssysteme (Gradingssysteme) – nach Patnaik et al. sowie Kiupel et al. - bewährt. In diesen Gradingssystemen werden qualitative und semiquantitative Bewertungskriterien verwendet, welche wesentliche Intra- und Interobserver Variabilität aufweisen können. Eines dieser Kriterien mit bekannter prognostischer Relevanz ist die nukleäre Pleomorphie, d.h. die Variabilität der Zellkerngröße. Eine Alternative zu der subjektiven Einschätzung der nukleären Pleomorphie durch PathologenInnen ist die nukleäre Morphometrie, d.h. das Ausmessen der Zellkerne, in digitalisierten Histologie-Bildern.

In der vorliegenden Arbeit wird die prognostische Bewertung der cMCT durch eine automatisierte nukleäre Morphometrie mittels künstlicher Intelligenz überprüft, welches eine schnelle, akkurate und reproduzierbare Bewertungsmöglichkeit des Tumors zulassen könnte.

Für die Entwicklung des Algorithmus wurden insgesamt 86 Proben annotiert. Die Validierung des Modells wurde mit 96 zusätzlichen Fällen durchgeführt.

Die Ergebnisse lassen in der untersuchten Probengruppe darauf schließen, dass die algorithmische Morphometrie, insbesondere das geometrische Mittel (AUC = 0,913) und die Standardabweichung (AUC = 0,936) der Flächengröße, bei cMCT einen hohen prognostischen Wert hinsichtlich der Überlebenszeit aufweisen könnte. Die Klassifizierung von Fällen anhand eines definierten Grenzwertes des geometrischen Mittels bzw. der Standardabweichung der Fläche hat eine Sensitivität von 69,2 % bzw. 84,6 % und die Spezifität von 90,4 % bzw. 89,2 % ergeben. Merkmale wie Exzentrizität und Kreisförmigkeit haben eine schwache bis keine prognostische Aussage. Veterinärpathologische Labore könnten in Zukunft diesen Algorithmus zur objektiven Prognose von cMCT in ihre digitalen Arbeitsabläufen einsetzen.

Zukünftige Studien mit einer größeren Datenmenge sowie anderen tierspezifische Tumortypen sind erforderlich, um diese Ergebnisse zu bekräftigen. Ferner sollte die automatisierte Morphometrie mit Schätzungen der PathologenInnen verglichen werden.

6 Summary

Canine mast cell tumors are common malignant tumors that occurs mainly in the skin and subcutaneous tissue. In order to diagnose as well as prognosticate a canine cutaneous mast cell tumor (cMCT), a histopathological examination of a tissue sample is mandatory. Two grading-systems - the Patnaik- and Kiupel- system- have been proven useful for histological evaluation. In these classification-systems, qualitative and semiquantitative grading criteria are used, which may show substantial intra- and interobserver variability. One of these criteria with known prognostic relevance is nuclear pleomorphism, i.e., variability in cell nuclear size. An alternative to the subjective assessment of nuclear pleomorphism by pathologists is nuclear morphometry, i.e. the measurement of cell nuclei, in digitized histology images.

In this diploma thesis, the prognostic evaluation of cMCT is reviewed by automated nuclear morphometry using artificial intelligence, which may allow a faster, more accurate, and more reproducible evaluation of the tumor in the future.

A total of 86 slides were annotated for the development of the algorithm. Validation of the model was performed with 96 additional cases.

The results of the evaluated samples in this study provide evidence that algorithmic morphometry, especially geometric mean (AUC = 0,913) and standard deviation (AUC = 0,936) of area size, may offer high prognostic value in cMCT in terms of survival. Classification based on a determined cutoff value of geometric mean and standard deviation of area size resulted in a sensitivity of 69.2% and 84.6%, respectively, and specificity of 90.4% and 89.2% in the study group. Features such as eccentricity and solidity had weak to no prognostic value. Based on this study, veterinary pathology laboratories might be able to use this algorithm to objectively predict cMCT in their digital workflows.

Future studies with a larger data set as well as other animal-specific tumor types are needed to corroborate these results. Furthermore, automated morphometry should be compared with pathologist estimates.

7 Abkürzungsverzeichnis

cMCT.....	= Caniner kutaner Mastzelltumor (engl.: canine cutaneous mast cell tumor)
DL.....	Deep Learning
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HPF	High power field = Gesichtsfeld des Lichtmikroskops bei einer Vergrößerung von 400x
IoU.....	Intersection over Union
KI.....	Künstliche Intelligenz
MC.....	Mitotic Count
MCT.....	Mastzelltumor (engl.: Mast Cell Tumor)
PSI.....	Point-Sampled Intercept
ROI	Region of Interest = Bereich von Interesse
SD	Standard Deviation = Standardabweichung
WSI.....	Whole-Slide-Image

8 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mich während meines Studiums und der Erstellung dieser Diplomarbeit unterstützt haben.

Zu Beginn möchte ich mich besonders bei meinem Betreuer Dr. Christof Bertram bedanken, der mir die nötigen Hilfestellungen und die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit bereitgestellt hat.

Ebenfalls möchte ich Andreas Haghofer, MSc (FH Oberösterreich) danken, der den Algorithmus und dessen Ergebnisse bereitgestellt hat und bei Fragen immer weitergeholfen hat.

Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Dr. Robert Klopffleisch (Freie Universität Berlin), Dr. Taryn Donovan (Schwarzman Animal Medical Center) und Prof. Dr. Matti Kiupel (Michigan State University), die Proben für die Entwicklung und Auswertung des Algorithmus zur Verfügung gestellt haben.

Zudem danke ich Prof Dr. Marc Aubreville (Technische Hochschule Ingolstadt), der mich bei technischen Problemen unterstützt hat.

Ebenso danke ich meiner Schwester Ela für das Korrekturlesen und dafür, dass sie immer für mich da ist.

9 Literaturverzeichnis

Aeffner, Famke; Adissu, Hibret A.; Boyle, Michael C.; Cardiff, Robert D.; Hagendorn, Erik; Hoenerhoff, Mark J. et al. (2018): Digital Microscopy, Image Analysis, and Virtual Slide Repository. In: *ILAR Journal* 59 (1), S. 66–79. DOI: 10.1093/ilar/ily007.

Aubreville, Marc; Bertram, Christof; Klopffleisch, Robert; Maier, Andreas (2018): SlideRunner. In: Andreas Maier, Thomas M. Deserno, Heinz Handels, Klaus Hermann Maier-Hein, Christoph Palm und Thomas Tolxdorff (Hg.): *Bildverarbeitung für die Medizin 2018*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Informatik aktuell), S. 309–314.

Aubreville, Marc; Bertram, Christof A.; Donovan, Taryn A.; Marzahl, Christian; Maier, Andreas; Klopffleisch, Robert (2020a): A completely annotated whole slide image dataset of canine breast cancer to aid human breast cancer research. In: *Scientific data* 7 (1), S. 417. DOI: 10.1038/s41597-020-00756-z.

Aubreville, Marc; Bertram, Christof A.; Marzahl, Christian; Gurtner, Corinne; Dettwiler, Martina; Schmidt, Anja et al. (2020b): Deep learning algorithms out-perform veterinary pathologists in detecting the mitotically most active tumor region. In: *Scientific reports* 10 (1), S. 16447. DOI: 10.1038/s41598-020-73246-2.

Aubreville, Marc; Stathonikos, Nikolas; Bertram, Christof A.; Klopffleisch, Robert; Hoeve, Natalie ter; Ciompi, Francesco et al. (2023): Mitosis domain generalization in histopathology images -- The MIDOG challenge. In: *Medical image analysis* 84 (1), Artikel 102699, S. 102699. DOI: 10.1016/j.media.2022.102699.

Bera, Kaustav; Schalper, Kurt A.; Rimm, David L.; Velcheti, Vamsidhar; Madabhushi, Anant (2019): Artificial intelligence in digital pathology — new tools for diagnosis and precision oncology. In: *Nat Rev Clin Oncol* 16 (11), S. 703–715. DOI: 10.1038/s41571-019-0252-y.

Berlato, Davide; Bulman-Fleming, Julie; Clifford, Craig A.; Garrett, Laura; Intile, Joanne; Jones, Pamela et al. (2021): Value, Limitations, and Recommendations for Grading of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: A Consensus of the Oncology-Pathology Working Group. In: *Veterinary pathology* 58 (5), S. 858–863. DOI: 10.1177/03009858211009785.

Bertram, Christof A.; Aubreville, Marc; Donovan, Taryn A.; Bartel, Alexander; Wilm, Frauke; Marzahl, Christian et al. (2022): Computer-assisted mitotic count using a deep learning-based algorithm improves interobserver reproducibility and accuracy. In: *Veterinary pathology* 59 (2), S. 211–226. DOI: 10.1177/03009858211067478.

- Bertram, Christof A.; Aubreville, Marc; Gurtner, Corinne; Bartel, Alexander; Corner, Sarah M.; Dettwiler, Martina et al. (2020): Computerized Calculation of Mitotic Count Distribution in Canine Cutaneous Mast Cell Tumor Sections: Mitotic Count Is Area Dependent. In: *Veterinary pathology* 57 (2), S. 214–226. DOI: 10.1177/0300985819890686.
- Bertram, Christof A.; Aubreville, Marc; Marzahl, Christian; Maier, Andreas; Klopffleisch, Robert (2019): A large-scale dataset for mitotic figure assessment on whole slide images of canine cutaneous mast cell tumor. In: *Scientific data* 6 (1), S. 274. DOI: 10.1038/s41597-019-0290-4.
- Bertram, Christof A.; Gurtner, Corinne; Dettwiler, Martina; Kershaw, Olivia; Dietert, Kristina; Pieper, Laura et al. (2018): Validation of Digital Microscopy Compared With Light Microscopy for the Diagnosis of Canine Cutaneous Tumors. In: *Veterinary pathology* 55 (4), S. 490–500. DOI: 10.1177/0300985818755254.
- Bertram, Christof A.; Klopffleisch, Robert (2017): The Pathologist 2.0: An Update on Digital Pathology in Veterinary Medicine. In: *Veterinary pathology* 54 (5), S. 756–766. DOI: 10.1177/0300985817709888.
- Casanova, Mafalda; Branco, Sandra; Veiga, Inês Berenguer; Barros, André; Faísca, Pedro (2021): Stereology in Grading and Prognosis of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. In: *Veterinary pathology* 58 (3), S. 483–490. DOI: 10.1177/0300985820985138.
- Chuang, Wen-Yu; Yu, Wei-Hsiang; Lee, Yen-Chen; Zhang, Qun-Yi; Chang, Hung; Shih, Lee-Yung et al. (2022): Deep Learning-Based Nuclear Morphometry Reveals an Independent Prognostic Factor in Mantle Cell Lymphoma. In: *The American journal of pathology* 192 (12), S. 1763–1778. DOI: 10.1016/j.ajpath.2022.08.006.
- Dubitzky, Werner; Wolkenhauer, Olaf; Cho, Kwang-Hyun; Yokota, Hiroki (Hg.) (2013): *Encyclopedia of Systems Biology*. New York, NY: Springer New York; Imprint; Springer.
- Jiang, Yahui; Yang, Meng; Wang, Shuhao; Li, Xiangchun; Sun, Yan (2020): Emerging role of deep learning-based artificial intelligence in tumor pathology. In: *Cancer communications (London, England)* 40 (4), S. 154–166. DOI: 10.1002/cac2.12012.
- Kiupel, M.; Webster, J. D.; Bailey, K. L.; Best, S.; DeLay, J.; Detrisac, C. J. et al. (2011): Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. In: *Veterinary pathology* 48 (1), S. 147–155. DOI: 10.1177/0300985810386469.

- Kiupel, Matti; Camus, Melinda (2019): Diagnosis and Prognosis of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. In: *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* 49 (5), S. 819–836. DOI: 10.1016/j.cvsm.2019.04.002.
- Ladekarl, Morten (1998): Objective malignancy grading. A review emphasizing unbiased stereology applied to breast tumors. Copenhagen: Munksgaard.
- Maiolino, P.; Cataldi, M.; Paciello, O.; Restucci, B.; Vico, G. de (2005): Nucleomorphometric analysis of canine cutaneous mast cell tumours. In: *Journal of comparative pathology* 133 (2-3), S. 209–211. DOI: 10.1016/j.jcpa.2005.02.002.
- Meuten, D. J.; Moore, F. M.; George, J. W. (2016): Mitotic Count and the Field of View Area: Time to Standardize. In: *Veterinary pathology* 53 (1), S. 7–9. DOI: 10.1177/0300985815593349.
- Meuten, Donald J.; Moore, Frances M.; Donovan, Taryn A.; Bertram, Christof A.; Klopffleisch, Robert; Foster, Robert A. et al. (2021): International Guidelines for Veterinary Tumor Pathology: A Call to Action. In: *Veterinary pathology* 58 (5), S. 766–794. DOI: 10.1177/03009858211013712.
- Misdorp, W. (2004): Mast cells and canine mast cell tumours. A review. In: *The veterinary quarterly* 26 (4), S. 156–169. DOI: 10.1080/01652176.2004.9695178.
- Patnaik, A. K.; Ehler, W. J.; MacEwen, E. G. (1984): Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. In: *Veterinary pathology* 21 (5), S. 469–474. DOI: 10.1177/030098588402100503.
- Romansik, E. M.; Reilly, C. M.; Kass, P. H.; Moore, P. F.; London, C. A. (2007): Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. In: *Veterinary pathology* 44 (3), S. 335–341. DOI: 10.1354/vp.44-3-335.
- Salvi, Massimo; Acharya, U. Rajendra; Molinari, Filippo; Meiburger, Kristen M. (2021): The impact of pre- and post-image processing techniques on deep learning frameworks: A comprehensive review for digital pathology image analysis. In: *Computers in biology and medicine* 128, S. 104129. DOI: 10.1016/j.combiomed.2020.104129.
- Santos, M.; Correia-Gomes, C.; Santos, A.; Matos, A. de; Dias-Pereira, P.; Lopes, C. (2015): Interobserver Reproducibility of Histological Grading of Canine Simple Mammary Carcinomas. In: *Journal of comparative pathology* 153 (1), S. 22–27. DOI: 10.1016/j.jcpa.2015.04.005.

Santos, Marta; Correia-Gomes, Carla; Santos, Andreia; Matos, Augusto de; Rocha, Eduardo; Lopes, Carlos; Pereira, Patrícia Dias (2014): Nuclear pleomorphism: role in grading and prognosis of canine mammary carcinomas. In: *Veterinary journal (London, England : 1997)* 200 (3), S. 426–433. DOI: 10.1016/j.tvjl.2014.03.019.

Schwab, Manfred (2012): Encyclopedia of Cancer [recurso electrónico]. 3. Aufl. Alemania: Springer Healthcare Ltd.

Sledge, Dodd G.; Webster, Joshua; Kiupel, Matti (2016): Canine cutaneous mast cell tumors: A combined clinical and pathologic approach to diagnosis, prognosis, and treatment selection. In: *Veterinary journal (London, England : 1997)* 215, S. 43–54. DOI: 10.1016/j.tvjl.2016.06.003.

Strefezzi, R. De F.; Xavier, J. G.; Catão-Dias, J. L. (2003): Morphometry of canine cutaneous mast cell tumors. In: *Veterinary pathology* 40 (3), S. 268–275. DOI: 10.1354/vp.40-3-268.

Strefezzi, Ricardo de Francisco; Xavier, José Guilherme; Kleeb, Silvia Regina; Catão-Dias, José Luiz (2009): Nuclear morphometry in cytopathology: a prognostic indicator for canine cutaneous mast cell tumors. In: *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 21 (6), S. 821–825. DOI: 10.1177/104063870902100608.

Süße, Herbert; Rodner, Erik (2014): Bildsegmentierung. In: Herbert Süße und Erik Rodner (Hg.): Bildverarbeitung und Objekterkennung. Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden, S. 211–240.

W.A. Hemmerich: Pearson Produkt-Moment-Korrelation in SPSS. Statistik Guru. Online verfügbar unter <https://statistikguru.de/spss/produkt-moment-korrelation/pearson-korrelation-in-spss.html>, zuletzt geprüft am 05.02.2023.

Willmann, Michael; Yuzbasiyan-Gurkan, Vilma; Marconato, Laura; Dacasto, Mauro; Hadzijusufovic, Emir; Hermine, Olivier et al. (2021): Proposed Diagnostic Criteria and Classification of Canine Mast Cell Neoplasms: A Consensus Proposal. In: *Frontiers in veterinary science* 8, S. 755258. DOI: 10.3389/fvets.2021.755258.

Yuan, Yinyin (2016): Spatial Heterogeneity in the Tumor Microenvironment. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 6 (8). DOI: 10.1101/cshperspect.a026583.

Zhou, Zongwei; Siddiquee, Md Mahfuzur Rahman; Tajbakhsh, Nima; Liang, Jianming (2018): UNet++: A Nested U-Net Architecture for Medical Image Segmentation. Online verfügbar unter <http://arxiv.org/pdf/1807.10165v1>.

10 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

10.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Benutzeroberfläche der Annotationssoftware Slide Runner 2.0.0..	14
Abb. 2: A Mastzellkerne ohne Annotationen. B Mastzellkerne mit Polygon-Annotationen	14
Abb. 3: Beispiel eines Bildsegmentierung-Overlays.	15
Abb. 4: Schritte zur Entwicklung des Algorithmus	17
Abb. 5: Streudiagramme der verschiedenen morphometrischen Parameter	22
Abb. 6: ROC-Kurven mit AUC-Werten für die morphometrischen Parameter.	25
Abb. 7: Kaplan-Meier-Kurve für die verschiedenen morphometrische Parameter.	27
Abb. 8: Heterogenität der Zellkerngrößen	29

10.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Bewertungskriterien für das Grading System für cMCT nach Patnaik et al. (Patnaik et al. 1984).	7
Tab. 2: Bewertungskriterien für das Grading System für cMCT nach Kiupel et al (Kiupel et al. 2011).	7
Tab. 3: Gegenüberstellung der verschiedenen Methoden zur Beurteilung der nukleären Pleomorphie	9
Tab. 4: Sensitivität, Spezifität Präzision und Genauigkeit der verschiedenen Grenzwerte für die morphometrischen Parameter und den Mitotic Count tumorbedingter Tode.	23
Tab. 5: Sensitivität, Spezifität Präzision und Genauigkeit der verschiedenen Grenzwerte für die morphometrischen Parameter und den Mitotic Count aller Todesursachen.	24
Tab. 6: AUC-Werte, 95% Konfidenzintervalle und p-Wert für die morphometrischen Parameter und den Mitotic Count.	26
Tab. 7: Pearson-Korrelation mit SPSS.	28
Tab. 8: Übereinstimmung in den 5 verschiedenen ROI pro Tumorfall anhand des prognostischen Grenzwertes.	29
Tab. 9: Anzahl der Annotationen und Herkunft der WSI.	43

11 Anhang

Tab. 9: Anzahl der Annotationen und Herkunft der WSI, welche in dieser Diplomarbeit verwendet wurden.

WSI-ID	Labor/Universität	ROI	Anzahl der Annotationen
1	Michigan State University	2	1737
2	Michigan State University	2	799
3	Michigan State University	2	605
4	Michigan State University	2	226
5	Michigan State University	2	924
6	Michigan State University	2	444
7	Michigan State University	2	1102
8	Michigan State University	2	1153
9	Michigan State University	2	769
10	Michigan State University	2	992
11	Michigan State University	2	2019
12	Michigan State University	2	1103
13	Michigan State University	2	1484
14	Michigan State University	2	596
15	Michigan State University	2	399
16	Michigan State University	2	856
17	Michigan State University	2	1255

WSI-ID	Labor/Universität	ROI	Anzahl der Annotationen
18	Michigan State University	2	769
19	Michigan State University	2	379
20	Michigan State University	2	659
21	Michigan State University	2	942
22	Freie Universität Berlin	1	557,00
23	Freie Universität Berlin	1	810,00
24	Freie Universität Berlin	1	137,00
25	Freie Universität Berlin	1	531,00
26	Freie Universität Berlin	1	219,00
27	Freie Universität Berlin	1	522,00
28	Freie Universität Berlin	1	804,00
29	Freie Universität Berlin	1	844,00
30	Freie Universität Berlin	1	455,00
31	Freie Universität Berlin	1	593,00
32	Freie Universität Berlin	1	937,00
33	Freie Universität Berlin	1	833,00
34	Freie Universität Berlin	1	470,00
35	Freie Universität Berlin	1	274,00
36	Veterinärmedizinische Universität Wien	1	1.737

WSI-ID	Labor/Universität	ROI	Anzahl der Annotationen
37	Veterinärmedizinische Universität Wien	1	799
38	Veterinärmedizinische Universität Wien	1	605
39	Veterinärmedizinische Universität Wien	1	226
40	Veterinärmedizinische Universität Wien	1	924
41	Veterinärmedizinische Universität Wien	1	444
42	Veterinärmedizinische Universität Wien	1	1.102
43	Veterinärmedizinische Universität Wien	1	1.153
44	Veterinärmedizinische Universität Wien	1	769
45	Veterinärmedizinische Universität Wien	1	992
46	Veterinärmedizinische Universität Wien	1	2.019
47	Veterinärmedizinische Universität Wien	1	1.103
48	Veterinärmedizinische Universität Wien	1	1.484
49	Veterinärmedizinische Universität Wien	1	596
50	Veterinärmedizinische Universität Wien	1	399
51	Veterinärmedizinische Universität Wien	1	856
52	Schwarzman Animal Medical Center	1	1.255
53	Schwarzman Animal Medical Center	1	769
54	Schwarzman Animal Medical Center	1	379
55	Schwarzman Animal Medical Center	1	659

WSI-ID	Labor/Universität	ROI	Anzahl der Annotationen
56	Schwarzman Animal Medical Center	1	942
57	Schwarzman Animal Medical Center	1	557
58	Schwarzman Animal Medical Center	1	810
59	Schwarzman Animal Medical Center	1	137
60	Schwarzman Animal Medical Center	1	531
61	Schwarzman Animal Medical Center	1	219
62	Schwarzman Animal Medical Center	1	522
63	Schwarzman Animal Medical Center	1	804
64	Schwarzman Animal Medical Center	1	844
65	Schwarzman Animal Medical Center	1	455
	Gesamtanzahl der Annotationen	86	41.145