

**Dissertation**

**Morphometrische Texturanalyse des Herzens und  
der Herzmuskelfasern**

eingereicht von

**DI(FH)**

**Bernhard Zach, MSc**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der Medizinischen Wissenschaft**

**(Dr. scient. med.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt am

**Institut für Biophysik**

unter der Anleitung von

**Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. rer. nat. Helmut Ahammer**

**2016**

# **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und abgefasst, und jene Personen und Institutionen, die am Zustandekommen der Forschungsdaten beteiligt waren, namentlich genannt habe. Andere als die angegebenen Quellen habe ich nicht verwendet und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit an der Dissertation und daraus entstandener Publikationen wurde gemäß den Regeln der „Good Scientific Practice“ durchgeführt.

Graz, am 30.7.2016

# **Danksagung**

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden! Sie mussten viel Zeit ohne mich verbringen.

Ich danke Ao. Univ. Prof. Dr. Helmut Ahammer, Ao. Univ. Prof. Dr. Ernst Hofer und Sen. Scientist Dr. Martin Asslaber für die Betreuung dieser Arbeit!

# Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung .....	i
Danksagung .....	ii
Inhaltsverzeichnis .....	iii
Abkürzungen .....	vii
Zusammenfassung .....	viii
Abstract.....	xi
1 Einleitung .....	1
1.1 Das Herz .....	1
1.1.1 Gewebe .....	1
1.1.2 Histologie und Funktion des Herzens.....	1
1.2 Visualisierung des Herzmuskelgewebes.....	10
1.2.1 Anforderungen.....	11
1.2.2 Histologie .....	11
1.2.3 Computertomographie, Mikrocomputertomographie.....	11
1.2.4 Kardiale Magnetresonanztomographie (Herz-MRI, CMR).....	12
1.2.5 Diffusionsgewichtete Magnetresonanztomographie (DW-MRI) .....	13
1.2.6 Echokardiographie.....	13
1.2.7 Weitere Methoden der Bilderzeugung und -aufnahme.....	14
1.2.8 Übersicht.....	14
1.3 Texturanalyse des Herzens .....	15
1.3.1 Textur .....	15
1.3.2 Texturanalyse.....	16
1.3.3 Morphometrie .....	16

1.4	Quantitative Parameter für die Texturbeschreibung und die Morphologie des Myokards .....	17
1.5	Fibrose und Faserorientierung: Stand der Forschung .....	19
1.5.1	Ansätze zur Bestimmung der Faserorientierung .....	20
2	Material und Methoden .....	23
2.1	Histologie .....	23
2.1.1	Auswahl des Gewebes, Einbettung, Fixierung .....	23
2.1.2	Auswahl der Färbemethoden .....	25
2.1.3	Digitalisierung .....	26
2.1.4	Auswahl der Färbemethode und der Gewebeproben .....	26
2.1.5	Bildverarbeitung .....	27
2.1.6	Ausgewertete morphometrische Eigenschaften des Gewebes .....	27
2.2	Bindegewebe: Bestimmung des Flächenanteils .....	28
2.3	Bindegewebe: Analyse des Fibrosetyps .....	30
2.3.1	Bildverarbeitung .....	30
2.3.2	Auswahl der Bildverarbeitungsmethode .....	31
2.4	Kardiomyozyten – Anzahl und Größe der Zellkerne .....	32
2.4.1	Bildvorverarbeitung für die automatische Bestimmung der Faserorientierung („Nucleus Based Orientation“ Methode) .....	32
2.4.2	Berechnung der Zellkerngröße .....	39
2.5	Bestimmung von Anzahl und Fläche der Kardiomyozyten .....	39
2.5.1	Bildvorverarbeitung .....	39
2.5.2	Berechnung der Anzahl an Kardiomyozyten im Bild .....	40
2.5.3	Validierung der Ergebnisse .....	42
2.6	Kardiomyozyten - Bestimmung des Flächenanteils .....	42
2.7	Faserorientierung .....	44
2.7.1	Methoden für die Bestimmung der Faserorientierung .....	44

2.7.2	„Nucleus Based Orientation“ (NBO) Methode zur Bestimmung der Faserorientierung.....	47
2.8	Validierung und Simulation.....	52
3	Ergebnisse .....	56
3.1	Histologie.....	56
3.2	Bindegewebe: Bestimmung des Flächenanteils.....	60
3.3	Bindegewebe: Analyse des Fibrosetyps .....	61
3.4	Kardiomyozyten – Anzahl und Abmessungen der Zellkerne.....	66
3.4.1	Algorithmus 1: Filterbasierte Identifikation der Kardiomyozytenzellkerne .	66
3.4.2	Algorithmus 2: Identifikation der Kardiomyozytenzellkerne basierend auf einer quantitativen Auswertung der Bildinformation.....	68
3.4.3	Auswertung der Segmentierung .....	69
3.4.4	Segmentierung der Zellkerne - Fazit .....	70
3.5	Bestimmung von Anzahl und Fläche der Kardiomyozyten.....	71
3.6	Kardiomyozyten- Bestimmung des Flächenanteils .....	72
3.7	Faserorientierung .....	73
3.7.1	Manuelle Vermessung im Referenzbild .....	75
3.7.2	Anwendung der Hesse Matrix auf das Referenzbild.....	77
3.7.3	Anwendung der Fourier-Transformation auf das Referenzbild .....	77
3.7.4	Bestimmung der lokalen Gradienten / lokal-dominanten Orientierungen im Referenzbild .....	78
3.7.5	Anwendung der co-occurrence matrix auf das Referenzbild .....	79
3.7.6	Anwendung eines „Structure Tensors“ auf das Referenzbild .....	80
3.7.7	Bestimmung der Faserorientierung im Referenzbild mit der „Nucleus Based Orientation“ Methode.....	81
3.8	Auswertung .....	91
4	Diskussion .....	93
	Literaturverzeichnis .....	97

Anhang ..... 104

# Abkürzungen

Aqua dest.	Destilliertes Wasser
CC	Creative Commons
CT	Computertomographie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DWI	Diffusion Weighted Imaging
FFT	Fast Fourier Transform
HE	Hämatoxylin-Eosin
HSB	HSB Farbraum (Hue, Saturation, Brightness)
MRI	Magnetic Resonance Imaging
MR(T)	Magnetresonanz(tomographie)
NBO	Nucleus Based Orientation
DTMR	Diffusions-Tensor-Magnetresonanztomographie
LGE	Late Gadolinium Enhancement
T	Tesla
TIFF	Tagged Image File Format
V.a.	Verdacht auf

# Zusammenfassung

## Hintergrund

Fraktionierte Elektrogramme finden in der kardialen Grundlagenforschung zunehmendes Interesse. Bei Myokard ist im fortgeschrittenen Lebensalter mit Diskontinuitäten bei der Erregungsausbreitung zu rechnen. Strukturänderungen lassen eine nur mehr stückweise kontinuierliche Ausbreitung von entkoppelten Erregungswellen erwarten. Die Depolarisationssignale sind als fraktionierte Elektrogramme mit multiplen Auslenkungen charakterisiert. Diese können zueinander Latenzen im Millisekundenbereich aufweisen und als fraktionierte Aktivierungswellen zueinander parallel, orthogonal oder sogar gegengleich gerichtet sein.

Am Institut für Biophysik der Medizinischen Universität Graz wurde eine Messtechnik entwickelt, mit der eine elektrische Charakterisierung der Makro- und Mikroerregungsausbreitung nach den oben angeführten Typen der Weiterleitungen vorgenommen werden kann. Mit dieser höchstauflösenden Messtechnik wird es darüber hinaus auch möglich sein, Diskontinuitäten der durch Fibrose verursachten Erregungsausbreitung zu detektieren. Um die räumlichen Erregungsmuster mit der zugrunde liegenden Histologie zu korrelieren, ist eine automatisierte morphometrische Analyse der unterschiedlichen Typen der Fibrose sowie die Orientierung der Kardiomyozyten erforderlich. Dies ermöglicht eine elektroanatomische Charakterisierung und Analyse des Gewebes.

Das menschliche Herz besitzt eine heterogene Struktur welche durch unterschiedliche Zelltypen und deren räumlicher Anordnung charakterisiert ist. Die physikalische Struktur bestimmt die elektrische Erregungsleitung und in weiterer Folge die makroskopische und mikroskopische Kontraktilität des Herzens. Die mikroskopische Charakterisierung des Herzgewebes gekoppelt mit der Analyse der elektrischen Erregungsleitung lassen Rückschlüsse auf die Auswirkung anatomischer Veränderungen auf die Funktion des Herzens zu. Moderne Bildverarbeitungsmethoden und Parameter wie zum Beispiel Energie, Standardabweichung und Schiefe dienen dazu die Textur eines Bildes zu beschreiben. Die Beschreibung der Textur ist in den meisten Fällen jedoch nicht zufriedenstellend, da die Nachbarschaft der Objekte meist unberücksichtigt bleibt.

## **Ziele**

In dieser Arbeit soll eine strukturelle und mikroanatomische Charakterisierung des Herzgewebes ausgearbeitet werden. Ein Vergleich aller relevanten Bilderzeugungs- und Bildverarbeitungsverfahren soll durchgeführt werden um die Möglichkeiten, Vorteile und Nachteile dieser Technologien aufzeigen.

Quantitative Parameter für die Identifizierung der Texturen vor allem im Hinblick auf die automatische Identifizierung der Faserorientierung der Kardiomyozyten und dem Anteil an Bindegewebe und des vorliegenden Bindegewebs-Typs sollen erarbeitet werden.

## **Methoden**

Die Beurteilung der Eignung gängiger Modalitäten und Verfahren, welche in der Lage sind, das menschliche Herz zu visualisieren und morphometrische Charakteristika zu identifizieren erfolgte per Literaturstudium und praktischer Versuche. Histologische Schnitte wurden am Institut für Pathologie der Medizinischen Universität Graz erstellt um die für die Zielerreichung erforderlichen Merkmale des Gewebes bestmöglich darzustellen. Die Bilder wurden am Zentrum für medizinische Grundlagenforschung (ZMF) in Graz digitalisiert. In einem weiteren Schritt erfolgte die Auswahl der Färbemethode sowie die Bestimmung der am besten für die Analyse geeigneten morphometrischen Merkmale des Gewebes sowie die Entwicklung von Algorithmen zur automatischen Quantifizierung der Eigenschaften des Gewebes. Aus den zuvor digitalisierten Bildern wurden stichprobenartig Ausschnitte ausgewählt und der automatischen Bildverarbeitung zugeführt. Für die Bildverarbeitungsschritte wurde die Software Fiji verwendet. Um die Ergebnisse der automatisch bestimmten Faserorientierung zu validieren wurde eine Simulation modelliert, mithilfe derer es möglich ist anhand bestimmter Parameter wie Winkel und Zellkerngröße Myokardgewebe zu generieren. Die vorgestellte Methode zur Segmentierung und Berechnung der Faserorientierung der Zellkerne wird als „Nucleus Based Orientation“ (NBO) Methode bezeichnet.

## **Resultate**

Die Evaluierung unterschiedlichster Bilderzeugungsverfahren zeigte, dass es durchaus interessante Ansätze für die Generierung des verwendbaren Bildmaterials gibt, die

histologischen Schnitte aber diesen Methoden in Auflösung, Kontrast und Artefaktanfälligkeit überlegen sind.

Experimente mit bekannten Bildverarbeitungsmethoden wie die Fourier-Transformation, lokale Gradienten oder Grauwertabhängigkeitsmatrix zeigten, dass eine Charakterisierung des Gewebes vor allem im Hinblick auf die Faserorientierung mit teilweise kleineren Modifikationen in zweidimensionaler Richtung und für das Gesamtbild möglich ist. Die Beurteilung der angefertigten histologischen Schnitte zeigte im Hinblick auf die Identifizierung der für die automatische Bildverarbeitung geeigneten Gewebestandteile bei der Trichrome Färbung (nach Gieson) und bei der Piko-Siriusrot-Färbung die besten Resultate wobei sich der Zellkern als geeignetstes Element für die Detektion der Faserorientierung und die „grey level co-occurrence matrix“ (GLCM) als geeignetes Verfahren für die Bestimmung des Fibrosetyps erwies. Die gewählten Verfahren zur Visualisierung und die Algorithmen zur automatischen Detektion der charakteristischen Merkmale erwiesen sich nach manueller Validierung als sehr effektiv. Neben der Segmentierung der Zellkerne und der zweidimensionalen Faserorientierung ist es auch gelungen, einen Eindruck über die Faserorientierung im dreidimensionalen Raum zu erhalten. Darüber hinaus ist es gelungen weitere morphometrische Merkmale des Gewebes wie die Anzahl an Kardiomyozyten oder die durchschnittliche Fläche der Kardiomyozyten-Zellkerne zu bestimmen.

Die Ergebnisse der Bildverarbeitung, Zellkern, Faserorientierung in zwei- und dreidimensionaler Richtung und Bindegewebe wurden durch Überlagerung mit dem Originalbild visualisiert und für den Betrachter übersichtlich dargestellt. Die Ergebnisse wurden in eine Textdatei exportiert und somit für die weitere Bearbeitung verfügbar gemacht.

# **Abstract**

## **Background**

The human heart has a heterogeneous structure, which is characterized by different cell-types and their spatial configuration. The physical structure determines the electric excitation and in further consequence the contractility in macroscopic as well as in microscopic area. Modern image processing methods and parameters like energy, standard deviation, skewness, etc. could be used to describe the image content and image texture. The description of the texture is in almost all cases not satisfying because the neighbourhood in the objects remain unconsidered. The characterization of the texture and particularly the determination of the orientation of the tissue at a certain position would allow an electro-anatomical correlation. In further consequence, it would be possible to conclude how changes in the microscopic anatomy affect the stimulus conduction of cardiac tissue.

## **Aims**

A structural characterization of heart tissue should be worked out and evaluated with digital image processing methods.

A comparison of imaging methods should give indication of possibilities, advantages and disadvantages occurring with different types of imaging modalities.

Quantitative parameters for identification of textures of different complexity and pathological attributes inside the heart should be determined. A focus should be set on a quantitative automatic characterization of heart tissue concerning the orientation of myocytes and the cellular interstice.

## **Methods**

The evaluation of common modalities and algorithms, which are able to visualize the human heart and identify morphometric characteristics, was performed by literature studies and experiments. Histological slices have been produced at the Institute of Pathology of the Medical University of Graz to identify all relevant features of the tissue. The slices were digitalized at the Zentrum für medizinische Grundlagenforschung (ZMF) in Graz. In a

further step, the staining methods were evaluated and the most significant features of the tissue were chosen as input for automatic image processing.

Five random images from the digitalized slices were taken for evaluating automatic image processing methods and developing new algorithms for segmentation and identifying the fibre direction. Those results were compared to known image processing methods. For image processing, the software Fiji was used. For validating the accuracy of the fibre direction a simulation was created, which allows to generate cardiac tissue based on the parameters angle and dimensions of the cardiac nuclei. The proposed method for an automatic determination of the fibre orientation in this study is named “Nucleus Based Orientation” (NBO) method.

## **Results**

Evaluation of different modalities showed that for a valid characterisation on a microscopic level histology still shows best results for resolution, contrast and low artifacts. Common image processing methods like Fourier transformation, local gradients or the grey level co-occurrence matrix (GLCM) showed that a texture analysis of heart tissue can be performed with some slight modifications, but unfortunately, those methods only consider the global aspects of an image and cannot determine if a cardiomyocyte is present and in which direction it is aligned.

Histological staining showed best results with Trichrome (Gieson) and Picrosirius Red. By performing a morphometric study manually, the nucleus was identified as the best element for detecting the fibre orientation. The grey level co-occurrence matrix was identified as a good approach to identify the type of fibrosis.

By developing new algorithms for segmenting and detecting nuclei it was not only possible to identify a high number of nuclei and the two-dimensional fibre orientation but also to give an idea about the three-dimensional orientation of the fibre. In addition to this, other characteristics of the tissue like the average area of the cardiomyocyte nuclei or the amount of cardiomyocytes in the image could have been identified.

# 1 Einleitung

Das menschliche Herz besteht aus sehr heterogenem Gewebe, welches durch unterschiedliche Zelltypen und eine sehr komplexe Faserstruktur charakterisiert ist. Für die Charakterisierung des Gewebes und Ansätzen für die Analyse der Gewebetextur ist es erforderlich die einzelnen Bestandteile des Gewebes bestmöglich zu identifizieren und deren Eigenschaften in Größe und Form zu quantifizieren sowie die räumliche Struktur darzustellen.

## 1.1 Das Herz

Das Herz des Menschen hat ungefähr die Größe einer Faust und wiegt in etwa 300 Gramm. Seine Funktion ist die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen und der Abtransport von Stoffwechselprodukten.

### 1.1.1 Gewebe

Das Herz weist einen dreischichtigen Wandaufbau auf, diese Schichten sind

- das Endokard,
- das Myokard und
- das Epikard.

Während die Aufgabe des Endokard und des Epikards vor allem darin besteht, für eine glatte Oberfläche bzw. für ein reibungsfreies Gleiten zu sorgen, ist das Myokard für die mechanische Herztätigkeit verantwortlich. In dieser Arbeit liegt der Fokus in der Charakterisierung des Myokards, da in diesem Gewebe die elektrische Erregungsleitung stattfindet und sich darin die dafür verantwortliche mikroanatomische Struktur befindet.

### 1.1.2 Histologie und Funktion des Herzens

Das Myokard ist eine Sonderform der quergestreiften Muskulatur und besteht aus einer äußeren Längsmuskelschicht, einer mittleren Ringmuskelschicht und einer inneren Längsmuskelschicht. Die Kardiomyozyten bilden funktionell ein sogenanntes „Synzytium“ (Siew 2009, S4). Dieser Begriff bezeichnet Zellkomplexe, welche durch Zusammenschluss

einen charakteristischen Gewebetyp bilden. Die Muskelzellen sind durch sogenannte „Glanzstreifen“ miteinander verbunden. In diesen Glanzstreifen sind sogenannte „Gap Junctions“ vorhanden, welche die benachbarten Zellen miteinander verbinden und eine Erregungsausbreitung ermöglichen.

In der nachfolgenden Abbildung 1 sind longitudinal und transversal geschnittene Herzmuskelzellen und zahlreiche andere Gewebebestandteile wie Kapillargefäße und Bindegewebe abgebildet.

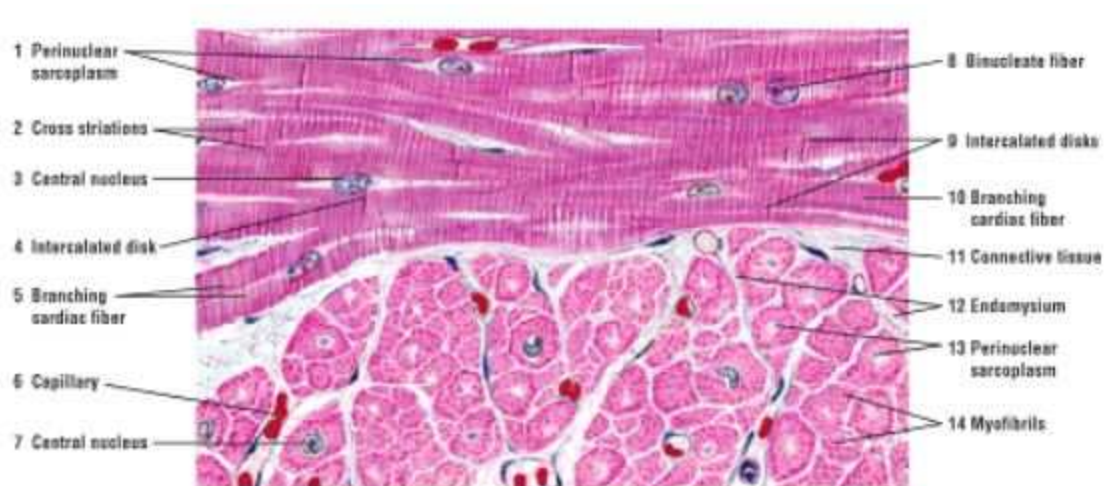


Abbildung 1: Longitudinaler und transversaler Schnitt durch Herzmuskelgewebe. Es ist offensichtlich, dass die Herzmuskelzellen abhängig vom Faserverlauf ein unterschiedliches Erscheinungsbild aufweisen (Eroschenko 2012, S157, Abbildung 8.8, mit Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Lizenznummer: 3938320584844).

Der größte Massenanteil des Herzens wird von Kardiomyozyten gebildet. Um die Blutversorgung und die mechanische Stabilität zu gewährleisten, finden sich auch andere Zelltypen wie Fibrozyten, welche das strukturegebende Herzskelett bilden, und alle Zellen, die für den Aufbau von Kapillaren, Arterien und Venen verantwortlich sind (Thomas 1998, S103f).

Die folgenden Gewebetypen in Tabelle 1 bilden zusammen das Myokard.

Tabelle 1: Tabellarische Auflistung der häufigsten Zelltypen im Myokard (Camelliti et al. 2004, S40; Genova 2007).

Zelltyp/Gewebetyp	Anteil (Volumen)
-------------------	------------------

Kardiomyozyten	Ca. 75%
Bindegewebe	Ca. 15%
Blutgefäße	Ca. 10%

### **1.1.2.1 Kardiomyozyten**

Das menschliche Herz besteht aus mehreren Milliarden Herzmuskelzellen, welche über Verzweigungsbrücken zusammenhängen. Die Muskelfasern sind über sogenannte Glanzstreifen miteinander verbunden und dadurch elektrisch und mechanisch gekoppelt. Die Muskelzellen bestehen aus langgestreckten Fasern mit zentralem Kern und quergestreiftem Zytoplasma (Thomas, Carlos, S103).

Kardiomyozyten sind nach Auswertung der Literatur zylinderförmig (Tracy 2011) und ca.

- 50 µm – 150 µm lang (Kühnel 2014, S172 u.a.) und
- 10 µm – 35 µm dick bzw.
- im Vorhof ca. 10 µm – 20 µm lang und ca.
- 5 µm dick (Nakano 2012)
- wobei sich generell ein Größenverhältnis (Breite/Länge) von ca. 1/5 ergibt, welches eine ideale intrazelluläre elektrische Konduktion gewährleistet (Lewalter, Lüderitz 2010)

Die Zellen im linken Ventrikel sind etwas dicker als im rechten Ventrikel.

Der langgestreckte Zellkern ist linsenförmig und hat eine ungefähre

- Länge von 15 µm und eine
- Breite von ca. 4 µm - 5 µm.

Der Zellkern ist üblicherweise zentral lokalisiert und verläuft in seiner Längsachse parallel zu den Myofibrillen. Die Gestalt ist abhängig vom Kontraktionszustand der Zelle (Beyersdorf 1983, S57). Bei gewissen pathologischen Prozessen kann sich der Zellkern in seiner Form verändern, beispielsweise ist bei Hypertrophie der Zellkern sich in seiner Form verändert und erscheint polymorph (Thomas 1998, S104).

Die Kardiomyozyten, vor allem aber die Zellkerne besitzen annähernd die Form eines Kreiszyinders. Dies wurde auch in eigenen Beobachtungen von aneinander liegenden histologischen Schnitten beobachtet. In der Literatur wird v.a. in Modellen oder z.B. für

die Volumenberechnung ebenfalls von der Form eines Kreiszylinders ausgegangen. Daher wird den in dieser Arbeit enthaltenen morphometrischen Betrachtungen die Annahme zugrunde gelegt, dass es sich bei der Form des Zellkerns der Herzmuskelzellen um einen Kreiszylinder handelt (Tracy 2011).

Die überwiegende Mehrzahl der Zellen ist einkernig, es kommen jedoch auch zwei und in äußerst selten drei und vierkernige Zellen vor. Charakteristisch für die Herzmuskelzellen ist die Querstreifung, welche durch die längs durch die Zelle verlaufenden Myofibrillen bedingt ist.

Im Längsschnitt ergibt sich ein ungefähre Flächenanteil des Zellkerns von 5%, im Querschnitt erhöht sich dieser Anteil. Die Erscheinungsform des Zellkerns innerhalb eines Kardiomyozyten abhängig vom Schnittwinkel ist in Abbildung 2 dargestellt.

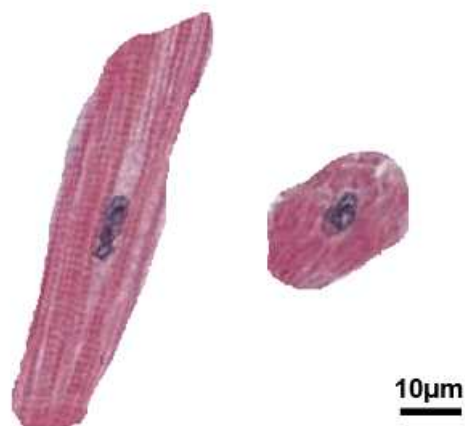


Abbildung 2: Der Flächenanteil und die Form des Zellkerns eines Kardiomyozyten sind abhängig vom Schnittwinkel durch den Kardiomyozyt. Links ist ein Längsschnitt durch die Zelle, rechts ein Querschnitt dargestellt.

Eine Darstellung eines histologischen Schnittes durch ein Hasenherz findet sich nachfolgend in Abbildung 3.

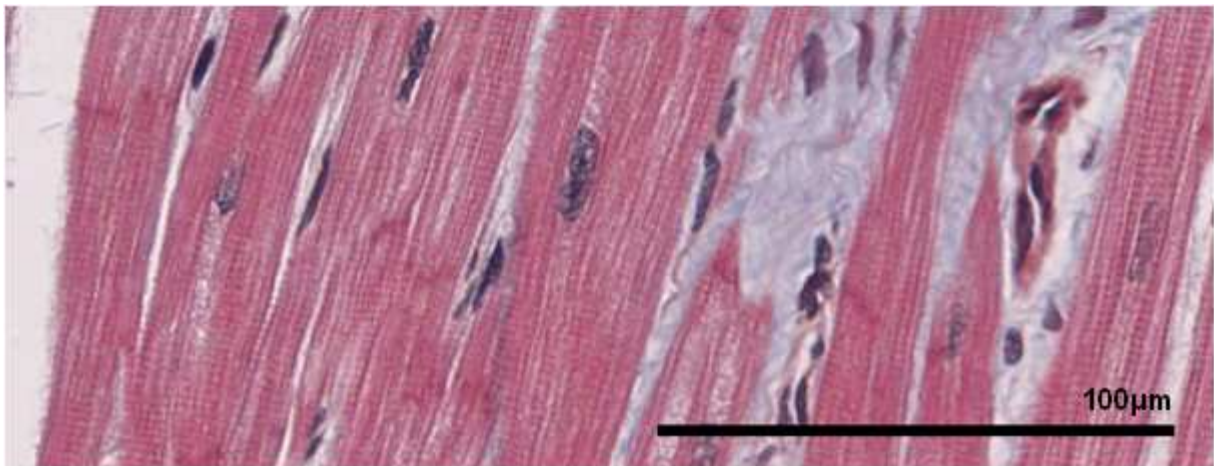


Abbildung 3: Darstellung der Kardiomyozyten inklusive Zellkerne und Bindegewebe in Trichrome Färbung (nach Gieson). Anfertigt am Institut für Pathologie der Medizinischen Universität Graz. Klar zu erkennen sind die Kardiomyozyten (rosa), die Zellkerne der Kardiomyozyten, der Fibrozyten und des Endothels (dunkelblau) sowie das Bindegewebe (hellblau).

#### **1.1.2.2 Bindegewebe**

Das Bindegewebe des Herzens, auch kardiales Stroma genannt bildet den wesentlichen Bestandteil des „Herzskeletts“ welches dem Organ eine Struktur verleiht und essentiell für die mechanische Herzaktion ist.

Der Anteil des Bindegewebes am Volumen beträgt nur etwa ein Fünftel des Anteils an Kardiomyozyten, jedoch überwiegt die Anzahl an Fibrozyten gegenüber den Kardiomyozyten. Bei ca. 90% der Zellen, welche nicht Kardiomyozyten sind, handelt es sich um Fibrozyten (Agocha, Eghbali-Webb 1997).

#### **1.1.2.3 Fibrose**

Unter Fibrose versteht man die krankhafte Vermehrung des Bindegewebes die zu einer Verhärtung des Gewebes führt. Hauptbestandteil des zur Verminderung der Organfunktion beitragenden Bindegewebes sind Kollagenfasern.

Der Anteil an fibrotischem Gewebe im gesunden Herz beträgt ca. 1-5%. Durch Alterung, Myokardinfarkt, Kardiomyopathie und andere Herzerkrankungen kann dieser Anteil auf bis zu 40% steigen. Dadurch wird das Herz steifer, die Verschlechterung der biomechanischen Eigenschaften führt zu einer verminderten Pumpleistung und es können

Rhythmusstörungen entstehen, da in der Erregungsleitung Blockaden entstehen (De Jong et al. 2011).

Bezogen auf die Pathophysiologie gibt es folgende Typen der Fibrose:

- **Reaktive interstitielle Fibrose:** Dieser Typ der Fibrose wird im alternden Herz aber vor allem bei Hypertonikern und Patienten mit Diabetes Mellitus beobachtet und ist verursacht durch eine Steigerung der Kollagensynthese der Myofibroblasten unter verschiedenen Einflüssen. Diese Art der Fibrose ist durch gewisse Therapien reversibel, daher ist die Identifikation und Behandlung dieser Patienten von großer Bedeutung (Mewton et al. 2011, S892).
- **Infiltrative interstitielle Fibrose:** Es kommt zur fortschreitenden Ablagerung von Proteinen oder Glykosphingolipiden im kardialen Interstitium (Mewton et al. 2011, S893).
- **Narbenbildende Fibrose:** In diesem Stadium werden zerstörte oder nekrotische Kardiomyozyten zu Typ I Kollagen. Die Narbenbildung kann lokal oder diffus auftreten, je nach zugrundeliegender Ätiologie (Mewton et al. 2011, S893).

Reaktive und infiltrative interstitielle Fibrose führen in einem späteren Krankheitsstadium zur Narbenbildung im Herzen.

In Bezug auf die Verbreitung und die damit einhergehende Textur lassen sich folgende Fibrosetypen unterscheiden:

- **Interstitielle Fibrose („interstitial“)**  
Bei diesem Fibrosetyp findet sich das Bindegewebe zwischen den Muskelfasern. Das Myokard ist mit dünnen, langgezogenen Streifen an fibrotischem Gewebe durchzogen, welche die Kardiomyozyten voneinander trennen. Die Erregungsleitung bleibt in longitudinaler Richtung ungestört, während die transversale Erregungsleitung gestört ist (De Jong 2011, S4). In Abbildung 4 findet sich eine entsprechende Darstellung der interstitiellen Fibrose.

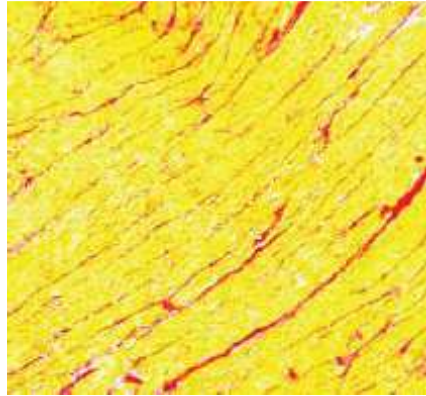


Abbildung 4: Interstitielle Fibrose. Gelb visualisiert ist das Herzmuskelgewebe, rot erscheint das Bindegewebe (De Jong 2011, S20, Abbildung 1, mit Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Lizenznummer: 3938090650115).

- **Kompakte Fibrose („compact“)**

Im Herzgewebe treten größere Areale auf, welche homogen fibrosiert sind. Dies ist in Abbildung 5 sehr gut erkennbar. Myokard ist in diesen Arealen nicht mehr vorhanden. In Bezug auf Arrhythmien ist dieser Fibrosetyp eher nicht relevant, sogenannte „reentries“ treten nur kreisend um das fibrotische Areal auf (De Jong 2011, S4).

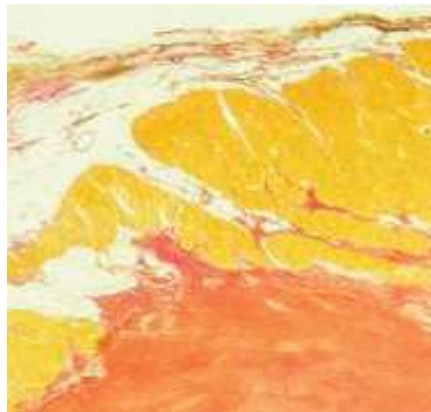


Abbildung 5: Kompakte Fibrose, gut zu erkennen ist das kompakte Areal mit fibrotischem Gewebe im unteren Bildbereich (De Jong 2011, S20, Abbildung 1, mit Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Lizenznummer: 3938090650115).

- **Diffuse Fibrose („diffuse“)**

Diffuse Fibrose zeigt sich durch wiederkehrende, kurze Streifen und Flecken an eingelagerter Fibrose, wie in Abbildung 6 erkennbar ist. Dieser Fibrosetyp

beeinträchtigt die Erregungsleitung, bei gleichem prozentualem Anteil wie bei fleckiger Fibrose, jedoch in geringerem Ausmaß (De Jong 2011, S4).

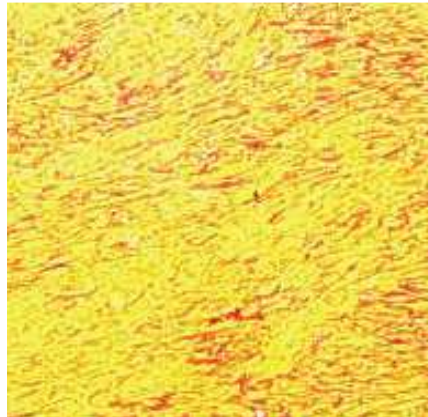


Abbildung 6: Diffuse Fibrose, die fibrotischen Areale finden sich im gesamten Gewebe (De Jong 2011, S20, Abbildung 1, mit Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Lizenznummer: 3938090650115).

- **Uneinheitlich / fleckige Fibrose („patchy“)**

Diese Art der Fibrose, dargestellt in Abbildung 7 ist gekennzeichnet von Gebieten, in denen sich Kollagenfasern und Bündel von Herzmuskeln abwechseln. Die Kollagenfasern treten in langen Strängen auf. Fleckige Fibrose ist am anfälligsten für Arrhythmien (De Jong 2011, S4).

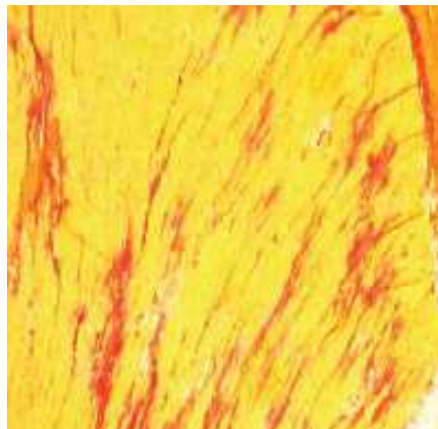


Abbildung 7: Diffuse Fibrose. Die Einlagerungen verlaufen teilweise parallel zu den Kardiomyozyten (De Jong 2011, S20, Abbildung 1, mit Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Lizenznummer: 3938090650115).

#### **1.1.2.4 Weitere Zelltypen im gesunden oder kranken Herzen**

Neben den genannten Zell- und Gewebetypen gibt es im Herzen noch zahlreiche weitere Bestandteile, welche zur Mechanik und zur Physiologie des Organs beitragen (Thomas, Carlos S105ff).

Das sind beispielsweise:

- Sehnen
- Subepikardiales Fettgewebe (normal nur über Vorderwand des rechten Ventrikels und in den Kranzfurchen)
- Fettzellen
- Reizleitungssystem (Erregerknoten, Bündel)
- Purkinje-Fasern

Im erkrankten Herzen finden sich zudem einige weitere Zelltypen:

- Lipofuszin (Atrophie)
- Granulozyten (Infarkt)
- Fettzellen (Infarkt)
- Makrophagen (Infarkt, Myokarditis)
- Histozyten (Infarkt)
- Lymphozyten (v.a. Myokarditis)
- Kokken, Eiterzellen (bakterielle Myokarditis)

In Summe zeigt sich, dass das Herzmuskelgewebe ein sehr heterogenes Gewebe ist, dessen Gewebebestandteile in Abhängigkeit von physiologischen und pathologischen Prozessen unterschiedlichste Erscheinungsformen in Größe und Form aufweisen können. Diese heterogenen Bildstrukturen sind für die Bildverarbeitung eine große Herausforderung, da die Strukturen weder in ihrer Morphologie noch in ihrer Orientierung eine durchgängige Regelmäßigkeit zeigen.

Um die räumlichen Erregungsmuster mit der zugrunde liegenden, komplexen, heterogenen Histologie zu korrelieren, ist eine automatisierte morphometrische Analyse der

unterschiedlichen Typen der Fibrose erforderlich. Dies ermöglicht eine elektroanatomische Charakterisierung und Analyse des Gewebes. Vorrangige Zielsetzung ist:

- Eine möglichst genaue strukturelle und automatische Charakterisierung des Herzgewebes mittels digitaler Bildverarbeitung.
- Vergleich der Texturanalyse histologischer Schnittbilder mit Bildern anderer Modalitäten um Aufschluss über die Möglichkeiten bzw. über die jeweiligen Vor- und Nachteile zu erhalten.
- Erarbeitung und Evaluierung quantitativer Parameter zur Erkennung unterschiedlich komplexer Texturen oder pathologischer Eigenschaften innerhalb des Herzens.
- Die quantitative, automatisierte Charakterisierung des Herzmuskelgewebes in Bezug auf die Richtung der Herzmuskelfasern und der Zellzwischenräume (Fibrose).

## **1.2 Visualisierung des Herzmuskelgewebes**

Das menschliche Herz ist ein biologisches System. Die Systemforschung kombiniert laut Kohl, folgende Schritte:

- 1.) Die Identifikation,
- 2.) die detaillierte Charakterisierung der Teile,
- 3.) die Erforschung der Interaktionen untereinander und
- 4.) mit der Umwelt um
- 5.) ein systematisches Verständnis der Einheit mit ihren Effekten auf die Punkte 1-4 zu entwickeln. (Kohl, Noble 2009)

Aus diesem systemischen Ansatz heraus ergibt sich in dieser Arbeit die Notwendigkeit die Schritte 1 und 2 in der größtmöglichen Qualität als Basis für die Schritte 3-5 zu erarbeiten. Dies beinhaltet die Identifikation der Gewebebestandteile sowie die Charakterisierung der einzelnen mikroanatomischen Strukturen in der besten Qualität, sowohl in Bezug auf die Bilderzeugung, als auch in Bezug auf die Anforderungen an den Algorithmus für die automatische Bildverarbeitung.

### **1.2.1 Anforderungen**

Die Anforderungen, welche an die Bilder gestellt werden, sind im Wesentlichen nach der Priorität gereiht:

- Eine hohe Auflösung, um die Zellen inklusive des Zellkerns möglichst detailliert darstellen zu können.
- Ein hoher Kontrast um Mikrostrukturen voneinander abgrenzen zu können.
- Möglichst wenig Artefakte, um eine durchgängige, automatisierte Analyse des Gewebes zu ermöglichen.

### **1.2.2 Histologie**

Es gibt einige histologische Färbungen, welche in der Lage sind die gewünschten Strukturen in ausreichender Qualität darzustellen. Die Schnitte können mittels hochauflösenden Scannern digitalisiert werden. Mit dem Scanner des Zentrums für Medizinische Grundlagenforschung der Medizinischen Universität Graz kann beispielsweise eine Auflösung von ca. 3 Pixel pro  $\mu\text{m}$ , also ca.  $0,3 \mu\text{m}$  erreicht werden. Die Histologie liefert gute Ergebnisse bei der Identifizierung von Zellkern, Kardiomyozyten und interzellulärem Gewebe. Zellgrenzen könnten mit immunhistochemischen Verfahren identifiziert werden, der große Nachteil dieser Methoden ist jedoch die Anfälligkeit für Artefakte, welche durch die notwendige Einbettung in Paraffin bedingt ist. Die Schnittdicke bei Einbettung mit Paraffin beträgt standardmäßig ca.  $2-4 \mu\text{m}$ . Eine Einbettung in Acrylat kann die Artefaktanfälligkeit vermindern.

Färbungen mit Antimyomesin (Myozyten), Anti Vimentin (Fibroblasten) und 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) können für die bessere Unterscheidung zwischen Kardiomyozyten und Fibroblasten verwendet werden, sind jedoch weitaus aufwendiger und für die Routine weniger geeignet (Camelitini et al. 2004).

### **1.2.3 Computertomographie, Mikrocomputertomographie**

Auflösungen von  $3-10 \mu\text{m}$  sind derzeit Standard bei Computertomographien (CT). Mikrocomputertomographiegeräte sind hochauflösende Systeme welche neben der Anwendung an Tieren oder humanen Präparaten auch beispielsweise in der Werkstoffprüfung Anwendung finden und erreichen Auflösungen von bis zu  $0,25 \mu\text{m}$

(Betz et al. 2007). Allerdings ist die Auflösung von der Probengröße abhängig. Je kleiner der Objektausschnitt desto mehr Einzelaufnahmen sind innerhalb einer 180°-Rotation der Gantry möglich. Ein entscheidender Nachteil gegenüber histologischen Methoden ist jedoch der geringe Weichteilkontrast, dadurch erscheinen diese Verfahren der Bilderzeugung für den Zweck dieser Arbeit ungeeignet.

#### **1.2.4 Kardiale Magnetresonanztomographie (Herz-MRI, CMR)**

Die Magnetresonanztomographie (MRT) des Herzens dient vor allem der Funktionsbeurteilung des Herzmuskels und der Beurteilung der Morphologie. Die makroskopische Darstellung von fibrotischen Arealen ist mit diesem nichtinvasiven Verfahren möglich.

Die Frage nach der erzielbaren räumlichen Auflösung des Magnetresonanztomographen ist nicht so einfach zu beantworten, da sie von vielen Parametern abhängt, z. B. wie lange die Messzeit sein darf oder ob sich das Objekt bewegt. In den derzeit weit verbreiteten 1,5 Tesla und 3 Tesla Systemen kommt man aber derzeit nicht in den Bereich der einzelnen Zelle. Bei 7 Tesla können Auflösungen von  $100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$  bei Messzeiten von 25 Minuten erreicht werden.

Die Auflösung ist bei klinischen Standardsystemen durch die begrenzte Feldstärke auf etwa einen Millimeter begrenzt. In speziellen Forschungsbereichen können räumliche Auflösungen von unter  $20 \mu\text{m}$  erreicht werden. Ein Beispiel eines hochaufgelösten MRT Bildes ist in Abbildung 8 dargestellt. Das Bild wurde mit einem 1,5 Tesla MRT ex vivo angefertigt, eine Identifizierung von Kardiomyozyten oder Zellkernen ist nicht möglich.

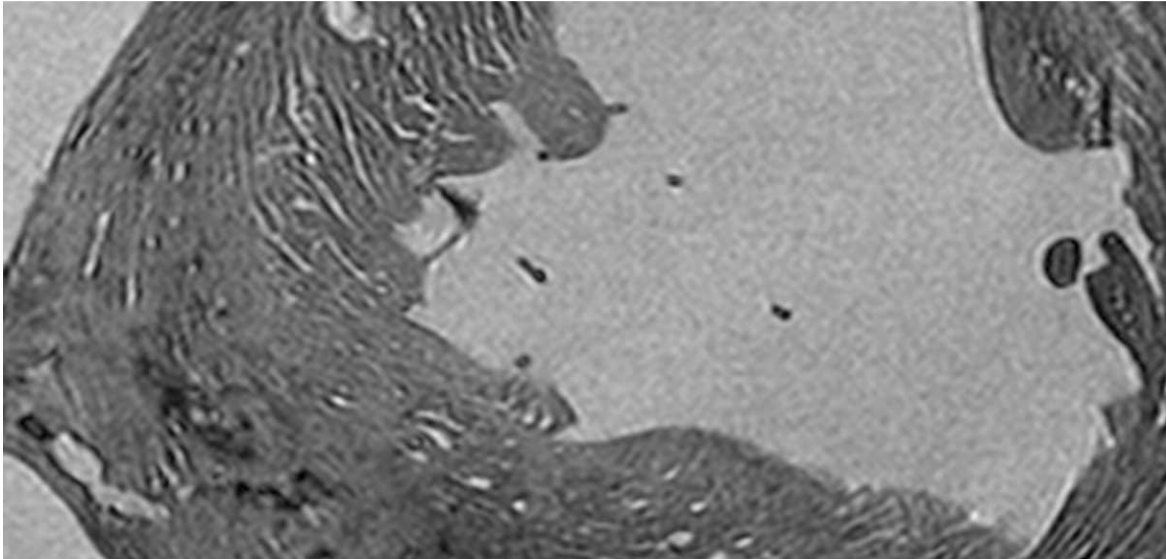


Abbildung 8: MRT eines Hasenherzens, aufgenommen ex vivo mit 1,5 Tesla. Das Bild wurde 3-fach vergrößert, eine makroskopische Geweborientierung kann an manchen Stellen angenähert werden, eine mikroskopische Identifizierung der Faserorientierung inklusive Detektion einzelner Zellen oder Zellkerne ist nicht möglich (Plank et al., 2009).

### **1.2.5 Diffusionsgewichtete Magnetresonanztomographie (DW-MRI)**

Diffusions-Magnetresonanztomographie ist ein bildgebendes Verfahren. Es misst mithilfe der MRT die Diffusionsbewegung der Wassermoleküle im Gewebe. Dieses Verfahren ist vor allem zur Detektion der Nervenfasern geeignet und wird vor allem für die Bildgebung des Gehirns angewendet. Die Auflösung ist geringer als bei der Standard-MRT. Mithilfe dieser Diffusionsmessungen können jedoch auch Faserstrukturen im Myokard dargestellt werden. Einige diesbezügliche Forschungsarbeiten wurden beispielsweise durch die Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) Zürich in Kooperation mit der Firma Philips durchgeführt (Gamper et al. 2007, Stoeck et al. 2012, Toussaint et al. 2010). Die Faserstrukturen werden nur auf makroskopischer Ebene visualisiert, einzelne Fasern oder Bindegewebe zwischen Fasern oder Faserbündeln können nicht identifiziert werden (Stoeck et al. 2012).

### **1.2.6 Echokardiographie**

Ultraschall erreicht, abhängig von der Sendefrequenz bzw. der Eindringtiefe eine Bildauflösung von ca. 0,25 mm (Michels 2012, S4). Es zeigt sich zudem ein sehr schlechter Kontrast, wodurch diese Modalität für die gewünschten Zwecke nicht relevant

ist. Mithilfe der Doppler Echokardiographie lassen sich zumindest die funktionellen Konsequenzen der Myokardfibrose bestimmen (Mewton et al. 2011, S900).

### **1.2.7 Weitere Methoden der Bilderzeugung und -aufnahme**

Es sind zahlreiche weitere Methoden verfügbar um Strukturen im Gewebe zu visualisieren. Vor allem die Mikroskopie ermöglicht es, Gewebeproben hochauflösend darzustellen und mittels unterschiedlicher Verfahren Strukturen im Gewebe zu visualisieren. Diese Methoden sind meist mit hohem manuellen Aufwand sowie hohen Kosten verbunden und eignen sich nicht für eine quantitative, automatisierte Analyse der Massendaten. Qualitative Fragestellungen einzelner Zellen stehen eher im Fokus dieser Methoden.

Nachfolgend eine Auflistung derartiger Visualisierungsverfahren:

- Thermal Lens Microscopy (TLM)
- (Quantitative) Polarized Light Microscopy ((Q)PLM)
- Small Angle Light Scattering (SALS)
- Fluorescence Microscopy (FM)
- (Confocal) Laser Scanning Microscopy ((C)LSM)
- Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM)
- Second Harmonic Generation Microscopy (SHG)
- Laser-Ultraschall
- Positronen-Emissions-Tomographie (Gewebedurchblutung zur Fibrosebestimmung) (Daniels 2006, Elbischger 2005).

### **1.2.8 Übersicht**

Für diese Arbeit sind vor allem die hochauflösende Darstellung von Zellstrukturen der Kardiomyozyten und die Visualisierung des fibrotischen Gewebes von großem Interesse. Nur durch eine genaue Analyse und Charakterisierung der Gewebe- und Zellbestandteile können Ansätze für die Texturanalyse bzw. die Identifizierung von Strukturen erfolgen, die eine Aussage über die Faserorientierung zulassen. Die kleinsten Strukturen erreichen eine Größe von nur wenigen Mikrometern, daher ist eine Auflösung von  $<1\mu\text{m}$  und ein hoher Weichteilkontrast erforderlich. Mit Ausnahme der Mikrocomputertomographie (Auflösung  $\sim 0,25\ \mu\text{m}$ ) findet sich keine Bildverarbeitungsmethode für die geeignete Darstellung der nötigen Bildinformation. Allerdings spielt der Kontrast eine wesentliche Rolle um

Zellstrukturen identifizieren zu können, weshalb auch die Mikrocomputertomographie für die Anforderungen ungeeignet ist. Nachfolgend beschreibt Tabelle 2 jene Eigenschaften, welche die beschriebenen Verfahren in Bezug auf Auflösung, Kontrast und Artefaktanfälligkeit auflistet.

Tabelle 2: Tabellarische Auflistung der Eigenschaften von verschiedenen Bilderzeugungsmethoden. Für den Zweck dieser Arbeit sollten die Auflösung und der Kontrast hoch und die Artefakte niedrig sein. Die Einteilung erfolgt folgendermaßen: +++ = ausgezeichnet, ++ = sehr gut, + = gut, - = schlecht, -- = sehr schlecht.

	<b>MRT, DTMR</b>	<b>CT, Mikro-CT</b>	<b>Echo- kardiographie</b>	<b>Histologie</b>
Auflösung	-	++	--	+++
Kontrast	+	--	--	+++
Vermeidung von Artefakten	+	+	--	Acrylat: ++ Paraffin: -

Als derzeit geeignete Methode der Wahl hat sich nach intensiver Recherche nur die Histologie erwiesen.

## **1.3 Texturanalyse des Herzens**

### **1.3.1 Textur**

Es existiert keine allgemeingültige Definition des Begriffs „Textur“, im Allgemeinen wird unter diesem Begriff eine „zweidimensional ausgeprägte Oberflächenstruktur mit einer gewissen deterministischen oder statistischen Regelmäßigkeit“ verstanden (Bauer 2007). Eine andere Definition aus Jähne 1989 bezeichnet die Textur folgendermaßen: "Die Strukturierung des Grauwerts wird allgemein als "Textur" bezeichnet. Texturen sind gerade dadurch gekennzeichnet, dass es nicht leicht ist, sie mit einem einfachen Merkmal zu charakterisieren, obwohl wir sie mit unserem visuellen System leicht erfassen und unterscheiden können" (Jähne 1989, zit. nach Voss & Süße 1991).

Das Myokard weist nach dieser Definition zweifellos Texturcharakter auf, welches mithilfe moderner Bildgebungsverfahren auf verschiedenste Art visualisiert werden kann. Beispielsweise visualisieren histologische Schnitte die Zellkerne der Kardiomyozyten in gewisser statistischer Regelmäßigkeit oder ermöglichen eine morphometrische Analyse der Größe der Zellkerne. Diese Merkmale können wiederum Hinweise auf spezielle Erkrankungen wie zum Beispiel Kardiomyopathie geben. Ultraschallbilder ermöglichen es beispielsweise anhand der Echodichte Rückschlüsse auf die Beschaffenheit des Gewebes zu ziehen, so kann z.B. ein echodichter Raum auf das Vorhandensein von epikardialem Fettgewebe hindeuten.

Die Analyse der Textur des Myokards ist folglich ein hilfreiches Werkzeug um einer pathologischen Veränderung des morphologischen Zustands und somit der Funktion auf den Grund zu gehen. Eine manuelle Analyse kann mitunter sehr aufwendig werden und ist im klinischen Alltag nicht durchführbar, daher ist es auch ein Ziel dieser Arbeit, diesen Vorgang so gut wie möglich zu automatisieren.

### **1.3.2 Texturanalyse**

Ansätze zur Texturanalyse können in statistische, strukturelle und modellbasierte Methoden gegliedert werden (Zhang 2001).

Die statistischen Ansätze versuchen variierende Texturmuster im Bild durch einen Satz statistischer Parameter zu beschreiben. Strukturelle Ansätze beschreiben Anordnungsregeln der Texturprimitiven. Diese Methoden sind auf die Analyse stark ausgeprägter, regelmäßiger Texturen beschränkt. Modellbasierte Ansätze definieren Texturen anhand analytischer Modelle. Für medizinische Anwendungsgebiete bieten sich statistische Methoden aufgrund der hohen Differenzierungsraten am ehesten an (Handels 2009, S162f).

### **1.3.3 Morphometrie**

Der Begriff „Morphometrie“ bezeichnet die „Methode zur Messung der Strukturelementen (Gewebe- und Zellkompartimente) sowie Partikeln (Zellen)“ (Oberholzer 1983, S2). Eine morphometrische Texturanalyse beinhaltet somit die Charakterisierung der Textur eines Bildes als Ganzes sowie die Vermessung der einzelnen Bestandteile, in diesem Fall des Gewebes.

## 1.4 Quantitative Parameter für die Texturbeschreibung und die Morphologie des Myokards

Durch die Bestimmung quantitativer Parameter des Myokards lassen sich Rückschlüsse auf den Zustand des Gewebes schließen. Das Ziel der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten morphometrischen Studie ist es, eine Aussage liefern zu können, ob sich das Gewebe innerhalb der physiologischen Normwerte befindet oder ob darin pathologische Prozesse stattgefunden haben. Unabhängig davon wird untersucht, inwieweit eine möglichst genaue Bestimmung der Faserorientierung im zweidimensionalen aber auch im dreidimensionalen Raum durchführbar ist. Die Bestimmung der Faserorientierung im mikroskopischen Bereich ermöglicht es nach einer elektroanatomischen Korrelation Rückschlüsse auf die Mikrostruktur des Gewebes und die Ursachen für elektrisch detektierte Arrhythmien zu schließen.

In der nachfolgenden Tabelle 3 sind quantitative Parameter des Myokards, die jeweiligen Referenzbereiche und pathologische Prozesse zusammengefasst.

Tabelle 3: Quantitative Parameter der Morphologie des menschlichen Herzens. Unter den jeweiligen morphometrischen Merkmalen findet sich eine Spalte, mit den physiologischen Daten im gesunden Herzen und eine Spalte über die pathologischen Hintergründe bei Abweichungen vom Referenzbereich.

	Im gesunden Herzen	Liefert Aussage über...
<b>Fibrose – Anteil</b>		
	Ca. 1%-5% (Mewton et al. 2012)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fibrose</li> <li>• Hypertrophie</li> </ul>
<b>Fibrosetyp</b>		
	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interstitielle Fibrose: Moderate Störung der Erregungsausbreitung v.a. in longitudinaler Richtung</li> <li>• Kompakte Fibrose: Wenig relevant für Arrhythmien</li> <li>• Diffuse Fibrose: Störung der</li> </ul>

		<p>Erregungsleitung</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fleckige Fibrose: Am anfälligsten für Störungen (De Jong 2011, S4).</li> </ul>
<b>Kardiomyozyten – Größe der Zellkerne</b>		
	<p>Länge: 10 µm -15 µm  Breite: 4 µm -5 µm  Fläche: 40-75 µm<sup>2</sup></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kardiomyopathie</li> <li>• Atrophie (bei verkleinerten Zellkernen)</li> </ul>
<b>Kardiomyozyten - Chromatinverteilung</b>		
	<p>Disperse Chromatinverteilung, homogene Matrix</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ausprägungsgrad I: Leichte/keine Chromatinmargination, geringe Matrixaufhellungen</li> <li>• Ausprägungsgrad II: Mittlere Chromatinmargination, mittlere Matrixaufhellungen</li> <li>• Ausprägungsgrad III: Starke Chromatinmargination, starke Matrixaufhellungen (Beyersdorf 1983, S17).</li> </ul>
<b>Kardiomyozyten – Anzahl an Zellen</b>		
	<p>Ca. 30%-40% (Camelliti et al. 2004, S40)</p> <p>20%-25% (Pangonyté et al. 2008, S848)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hyperplasie</li> </ul>
<b>Kardiomyozyten – Fläche/Volumen</b>		
	<p>Ca. 75% (Camelliti et al. 2004, S40)</p> <p>Fläche im Querschnitt: Zellkern x 10</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hypertrophie (bei vergrößerten Kardiomyozyten, Anzahl normal)</li> <li>• Atrophie (bei verkleinerten</li> </ul>

	Fläche im Längsschnitt: Zellkern x 20	Kardiomyozyten, Zellkernanteil gleich)
<b>Kardiomyozyten – Faserorientierung</b>		
	In der Regel verlaufen die Zellen im Myokard parallel und spiralförmig sowie mit durchgehender Reizleitung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hypertrophie</li> <li>• Arrhythmien</li> <li>• „Reentries“ (Elektroanatomische Korrelation)</li> </ul>
<b>Gewebefreier Raum, Fettgewebe</b>		
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kolliquative Myozytolyse</li> <li>• Lipomatosis cordis</li> </ul>
<b>Granulozyten – Anzahl</b>		
	Keine bis wenige	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infektiöse Myokarditis</li> </ul>
<b>Berechnung – Größe, Länge und Breite der Kardiomyozyten</b>		
	Längen- / Breitenverhältnis von 1/5 für ideale elektrische Konduktion	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hyper- oder hypotrophe Kardiomyozyten weisen eine gestörte Erregungsausbreitung auf (Lewalter, Lüderitz 2010, S26)</li> </ul>

## 1.5 Fibrose und Faserorientierung: Stand der Forschung

In der kardiovaskulären Forschung wird der Fibrosebestimmung in vivo und ex vivo aufgrund der diagnostischen Aussage starke Bedeutung beigemessen. Vor allem Magnetresonanzverfahren wie Late Gadolinium Enhancement (LGE) oder Diffusion Weighted Imaging (DWI) sind in der Lage, Fibrose im Gewebe zu detektieren. Pop et al. konnten eine starke Korrelation beider Verfahren mit der Histologie nachweisen, wobei LGE in geringem Ausmaß bessere Ergebnisse lieferte (Pop et al. 2013). Mewton et al. bezeichnen die MRI als „aussichtsreichstes zugängliches, präzises, nichtinvasives bildgebendes Werkzeug für die Bestimmung der Myokardfibrose in der klinischen Praxis“ (Mewton et al. 2012).

Die Faserorientierung der Kardiomyozyten kann in Kombination mit der elektrischen Erregungsleitung Rückschlüsse auf die Funktion des Herzens geben. Der Faserverlauf der

Kardiomyozyten ist aufgrund der daraus abzuleitenden Informationen über die Morphologie und Mechanik des Herzens im Fokus einiger Forschungszentren, allen voran das „Institute for Biomedical Engineering, University and ETH Zurich“, welches in den vergangenen Jahren einige Studien über die Faserorientierung der Myokardfasern in vivo veröffentlichten (z.B. Stoeck et al. 2012). In diesen und andere Studien (z.B. Lombaert et al. 2011) wird die Faserorientierung des Myokards in einer Auflösung von etwa 2 mm dargestellt. Ex vivo können höhere Auflösungen von bis zu 0,1 mm erzielt werden (Plank et al. 2009, S2269).

Die Bestimmung der Faserorientierung findet vor allem in der Industrie Anwendung, beispielsweise für die Qualitätssicherung bei der Papierproduktion oder auch für die Anwendung im medizinischen Bereich, beispielsweise für die Analyse der Knochenarchitektur oder die Kollagenstruktur der menschlichen Haut. Der Fokus dieser Arbeit liegt in der Analyse histologischer Bilder, da eine mikroskopische Bestimmung der Faserorientierung möglich ist. Andere Ansätze wie Diffusion Tensor Magnetic Resonance Imaging (DTMRI) liefern globale Aussagen über die Faserorientierung auf makroskopischer Ebene.

### **1.5.1 Ansätze zur Bestimmung der Faserorientierung**

Unter den gängigen Bildverarbeitungsmethoden finden sich in der Literatur einige durchaus brauchbare Methoden, welche für Richtungsbestimmungen in Bildern eingesetzt werden können. Relevante Methoden sind:

#### **Hesse Matrix**

Die Hesse Matrix beschreibt die Krümmung einer Funktion. Sie ist eine Matrix der zweiten partiellen Ableitung.

Mit der Hesse Matrix können jene Bereiche im Bild identifiziert werden, an denen die 2. Ableitung ihr Maximum aufweist (Elbischger et al. 2004). Damit ist es möglich, den Winkel der Orientierung zu berechnen (Daniels et al. 2006).

#### **Fourier-Transformation**

Mittels Fourier-Transformation erfolgt die Quantifizierung des Spektrums aller Frequenzen innerhalb eines Bildes. Van Zuijlen zeigte bereits im Jahr 2002 in der Arbeit „Morphometry of dermal collagen orientation by Fourier analysis is superior to multi-

observer assessment“, dass die Fourier-Transformation einer optischen Prüfung durch einen Betrachter überlegen ist (van Zuijlen et al. 2002).

Es gibt zahlreiche Autoren, welche Richtungsinformationen durch Anwendung der Fourier-Transformation gewonnen haben. Beispiele sind die Arbeiten von van Zuijlen et al. 2002, Khorasani et al. 2011, Palmer 1997, Enomae et al. 2006 oder Auada et al. 2006.

### **Lokale Gradienten / lokal-dominante Orientierungen**

Statt der Häufigkeit der Grauwerte wird die Häufigkeit der Kantenrichtungen gemessen. Dadurch ist die Erstellung eines Richtungshistogramms möglich. Ein flaches Histogramm bedeutet, dass es sich im Bild um eine „ungerichtete“ Textur handelt, wenn es jedoch ein lokales Maximum gibt, so ist von einer gerichteten Textur auszugehen. Die dominante Orientierung wird durch das lokale Maximum repräsentiert.

Es finden sich in der Literatur zahlreiche Arbeiten welche durch Gradientenbestimmung die Orientierung in Bildern bestimmen, u.a. wird in den Arbeiten von Karlon et. al 1999, Chen 1998, Ilea et al. 2008 Niessen et al. 1997 und Sauvola 1995 diese Methode angewendet.

Die Kantenrichtung errechnet sich wie folgt:

$$\theta = \arctan\left(\frac{\Delta v}{\Delta h}\right) + \frac{\pi}{2}$$

Die Stärke und die Orientierung der Grauwertänderungen im Bild kann durch die Bestimmung der lokalen Gradienten ermittelt werden. Hierfür werden die ersten Ableitungen (orthogonal zueinander) im Bild bestimmt, die zweite Ableitung dient der Ermittlung von langsamen Übergängen.

Die lokal-dominante Orientierung wird durch die Kombination der Stärke und der lokalen Orientierung jedes Pixels berechnet.

### **Grey level co-occurrence Matrix (GCLM)**

Mittels der GCLM werden die „Nachbarschaftsbeziehungen“ einzelner Pixel (bzw. derer Grauwerte) im Bild quantifiziert. Die GCLM Merkmale einer Textur, welche eine ungeordnete Struktur aufweisen, unterscheiden sich in der dominanten Richtung von jenen

welche aus den anderen Richtungen berechnet werden. Die Texturcharakteristik ist dementsprechend abhängig von der Richtung die in der GCLM Analyse ausgewählt wurde.

Relevante Arbeiten, welche die Orientierung eines Bildes mithilfe der GLCM detektieren sind unter anderem Hu et. al. 2012, Chen 1998 und Karathanassi et al. 2004.

### **Structure Tensor**

Als “Structure Tensor” bezeichnet man eine vom Gradienten einer Funktion abgeleitete Matrix. Sie fasst die vorherrschenden Orientierungen des Gradienten in einer definierten Nachbarschaft eines Punktes und die Kohärenz dieser Orientierungen zusammen. Diese Methode wird beispielsweise in den Arbeiten von Rezakhanlha et al. 2011 und Niessen et al. 1997 angewendet um die Orientierung in einem Bild zu bestimmen.

In den folgenden Kapiteln soll gezeigt werden, dass eine automatische morphometrische Studie mit einer detaillierten Analyse relevanter Gewebebestandteile inklusive der Faserorientierung und somit eine Charakterisierung des Gewebes aus einem zweidimensionalen histologischen Schnitt durchgeführt werden kann.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Histologie**

Histologische Schnitte besitzen hervorragende Eigenschaften in Bezug auf Auflösung und Kontrast und weisen gleichzeitig eine geringe Artefaktanfälligkeit auf, sofern sie in Acrylat eingebettet wurden. Im Vergleich zu nichtinvasiven Methoden wie Magnetresonanztomographie (MRT) oder Computertomographie (CT) hat der histologische Schnitt den Nachteil, dass eine umfassende Verwendung, also die Analyse eines gesamten kardialen Gewebeschnittes, nur in vitro möglich ist. Gleichzeitig sind in vivo Aufnahmen mittels MR oder CT wiederum sehr zeitaufwendig und auch nur mit geringerer Auflösung als entsprechende in vitro Studien möglich.

In vitro Studien sind für den Zweck dieser Arbeit kein Nachteil. Außerdem ist anzumerken, dass Herzmuskelbiopsien mittlerweile in Herzkatheterlaboren zu Standarduntersuchungen zählen und die Kenntnisse dieser Arbeit auch auf diese Art entnommene Proben angewendet werden können.

Ein wesentlicher Schritt war es nun, geeignete Schnitt- und Färbemethoden zu finden, welche eine Analyse der im Kapitel 1.1.2, „Histologie und Funktion des Herzens“ identifizierten Zelltypen und deren morphometrische Eigenschaften inklusive der vorliegenden Faserorientierung ermöglichen.

#### **2.1.1 Auswahl des Gewebes, Einbettung, Fixierung**

Ein isoliertes Hasenherz wurde für die Präparierung herangezogen. Der Hase wurde fachgerecht vom Team der Tierstation der Medizinischen Universität Graz (ISO 9001 zertifiziert 2008 und bewilligt vom österreichischen Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Wirtschaft, Zulassungsnummer: BMWF-66.010/0017-II/3b/2014) mit einer Überdosis von 5mg/kg Propofol und 20µg/kg Fentanyl eingeschläfert. Diese Prozedur wurde im Einklang mit den österreichischen Ethik-Standards und Vorschriften durchgeführt (§2 Abs.1 Definition von Tierversuchen, österreichisches Gesetz TVG 2012 BGBL. I Nr. 114/2012 und §20: Zulässige Tötungsmethoden TVV 2012). Dementsprechend ist die Gewebesentnahme im österreichischen Gesetz nicht von einer Ethikkommission genehmigungspflichtig und die Tötung von Tieren ist für den

ausschließlichen Zweck der Verwendung von Gewebe oder Organen in der Forschung per Definition nicht als Tierversuch anzusehen.

Das Herz wurde nach der Feststellung des Todes rasch entnommen und für die Gewebepräparation in modifizierte sowie oxygenierte „Tyrode’s solution“ (bei 4-8°C) gebettet. Das Gewebe des rechten Vorhofs wurde dann vom isolierten Herz abgetrennt und in Acrylat fixiert. In Abbildung 9 ist das Herz des Hasen dargestellt. Die Gewebeschnitte wurden mit einem Mikrotom (Polycut SM 2500E, Leica, Vienna, Austria, 2µm) erzeugt und auf Objektträgern aus Glas für die weitere Bearbeitung platziert.

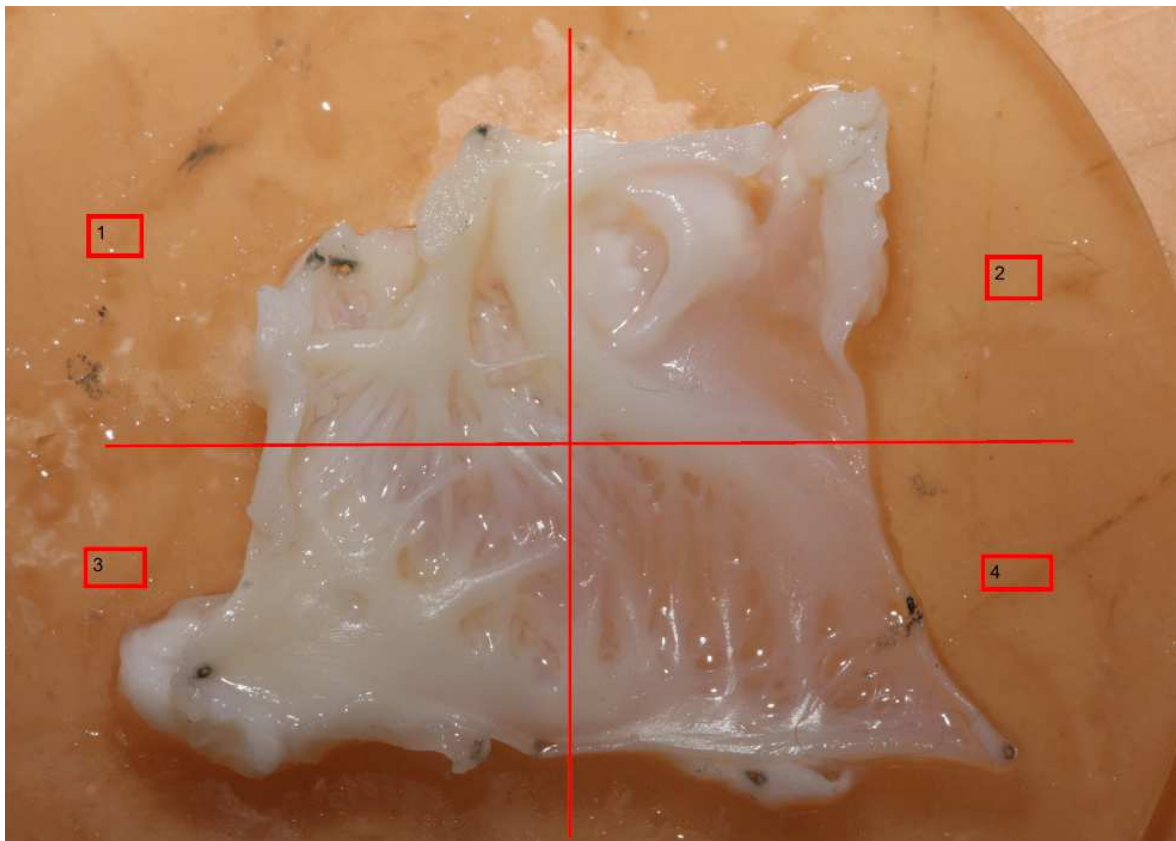


Abbildung 9: Eingebettetes Hasenherz. Die in dieser Arbeit verwendeten digitalisierten histologischen Schnitte wurden aus diesem Präparat angefertigt (Präparat wurde angefertigt im Rahmen des Projekts „Cardiac Conduction and Microstructure in the Right Atrial Isthmus“ von Ernst Hofer, Robert Arnold, Institut für Biophysik, Medizinische Universität Graz. Mit Genehmigung von Martin Asslaber, Institut für Pathologie, Medizinische Universität Graz).

Für eine automatisierte Auswertung der morphologischen Eigenschaften von Gewebe ist es erforderlich, möglichst geringe Artefakte im Bild vorzufinden. Da die Bilderzeugungsmethode in der Verarbeitungskette ganz zu Beginn steht, würden sich Fehler die hier entstehen, in der weiteren Verarbeitungskette fortsetzen und verstärken. Aus diesem Grund wurde für die Einbettung Acrylat verwendet. Acrylat ist wesentlich härter als Paraffin, damit ist auch die Artefaktanfälligkeit geringer.

### **2.1.2 Auswahl der Färbemethoden**

Bei der Auswahl der Färbemethoden wurde ein besonderer Wert auf die Möglichkeit der Darstellung der Kardiomyozyten und den darin befindlichen Strukturen (Zellkerne, Glanzstreifen, Zellmembran, Myofibrillen) und des Bindegewebes gelegt. Am Institut für Pathologie der Medizinischen Universität Graz wurden hierfür einige vielversprechende Methoden ausgewählt und anschließend die Färbungen laut den vorliegenden Färbeprotokollen im Anhang durchgeführt. Ein Beispiel eines Glasobjektträgers ist in Abbildung 10 dargestellt.

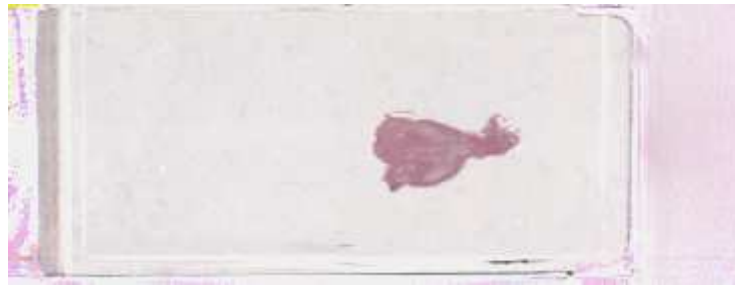


Abbildung 10: Glasobjektträger mit Organschnitt in Trichrome-Färbung (nach Gieson).

Der histologische Schnitt, der für die Evaluierung der myokardialen Pikro-Siriusrot-Färbung verwendet wurde, wurde an der University of Extremadura, Badajoz, Spanien angefertigt (Mayrhofer-Reinhartshuber et al. 2014).

Insgesamt wurden für diese Arbeit am Institut für Pathologie der Medizinischen Universität Graz 11 Schnitte angefertigt und digitalisiert. Die Färbungen wurden nach den Färbeprotokollen im Anhang durchgeführt.

Die Gewebeschnitte sind in etwa zwei Mikrometer dick.

### **2.1.3 Digitalisierung**

Die Bilder wurden mit einem hochauflösenden Scanner (Aperio Slide Scanner, Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland) am Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMF) der Medizinischen Universität Graz aufgenommen und haben eine Größe von ca. 72000 x 57000 Pixel, eine Auflösung von 0,279 Mikrometer pro Pixel und wurden im TIFF Format mit der Dateierweiterung .svs abgespeichert.

### **2.1.4 Auswahl der Färbemethode und der Gewebeproben**

Die Morphologie der Herzmuskelzellen von Hasen hat starke Ähnlichkeiten mit jener des menschlichen Herzens. Es wurden für diese Arbeit somit die bereits erwähnten Proben eines Hasen verwendet.

Die histologischen Schnitte wurden manuell im Hinblick auf die Darstellbarkeit der

- Kardiomyozyten,
- des Zellkerns,
- der Glanzstreifen,
- der Zellmembran,
- der Myofibrillen und des
- Bindegewebes

im Programm „ImageScope“ (Aperio, Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland) analysiert und klassifiziert.

Die Auswahl der Bilder bzw. Bildausschnitte, welche mittels automatischer Bildverarbeitungsmethoden analysiert wurden, erfolgte ebenfalls im Programm „ImageScope“ von Aperio in 40-facher Vergrößerung. Die Ergebnisse aller Bildverarbeitungsprozesse wurden in Kapitel 3 anhand eines repräsentativen Referenzbildes im Ausmaß von 1024 x 768 Pixel visualisiert. Für die Bestimmung der Faserorientierung und die Segmentierung der Zellkerne wurden fünf Bildausschnitte zufällig aus zwei unterschiedlichen Gewebeproben erstellt und der automatisierten Bildverarbeitung zugeführt.

Die Bestimmung des Fibrosetyps erfolgte anhand eines Areal um das Referenzbild im Ausmaß von 6140 x 3905 Pixel, da der Bildausschnitt im Ausmaß von 1024 x 768 Pixel zu wenig Bindegewebe für eine Klassifizierung beinhaltet.

### **2.1.5 Bildverarbeitung**

Die Segmentierung der Zellkerne in den fünf digitalisierten histologischen Schnitten in Abbildung 16 erfolgte mit der Bildbearbeitungssoftware Fiji (Schindelin J et al. 2012), basierend auf ImageJ Version 1.49m. Für die Evaluierung der bekannten Bildverarbeitungsmethoden wurden vorhandene Plug-ins verwendet, die eigenen Algorithmen wurden für die weitere Verwendung als Makro gespeichert.

### **2.1.6 Ausgewertete morphometrische Eigenschaften des Gewebes**

Der primäre Fokus liegt in dieser Arbeit auf der Bestimmung der Faserorientierung und der Analyse der Fibrose. Es wurde basierend auf dem erzeugten Bildmaterial eine morphometrische Studie durchgeführt, welche folgende Charakteristika des Gewebes automatisch determinierte:

- Anteil an Bindegewebe
- Fibrosetyp
- Anzahl, Dimension und Fläche der Zellkerne
- Anzahl der Kardiomyozyten
- Fläche der Kardiomyozyten
- Faserorientierung  $x/y$
- Faserorientierung  $z$

Die Anwendung sämtlicher Bildverarbeitungsschritte erfolgte auf ein Referenzbild, welches nachfolgend in Abbildung 11 dargestellt ist. Die Ergebnisbilder dieser Bildverarbeitungsschritte wurden für den Anteil an Bindegewebe, den Fibrosetyp, die Anzahl, Größe und Fläche der Zellkerne, die Anzahl der Kardiomyozyten, die Fläche der Kardiomyozyten, die Faserorientierung in  $x/y$ -Richtung und die Faserorientierung in  $z$ -Richtung in den Kapiteln 3.2-3.7 dargestellt und die Ergebnisse der morphometrischen Studie in Kapitel 3.8 zusammengefasst.

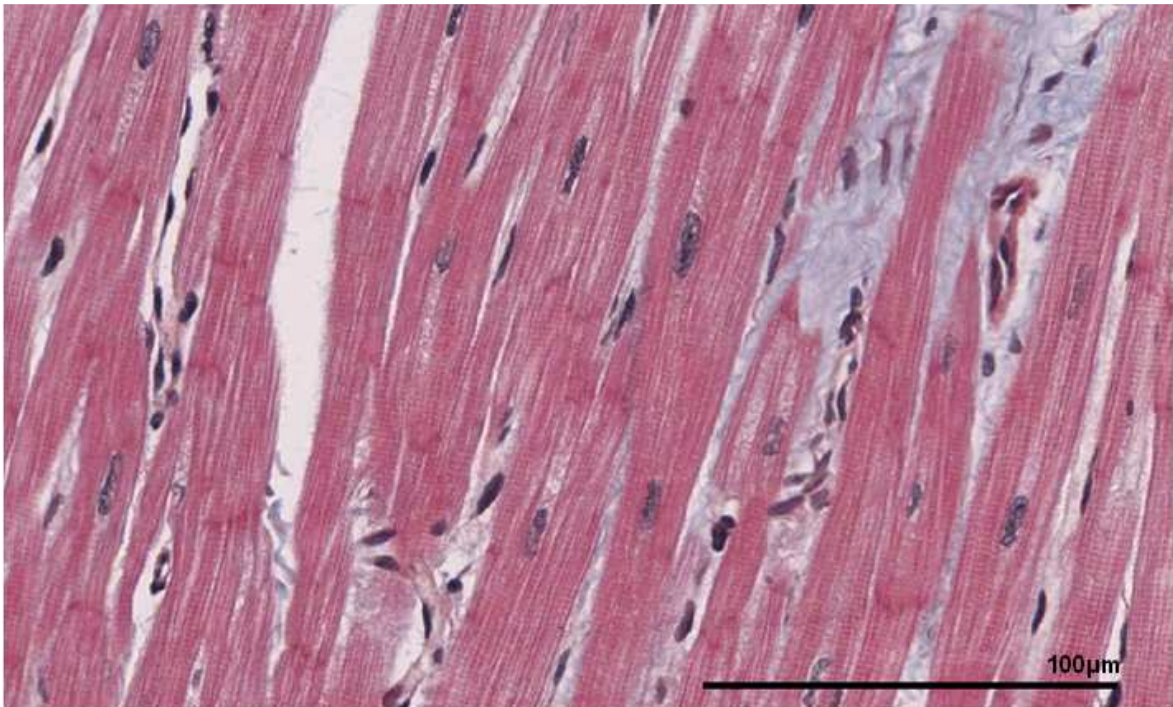


Abbildung 11: Referenzbild für die Anwendung der Bildverarbeitungsschritte, zufällig ausgewählt aus dem Gewebeschnitt, welcher mit Trichrome (Gieson) gefärbt wurde (adaptiert nach Zach et al. 2016, Abbildung 1(A), Lizenz: CC BY 4.0).

## 2.2 Bindegewebe: Bestimmung des Flächenanteils

Das Ziel dieser Texturanalyse war die quantitative Bestimmung des Anteils an Bindegewebe im histologischen Schnitt durch das Myokard. Im gesunden Herzen beträgt dieser ca. 1%-5%, Veränderungen dieses Anteils lassen beispielsweise Rückschlüsse auf Fibrose oder Hypertrophie des Herzens zu.

Durch Färbemethoden wie Trichrome (nach Gieson) oder Siriusrot können Bindegewebsanteile im Myokard farblich sehr gut hervorgehoben werden. Diese farbliche Vorcharakterisierung liefert bereits Bildinformationen, die es ermöglichen, die jeweiligen Bildbereiche relativ einfach zu segmentieren und einer automatischen Anteilsberechnung zuzuführen.

Die Trichrome Färbemethode (nach Gieson) stellte sowohl die Zellkerne als auch das Bindegewebe in der gewünschten Qualität dar, allerdings ist der Farbton sowohl für die Zellkerne der Kardiomyozyten, als auch für das Bindegewebe sowie dessen Zellkerne blau. In Abbildung 12 ist ein Gewebeschnitt, gefärbt mit Trichrome (nach Gieson) dargestellt.

Gut erkennbar sind die Kardiomyozyten sowie die Zellkerne der Kardiomyozyten sowie der Fibrozyten und des Endothels. Die größte Herausforderung in einem entsprechenden Bild ist es, die Zellkerne, welche nicht dem Bindegewebe zuzuordnen sind (v.a. Kardiomyozyten), nicht zum farblich ähnlichen Bindegewebe dazuzurechnen.

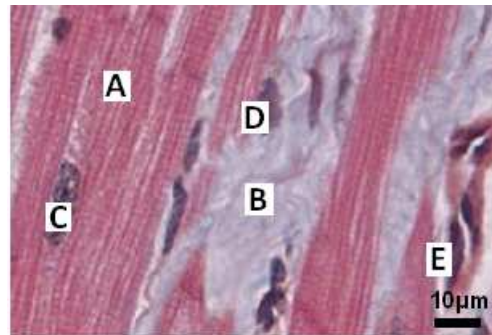


Abbildung 12: Trichrome Färbung (Gieson): Darstellung von Kardiomyozyten (A), Bindegewebe (B), Kardiomyozytenzellkernen (C), Fibrozytenzellkernen (D) und Endothelzellkernen (E).

Lediglich in der Helligkeit bzw. in der Chromatinverteilung unterscheiden sich Zellkerne der Kardiomyozyten von den Zellkernen des Bindegewebes und der Endothelzellen. Diese Tatsache ermöglichte es mittels der in Kapitel 2.4 vorgestellten Algorithmen die Elemente voneinander zu trennen und ein Bild zu generieren, welches nach Abzug der Kardiomyozytenzellkerne nur Bindegewebe darstellte.

### **Vorgehensweise:**

Die Verarbeitungsschritte erfolgten in chronologischer Reihenfolge wie folgt:

- 1.) Bindegewebe extrahieren (Farbentfaltung vom Originalbild).
  - a. Filter „Color Deconvolution“ Version 1.5
  - b. Vector: Giemsa
  - c. Von Farbe 3 (blau) Binärbild erzeugen
  - d. „Fill holes“ um die Bindegewebsflächen zu schließen
- 2.) Zellkerne der Kardiomyozyten aus dem Originalbild extrahieren, Vorgangsweise wie in Kapitel 2.4 beschrieben.
  - a. Ergebnis ist ein Binärbild mit den Kardiomyozytenzellkernen, welche bei der Farbentfaltung in Schritt 1 nicht vom Bindegewebe unterschieden werden konnten

- 3.) Bild aus Schritt 2 (Binärbild der Kardiomyozytenzellkerne) vom Bild aus Schritt 1 (Binärbild der Farbentfaltung) subtrahieren.
  - a. Image Calculator (Subtraktion) anwenden: Bindegewebe – Zellkerne
  - b. Ergebnis ist ein Binärbild welches nur mehr die Bindegewebsanteile beinhaltet.
- 4.) Die quantitative Bestimmung des Bindegewebsanteils erfolgt durch Berechnung der in der Vorverarbeitung extrahierten schwarzen Bildanteile, welche das Bindegewebe repräsentieren.
  - a. Erzeugtes Bild öffnen
  - b. „Measure“

Diese Einstellungen bewirken, dass alle Pixel, welche im Binärbild schwarz dargestellt werden, in die Berechnung einfließen.

Sämtliche Verarbeitungsschritte wurden für die spätere Reproduzierbarkeit und Automatisierung in einem Makro gespeichert.

Der Programmcode ist im Anhang zu finden.

## **2.3 Bindegewebe: Analyse des Fibrosetyps**

Bei der Charakterisierung des Fibrosetyps ging es vordergründig um die Unterscheidung der verschiedenen Gewebeanteile, im konkreten Fall um die Unterscheidung bzw. die Verteilung des fibrotischen Gewebes im Herzen. Wie im Kapitel 1.1., „Das Herz“, beschrieben, treten zwischen den Muskelfasern unterschiedliche Typen von Fibrose auf, welche die Erregungsleitung auf verschiedene Weise beeinflussen.

Ziel war es, den Fibrosetyp anhand einer Texturanalyse bestmöglich zu beschreiben. Strukturelle Verfahren kommen aufgrund des unterschiedlichen Erscheinungsbildes der Fibrosestrukturen nicht in Frage. Ebenso liefert ein statistisches Verfahren erster Ordnung keine aussagekräftigen Resultate. Ein statistisches Verfahren zweiter Ordnung war daher Mittel der Wahl.

### **2.3.1 Bildverarbeitung**

Wie im vorigen Kapitel (Verarbeitungsschritt 1) beschrieben wurde eine Farbentfaltung durchgeführt. Danach wurden aus jenem Bild, welches die Muskelfasern darstellte und aus

jenem Bild, das die Bindegewebsanteile identifizierte, Binärbilder erstellt. Mit einem Medianfilter wurden aus dem Bindegewebsbild kleinste Artefakte entfernt. Danach wurde das Muskelfaserbild vom Bindegewebsbild subtrahiert. Übrig blieben jene Areale, welche Bindegewebe enthielten. Es wurde ein Binärbild erstellt und die Areale, welche von Bindegewebe umschlossen waren, ausgefüllt.

### **2.3.2 Auswahl der Bildverarbeitungsmethode**

Zur Bestimmung des Fibrosetyps wurde die grey level co-occurrence matrix (GLCM) sowie die Auswertung der Haralick'schen Texturparameter herangezogen. Mit der alleinigen Anwendung der GLCM auf einen mit Picro-Siriusrot oder Trichrome gefärbten histologischen Schnitt konnte das Ziel nicht erreicht werden, da die Graustufenunterschiede zwischen Muskel und Bindegewebe zu gering sind. Außerdem war das Ziel nicht die Analyse der Grauwertverteilung an sich, sondern es war erstens die Frage zu klären, ob ein gewisser Bildpunkt Fibrose repräsentiert und zweitens, wie sich die Verteilung dieser Bildpunkte im Bild darstellten. Daher wurde die GLCM auf das zuvor generierte Binärbild angewendet.

Die grey level co-occurrence matrix bzw. die Haralick'schen Merkmale geben über die Charakteristika Kontrast und Entropie Rückschlüsse auf die Textur des Bildes bzw. auf den Fibrosetyp im Gewebe.

Das Haralick'sche Merkmal „Kontrast“ ist *„ein Maß für die mittlere Größe der Grauwertvariationen in der betrachteten geometrischen Anordnung  $\delta$ . Bildregionen mit hohem Kontrast weisen zwischen Bildpunkten in der Anordnung  $\delta$  häufig starke Grauwertsprünge auf.“* (Handels 2009, S167). Konkret bedeutet dies, je feiner, fleckiger und häufiger die Fibrose im Bild ist, desto größer ist der Kontrast (z.B. diffuse Fibrose). Je homogener die Fibrose ist und je größer die zusammenhängenden Bereiche sind über die sich das fibrotische Gebiet erstreckt, desto geringer ist der Kontrast (z.B. kompakte Fibrose). Die Anwendung der grey level co-occurrence matrix erfolgte für die Bestimmung des Fibrosetyps für den Nachweis der Gültigkeit der Methode zuerst auf die Abbildungen 4, 5, 6 und 7 da dieses Bildmaterial der Siriusrotfärbung (De Jong 2011) in Kapitel 1.1.2.3 aufgrund der ausgezeichneten Darstellung der unterschiedlichen Fibrosetypen als Referenz für die Bestimmung des Fibrosetyps herangezogen werden konnte. Die Bildgröße betrug 213x332 Pixel.

Anschließend erfolgte die Anwendung der GLCM auf einen größeren Bereich um das Referenzbild in Abbildung 11. Die Bildgröße betrug 6140x3905 Pixel um eine globale Aussage über das Gewebe zu erhalten, der für die anderen Auswertungen verwendete Bildausschnitt von 1024x768 Pixel war dafür zu klein bzw. enthielt für eine valide Bestimmung des Fibrosetyps zu wenig Areale mit Bindegewebe. Das Bild, welches auch Areale um das Referenzbild in Abbildung 11 enthält, ist in Abbildung 25 (A) dargestellt.

Die Bildverarbeitung erfolgte wie im Kapitel 2.7.1.5 beschrieben. Es ist zu beachten, dass, wie in Kapitel 2.7.1.5 dargelegt, die Faserorientierung Einfluss auf den GLCM Texturparameter „Kontrast“ haben kann. Daher wurden die Bilder, welche zur Bestimmung des Fibrosetyps herangezogen wurden neben der normalen Ausrichtung auch um 90° rotiert um eine Fehlinterpretation des Fibrosetyps aufgrund der Faserorientierung auszuschließen.

## **2.4 Kardiomyozyten – Anzahl und Größe der Zellkerne**

Die Anzahl und vor allem die Größe der Zellkerne lassen Rückschlüsse auf pathologische Veränderungen des Herzmuskels zu. Die Größe der Zellkerne ist beispielsweise ein Indikator für das Vorliegen einer Kardiomyopathie.

### **2.4.1 Bildvorverarbeitung für die automatische Bestimmung der Faserorientierung („Nucleus Based Orientation“ Methode)**

Eine wesentliche Herausforderung war es, die im Bild ähnlich visualisierten Zellkerne der Fibrozyten und Endothelzellkerne von den Zellkernen der Kardiomyozyten zu unterscheiden. 90% jener Zellen, die nicht Myozyten repräsentieren, sind Fibrozyten (Agocha, Eghbali-Webb 1997).

Die Zellkerne der Fibrozyten und des Endothels erscheinen in gleicher Färbung wie die Kardiomyozyten, dies ist in Abbildung 13 ersichtlich. Daher ist es von grundlegender Bedeutung, Unterscheidungsmerkmale in der Morphologie der Zellkerne zu finden.



Abbildung 13: Vergrößerter Gewebeausschnitt eines Trichrome Schnittes (Referenzbild). Dieses Bild verdeutlicht die Ähnlichkeit in der Farbe bzw. die kleinen Unterschiede in der Farbintensität der Zellkerne von Fibrozyten (blauer Kreis) und der Zellkerne der Kardiomyozyten (rote Kreise) aufgrund der unterschiedlichen Chromatinverteilung (Zach et al. 2016, Abbildung 2, Lizenz: CC BY 4.0).

Prinzipiell befinden sich die Zellen und somit die Zellkerne der Fibrozyten sowie des Endothels im Interstitium und die Zellkerne der Kardiomyozyten zentral gelegen in der Muskelzelle. Daher wären eine Segmentierung der Herzmuskelzellen und eine anschließende Überlagerung der Zellkerne die naheliegendsten Verarbeitungsschritte. In der Praxis zeigte sich jedoch, dass dies aus folgenden Gründen nicht zielführend ist:

Die Kardiomyozyten liegen oft eng aneinander und die Zellkerne der Fibrozyten und des Endothels erscheinen visuell oft so, als ob sie innerhalb der Kardiomyozyten liegen würden, da die Zellgrenzen der Kardiomyozyten nicht sichtbar sind. Des Weiteren erscheint ein potentiell vorhandener perinukleärer Hof eines Kardiomyozyten in der Segmentierung ähnlich den interzellulären Räumen und kann daher mit diesen verwechselt werden.

Die zwei angeführten Einschränkungen bei der Unterscheidung der Zellkerne der Kardiomyozyten und der Zellkerne der Fibrozyten und des Endothels sind in der nachfolgenden Abbildung 14 visualisiert.

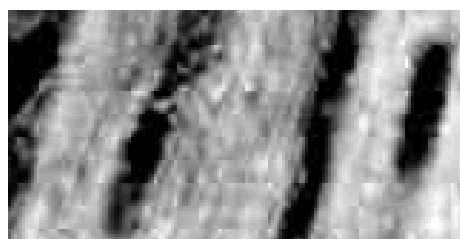


Abbildung 14: Segmentierter histologischer Schnitt. Es handelt sich um einen Teilausschnitt aus Abbildung 13. Eine klare Unterscheidung zwischen den Zellkernen der Kardiomyozyten und der Fibrozyten bzw. den Endothelzellkernen ist nicht möglich.

Eine farbliche Segmentierung, etwa durch ein Schwellwertverfahren, ist aufgrund der gleichen Farbtöne somit nicht möglich.

Ein Unterscheidungskriterium, welches schlussendlich für die Segmentierung der Zellkerne der Kardiomyozyten herangezogen wurde, ist die Homogenität des Chromatins. Zellkerne der Fibrozyten und Endothelzellkerne erscheinen im histologischen Schnitt wesentlich homogener als die Zellkerne der Kardiomyozyten.

Es wurden zwei Algorithmen entwickelt, der erste verfolgt einen filterbasierten und mathematischen Ansatz und der zweite Algorithmus verfolgt einen statistischen Ansatz, bei dem die Bildinformationen aus den Bereichen, wo Zellkerne vermutet werden, analysiert und entsprechend der Morphologie und Farbverteilung in Kardiomyozytenzellkerne oder restliches Gewebe eingeteilt werden. Beide Varianten erzeugen in jenen Bereichen eine Maske, wo entsprechende Zellkerne vermutet werden. Die Algorithmen wurden auf das Referenzbild in Abbildung 11 angewendet um einen direkten Vergleich zu ermöglichen.

#### ***2.4.1.1 Algorithmus 1: Filterbasierte Identifikation der Kardiomyozytenzellkerne***

Der Ablauf dieser Segmentierung ist in folgendem Flussdiagramm (Abbildung 15) beschrieben.

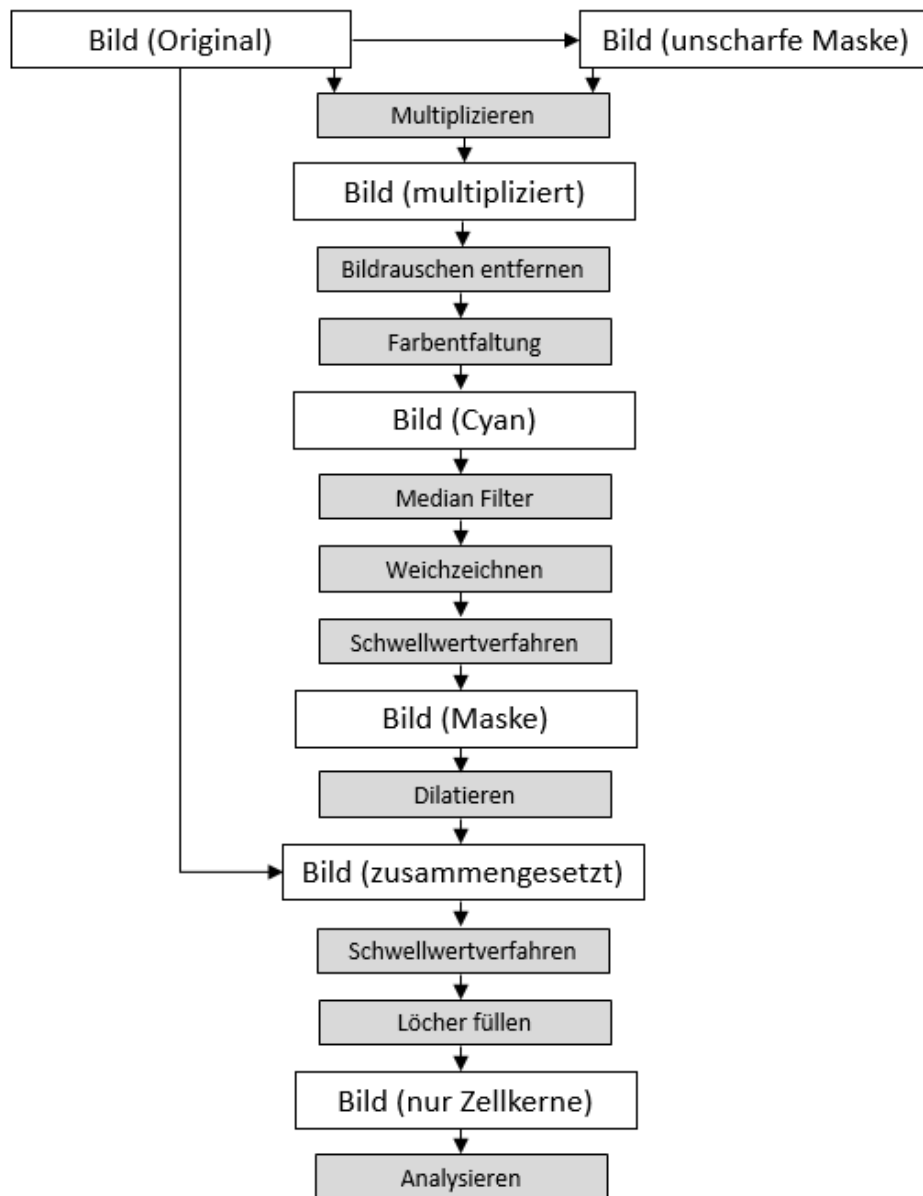


Abbildung 15: Ablauf der Bildverarbeitung des Algorithmus 1. Es stellt alle Bildverarbeitungsschritte des filterbasierten Algorithmus, vom Originalbild bis zu jenem Bild in dem nur mehr die Zellkerne sichtbar sind, dar (adaptiert nach Zach et al. 2016, Abbildung 3, Lizenz: CC BY 4.0).

Folgende Verarbeitungsschritte, welche vor allem die Hervorhebung der Inhomogenität der Zellkerne von Kardiomyozyten und Fibrozyten zum Ziel haben, wurden durchgeführt:

- Originalbild (BO) → Bild mit unscharfer Maske erzeugen (BUM). Parameter:
  - a. Radius, Sigma: 10
  - b. Mask Weight: 0,9

- Originalbild (BO) mit unscharfer Maske (BUM) multiplizieren
- Originalbild multipliziert mit unscharfer Maske (BOUM) → Ausreißer entfernen (Noise → Remove outliers). Parameter:
  - c. Radius 5,
  - d. Schwellwert 50,
  - e. Anwenden auf dunkle Elemente
- Von Originalbild multipliziert mit unscharfer Maske (BOUM) nur Cyan extrahieren mit Color Deconvolution ROI (BOUMC). Parameter:
  - f. [r1]=0.57735026 [g1]=0.57735026 [b1]=0.57735026
  - g. [r2]=0.9999995 [g2]=0.0007063186 [b2]=0.0007063186
  - h. [r3]=0.0007063186 [g3]=0.9999995 [b3]=0.0007063186")
- Medianfilter, Parameter:
  - i. Radius 1
- Gaussian Blur auf Cyan (BOUMC), Parameter:
  - j. Radius 10
- Threshold, Parameter:
  - k. max Entropy,
- 3 x Dilatieren
- Originalbild und Dilatiertes Binärbild addieren
- Threshold Standard
- Binärbild erzeugen (Make Binary)
- Morphologische Operation
  - l. Fill holes
  - m. Close
- Gaussian Blur, Parameter:
  - n. Sigma 3
- Binärbild erzeugen (Make Binary)
- Regionen im Binärbild analysieren (Analyze particles)
- Ergebnisdatei speichern

Der Programmcode ist im Anhang zu finden.

Parametrisierung:

In Abhängigkeit des Bildausschnittes können die Parameter der Filter (Median, Gaussian blur) sowie der morphologischen Operationen angepasst werden. In Bildern mit zahlreichen, kleineren Fibrozyten- und Endothelzellkernen macht es beispielsweise durchaus Sinn, den Medianfilter etwas größer zu wählen, um kleinere, störende Elemente zu eliminieren, damit die Zellkerne der Kardiomyozyten ohne falsch positive Ergebnisse in gewünschter Qualität detektiert werden.

#### ***2.4.1.2 Algorithmus 2: Identifikation der Kardiomyozytenzellkerne basierend auf quantitativer Auswertung der Bildinformation***

Der Ablauf dieser Segmentierung erfolgte in den nachfolgend aufgelisteten Schritten.

- Thresholding (HSB)
- Regionen analysieren und speichern der Ergebnisse in eine Datei
- Datei einlesen
- Erzeugen einer binären Maske (draw Ellipse) anhand der Koordinaten der detektierten Regionen, wobei homogene Regionen (Fibrozyten- und Endothelzellkerne) ausgeschlossen werden (Fläche <99.5) und keine Maske in dieser Region erzeugt wird. Die Maske wird bewusst um 3-5 Pixel größer gewählt als der Zellkern damit die Umgebung des Zellkerns in die Bildverarbeitung hineinfließt. Die Zellkerne der Fibrozyten und des Endothels sind üblicherweise nicht unmittelbar von Muskelgewebe umgeben.
- Überlagern der Maske mit dem Originalbild.
- Thresholding (Max Entropy) des überlagerten Bildes, es werden nur mehr jene Regionen analysiert, welche eine entsprechende Inhomogenität aufweisen
- Regionen werden analysiert (Analyze Particles) und die Ergebnisse erneut in eine Datei gespeichert.
- Laden der Datei und Analyse von Mean und Standardabweichung, zeichnen einer Zellkernmaske nur, wenn bestimmte Schwellwerte nicht über- oder unterschritten werden.
- Abschließende Analyse der detektierten Bereiche, wo Zellkerne vermutet werden (Analyze Particles).

Der Programmcode ist im Anhang zu finden.

Parametrisierung: Der Algorithmus kann in Bezug auf die Toleranz von „Mean“ und „Standardabweichung“ der Zellkerninhalte (Homogenität) parametrisiert werden. Diese Parameter erlauben es, die Zahl der erkannten Kardiomyozytenzellkerne zu erhöhen, wobei sich in diesem Fall auch die Zahl der fälschlich erkannten Fibrozytenzellkerne im ungefähren Verhältnis von 1:10 erhöht.

Um eine genauere Aussage über die Qualität der Segmentierungs-Algorithmen treffen zu können wurden Algorithmus 1 und Algorithmus 2 zusätzlich zum Referenzbild in Abbildung 11 (große Darstellung) auf 4 weitere digitalisierte histologische Schnitte angewendet. Alle 5, für die Evaluierung der Segmentierung herangezogenen, digitalisierten histologischen Schnitte sind der folgenden Abbildung 16 zu entnehmen.

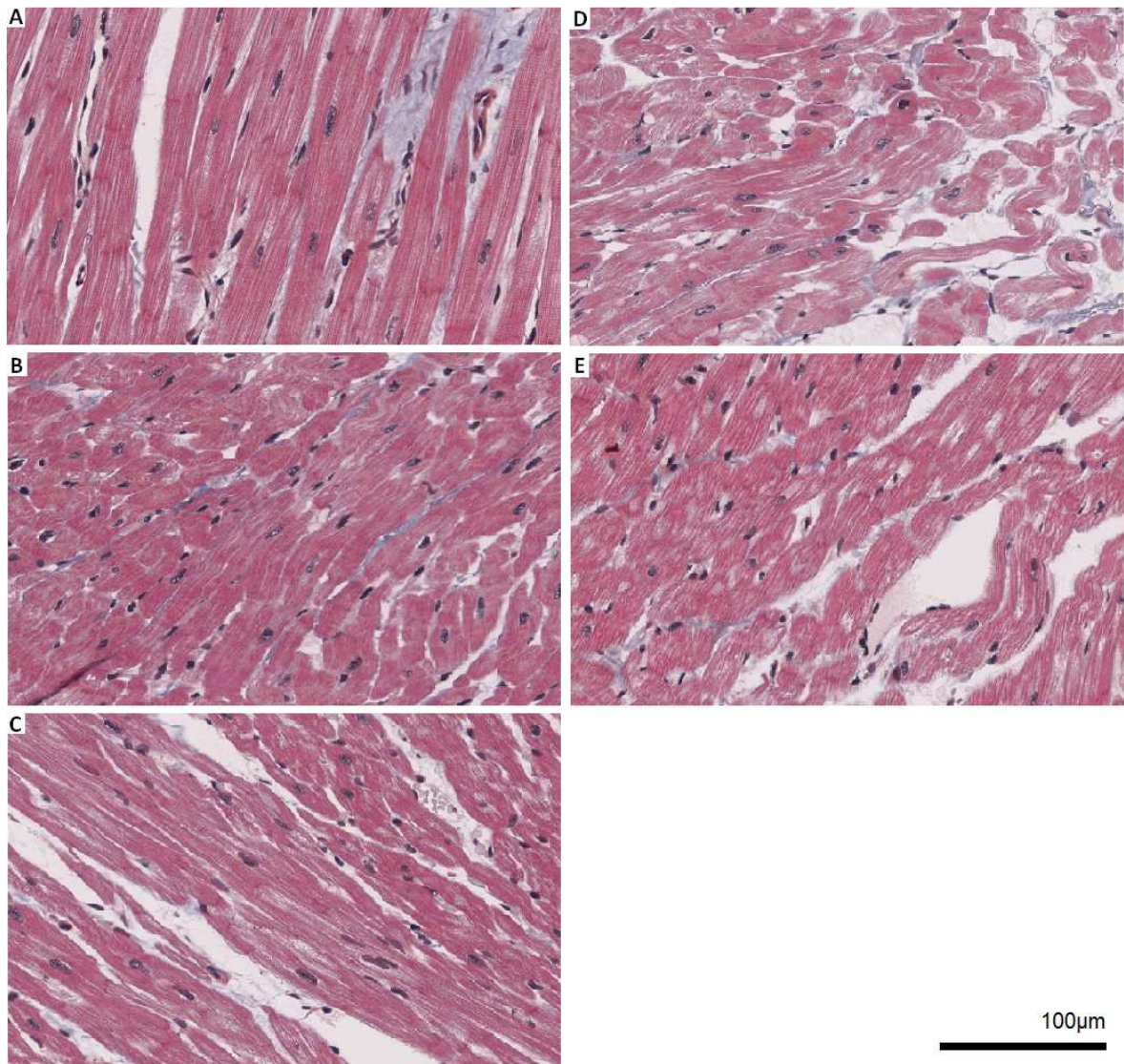


Abbildung 16: Fünf unterschiedliche Ausschnitte aus dem mit Trichrome (nach Gieson) gefärbten und anschließend digitalisierten histologischen Schnitt. Diese Schnitte wurden für die Evaluierung der Segmentierungs-Algorithmen herangezogen.

## **2.4.2 Berechnung der Zellkerngröße**

Die Berechnung der Anzahl der Kardiomyozytenzellkerne sowie der Dimensionen erfolgte mit dem Plug-in „Analyze Particles“ der Software Fiji. Durch die zuvor erzeugte Maske wurden alle anderen Gewebestandteile ausgefiltert und nur die Zellkerne der Kardiomyozyten analysiert.

Für die Berechnung des Flächenanteils wurden die segmentierten Kerne in einem Binärbild mit der Software Fiji („Measure“) vermessen. Das Ergebnis der Gesamtfläche wurde durch die erkannten Zellen dividiert womit man als Zusatzinformation die durchschnittliche Größe der Zellkerne im Verhältnis zur gesamten Fläche erhält.

## **2.5 Bestimmung von Anzahl und Fläche der Kardiomyozyten**

Bei einer Herzhyperplasie, beispielsweise durch die Vergrößerung der linken Herzkammer durch einen Klappenfehler, kommt es zur Zunahme an Kardiomyozyten (Lüllmann-Rauch 2009, S230).

Massezunahmen sind jedoch in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle durch eine Größenzunahme der Zellen und nicht durch eine Vermehrung der Zellen verursacht. Die Bestimmung der Anzahl an Kardiomyozyten kann daher in weiterer Folge unter Berücksichtigung des Flächenanteils der Kardiomyozyten auch herangezogen werden, um die Größe der im Bild sichtbaren Kardiomyozyten zu berechnen.

### **2.5.1 Bildvorverarbeitung**

Eine automatische Segmentierung und somit Zählung der Kardiomyozyten war nicht möglich da die Zellgrenzen in den vorliegenden Färbungen selbst für das menschliche Auge nur sehr schwer zu erkennen sind. Es wurde daher die Berechnung der Anzahl an Kardiomyozyten basierend auf der Anzahl der identifizierten Zellkerne durchgeführt.

Die überwiegende Mehrheit der Kardiomyozyten besitzt einen Zellkern. Daher konnte die Zellzahl mithilfe der im Bild segmentierten Zellkerne bestimmt werden.

Die Herausforderung bei der Bestimmung der Anzahl an Kardiomyozyten war es vor allem, die Zellkerne der Kardiomyozyten von jenen des Bindegewebes zu unterscheiden, da eine Segmentierung der Fibrozyten- und Endothelzellkernen das Ergebnis stark verfälschen würde. Im vorigen Kapitel wurden die entsprechenden Bildverarbeitungsschritte bereits beschrieben. Der dort entwickelte Algorithmus bzw. das Ergebnis der Analyse wurde als Basis für diese Berechnung herangezogen.

## **2.5.2 Berechnung der Anzahl an Kardiomyozyten im Bild**

Die im vorigen Kapitel ermittelte Anzahl an Zellkernen lässt noch keinen unmittelbaren Rückschluss auf die tatsächliche Anzahl an im Bild sichtbaren Kardiomyozyten zu. Die Anzahl an Kardiomyozyten im digitalisierten histologischen Schnitt kann aber abhängig von einigen nachfolgend beschriebenen Punkten berechnet werden. Diese wird durch folgende Parameter beeinflusst:

### **Qualität der Segmentierung**

Je nach Qualität der Segmentierung der Zellkerne wird ein gewisser Prozentsatz an Zellkernen korrekt identifiziert. Die Algorithmen sind in der Regel relativ stabil, unabhängig vom Bildmaterial wird ein gewisser Anteil an vorhandenen Zellkernen korrekt identifiziert. Aufgrund der schon erwähnten Einflussfaktoren wie Fibrozyten- und Endothelzellkernen oder den perinukleären Höfen ist eine hundertprozentig korrekte Segmentierung nahezu unmöglich. Die Erkennungsrate lag je nach Algorithmus zwischen 58% und 88%. Das bedeutet, dass die erkannten Zellkerne um den entsprechenden Faktor multipliziert werden müssen um die tatsächliche Anzahl an Zellkernen anzunähern.

### **Zellkerne pro Kardiomyozyt**

Kardiomyozyten besitzen üblicherweise einen Zellkern, ein gewisser Prozentsatz enthält jedoch zwei oder mehr Zellkerne. In der Literatur finden sich Raten von 4,5% (Wohlschlaeger et al. 2010) bis 25,5% (Olivetti et al. 1996) an zweikernigen Zellen. Korecky et al. fanden in einer Studie über Herzmuskelzellkerne von Säugetieren einen Anteil von  $10 \pm 2,2\%$  in menschlichen Herzen (Korecky et al. 1979). Aufgrund der Literaturangaben kann man davon ausgehen, dass durchschnittlich etwa 10% der Kardiomyozyten zwei Zellkerne enthalten. Da die Zellkerne zentral gelegen sind, ist die Wahrscheinlichkeit beide im horizontalen Schnitt zu visualisieren groß.

Vereinzelt kommen auch drei- und vierkernige Zellen vor, die Anzahl dürfte jedoch verschwindend gering sein und kann daher vernachlässigt werden.

### **Den Winkel des Schnittes**

Da der Zellkern bei einem horizontalen Schnitt mit größerer Wahrscheinlichkeit geschnitten wird als bei einem vertikalen Schnitt muss auch die Orientierung des Gewebes in die Bestimmung der im Bild sichtbaren Kardiomyozyten einfließen.

Wird das Gewebe horizontal geschnitten so ergibt sich aufgrund des Verhältnisses von Breite des Zellkerns zu Breite der Zelle eine Wahrscheinlichkeit von ca. 50%, dass der Zellkern geschnitten wird. In einem vertikalen Schnitt ist die Wahrscheinlichkeit aufgrund des größeren Längenunterschieds mit ca. 15% geringer. Je horizontaler der Schnitt erfolgte, desto höher war somit auch die Wahrscheinlichkeit, dass der Zellkern geschnitten und im histologischen Schnitt dargestellt wurde. Die tatsächliche Anzahl an Kardiomyozyten ist folglich abhängig vom Neigungswinkel  $\alpha$  und somit in etwa das 2- bis 6-fache höher als die Zahl der dargestellten Zellkerne.

Daraus ergibt sich folgende Formel zur Berechnung der Anzahl an Kardiomyozyten  $N_c$  im Bild,

$$N_c = 0,9 \frac{1}{f_\alpha} \frac{N_d}{\varepsilon}$$

wobei:

$N_d$ .....Anzahl detektierter Zellkerne.

$\varepsilon$ .....Faktor um den die Anzahl der Zellkerne aufgrund der Segmentierungsergebnisse erhöht werden muss. Dieser berechnet sich aus der Anzahl der automatisch detektierten Zellkerne dividiert durch die tatsächliche Anzahl an Zellkernen im histologischen Schnitt, welche manuell bestimmt wurde.

0,9.....Konstante, da 10% der Kardiomyozyten zweikernig sind.

$f_\alpha$ .....Korrekturfaktor, der das Verhältnis der sichtbaren Zellkerne zu den vorhandenen Fasern im histologischen Schnitt, basierend auf dem Neigungswinkel, angibt:

$$f_\alpha = \frac{1}{6 - 4(\sin(90 - \alpha))}$$

Das bedeutet, dass bei einem Neigungswinkel von  $0^\circ$ , also längs des Zellkerns, die Anzahl mit ca. 2 multipliziert wird. Die Wahrscheinlichkeit einen Zellkern zu treffen ist in diesem Fall aufgrund der Längen/Breitenverhältnisse von Zelle zu Zellkern ca.  $\frac{1}{2}$  ist. Bei einem Schnitt quer durch den Zellkern, also einem Neigungswinkel von  $\alpha=90^\circ$  wird mit 6 multipliziert.

### **2.5.3 Validierung der Ergebnisse**

Das Referenzbild wurde manuell segmentiert und die einzelnen Muskelzellen farblich markiert. Das Ergebnis wurde mit der Berechnung verglichen.

## **2.6 Kardiomyozyten - Bestimmung des Flächenanteils**

Der prozentuale Anteil an Kardiomyozyten im histologischen Schnitt kann Hinweise auf das Vorliegen einer Krankheit bzw. einer pathologischen Veränderung des Herzens wie Hypertrophie, Atrophie, Kardiomyopathie oder Myozytolyse geben.

Die Bestimmung des Flächenanteils der Kardiomyozyten kann durch ein Schwellwertverfahren oder durch Farbfaltung errechnet werden. Es gibt auch die Möglichkeit der mathematischen Berechnung. Eine nahezu exakte Berechnung kann mit der Formel

$$\begin{aligned} \text{Fläche (Kardiomyozyten)} \\ = \text{Gesamtfläche} - (\text{Bindegewebe inkl. Zellkerne}) - \text{Interstitium} \end{aligned}$$

durchgeführt werden. Die Parameter Gesamtfläche und Bindegewebe inklusive Zellkernen sind bereits bekannt, zu bestimmen ist noch der Anteil der gewebefreien Zellzwischenräume, wie sie in Abbildung 17 dargestellt sind. Diese können vor allem durch Blutgefäße, Fettzellen oder Degeneration der Myokardfasern entstehen (Kühnel 2014, S172).

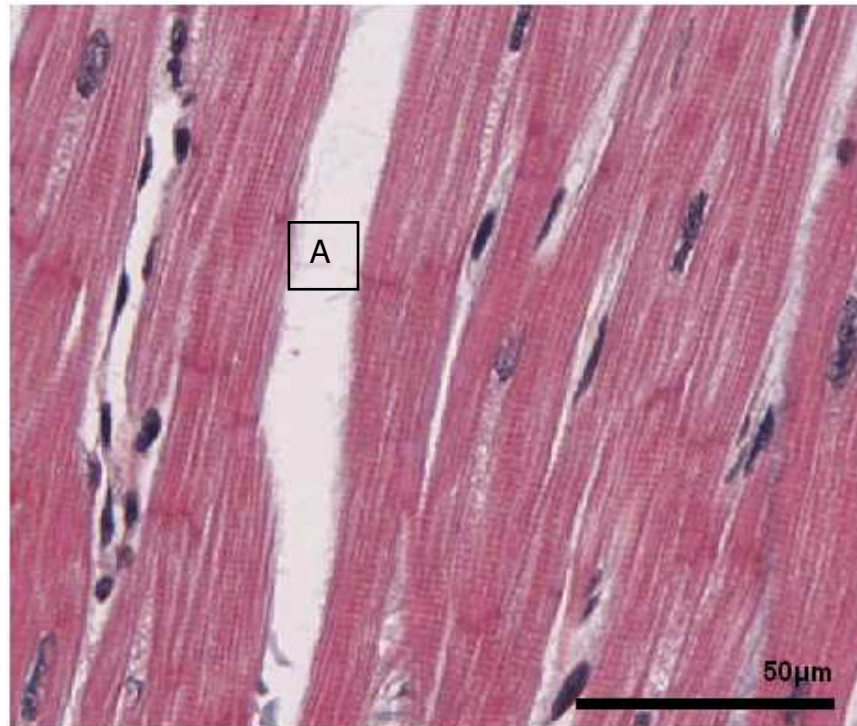


Abbildung 17: Gewebefreie Zellzwischenräume (A) in einem digitalisierten histologischen Schnitt.

In praktischen Versuchen erweist sich die Farbentfaltung als zielführend, damit gelingt die Kardiomyozyten eindeutig zu identifizieren.

Folgende Bildverarbeitungsschritte wurden dementsprechend durchgeführt, um die Kardiomyozyten im Bild zu segmentieren:

- 1.) Color Deconvolution mit
  - a.  $[r1]=0.28175664$   $[g1]=0.76879025$   $[b1]=0.574086$
  - b.  $[r2]=0.45382735$   $[g2]=0.6876172$   $[b2]=0.56676567$
  - c.  $[r3]=0.5215309$   $[g3]=0.69071317$   $[b3]=0.50092$ )
- 2.) Medialfilter (Radius=10) auf Farbe 1
- 3.) Binärbild erzeugen
- 4.) Messen der Farbverteilung

Der Programmcode ist im Anhang zu finden.

## 2.7 Faserorientierung

Um die für die Bestimmung der Faserorientierung geeignetste Struktur im Bild zu eruieren, wurde eine manuelle Analyse des Faserverlaufes und die Identifizierung der am besten für eine automatische Detektion geeigneten Struktur an den zuvor gefertigten und digitalisierten histologischen Schnitten durchgeführt. Hierfür wurde für 10 Fasern aus unterschiedlichen Positionen in den Trichrome (nach Gieson) Bildern der Winkel  $\varphi_0$  in der  $x/y$  Ebene bestimmt. Diese Winkel dienten als Referenzwinkel, welche in weiterer Folge mit den ebenfalls manuell vermessenen Winkeln  $\varphi$  der Strukturen Zellkern, Glanzstreifen, Zellmembran und Myofibrillen verglichen wurden. Die manuellen Winkelmessungen wurden mit dem „Angle Tool“ in der Software Fiji durchgeführt.

Alle Ergebnisse dieser manuellen Winkelmessung, sind in Tabelle 7, Kapitel 3, aufgelistet.

Die Schlussfolgerung aus dieser Analyse war, dass sich der Nukleus und die Myofibrillen aufgrund ihrer mikroanatomischen Eigenschaften und ihrer Detektierbarkeit am besten für die Ermittlung der zweidimensionalen Faserrichtung eignen.

Einige Bildverarbeitungsmethoden und Verfahren, welche prinzipiell oder durch geringe Modifikationen in der Lage sind, Richtungen in einem Bild zu detektieren, werden in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben.

### 2.7.1 Methoden für die Bestimmung der Faserorientierung

Mittels Literaturrecherche wurden bereits in der Forschung angewendete Methoden für die Erkennung der Orientierungen in einem Bild definiert. Diese Methoden wurden sowohl auf menschliches als auch tierisches Gewebe, aber beispielsweise auch für die Analyse der Struktur von Papier oder der Meeresoberflächen herangezogen.

Alle Methoden wurden auf das gleiche, zuvor ausgewählte Referenzbild (Trichrome Färbung nach Gieson, erzeugt am Institut für Pathologie der Medizinischen Universität Graz) angewendet und gegebenenfalls modifiziert um die Tauglichkeit für den Zweck der Arbeit zu testen und mit dem entwickelten Algorithmus zu vergleichen. Als Referenz für die Genauigkeit diente die manuelle Vermessung der einzelnen Zell-Orientierungen.

### **2.7.1.1 Manuelle Vermessung**

Es erfolgte die Bestimmung der Faserorientierung durch manuelle Winkelmessung an der Faser als Ganzes, am Zellkern, den Glanzstreifen, der Zellmembran und den Myofibrillen. Die Vermessung erfolgte in der Software Fiji mittels Winkelmessung mit dem „Angle Tool“. Die Orientierung der Fasern als Ganzes wurde anhand des subjektiven Eindrucks des Faserverlaufs bestimmt. Der Zellkern wurde anhand des längsten Durchmessers der Ellipse, welche durch den Schnitt durch einen Zellkern entsteht, vermessen. Die Vermessung der Glanzstreifen erfolgte durch das Legen einer Geraden vom Anfangspunkt zum Endpunkt und einer orthogonalen Winkelmessung. Die Zellmembran wurde in Ihrer Gesamtheit vermessen und der durchschnittliche Winkel berechnet. Die Vermessung der Myofibrillen anhand einer oder mehrerer repräsentativer Myofibrillen, welche in der Trichrome Färbung (nach Gieson) sehr gut identifizierbar sind.

Die Vermessung der Kardiomyozyten wurde unabhängig von drei unterschiedlichen Personen durchgeführt.

### **2.7.1.2 Hesse Matrix**

Die Hesse Matrix beschreibt wie bereits in Kapitel 1.5.1. dargelegt, die Krümmung einer Funktion und ist die Matrix der zweiten partiellen Ableitung.

Die Analyse wurde mit dem Plug-in „Differentials“ der Software Fiji, Option „Hessian Orientation“, durchgeführt (Thévenaz et al. 2000).

### **2.7.1.3 Fourier-Transformation**

Mittels Fourier-Transformation erfolgt die Quantifizierung des Spektrums aller Frequenzen innerhalb eines Bildes.

Die Anwendung der Fourier-Transformation auf das Bild erfolgte mittels der FFT Funktion der Software Fiji, abrufbar im Menü „Process“ → „FFT“ → „FFT“, basierend auf einer Arbeit von Arlo Reeves (Reeves 1990).

Eine weitere Analyse der Faserorientierung im Referenzbild mittels Fourier-Transformation erfolgte mit der Software Fiji (ImageJ Version 1.49m). Verwendet wurde das Plug-in „Directionality Analysis v2.0.1“ mit den Optionen

- Method: „Fourier Components“

- Nbins: 90
- Histogram start:  $-90^\circ$

Der Algorithmus basiert auf der Untergliederung des Bildes in kleine Quadrate, das Frequenzspektrum wird darauffolgend für jeden Winkel basierend auf den vorgeschlagenen Ortsfiltern von Liu berechnet (Liu 1991).

#### ***2.7.1.4 Lokale Gradienten, lokal-dominante Orientierungen***

Bei diesen Methoden erfolgt zur Bestimmung der Orientierung die Analyse der Gradienten im Bild. Statt der Häufigkeit von Grauwerten wird die Häufigkeit von Kantenrichtungen gemessen, dadurch ist die Erstellung eines Richtungshistogramms möglich. Eine genauere Beschreibung der Methode findet sich in Kapitel 1.5.1.

Die Analyse der Faserorientierung mittels lokaler Gradienten im Referenzbild erfolgte mit der Software Fiji (ImageJ Version 1.49m). Verwendet wurde das Plug-in „Directionality Analysis v2.0.1“ mit den Optionen

- Method: „Local gradient orientation“
- Nbins: 90
- Histogram start:  $-90^\circ$

#### ***2.7.1.5 Grey level co-occurrence matrix***

Basierend auf der „grey level co-occurrence matrix“ (GLCM), beschrieben in Kapitel 1.5.1 wird für die Evaluierung der Verwendbarkeit für die Bestimmung der Faserorientierung die „orientation dependent“ GLCM angewendet (Hu et al. 2012).

Für die Auswertung wurde das Plug-in „Textural features based in GLCM, Version 0.4“ verwendet. Das zuvor in ein Binärbild umgewandelte Referenzbild (Abbildung 11) wurde in der Software Fiji mit der Funktion „Rotate“ wiederholt um  $1^\circ$  rotiert und jeweils der Texturparameter „Kontrast“ bestimmt.

Die Parameter für die Berechnung der GLCM Features wurden wie folgt gewählt:

- Distanz: 1 Pixel
- Orientierung:  $0^\circ$

Mit diesen Einstellungen muss der Kontrast im Falle eines horizontalen Faserverlaufs minimal sein, da im Bild sehr wenige Übergänge weiß / schwarz vorhanden sind. Das Bild wurde solange um  $1^\circ$  rotiert (Fiji Funktion „Rotate“) bis der Kontrast minimal war, wodurch festgestellt werden konnte, in welchem Rotationswinkel der Faserverlauf horizontal war. Der Rotationswinkel ergab damit den dominanten Winkel  $\varphi$  des gesamten Bildes.

### **2.7.1.6 Structure Tensor**

Als „Structure Tensor“ bezeichnet man eine vom Gradienten einer Funktion abgeleitete Matrix.

Basierend auf der Arbeit von Niessen et al. wurde hier das Plug-in „Orientation J“ der Software Fiji auf das Referenzbild angewendet um mittels Structure Tensor die Faserorientierungen zu bestimmen (Niessen et al. 1997). Die Parameter setzten sich wie folgt zusammen: Structure Tensor: „Gauß-Fenster Sigma“=“1“, „Cubic Spline Gradient“. „Hue“=“Original-Image“, „Saturation“=“Orientation“, „Brightness“=“Original-Image“.

## **2.7.2 „Nucleus Based Orientation“ (NBO) Methode zur Bestimmung der Faserorientierung**

### **2.7.2.1 Bestimmung der Faserorientierung in x/y-Richtung**

Ein Zellkern hat in etwa die Form eines Kreiszyinders. Ein histologischer Schnitt durch den Zellkern führt zur Darstellung einer Ellipse. Die genaue Analyse der histologischen Schnitte und im speziellen der Zellkerne lässt die Vermutung zu, dass die Fasern in jene Richtung orientiert sind, in denen die Fläche der Ellipse den maximalen Durchmesser erreicht. Dieser Winkel, nachfolgend als  $\varphi$  bezeichnet ist besonders für die automatische Detektion geeignet, da sich die Zellkerne wie bereits im Kapitel 2.4., „Kardiomyozyten – Anzahl und Dimension der Zellkerne“, beschrieben durch entsprechende Bildverarbeitungsschritte segmentieren lassen und aus den segmentierten Ellipsen der maximale Durchmesser berechnen lässt.

Die Hauptscheitelpunkte S1 und S2 bilden eine Gerade die wiederum mit der Horizontalen einen Winkel  $\varphi$  bildet welcher die Faserorientierung in x/y-Richtung repräsentiert. Diese Faserorientierung kann sehr ausgeprägt oder nur minimal sein, je nachdem wie der

Kreiszyylinder in  $z$ -Richtung geschnitten wurde. Die Segmentierung und die daraus entstehende Kontur des Zellkerns sowie der daraus bestimmbare Winkel  $\varphi$  sind in Abbildung 18 dargestellt.

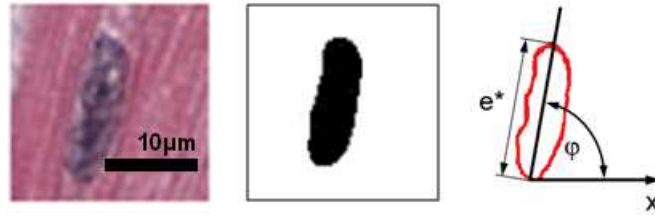


Abbildung 18: Die Faserorientierung in  $x/y$ -Richtung wird durch den Winkel der Hauptachse ( $e^*$ ) der Ellipse zur Horizontalen ( $x$ ) berechnet (adaptiert nach Zach et al. 2016, Abbildung 4, Lizenz: CC BY 4.0).

Theoretisch ist es auch möglich, dass der Zellkern genau plan geschnitten wird und zwar dann, wenn der Zellkern orthogonal zur Schnittfläche liegt. Dieser Fall ist in Abbildung 19 (B) dargestellt. Dann ergibt sich als Schnittfläche annähernd ein Kreis und der maximale und minimale Durchmesser des Zellkerns wären nahezu gleich. Die alleinige Berechnung des maximalen Durchmessers der Schnittfläche ist demnach noch nicht aussagekräftig. Es müssen der maximale und der minimale Durchmesser der Schnittfläche bestimmt werden.

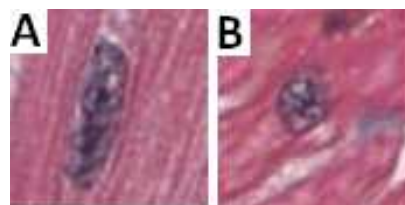


Abbildung 19: Schnitt durch einen Kardiomyozyten-Zellkern anhand von zwei Beispielen. (A) lässt auf eine horizontale Ausrichtung des Zellkerns schließen, (B) auf eine eher vertikale Orientierung des Zellkerns und somit der Kardiomyozytenfaser.

Grundlegend für diese NBO Methode ist die erfolgreiche und qualitativ hochwertige Segmentierung der Kardiomyozytenzellkerne, die Anzahl der „falsch positiven“ Segmentierungen, beispielsweise von Fibrozyten- oder Endothelzellkernen muss möglichst gering sein. Die Segmentierung ist in Kapitel 2.4. beschrieben.

Folgende Bildverarbeitungsschritte und Berechnungen wurden durchgeführt um die Faserorientierung in  $x/y$ -Richtung zu bestimmen.

- Zellkerne segmentieren, wie in Kapitel 2.4. beschrieben
- Segmentierte Bereiche Analysieren (Analyze Particles)
- Es werden die langen Achsen der Schnittfläche des Zellkerns in Relation zur Horizontalen gesetzt
- Speichern der Ergebnisse in einer Textdatei

Der Programmcode ist im Anhang zu finden.

### ***2.7.2.2 Bestimmung der Faserorientierung in z-Richtung mittels Zellkerndimensionen***

Da sich die Faserorientierung mit den zuvor genannten Methoden in einem zweidimensionalen histologischen Schnitt nur in  $x/y$ -Richtung bestimmen lässt ist es nun erforderlich eine Methode zu entwickeln, die es ermöglicht aus den zweidimensionalen Bildern die  $z$ -Richtung bzw. den Neigungswinkel  $\alpha$  des Zellkerns und somit auch des Kardiomyozyten bestimmen zu können.

Der Zellkern hat wie bereits in Kapitel 1 beschrieben in etwa die Form eines Kreiszyinders welcher bei der histologischen Bearbeitung in einem gewissen Winkel geschnitten wird. Die Schnittfläche eines Zylinders ist eine Ellipse und die Dimension der Schnittfläche (lange Achse und kurze Achse) lässt Rückschlüsse auf die Lage des Zylinders im Raum zu. Dieser Ansatz wird „Method of Ellipses“ genannt und wird beispielsweise zur Bestimmung der Orientierung von Polymer-Verbundwerkstoffen angewendet (Vélez-García et al., 2012). In einem Kreiszyinder hat die kurze Achse der durch einen Schnitt entstandenen Ellipse die gleiche Dimension wie die Ankathete und die lange Achse wie die Hypotenuse eines Dreiecks welches in Abbildung 20 zu sehen ist.

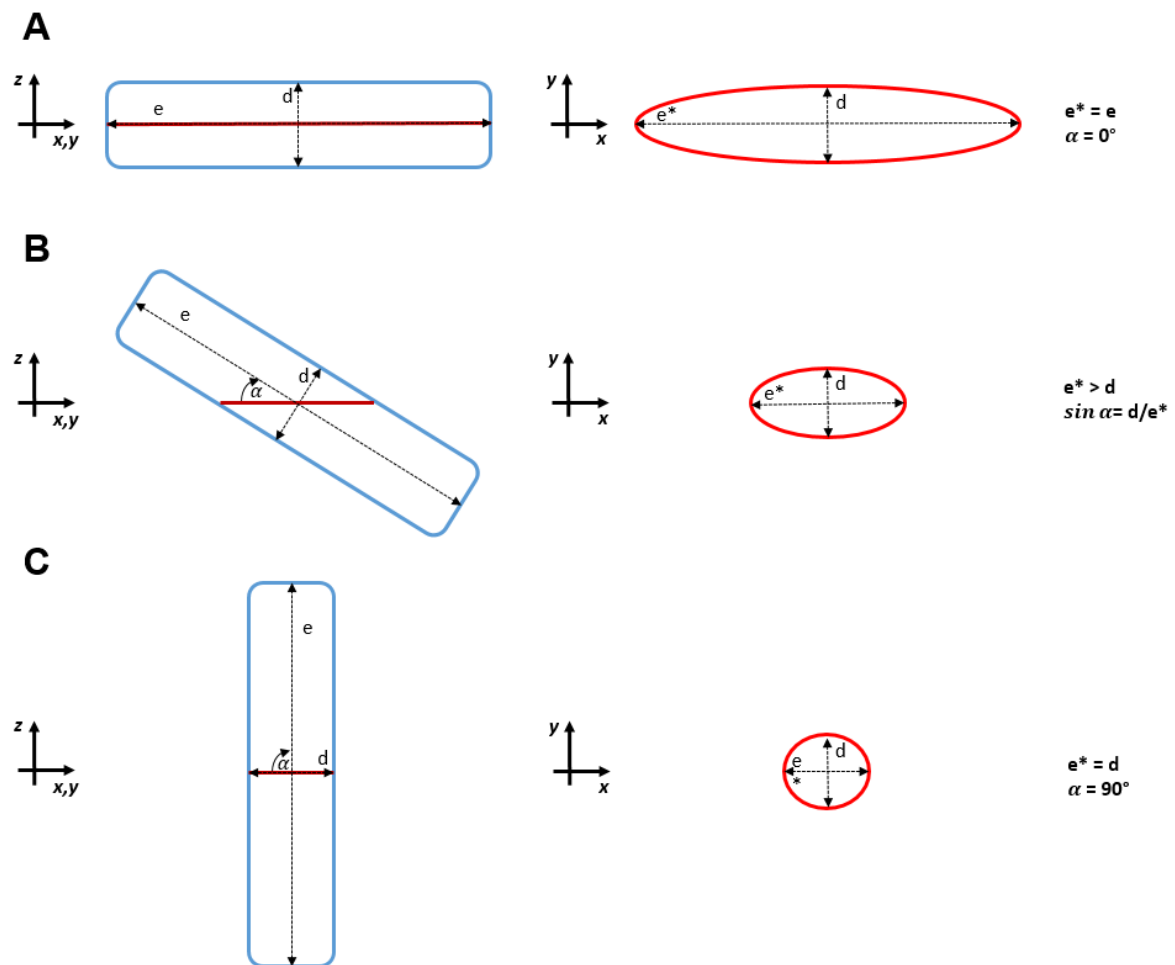


Abbildung 20: Schematische Geometrie der Schnitte und Neigungen eines Zellkerns. Die blauen Zylinder repräsentieren die laterale Sicht auf Zellkerne eines Kardiomyozyten mit unterschiedlichen Neigungswinkeln. Der plane Schnitt durch den Zellkern ist rot dargestellt. Die lange Achse des Zellkerns ist mit  $e$  bezeichnet, die kurze Achse mit  $d$ . Der ebene Schnitt führt zu einer langen Achse welche als  $e^*$  gekennzeichnet ist und eine unveränderte kurze Achse  $d$ . Der Neigungswinkel  $\alpha$  kann mittels des Dreiecks in (B) berechnet werden. (A) Paralleler (planer) Zellkern  $\alpha = 0^\circ$ . (B) Geneigter Zellkern. (C) Senkrechter Zellkern mit Neigungswinkel  $\alpha = 90^\circ$  (adaptiert nach Zach et al. 2016, Abbildung 5, Lizenz: CC BY 4.0).

Die lange Achse der Ellipse ist  $e^*$ , die kurze Achse ist  $d$ , wobei  $e^*$  gleichzeitig die Hypotenuse und  $d$  gleichzeitig die Gegenkathete eines rechtwinkligen Dreiecks darstellt. Der Winkel  $\alpha$  dieses Dreiecks ist gleichzeitig jener Winkel um den der Zellkern zur  $z$ -Achse geneigt ist.

### 2.7.2.3 Algorithmus zur Visualisierung der Faserorientierung und zur

#### **Berechnung des Neigungswinkels $\alpha$**

Aus den Erkenntnissen des vorangegangenen Kapitels ergibt sich folgender Ansatz: Gelingt es, die Zellkerne im Bild mit ihren Grenzen möglichst genau und zu identifizieren und die lange Achse sowie die kurze Achse der daraus entstehenden Schnittfläche (Ellipse) zu berechnen, ist es möglich, anhand dieser Maße, den vermuteten Neigungswinkel des Zellkerns sowie in weiterer Folge des Kardiomyozyten zu bestimmen.

Die Breite des Zellkerns  $d$  ist nach der Segmentierung bekannt, ebenso die Länge der Schnittfläche  $e^*$ , somit ergibt sich für den Neigungswinkel die Formel  $\sin \alpha = \frac{d}{e^*}$  bzw.  $\alpha = \arcsin \frac{d}{e^*}$ .

Der Zellkern hat eine endliche Länge und daher ergibt sich folgende Einschränkung: Bei einem maximalen Längen / Breitenverhältnis von 4:1 ist der spitzeste durch die Schnittfläche darstellbare Winkel 14,3 Grad. Bei spitzeren Winkeln muss davon ausgegangen werden, dass nicht mehr beide Seiten des Kreiszyinders geschnitten werden. Der Schnitt durch den gesamten Kreiszyinders ist die Voraussetzung für die korrekte Berechnung.

Die Umsetzung der Winkelmessung sowie der Markierung der Zellen inklusive des Richtungsvektors erfolgte in der Software Fiji in folgenden Schritten:

- Öffnen der originalen Bilddatei (histologischer Schnitt).
- Einlesen der Textdatei, welche bei der Segmentierung generiert wurde und die morphometrischen Daten der Zellkerne beinhaltet.
- Berechnung des Neigungswinkels  $\alpha$  jedes segmentierten Kerns anhand der Formel

$$\alpha = \arcsin \frac{\text{Achse}(kurz)}{\text{Achse}(lang)} * \left(\frac{180}{\pi}\right)$$

- Basierend auf den Koordinaten, an denen Zellkerne vermutet werden, und den errechneten Winkeln wurden Richtungsvektoren erzeugt und in das Bild eingefügt.
- Die Richtungsvektoren wurden für eine ergonomische Beurteilung durch den Betrachter in drei Klassen eingeteilt. Je nach errechnetem  $\alpha$ -Winkel erhält der automatisch eingezeichnete Richtungsvektor unterschiedliche Farben wobei die Farben alle 30° wechseln. Ein flacher Neigungswinkel von 0°-30° wird grün

dargestellt, ein Neigungswinkel von 31°-60° wird gelb dargestellt und ein spitzer Neigungswinkel von 61°-90° wird rot dargestellt.

- Öffnen der Bilddatei mit segmentierten Kernen.

Der Programmcode ist im Anhang zu finden.

Parametrisierung: Es ist möglich, die Visualisierung des Neigungswinkels (Farben) in kleinere oder größere Klassen einzuteilen. Die Größe des Richtungsvektors kann beliebig angepasst werden um dem Betrachter einen Eindruck über die Orientierungen im Bild geben zu können.

## 2.8 Validierung und Simulation

Für die Validierung wurde eine Simulation in der Bildverarbeitungssoftware Fiji programmiert. Das Ergebnis der Simulation ist ein Bild, welches ellipsenförmige Zellkerne mit entsprechender Chromatinverteilung in einem zufällig generierten Winkel beinhaltet. Als Hintergrund wurden aus fünf verschiedenen histologischen Schnitten repräsentative Gewebeabschnitte selektiert und zu einem Hintergrundbild zusammengefügt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Farbwerte für rot, grün und blau jenen von realem Gewebe entsprechen. Um die Unterscheidung der Bindegewebszellen zu validieren, wurden einige Areale mit der Form, dem Farbton und der Textur von entsprechenden Zellkernen gefüllt.

Sowohl die Dimensionen der Zellkerne als auch die Winkel wurden automatisch mittels Zufallsgenerators (Microsoft Excel, Funktion „RANDBETWEEN“) erstellt. Die Ergebnisse wurden in eine TAB-separierte Textdatei exportiert. Anhand der Parameter

- $x$ -Koordinate (horizontaler Mittelpunkt der Schnittfläche des simulierten Zellkerns  
Angabe in Pixel),
- $y$ -Koordinate (vertikaler Mittelpunkt der Schnittfläche des simulierten Zellkerns  
Angabe in Pixel),
- lange Achse der Schnittfläche des simulierten Zellkerns,
- kurze Achse der Schnittfläche des simulierten Zellkerns und
- Winkel  $\varphi_{\text{def}}$  ( $x/y$  Ausrichtung des simulierten Zellkerns)

wurden entsprechende Zellkerne generiert, wobei je nach Anwendungsfall bestimmte Grenzbereiche, z.B. für den automatisch generierten Winkel  $\varphi_{\text{def}}$ , definiert wurden. Die

Dimensionen der künstlich erzeugten Zellkerne entsprechen den realen Zellkernen, sowohl in der Länge als auch in der Breite. Es wurde auch darauf geachtet, in etwa die reale Häufigkeit an Zellkernen zu generieren. Bei einem Bildausschnitt von 1024 x 768 entspricht dies ca. 10 -20 Zellkernen.

Folgende Gewebetypen wurden simuliert: Gewebe mit eher horizontalem Faserverlauf und flachem Neigungswinkel, dargestellt in Abbildung 21, Gewebe mit schrägem Faserverlauf und flachem Neigungswinkel, dargestellt in Abbildung 22 und Gewebe mit steilem bzw. planem Neigungswinkel, dargestellt in Abbildung 23.

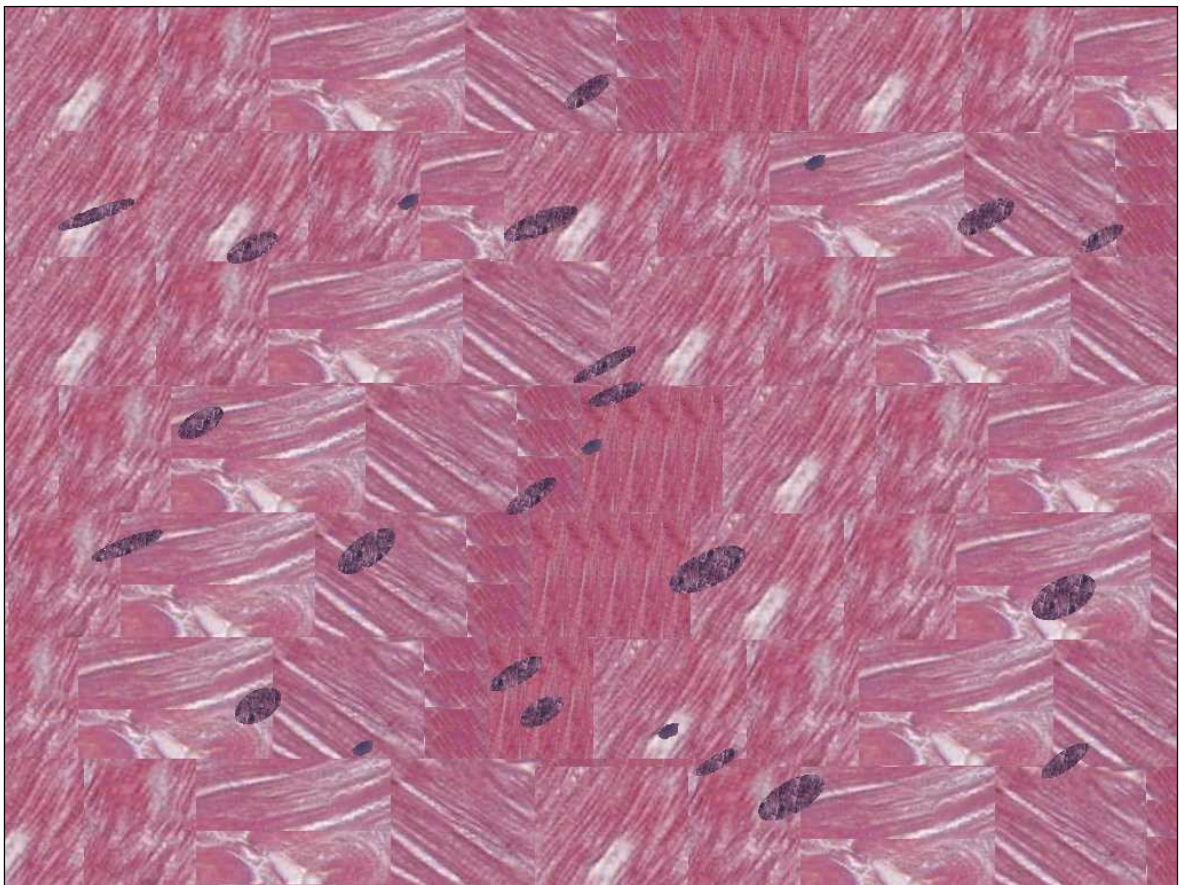


Abbildung 21: Simuliertes Gewebe mit eher horizontaler Ausrichtung der Zellkerne, die kleinen Zellkerne repräsentieren Bindegewebszellen.  $X$  und  $y$  im Bereich zwischen 50 und 980 sowie 50 und 730, lange Achse zwischen 20 und 35, kurze Achse zwischen 5 und 15, Winkel  $\varphi_{\text{def}}$  zwischen  $20^\circ$  und  $35^\circ$  und ein durchschnittlicher Winkel von  $28,25^\circ$ .

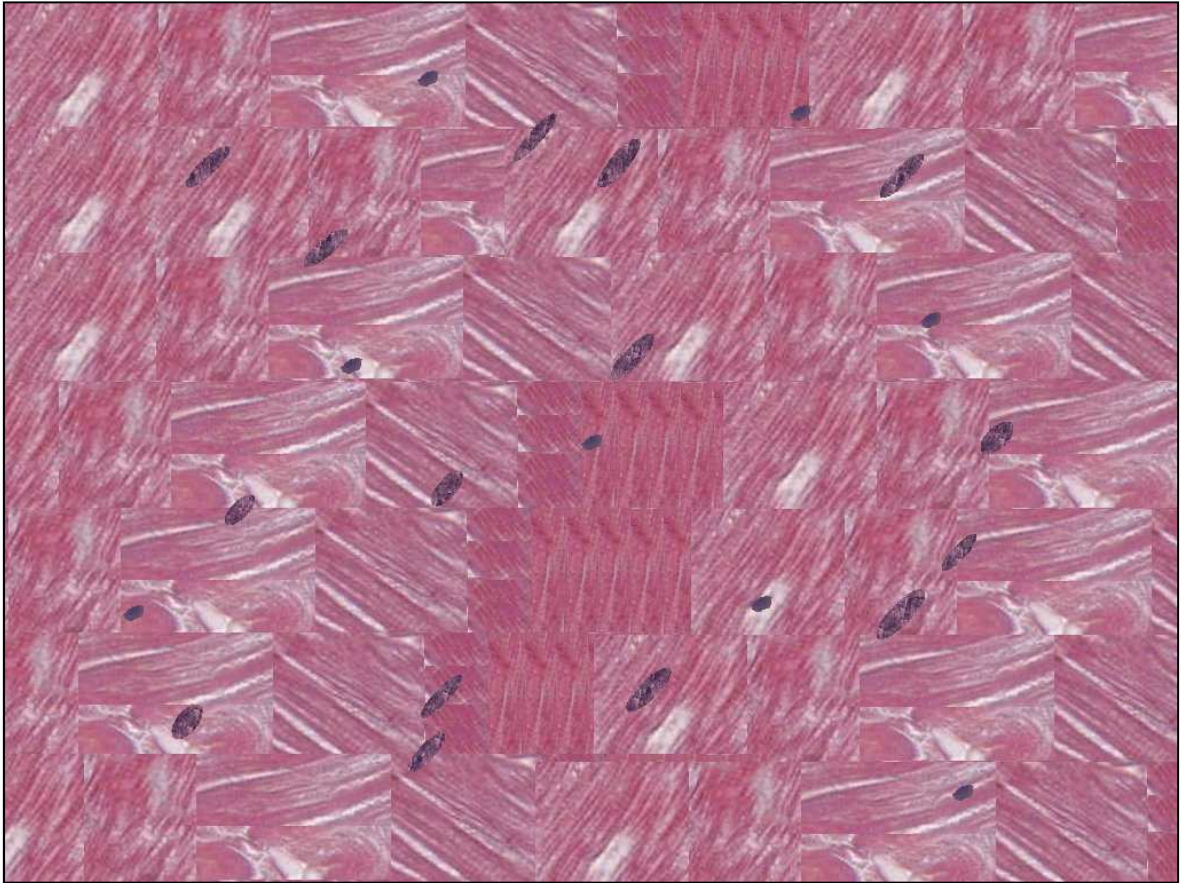


Abbildung 22: Simuliertes Gewebe mit steiler Ausrichtung der Zellkerne, die kleinen Zellkerne repräsentieren Bindegewebszellen.  $X$  und  $y$  im Bereich zwischen 50 und 980 sowie 50 und 730, lange Achse zwischen 15 und 30, kurze Achse zwischen 5 und 8, Winkel  $\varphi_{\text{def}}$  zwischen  $40^\circ$  und  $50^\circ$  und durchschnittlicher Winkel von  $44,15^\circ$ .

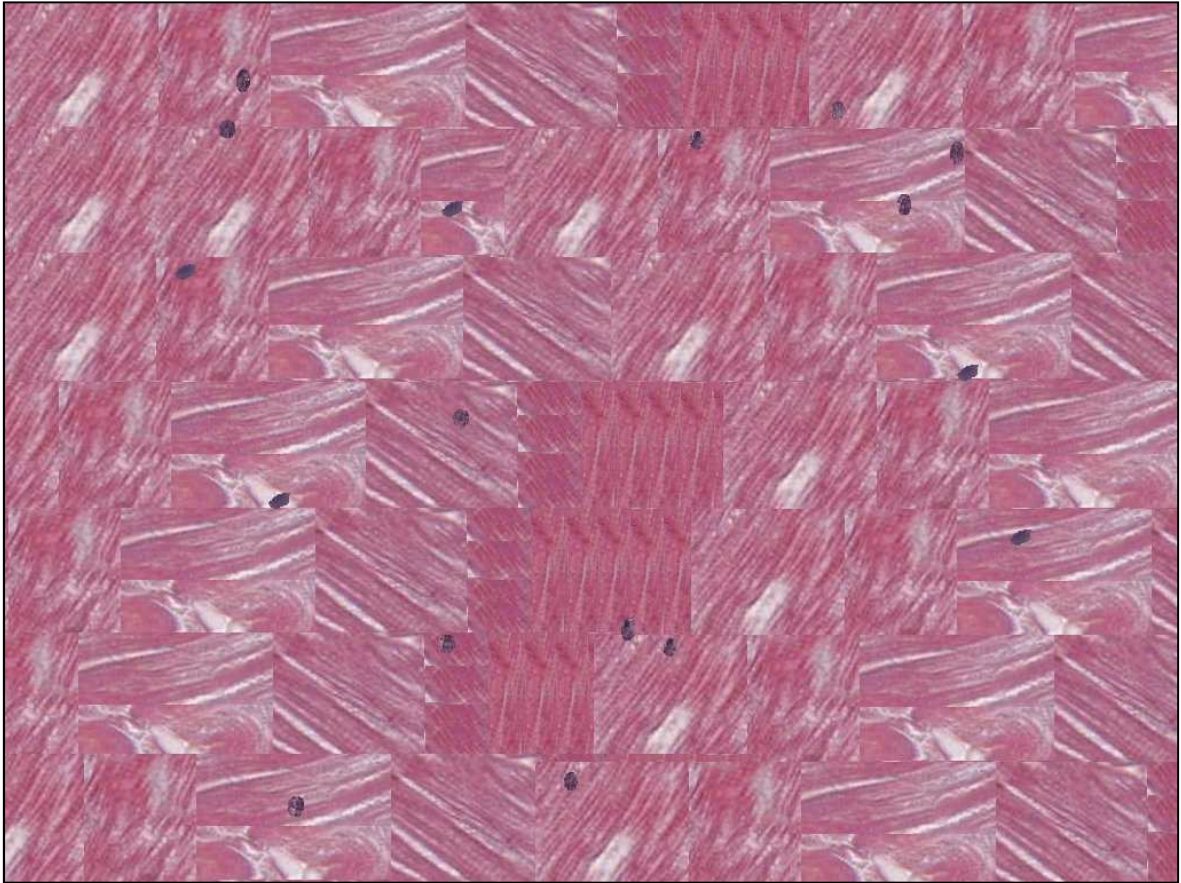


Abbildung 23: Simuliertes Gewebe mit planem Neigungswinkel und daher auch keiner signifikanten Ausrichtung von  $\varphi_{\text{def}}$ . X und y im Bereich zwischen 50 und 980 sowie 50 und 730, lange Achse zwischen 6 und 7, kurze Achse: Zwischen 5 und 6, Winkel  $\varphi_{\text{def}}$  zwischen  $80^\circ$  und  $90^\circ$  und durchschnittlicher Winkel von  $86,05^\circ$ .

Die erzeugten Bilder wurden mit dem in Kapitel 2.4.1.2 beschriebenen Algorithmus verarbeitet und die Ergebnisse der Orientierungsmessung mit den von einem Zufallsgenerator erstellten Werten verglichen.

Die Bildverarbeitungsschritte wurden wie folgt durchgeführt:

- Öffnen der Dateivorlage (Kardiomyozyten).
- Einlesen der Datei mit den definierten Winkeln und Zellkerngrößen.
- Erzeugung der Zellkernmasken an den definierten Positionen.
- Überlagerung mit der Dateivorlage (Kardiomyozytenzellkerne).

Der Programmcode ist im Anhang zu finden.

## 3 Ergebnisse

Insgesamt wurden elf Schnitte von zwei unterschiedlichen Präparaten angefertigt und ausgewertet. Die histologischen Schnitte wurden visuell auf die Eignung zur Visualisierung der Zell- und Gewebebestandteile analysiert. Es erwies sich der Zellkern als passendster Zellbestandteil um die Faserorientierung der Zelle zu bestimmen. Als geeignetste Färbemethode erwies sich die Trichrome Färbung nach Gieson, wobei vor allem die detaillierte Visualisierung des Zellkerns und des Bindegewebes ausschlaggebend für die Entscheidung die Studie mit dieser Färbung durchzuführen war. Basierend auf den in weiterer Folge zufällig ausgewählten Bildern wurde eine morphometrische Studie durchgeführt, wobei in einem repräsentatives Referenzbild (Abbildung 11) herangezogen und die Parameter Fibroseanteil, Fibrosetyp, Anzahl und Fläche der Zellkerne, Anzahl der Kardiomyozyten, Fläche der Kardiomyozyten, Faserorientierung  $x/y$  und Faserorientierung  $z$ , sowie weitere, sich daraus berechnende Charakteristika quantifiziert wurden.

Es zeigte sich, dass die vorgeschlagenen Algorithmen zur Zellkernidentifizierung gute bis sehr gute Ergebnisse lieferten, und die Faserorientierung mit großer Genauigkeit in  $x/y$  Richtung detektiert werden konnte. Dies konnte mit einer Simulation bestätigt werden. Äußerst interessant ist die gute Beschreibung des Neigungswinkels  $\alpha$  welcher basierend auf geometrischer Information des Zellkerns per Formel angenähert werden konnte. Die Segmentierung und die Berechnung der Winkel ermöglicht es an einem bestimmten Punkt im Bild die Frage nach der Anwesenheit eines Kardiomyozyten und dessen Faserorientierung zu beantworten. Durch die Identifikation und Vermessung der Zellkerne ist es somit gelungen, festzustellen, ob und in welcher Ausrichtung an einer bestimmten Position im Bild Kardiomyozyten vorhanden sind. Dies ist für die elektroanatomische Korrelation von großer Bedeutung. Die Resultate wurden visualisiert, wobei darauf geachtet wurde, dass der Betrachter auf einen Blick Auskunft über die Zellkerne, die Fibrose sowie die Faserorientierung in  $x/y$  sowie in  $z$ -Richtung erhält.

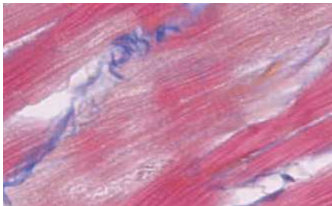
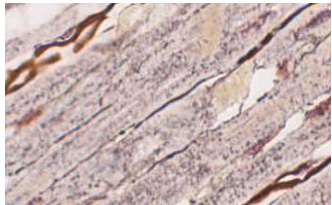
Nachfolgend findet sich die detaillierte Beschreibung der Ergebnisse.

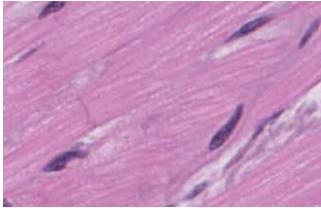
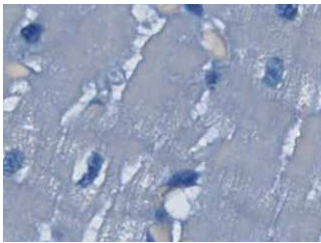
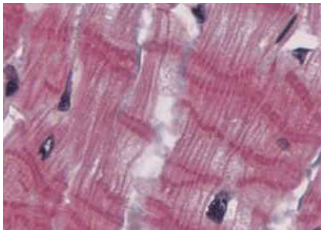
### 3.1 Histologie


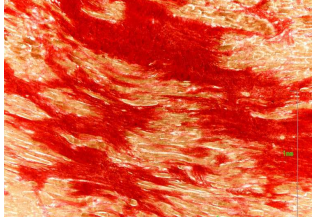
Das Ergebnis der Analyse der histologischen Färbungen ist nachfolgend in Tabelle 4 beschrieben. Für die Färbung von Herzgewebe mit dem Ziel, die Zellkerne und das

Bindegewebe darzustellen, haben sich die Trichrome und die Siriusrot Färbung als für den jeweiligen Zweck beste Färbemethoden erwiesen. Andere Techniken wie zum Beispiel die Gomori Färbung lieferten im Myokard sehr gute Teilergebnisse wie z.B. die Hervorhebung der Zellgrenzen. Wesentliche Bildinformationen wie Zellkern und Bindegewebe, welche für die Zielerreichung benötigt werden, sind nicht oder nur schwer zu identifizieren.

Tabelle 4: Tabellarische Auflistung und Charakterisierung der für die Evaluierung angefertigten Testfärbungen. Die Einteilung erfolgt folgendermaßen: +++ = ausgezeichnet, ++ = sehr gut, + = gut, - = schlecht, -- = sehr schlecht.

	<b>Methode</b>	<b>Nukleus</b>	<b>Glanzstreifen</b>	<b>Zellmembran</b>	<b>Myofibrillen</b>	<b>Bindegewebe</b>
<p><b>Azan</b></p>  <p>Sehr gute Darstellung der Myofibrillen, Zellgrenzen nicht erkennbar, Färbung der Muskelzellen rosa, Bindegewebe blau. Zellkerne eher schwach dargestellt.</p>		-	-	-	+++	++
<p><b>Gomori</b></p> 		--	-	++	-	++

<p>Diese Färbung stellt die Zelle bräunlich dar, Details sind schwach zu erkennen, jedoch sind die Zellgrenzen durch schwarze unterbrochene Linien zu erkennen. Die Zellkerne sind schwach zu erkennen.</p>					
<p><b>HE</b></p>  <p>Die HE Färbung stellt die Kardiomyozyten rosa und gut erkennbar dar, die Zellkerne sind dunkelblau und klar zu identifizieren.</p> <p>Myofibrillen und Zellgrenzen sind schwach bzw. gar nicht zu erkennen.</p>	+++	++	--	++	+
<p><b>Oelrot</b></p>  <p>Die Oelrot Färbung stellt die Kardiomyozyten, interzelluläres Gewebe, Zellgrenzen und Zellkerne in bläulicher Färbung dar. Die Zellgrenzen sind zwar sehr schwach erkennbar aber sie heben sich dennoch leicht von dem Blau der Kardiomyozyten ab.</p>	++	-	++	+	+
<p><b>Trichrome</b></p> 	+++	++	-	++	++

<p>Die Trichrome Färbung (nach Gieson) liefert eine gute Darstellung und Trennung der Kardiomyozyten und der Zellkerne. Interzelluläres Gewebe ist gut erkennbar. Es sind keine Zellgrenzen erkennbar, aber es zeigt sich eine sehr gute Darstellung der Myofibrillen.</p>					
<p><b>Sudanschwarz</b></p>  <p>Bei dieser Färbung sind die Kardiomyozyten schwarz gefärbt. Es sind weder Zellkerne noch Zellgrenzen gut erkennen.</p>	--	-	--	+	+
<p><b>Siriusrot</b></p>  <p>(Mayrhofer-Reinhartshuber et al. 2014, mit Genehmigung von Michael Mayrhofer-Reinhartshuber)</p> <p>Bei dieser Färbung zeigt sich eine außergewöhnlich gute Darstellung der Fibrose. Andere Detailinformationen wie z.B. der Zellkern werden nicht oder in geringer Qualität dargestellt.</p>	--	-	--	-	+++

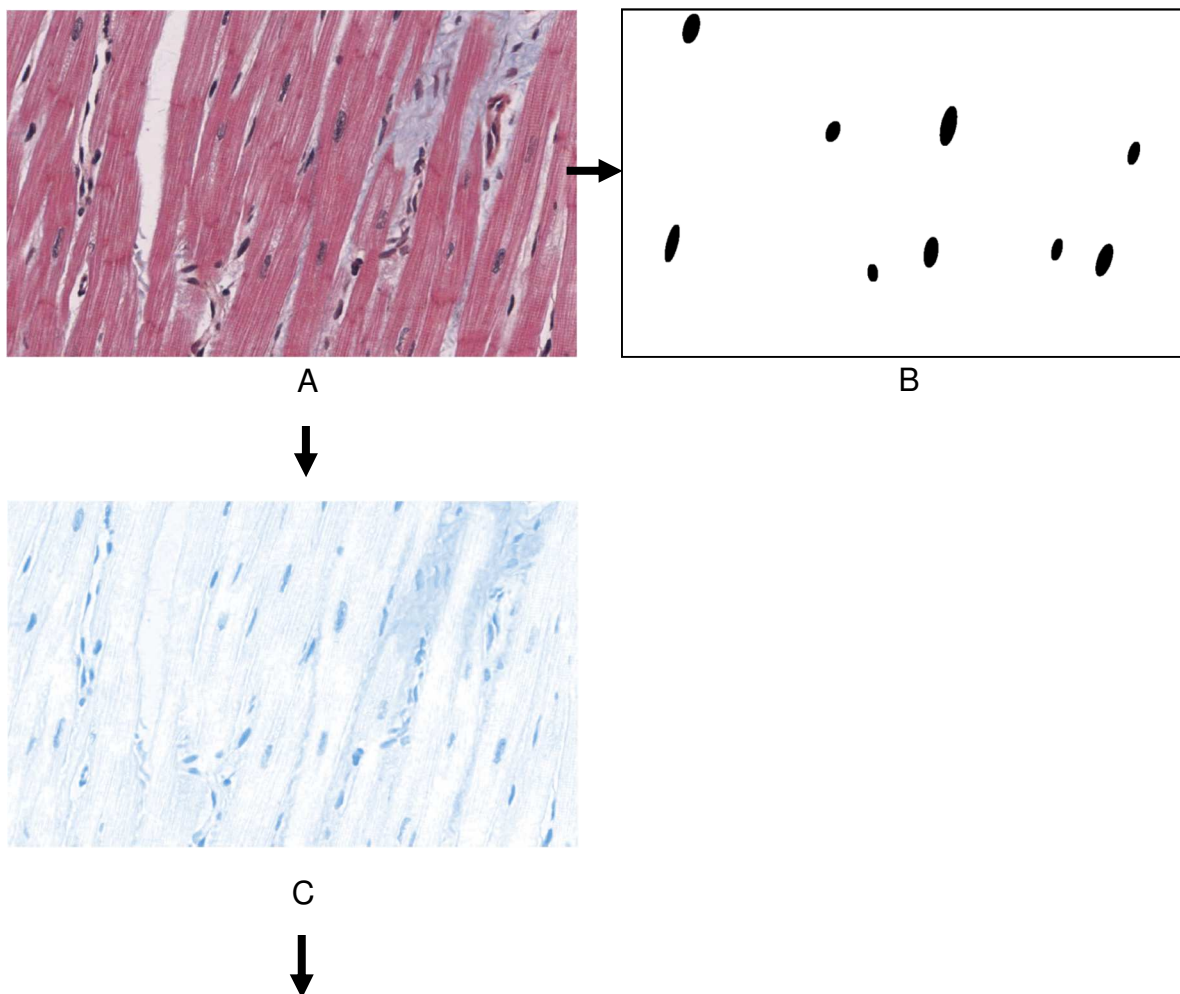
Die Ergebnisse der Evaluierung der Färbemethoden und die parallel dazu gewonnenen Erkenntnisse über die Möglichkeiten der Bestimmung der Morphologie (v.a. Faserorientierung und Fibroseanteil) ließ für den Zweck dieser Arbeit die Färbungen HE, Trichrome und Siriusrot in Frage kommen.

Die Entscheidung fiel schlussendlich aufgrund der guten Darstellung der Zellkerne auf die Trichrome-Färbung (nach Gieson). Das Referenzbild, auf das sämtliche in Kapitel 2 beschriebene Bildverarbeitungsschritte angewendet wurden, ist in Abbildung 11 dargestellt.

### 3.2 Bindegewebe: Bestimmung des Flächenanteils

Die Bestimmung des Anteils an Bindegewebe im Referenzbild konnte automatisiert durchgeführt werden. Die Ergebnisse können mit jedem beliebigen Bild, gefärbt mit Trichrome (nach Gieson), reproduziert werden. Im Referenzbild errechnet sich ein Bindegewebsanteil von zirka 9,8%, eine manuelle Validierung der Ergebnisse bestätigt die Exaktheit der Ergebnisse.

Nachfolgend in Abbildung 24 sind die Verarbeitungsschritte anhand des Referenzbildes aus Abbildung 11 visualisiert.



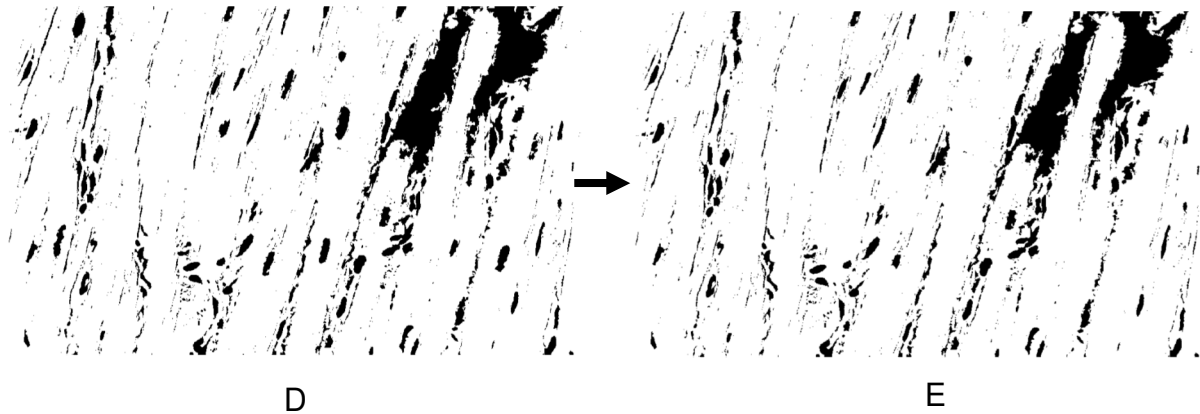

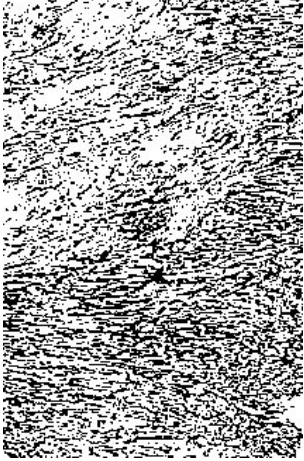




Abbildung 24: Automatische Berechnung des Bindegewebeanteils im Referenzbild, (A) zeigt das Originalbild. Aus dem Bild werden wie in Kapitel 2.4. beschrieben die Zellkerne extrahiert (B). Danach wird vom Originalbild eine Farbfaltung durchgeführt (C) und ein Binärbild erzeugt (D). Abschließend wird von (D) das Bild (B) subtrahiert und es bleiben die Gewebebestandteile übrig, die dem Bindegewebe zuzuordnen sind.

### 3.3 Bindegewebe: Analyse des Fibrosetyps

Die Anwendung der „grey level co-occurrence matrix“ (GLCM) auf Binärbilder von fibrotischem Gewebe zeigte interessante Resultate in Bezug auf die Beschreibung der Textur bzw. des Fibrosetyps, welche beispielhaft in der folgenden Tabelle 5 aufgelistet sind.

Tabelle 5: Anwendung der GCLM, wie in Kapitel 2.3 beschrieben, auf unterschiedliche Fibrosetypen. Links dargestellt das segmentierte Binärbild, in der rechten Spalte das Ergebnis der Anwendung der GLCM auf des entsprechende Bild.

Bild	Ergebnis
 <p data-bbox="236 786 644 1032">(Adaptiert nach De Jong 2011, S20, Abbildung 1, mit Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Lizenznummer: 3938090650115).</p>	<p data-bbox="676 248 1406 611">Wie erwartet ist der Kontrast mit einem Wert von 1406 sehr gering. Die Flächen sind sehr homogen. In anderen Richtungen zeigen sich keine wesentlichen Unterschiede, da die Richtungsabhängigkeit aufgrund der Homogenität hier keine Rolle spielt. Bei 90° Rotation ist der Kontrast mit 1698 nur unwesentlich höher.</p> <p data-bbox="676 689 1074 723">Kontrast (0°/90°): 1406 / 1698</p> <p data-bbox="676 745 1090 779">Entropie (0°/90°): 0,781 / 0,798</p>
 <p data-bbox="236 1547 644 1794">(Adaptiert nach De Jong 2011, S20, Abbildung 1, mit Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Lizenznummer: 3938090650115).</p>	<p data-bbox="676 1061 1406 1424">Die diffuse Fibrose weist einen sehr hohen Kontrast auf. In diesem Bild liegt der Kontrast bei 13376. Der Verlauf der Fasern ist eher horizontal. Dies bedeutet, dass der Kontrast in 90° Richtung noch höher sein muss, da es mehr Kanten in dieser Richtung gibt. Im Experiment bestätigt sich diese Annahme, der Kontrast beträgt im 90° Winkel 23378.</p> <p data-bbox="676 1503 994 1536">Kontrast: 13376 / 23378</p> <p data-bbox="676 1559 978 1592">Entropie: 1,128 / 1,254</p>

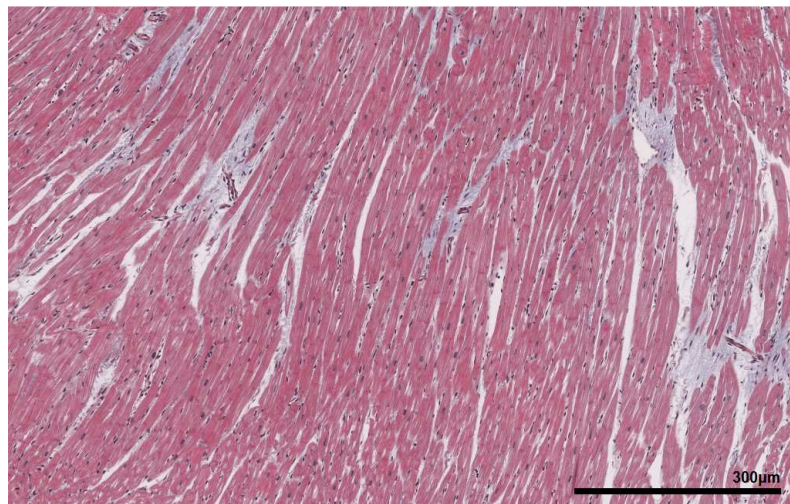
 <p>(Adaptiert nach De Jong 2011, S20, Abbildung 1, mit Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Lizenznummer: 3938090650115).</p>	<p>Dieser Fibrosetyp, die interstitielle Fibrose, zeichnet sich durch langgezogene Fibroseinlagerungen aus. Dieses Bild zeigt leicht nach oben geneigte, horizontale Faserverläufe. Der Kontrast in 0° Richtung ist dementsprechend mit 9981 geringer als in 90° Richtung, wo er 13388 beträgt.</p> <p>Kontrast: 9981 / 13388 Entropie: 0,894 / 0,956</p>
 <p>(Adaptiert nach De Jong 2011, S20, Abbildung 1, mit Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Lizenznummer: 3938090650115).</p>	<p>Die fleckige Fibrose weist mit 8382 nach der kompakten Fibrose in 0° Richtung den geringsten Kontrast auf wobei der Kontrast aufgrund des vertikalen Faserverlaufs in 90° Richtung mit 4510 noch wesentlich geringer ist.</p> <p>Kontrast: 8382 / 4510 Entropie: 0,883 / 0,767</p>

Die Auswertung der Anwendung der GLCM bzw. der Haralick'schen Texturparameter zeigt, dass aufgrund von Kontrast und Entropie eine Identifikation von diffuser und kompakter Fibrose möglich ist. Kontrast und Entropie sind bei kompakter Fibrose vergleichsweise sehr gering. Dies basiert auf den homogenen Bildarealen. Umgekehrt

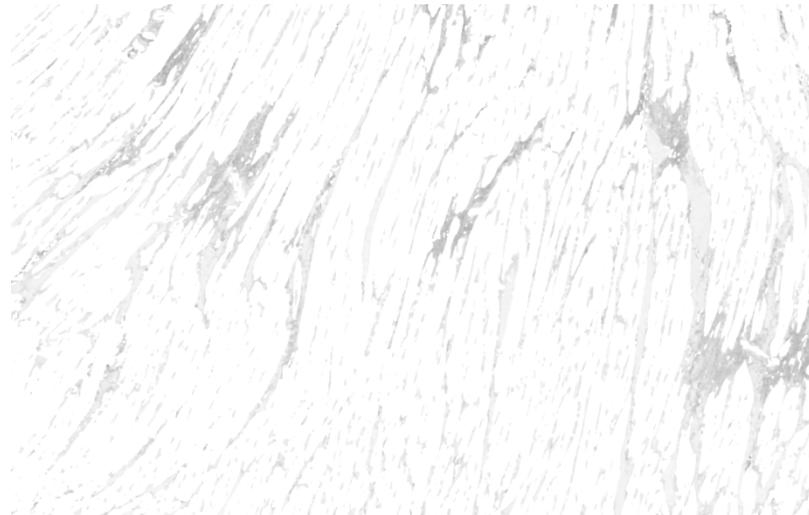
verhält sich dies bei der diffusen Fibrose, wo aufgrund der vielen kleineren fibrotischen Bereiche eine starke Inhomogenität vorherrscht.

Schwieriger wird die Unterscheidung bei der interstitiellen und der fleckigen Fibrose. Diese zwei Fibrosetypen sind zwar eindeutig von der kompakten und der diffusen Fibrose abgrenzbar, weisen jedoch untereinander starke Ähnlichkeiten auf. Für eine Unterscheidung müssen die beiden Fibrosetypen in die Faserorientierung rotiert werden. Wenn die Faserorientierung entlang der Horizontalen erfolgt ist eine Unterscheidung anhand des Kontrasts möglich, da die fleckige Fibrose größere zusammenhängende Areale abdeckt als die interstitielle Fibrose. Durch die Rotation und Ausrichtung auf die Faserorientierung erhalten die zusammenhängenden Areale größere Bedeutung für die Berechnung des Kontrasts. Sind beide Fibrosetypen korrekt ausgerichtet (niedrigster Kontrast innerhalb einer 90° Rotation) ist der Kontrast der fleckigen Fibrose weitaus niedriger als jener der Interstitiellen.

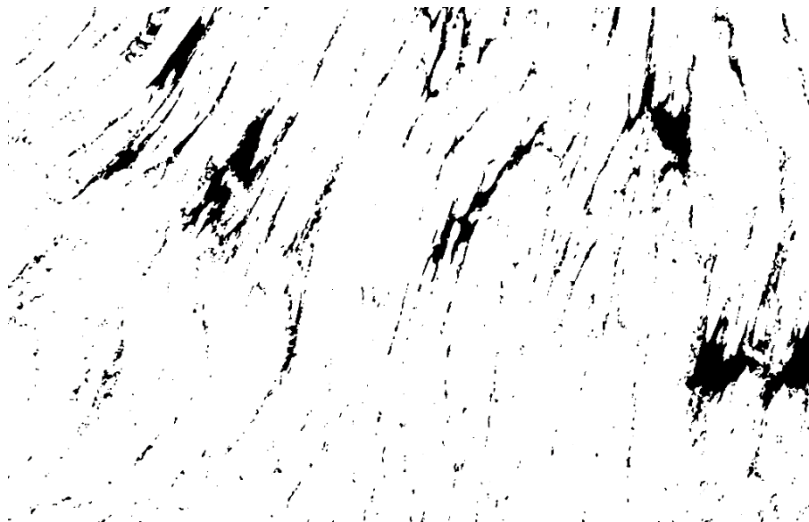
Voraussetzung für die Bestimmung des Fibrosetyps mittels der GLCM ist jedenfalls ein segmentiertes Binärbild wie in Abbildung 25 (C) dargestellt.



A



B



C

Abbildung 25: Originalbild (A), welches für die Bestimmung des Fibrosetyps mittels GLCM herangezogen wurde. Gewebeausschnitt inklusive gewebefreier Zellzwischenräume (B) und nach Schwellwertverfahren nur mehr mit Bindegewebeanteilen (C). Ein derartig segmentiertes Bild kann für die Bestimmung des Fibrosetyps mittels GLCM verwendet werden.

Die Anwendung des Verfahrens auf das Referenzbild und die anschließende Auswertung ergab einen sehr geringen Kontrast (278) und eine sehr geringe Entropie (0,26). Dies lässt einerseits auf ein eher geringes Vorkommen an Bindegewebe schließen (6,2%), andererseits sind jene Areale, in denen Bindegewebe vorhanden ist eher homogen. Dies deutet auf ein geringes Vorliegen an kompakter Fibrose hin.

### **3.4 Kardiomyozyten – Anzahl und Abmessungen der Zellkerne**

Dieser Verarbeitungsschritt liefert einerseits Aussagen über die Anzahl und Größe der Zellkerne, diese Parameter wiederum erlauben Rückschlüsse auf den Zustand des Gewebes. Andererseits werden die Zellkerne genau vermessen, dies ist für die Richtungsbestimmung essentiell. Anhand eines Referenzbildes (Abbildung 11) wird verdeutlicht, wie aus dem Originalbild die Zellkerne segmentiert und vermessen werden können. Die Ergebnisse (Abmessungen der Zellkerne) wurden automatisiert in eine Textdatei gespeichert.

#### **3.4.1 Algorithmus 1: Filterbasierte Identifikation der Kardiomyozytenzellkerne**

Die in Kapitel 2.4.1.1 beschriebenen Verarbeitungsschritte führen von einem histologischen Schnitt zu einem Ergebnisbild welches idealerweise nur mehr die segmentierten Zellkerne der Kardiomyozyten beinhaltet. Die Bildverarbeitungskette ist in der folgenden Abbildung 26 visualisiert.

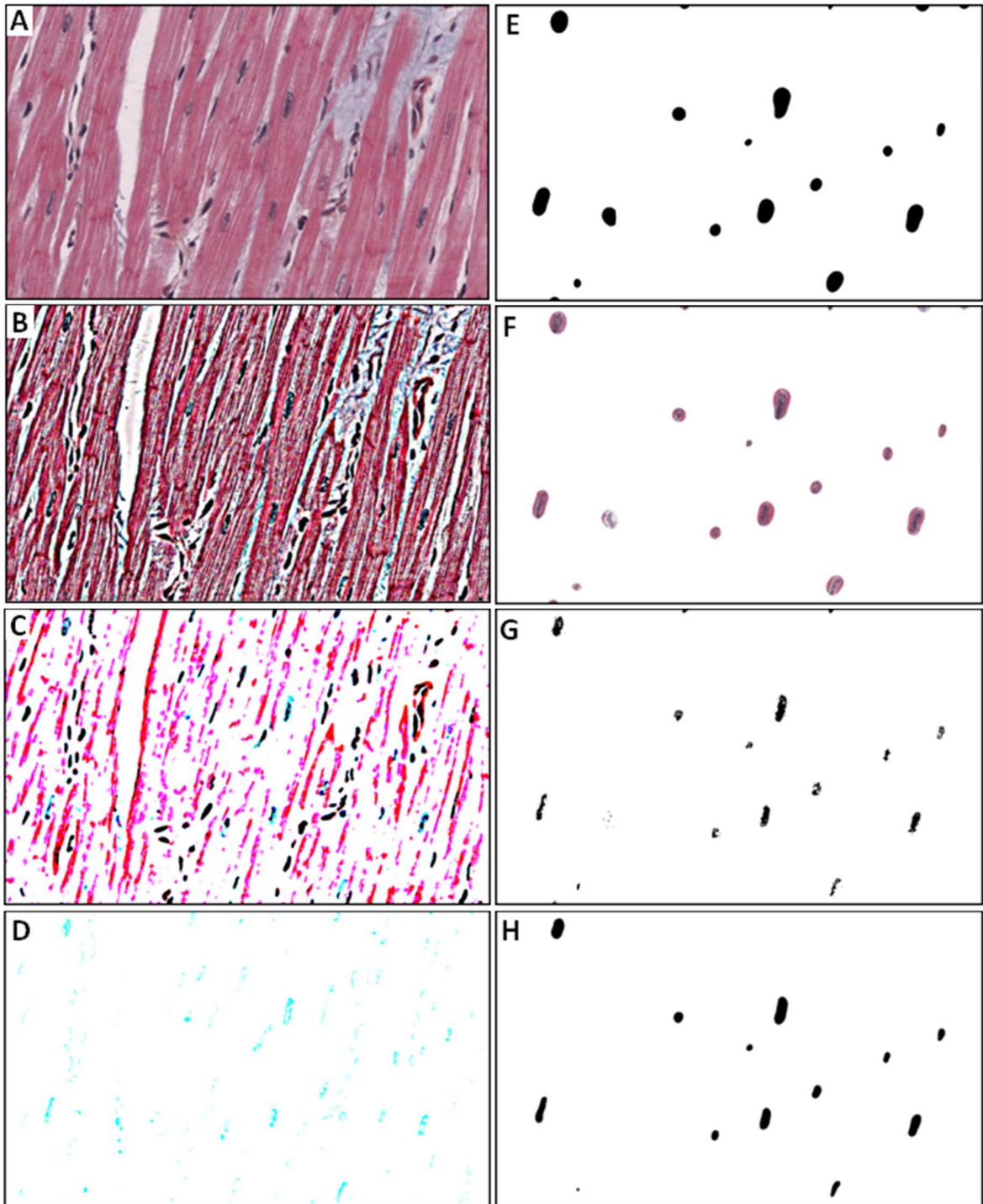


Abbildung 26: Automatische Verarbeitung des Referenzbildes, (A) zeigt das Originalbild. Eine unscharfe Maske wurde generiert (B), multipliziert mit (A), aus dem Ergebnisbild wurde das Rauschen entfernt (C) und eine Farbfaltung wurde durchgeführt um die Cyan-Elemente des Bildes zu extrahieren (D). Die Anwendung eines Filters (Gaussian blur) (E) und addieren von (E) zu (A) generierte eine Maske um die Zellkerne (F). Die zwei Bilder (G, H) stellen den Prozess der Hervorhebung der Form der geschnittenen

Zellkerne aus der generierten Maske mittels Schwellwertverfahren, Rauschentfernung und eines Filters (Gaussian blur) dar (Zach et al. 2016, Abbildung 6, Lizenz: CC BY 4.0).

### 3.4.2 Algorithmus 2: Identifikation der Kardiomyozytenzellkerne basierend auf einer quantitativen Auswertung der Bildinformation

Der zweite Algorithmus, beschrieben in Kapitel 2.4.1.2, generiert ebenso aus einem histologischen Schnitt segmentierte Kardiomyozytenzellkerne. Die Bildverarbeitungskette ist in der folgenden Abbildung 27 visualisiert.

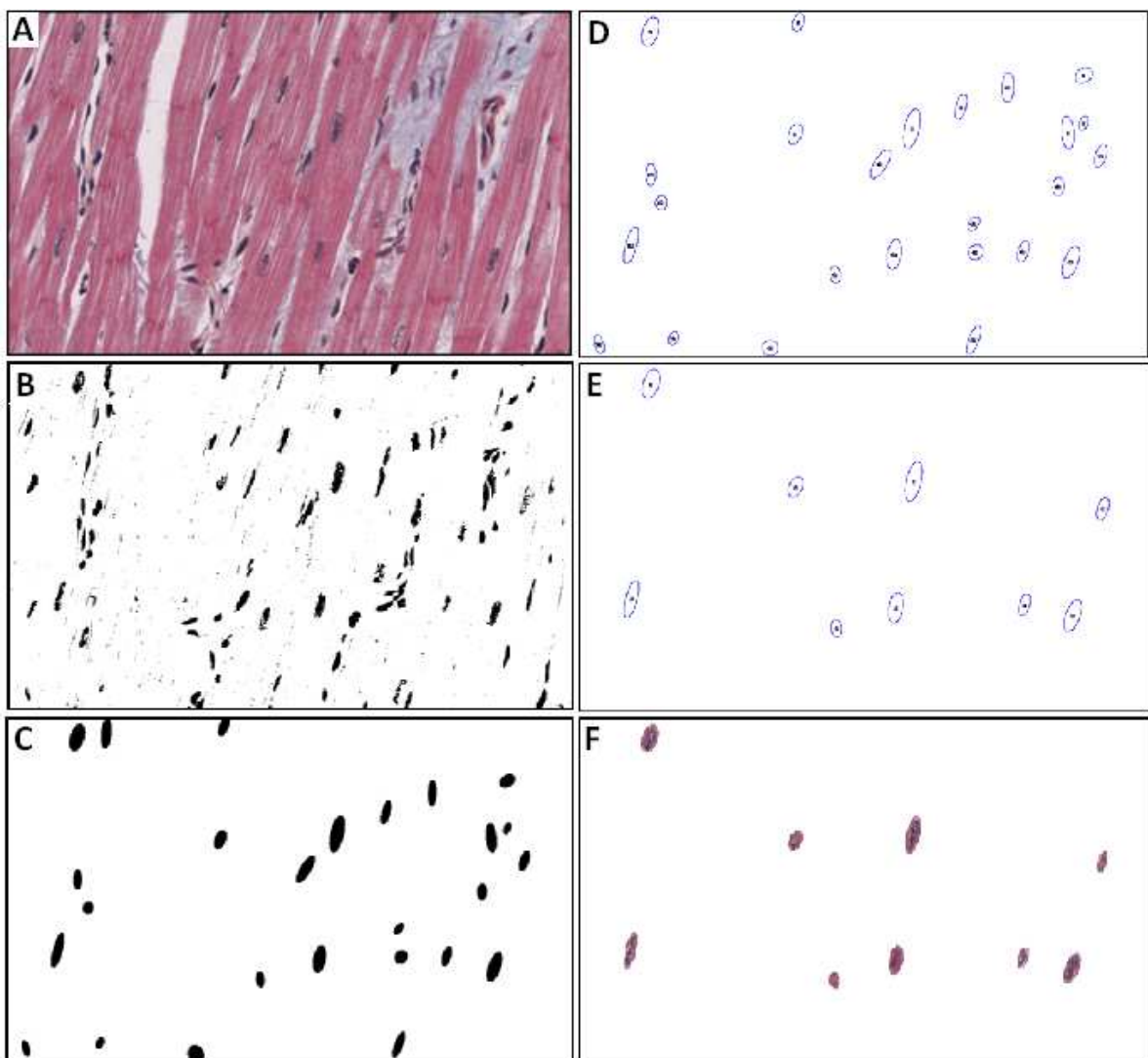


Abbildung 27: Automatische Verarbeitung des Referenzbildes, (A) zeigt das Originalbild. Mittels Schwellwertverfahren wurden jene Regionen identifiziert, die vermutlich Zellkerne beinhalten (B). Danach wurde in jenen Bereichen eine Zellkernmaske erstellt, welche aufgrund der niedrigeren Homogenität nicht die gesamte Fläche des vermuteten Zellkerns

ausfüllen (C). Die Homogenität dieser Bereiche, in denen Zellkerne vermutet wurden, wurde erneut analysiert (D). Zellkernmasken wurden erneut generiert und analysiert, wobei die Masken um 3 Pixel größer erstellt wurden um auch die Umgebung des vermuteten Zellkerns mit einzubeziehen, da Fibrozytenzellkerne meist nicht unmittelbar an Kardiomyozyten angrenzen und daher in der Umgebung andere Farbtöne aufweisen. Es wurden nur jene Bereiche als Zellkerne der Kardiomyozyten klassifiziert, welche einen gewissen Wert an Mittelwert und Standardabweichung vorwiesen. Im Bild (F) erfolgte die Überlagerung von Maske und Originalbild.

### **3.4.3 Auswertung der Segmentierung**

Es zeigte sich, dass die Zellkerne der Kardiomyozyten mit beiden vorgestellten Algorithmen gut identifiziert und segmentiert werden konnten. Algorithmus 1 (Kapitel 2.4.1.1) segmentierte ca. 87% der Zellkerne korrekt, wies jedoch eine Rate von 3% an falsch positiv identifizierten Zellkernen auf. Algorithmus 2 (Kapitel 2.4.1.2) erkannte 57% der Zellkerne wobei kein Fibrozytenzellkern fälschlicherweise als Kardiomyoytenzellkern identifiziert wurde.

Durch die Ähnlichkeit der Zellkerne wurden auch fälschlicherweise Zellkerne der Endothelzellen und Fibrozyten detektiert. Das Ausmaß der falsch erkannten Zellkerne lag je nach Algorithmus und Bild bei 0% - 3% der vorhandenen Endothel- und Fibrozytenzellkerne. Mit individuellen Anpassungen der Filterparameter konnten bessere Ergebnisse erzielt werden. Die Ergebnisse der Segmentierung der Beispielbilder aus Abbildung 16 sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Auswertung des Segmentierungserfolges anhand der mittels der NBO Methode (Algorithmus 1 und Algorithmus 2) segmentierten Beispielbilder.

	<b>Tatsächliche Anzahl an klar erkennbaren Kardiomyozyten- Zellkernen</b>	<b>Korrekt identifizierte Zellkerne. Algorithmus 1 / Algorithmus 2 (Flächenanteil pro Kern)</b>	<b>Tatsächliche Anzahl an Fibrozyten- und Endothelzellkernen</b>	<b>Falsch identifizierte Zellkerne. Algorithmus 1 / Algorithmus 2</b>
Abbildung 16(A) bzw. Abbildung 11 (Referenzbild)	15	12/9 (0,16%)	64	1/0
Abbildung 16(B)	33	31/19 (0,12%)	58	2/0
Abbildung 16(C)	25	21/11 (0,1%)	59	1/0
Abbildung 16(D)	24	20/18 (0,1%)	69	3/0
Abbildung 16(E)	20	18/10 (0,11%)	86	3/0
Durchschnitt (in %)	23	20/13 (0,12%) 87%/57%	67	2/0 3%/0%

Die Zellkerne haben je Kern einen durchschnittlichen Anteil von 0,12% an der Fläche des Gewebeschnittes. Zu beachten ist, dass die Fläche des Zellkerns immer in Relation zum Neigungswinkel gesehen werden muss. Bei einem Schnitt quer durch den Zellkern ist die Fläche naturgemäß größer als bei einem Schnitt längs des Zellkerns.

### 3.4.4 Segmentierung der Zellkerne - Fazit

Generell zeigte sich, dass beide Algorithmen gute Ergebnisse liefern,

- der erste Algorithmus, welcher primär mit Filtern (Gaussian Blur, Farbfaltung) die entsprechenden Informationen aus dem Bild extrahiert und sehr gute

Segmentierungsergebnisse liefert, zeigte sich anfälliger auf Variationen beim Input, also beispielsweise hellere oder dunklere histologische Schnitte oder Unterschiede im Kontrast.

- Der zweite Algorithmus liefert wesentlich stabilere Ergebnisse bei einer geringeren, aber dennoch akzeptablen Rate an identifizierten Kardiomyozytenzellkernen.

### 3.5 Bestimmung von Anzahl und Fläche der Kardiomyozyten

Im Referenzbild (Abbildung 11) wurden zwölf bzw. neun Kardiomyozytenzellkerne identifiziert, die Erkennungsrate betrug somit 87% in Algorithmus 1 und 57% in Algorithmus 2. Der Neigungswinkel  $\alpha$  war, entsprechend der Beschreibung in Kapitel 3.7,  $27^\circ$ . Daraus errechneten sich nach der Formel aus Kapitel 2.5 folgende Anzahlen an Kardiomyozyten im Bild:

Algorithmus 1: Kardiomyozyten = $12 / 0,87 * 0,9 * (6-4*(\sin(90-27))) = 30$
Algorithmus 2: Kardiomyozyten = $9 / 0,57 * 0,9 * (6-4*(\sin(90-27))) = 34$
$15$ (tatsächliche Zahl an Kernen) * $0,9 * (6-4*(\sin(90-27))) = 32$

Die vermutete Anzahl im Bild geschnittener Kardiomyozyten betrug somit zwischen 30 und 34, je nach für die Segmentierung verwendetem Algorithmus.

Die manuelle Auswertung ergab eine Anzahl von 32 sichtbaren und somit geschnittenen Kardiomyozyten. Dabei wurden die identifizierbaren Kardiomyozyten abgegrenzt und manuell eingefärbt. Die folgende Abbildung 28 visualisiert die im Bild vorhandenen Kardiomyozyten, die manuell eingefärbt wurden.

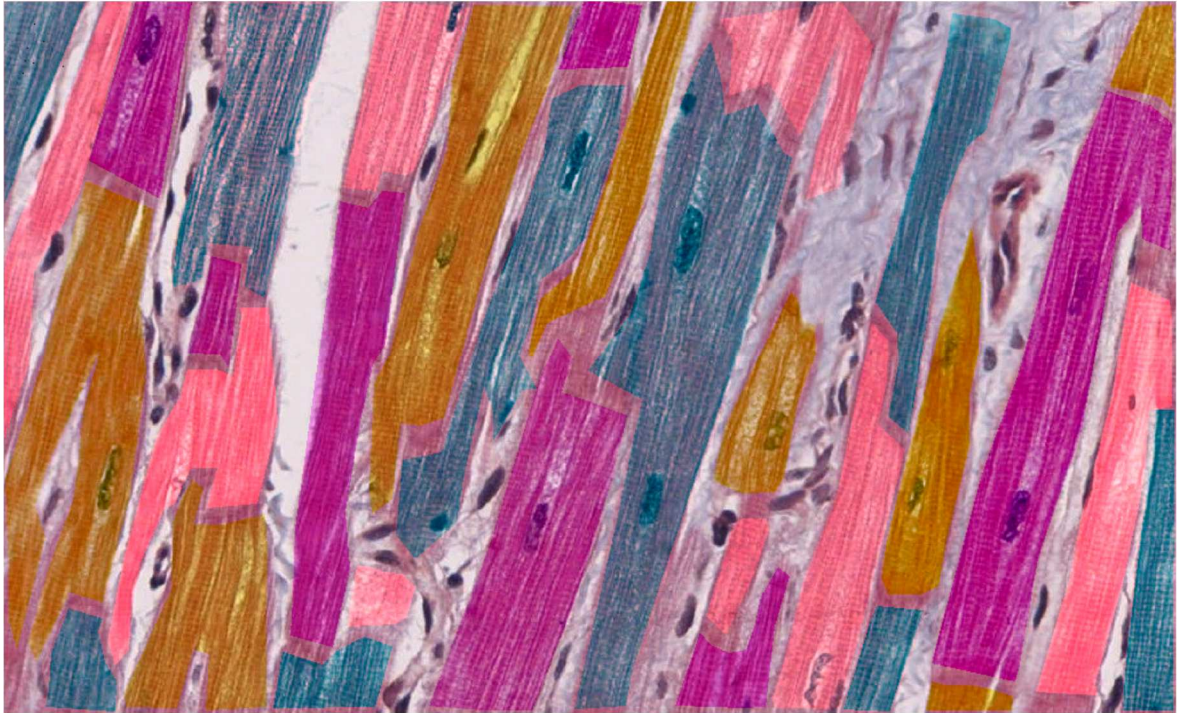


Abbildung 28: Kardiomyozyten im Referenzbild (Abbildung 11). Für die Zählung manuell segmentiert und eingefärbt.

Die Berechnung des durchschnittlichen Flächenanteils der einzelnen Kardiomyozyten ergab sich in weiterer Folge durch die Division des detektierten Flächenanteils von 70,4% (beschrieben in Kapitel 3.6) durch die Anzahl der berechneten Kardiomyozyten im Bild. Im Referenzbild war dies  $70,4\% / 30$  womit sich ein durchschnittlicher Flächenanteil je Kardiomyozyt von ca. 2,35% ergab. In Kombination mit dem Flächenanteil der einzelnen Kardiomyozytenzellkerne, im konkreten Fall 0,16%, war es möglich das durchaus interessante Verhältnis von Zellkerngrößen zu Zellen zu berechnen, welches in diesem Fall 1:14,7 betrug.

### **3.6 Kardiomyozyten- Bestimmung des Flächenanteils**

Nachfolgend ist in Abbildung 29 die Segmentierung des Muskelgewebes dargestellt. Das Ergebnis war ein Binärbild dessen schwarze Anteile Kardiomyozyten repräsentierten. Im Referenzbild errechnete sich ein Anteil an Kardiomyozyten von 70,4%.

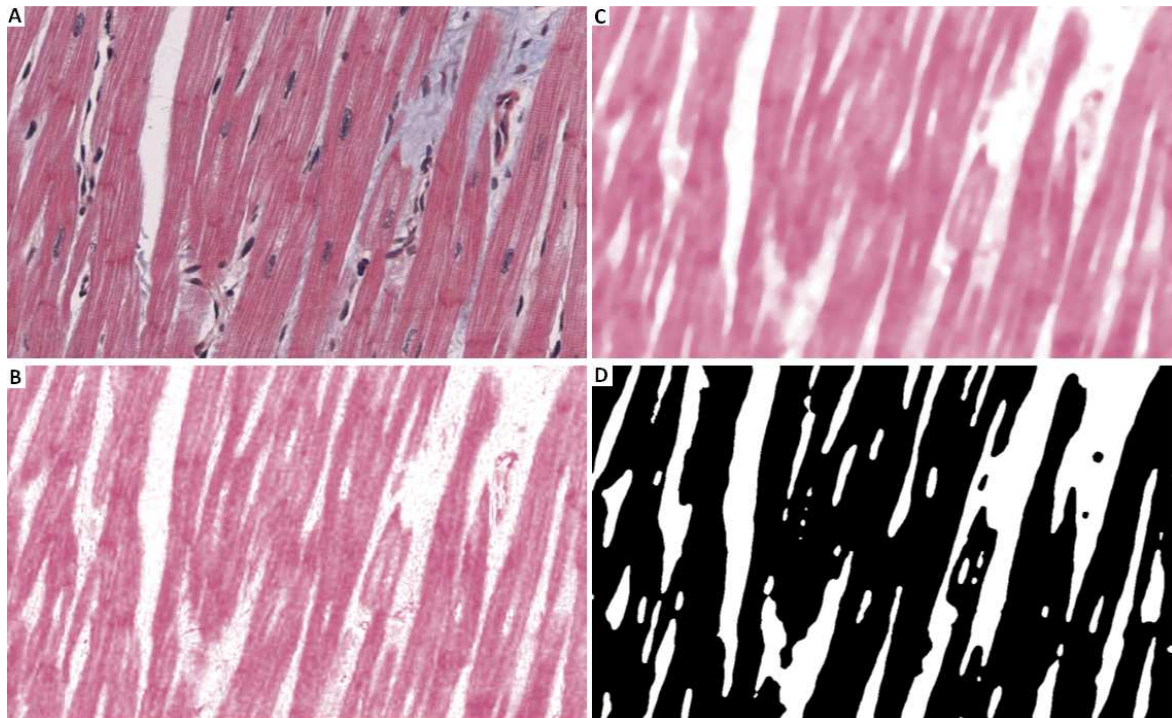


Abbildung 29: Automatische Berechnung des Flächenanteils der Kardiomyozyten, (A) zeigt das Originalbild. Durch Farbfaltung bleiben jene Bildbestandteile erhalten, welche die Farbwerte der Kardiomyozyten beinhalten (B). Mittels eines Medianfilters werden Ausreißer eliminiert (C). Daraus wird ein Binärbild (D) erstellt, aus welchem schließlich der Flächenanteil berechnet wird.

### 3.7 Faserorientierung

Es erwies sich der Kardiomyozytenzellkern, die Zellmembran und die Myofibrillen als höchst aussagekräftig und geeignet für die Richtungsdetektion im zweidimensionalen Raum. Die Glanzstreifen eigneten sich nur bedingt als Indikator für die Richtungsbestimmung. Beispiele für entsprechende Richtungsbestimmungen finden sich in Abbildung 30.

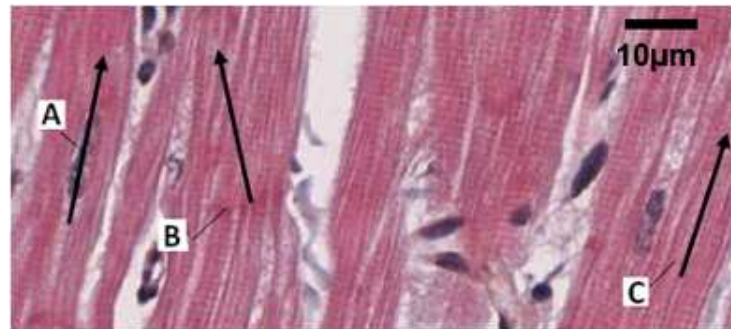


Abbildung 30: Zellkerne (A), Glanzstreifen (B) und Myofibrillen (C) als Indikatoren für die Faserorientierung mit unterschiedlicher Relevanz. Am Beispiel der Zellkerne der Kardiomyozyten und der Myofibrillen ist optisch erkennbar, dass die jeweilige Richtung (Pfeil) gut mit der tatsächlichen Faserorientierung übereinstimmt. Die Glanzstreifen weichen, soweit überhaupt visualisiert, stark von der tatsächlichen Faserorientierung ab.

Die durchschnittliche Abweichung von der tatsächlichen Ausrichtung der Zelle war beim Nukleus mit  $2,2^\circ$  am geringsten, gefolgt von den Myofibrillen mit  $3,1^\circ$  und der Zellmembran mit  $3,2^\circ$ . Der Nukleus war im Gegensatz zu den anderen Zellbestandteilen oftmals klar erkennbar und eindeutig zu identifizieren.

Besonders der Wert der Faserorientierung basierend auf der Zellmembran ist mit Vorsicht zu betrachten, da diese dort, wo ein Kardiomyozyt an einen anderen grenzt, teilweise nicht gut oder gar nicht sichtbar ist und die Richtung der Zellmembran einer Zelle stark variieren kann und somit keine homogene Linie bildet.

Myofibrillen zeigten sich in ihrer Orientierung sehr homogen, jedoch kann die Ausrichtung besonders um den perinukleären Hof eine Änderung erfahren. Am schlechtesten schnitten in dieser Analyse die Glanzstreifen ab, sie wiesen mit  $10,9^\circ$  die mit Abstand größte Abweichung von der tatsächlich gemessenen Faserrichtung auf. Aufgrund dieser Gegebenheiten erschien der Zellkern für die Bestimmung der Faserorientierung am aussagekräftigsten. Alle Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 7 detailliert aufgelistet.

Tabelle 7: Vergleich der manuellen Vermessung der Fasern mit den einzelnen Zellbestandteilen. Die Werte  $\Delta_\varphi$  beschreiben die Differenz zwischen den manuellen Referenzmessungen der Faserwinkel in  $x/y$  – Richtung (bezeichnet als „Ref.“) und die Winkel in  $x/y$  – Richtung der Zellkerne, der Glanzstreifen, der Membranen und der

Myofibrillen. Folglich ist  $\Delta_\varphi$  definiert als  $\Delta_\varphi = \text{abs}(\varphi_0 - \varphi)$ .  $\bar{\Delta}_\varphi$  ist die dementsprechende durchschnittliche Differenz. Die Glanzstreifen und die Membran sind in Faser 10 nicht dargestellt (adaptiert nach Zach et al. 2016, Tabelle 1, Lizenz: CC BY 4.0).

Faser Nr.	Ref.	Nucleus		Glanzstreifen		Membran		Myofibrillen	
		$\varphi_0$	$\varphi$	$\Delta_\varphi$	$\varphi$	$\Delta_\varphi$	$\varphi$	$\Delta_\varphi$	$\varphi$
1	70°	63°	7°	74°	4°	69°	1°	66°	4°
2	50°	49°	1°	53°	3°	51°	1°	47°	3°
3	57°	60°	3°	49°	8°	64°	7°	60°	3°
4	27°	22°	5°	30°	3°	24°	3°	25°	2°
5	7°	8°	1°	36°	29°	4°	3°	8°	1°
6	1°	1°	0°	19°	18°	4°	3°	2°	1°
7	41°	39°	2°	25°	16°	40°	1°	38°	3°
8	79°	77°	2°	75°	3°	85°	6°	70°	9°
9	73°	72°	1°	87°	15°	69°	4°	69°	4°
10	70°	70°	0°	-	-	-	-	69°	1°
$\bar{\Delta}_\varphi$			2.2°		10.9°		3.2°		3.1°

### 3.7.1 Manuelle Vermessung im Referenzbild

Die manuelle Vermessung der Ausrichtung der Herzmuskelzellen im Referenzbild ergab eine mittlere Faserorientierung  $\varphi$  von 75,69°. Dieser Wert dient zugleich als Referenzwert für die Beurteilung der bekannten Methoden und der NBO Methode. In Abbildung 31 sind die vermessenen Zellen und die Vorgehensweise dargestellt. Die Ergebnisse der Vermessung folgen danach in Tabelle 8.

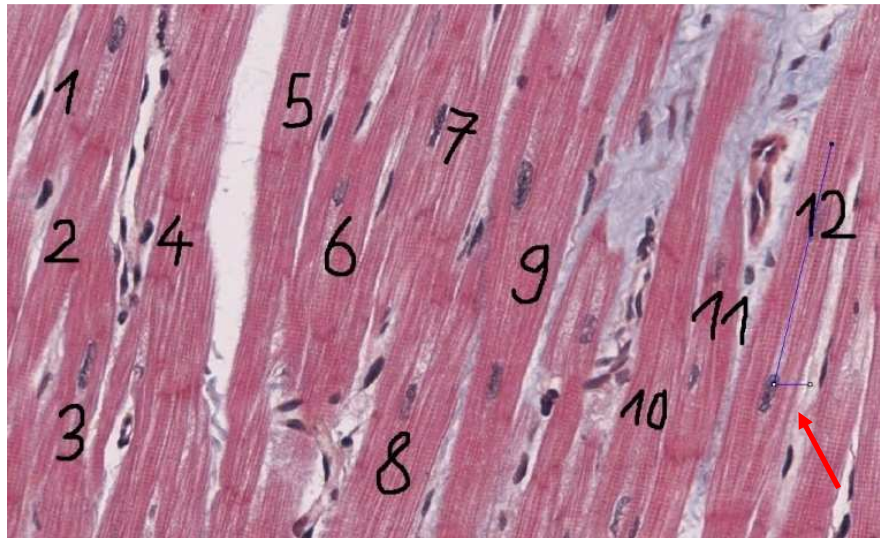


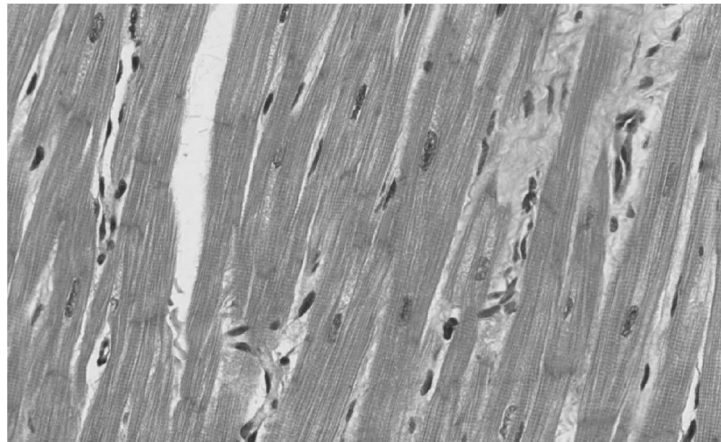
Abbildung 31: Manuelle Vermessung der Faserorientierung mittels des „Angle Tools“ in der Software Fiji. Die Kardiomyozyten sind mit Nummern gekennzeichnet, der rote Pfeil zeigt auf eine beispielhaft dargestellte Vermessung von Zelle 12 mittels des „Angle Tools“.

Tabelle 8: Diese Tabelle fasst das Ergebnis der manuellen Vermessung der einzelnen Kardiomyozyten im Referenzbild zusammen. In Spalte eins ist die Nummer der Zelle gelistet, in der zweiten Spalte findet sich der gemessene Winkel  $\varphi$ .

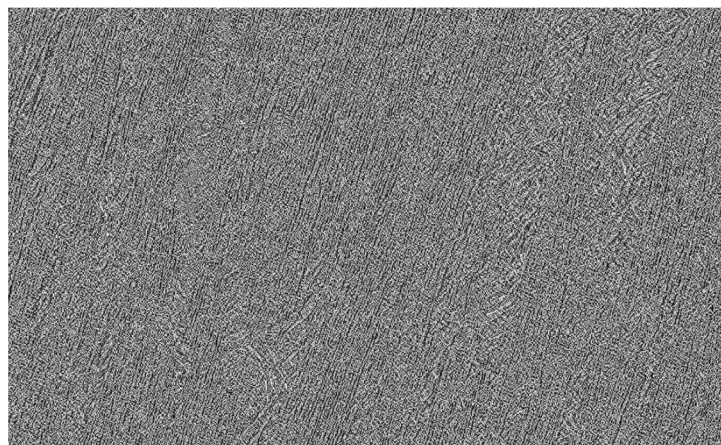
Zelle-Nr.	$\varphi$
1	69,63°
2	70,88°
3	79,19°
4	79,27°
5	74,63°
6	73,66°
7	74,12°
8	70,32°
9	76,58°
10	77,99°
11	85,46°
12	76,50°
<b>Mittelwert</b>	<b>75,69°</b>

### 3.7.2 Anwendung der Hesse Matrix auf das Referenzbild

Es erfolgte die Anwendung der Hesse Matrix auf das Referenzbild, umgewandelt in 8 Bit Graustufen in Abbildung 32(A). Das Ergebnisbild lieferte jene Orientierungen für welche die zweite Ableitung maximal war. Die Werte hinter jedem Bildpunkt lieferten einen Winkel angegeben in Radiant, dargestellt in Abbildung 32(B).



A



B

Abbildung 32: Ergebnisbild B nach der Anwendung der Hesse Matrix auf das Referenzbild A.

### 3.7.3 Anwendung der Fourier-Transformation auf das Referenzbild

Mithilfe des mittels Fourier-Transformation berechneten Frequenzspektrums ist es möglich in einem Bild die dominante(n) Orientierung(en) zu eruieren.

Nachfolgend, siehe Abbildung 33, ist das Frequenzspektrum des gewählten Referenzbildes visualisiert. Anhand des Frequenzspektrums ließ sich eine vorherrschende Orientierung von ca. 73,38 Grad eruieren. Die Anwendung des Plug-ins „Directionality“, welches das Frequenzspektrum durch Unterteilung des Bildes in einzelne Quadrate analysiert, zeigte eine dominante Orientierung von 77,35 Grad.

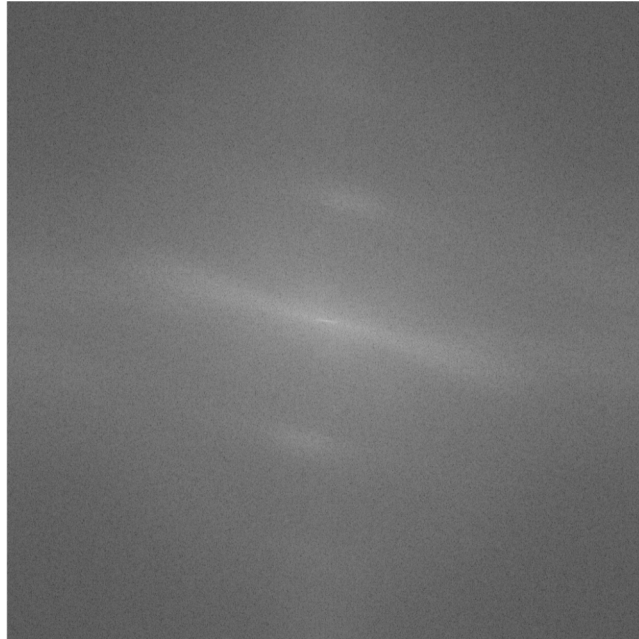


Abbildung 33: Frequenzspektrum des Referenzbildes, generiert mit der „FFT“ Funktion der Software Fiji.

Einen Rückschluss auf die Faserorientierung an einer gewissen Position im Bild bzw. Information, ob sich an einem gewissen Punkt eine Zelle oder ein Zellkern befindet, erhält man mittels der Anwendung der Fourier-Transformation allerdings nicht. Selbst die ausschließliche Analyse der zuvor segmentierten Zellkerne führt nicht zum gewünschten Ergebnis, da durch die unstrukturierte Anordnung des Chromatins innerhalb des Zellkernes keineswegs Rückschlüsse auf die lokale Orientierung des Zellkerns und somit auf die Orientierung des gesamten Kardiomyozyten gezogen werden können.

### **3.7.4 Bestimmung der lokalen Gradienten / lokal-dominanten Orientierungen im Referenzbild**

Die Berechnung der lokalen Gradienten erfolgt durch die Bildung der ersten Ableitungen bzw. durch die Bildung der zweiten Ableitungen für langsame Übergänge. Pro Pixel im

Bild werden zwei orthogonale Ableitungen im Bild gebildet. Durch die Kombination von Stärke des Übergangs und Orientierung erhält man die lokal dominante Orientierung im Bild. Im Referenzbild fanden sich die im folgenden Histogramm (Abbildung 34) dargestellten Orientierungen mit der jeweiligen Häufigkeit auf der y-Achse. Die dominante Orientierung im Referenzbild errechnete sich aus den R/G/B Einzelbildern mit 76,34 Grad, dies liegt sehr nahe an der manuell errechneten Orientierung.

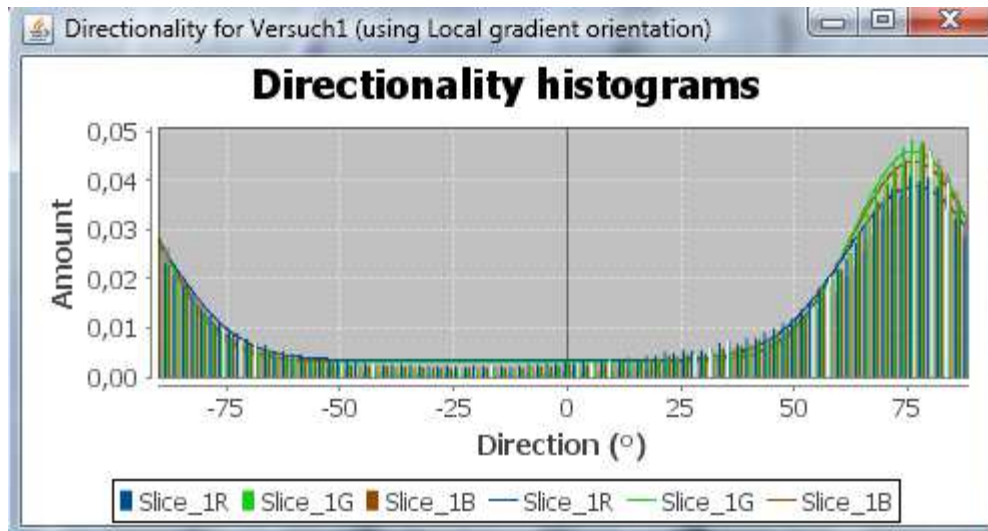
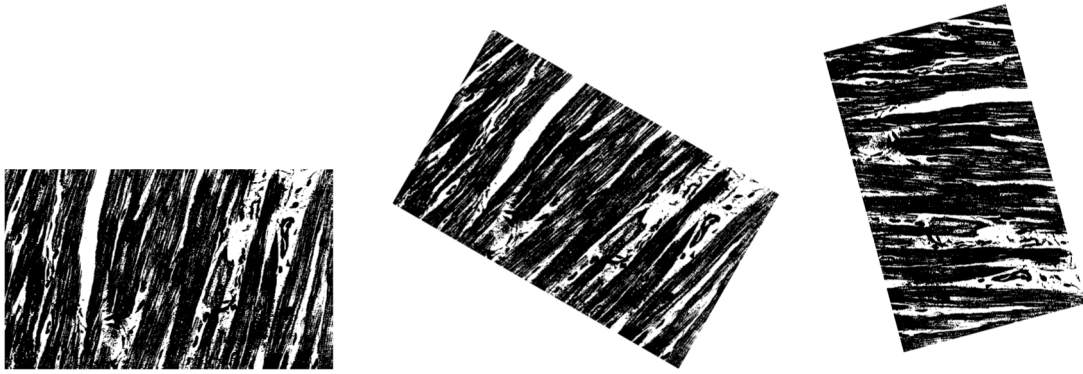


Abbildung 34: Das Frequenzspektrum des Referenzbildes gegliedert nach Richtung und Häufigkeit. Das Ergebnisbild stammt aus dem Modul „Directionality“ der Software Fiji.

### 3.7.5 Anwendung der co-occurrence matrix auf das Referenzbild

Es zeigte sich das der GLCM Texturparameter „Kontrast“ abhängig von der Rotation des Bildausschnittes ist. Je genauer die Faserorientierung entlang der Richtung  $x=1 / y=0$ , also im  $0^\circ$  Winkel verlief, desto niedriger war das Ergebnis des Texturparameters „Kontrast“. Dies hat die Ursache darin, dass beispielsweise bei exaktem (horizontalem) Faserverlauf entlang der Richtung  $x=1 / y=0$  die Übergänge schwarz/weiß und somit auch der GLCM Texturparameter „Kontrast“ minimal sind. Im Referenzbild, welches in ein Binärbild umgewandelt wurde und in Abbildung 35(A) dargestellt ist, beträgt der Wert im Originalbild ca. 3500, nach einer Rotation um  $30^\circ$ , dargestellt in Abbildung 35(B) liegt der Wert bei 2425. Der geringste Wert, 1715, errechnete sich bei einer Rotation von  $75^\circ$ , dargestellt in Abbildung 35(C). Dies lässt darauf schließen, dass die Mehrzahl der Strukturen im Bild in dieser Orientierung angeordnet ist. Wird das Bild hingegen um  $74^\circ$  oder  $76^\circ$  rotiert steigt der Kontrast bereits wieder auf 1716 bzw. 1728.



A

B

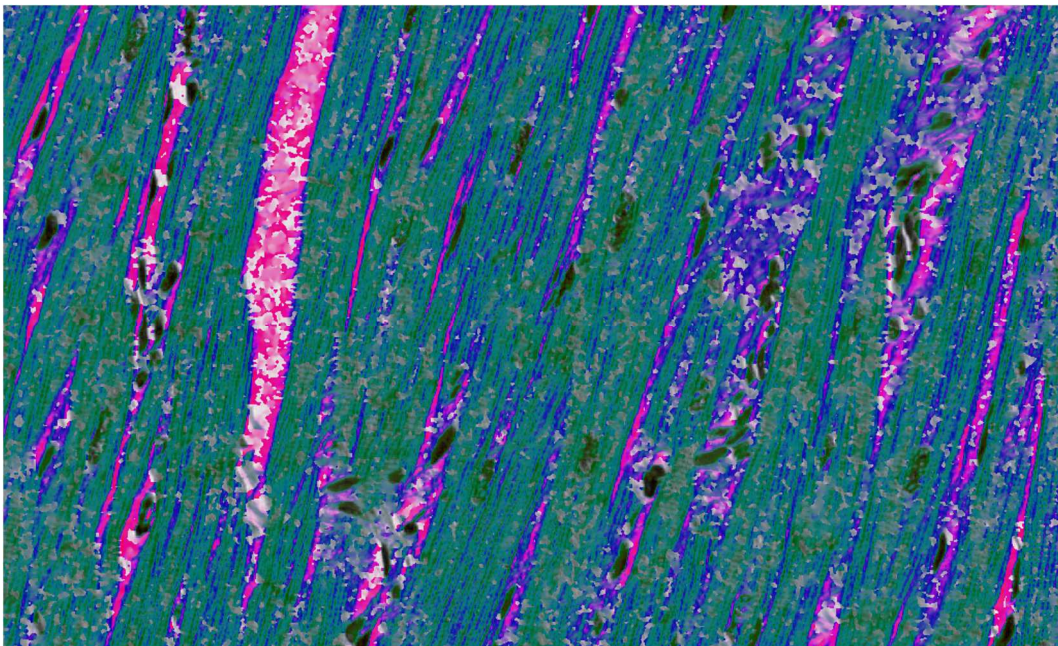
C

Abbildung 35: Rotation des Referenzbildes (A) um  $30^\circ$  (B) und  $75^\circ$  (C) für die Bestimmung der Orientierung des Gewebes mittels GLCM.

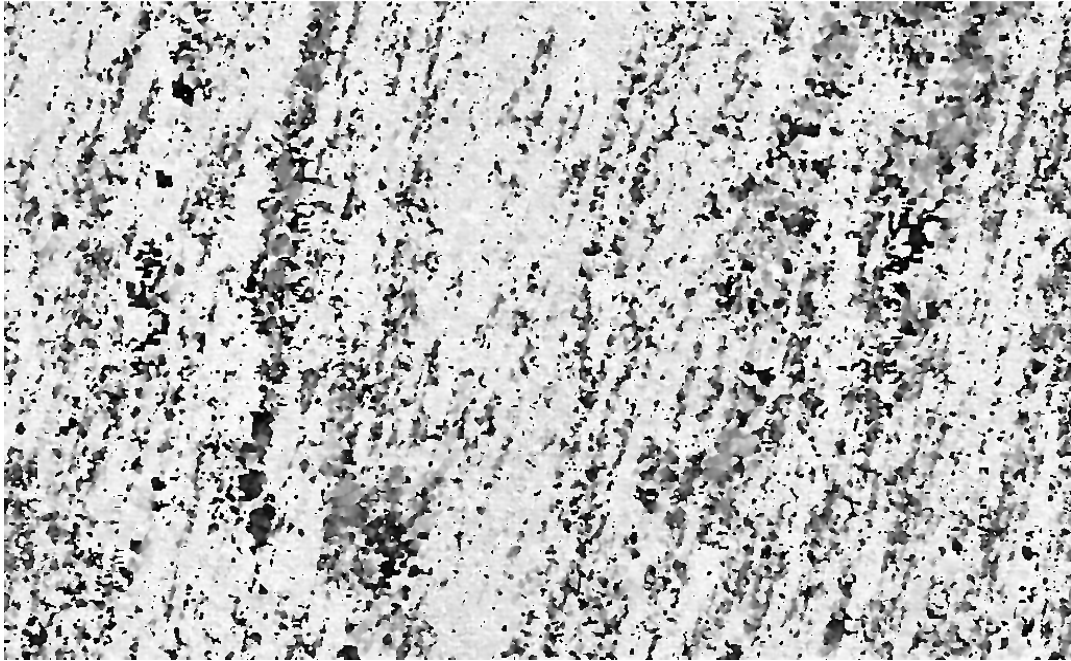
Es zeigte sich, dass das Haralick'sche Merkmal „Kontrast“ in Kombination mit der Rotation des Bildes als Indikator für die Orientierung einer Textur dienen kann, wobei die dominante Orientierung des Referenzbildes bei  $75^\circ$  liegt.

### 3.7.6 Anwendung eines „Structure Tensors“ auf das Referenzbild

Anwendung eines „Structure Tensors“ auf das. Der Farbton, dargestellt in Abbildung 36, beschreibt die Orientierungen im Bild mit einem Gauß-Fenster  $\text{Sigma}=1$ .



A



B

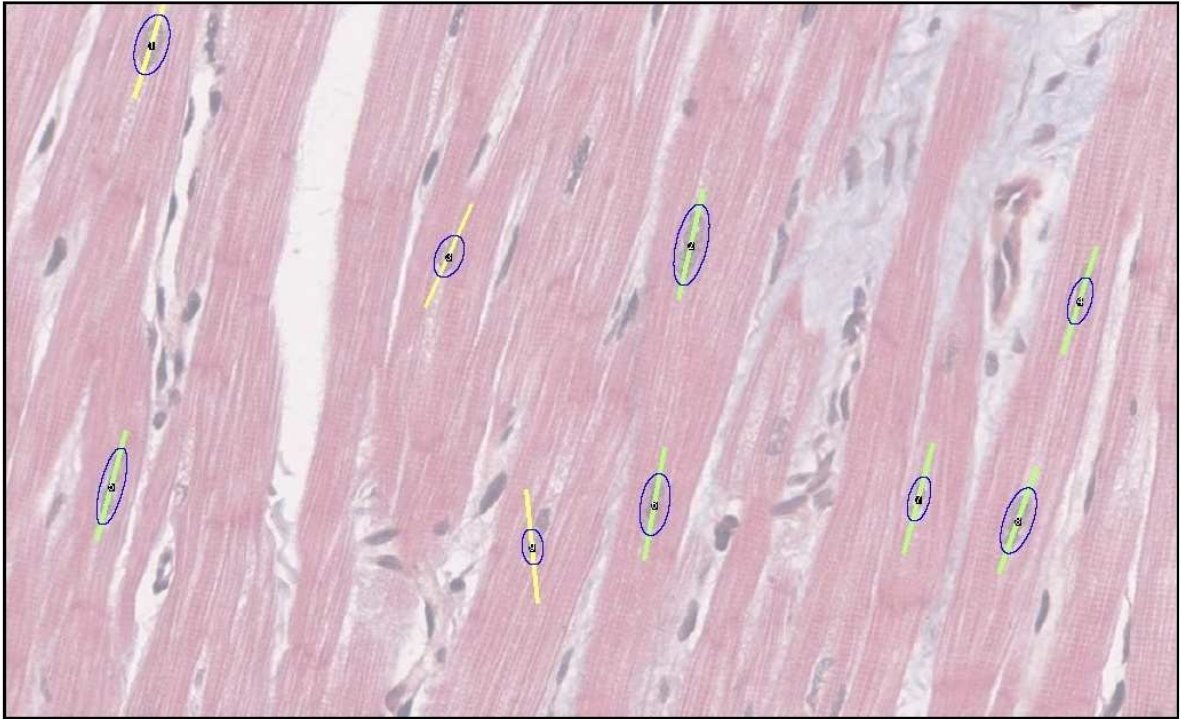
Abbildung 36: Optische Darstellung der Faserorientierung im Referenzbild, bestimmt mittels „Structure Tensor“ im Plug-in „Orientation J“ der Software Fiji (A). Im Bild (B) sind die Orientierungen in Graustufen dargestellt wobei folgendes gilt: Je heller der Bereich, desto näher ist der Winkel bei  $90^\circ$ . Dunklere Bereiche kennzeichnen flachere Winkel.

Als dominante Orientierung wurde mit diesem Verfahren im Referenzbild der Wert  $72,66^\circ$  berechnet.

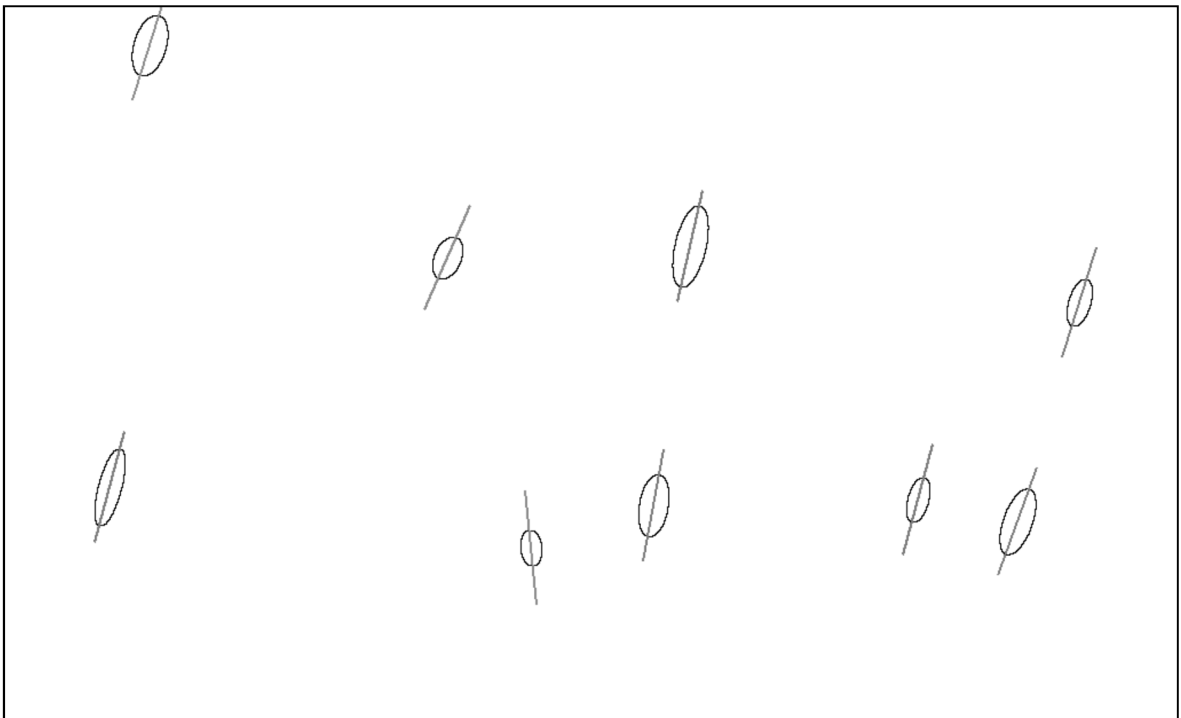
### **3.7.7 Bestimmung der Faserorientierung im Referenzbild mit der „Nucleus Based Orientation“ Methode**

Das Ergebnis der Auswertung der detektierten Zellkerne sind einerseits die Koordinaten des Zellkernes. Dies lässt Rückschlüsse darauf zu, ob sich an der jeweiligen Position eine Zelle befindet. Andererseits ermöglicht es die NBO Methode die Ausrichtung des Zellkerns in  $x/y$  sowie  $z$  –Richtung zu bestimmen. Die Winkel berechnen sich basierend auf den Achsenlängen der Zellkerne. Der Algorithmus kam der manuellen Winkelmessung mit einer durchschnittlichen Faserorientierung von  $76,25^\circ$  sehr nahe, der Unterschied betrug lediglich  $0,56^\circ$ . Die einzelnen Ergebnisse für jeden erfolgreich segmentierten Zellkern im Referenzbild sind der Tabelle 9 zu entnehmen. Die Ergebnisse wurden visualisiert, um dem Betrachter einen schnellen und ergonomischen Eindruck über die

vorherrschende Faserorientierung zu geben. Für das Referenzbild ist eine entsprechende Visualisierung in Abbildung 37 dargestellt.



A



B

Abbildung 37: Automatische Segmentierung des Referenzbildes, (A) zeigt das Originalbild, überlagert mit den segmentierten Kernen und den eingefügten Richtungsvektoren. Abbildung (B) visualisiert die Zellkerne mit den Richtungsvektoren. Eine genaue Erklärung der Vektoren erfolgt in Abbildung 41.

Tabelle 9: Die Ergebnisse der automatischen Berechnung der Faserorientierung mittels NBO Methode im Referenzbild. Angegeben sind die Fläche des Zellkerns, der Mittelpunkt des Zellkerns (X Koordinate und Y Koordinate), die lange Achse der Ellipse  $e^*$ , die kurze Achse der Ellipse  $d$ , der Winkel  $\varphi$  in  $x/y$ -Richtung und der Winkel  $\alpha$  in  $z$ -Richtung. Die Einheiten von Fläche, X und Y sind Pixel.

Zellkern	Fläche	X	Y	$e^*$	$d$	$\varphi$	$\alpha$
1	1214	127	35	54,47	28,38	73,13°	31,00°
2	1543	599	210	72,48	27,11	77,02°	22,00°
3	710	387	220	38,55	23,45	66,47°	37,00°
4	644	939	259	42,43	19,33	73,08°	27,00°
5	1107	92	420	69,66	20,23	75,23°	17,00°
6	1090	567	437	55,01	25,23	80,37°	27,00°
7	578	798	432	40,21	18,30	75,07°	27,00°
8	1208	885	451	60,78	25,30	70,12°	25,00°
9	456	460	474	31,43	18,47	95,76°	36,00°
Mittelwert						<b>76,25°</b>	<b>27°,00</b>

Der Faserverlauf ließ sich mit einer Standardabweichung von ca. 8° als durchaus homogen bezeichnen.

Die Methode lieferte außerdem eine Aussage über die Ausrichtung der Zelle im Raum, d.h. in  $z$ -Richtung. Mit einem durchschnittlichen Neigungswinkel  $\alpha$  von 27° bestätigte sich der optische Eindruck eines eher horizontalen Schnittes durch das Gewebe.

### 3.7.7.1 Validierung der Methode

Für die Validierung der Methode wurde wie im Kapitel 2.8. beschrieben eine Simulation durchgeführt. Die Ergebnisse werden auf den folgenden Seiten in den Abbildungen 38, 39 und 40 sowie in den Tabellen 10, 11 und 12 dargestellt. In den Abbildungen ersichtlich

sind jeweils die umrandeten und mit Nummern sowie einem Richtungsvektor versehenen erfolgreich erkannten Ellipsen, welche die simulierten Schnittflächen von Kardiomyozyten darstellen. Die kleineren Ellipsen stellen Fibrozyten dar, welche im Idealfall nicht als Kardiomyozytenzellkerne identifiziert wurden. Diese Ellipsen sind, sofern sich nicht fälschlich als Kardiomyozytenzellkerne identifiziert wurden, nicht umrandet.

### Simulation 1

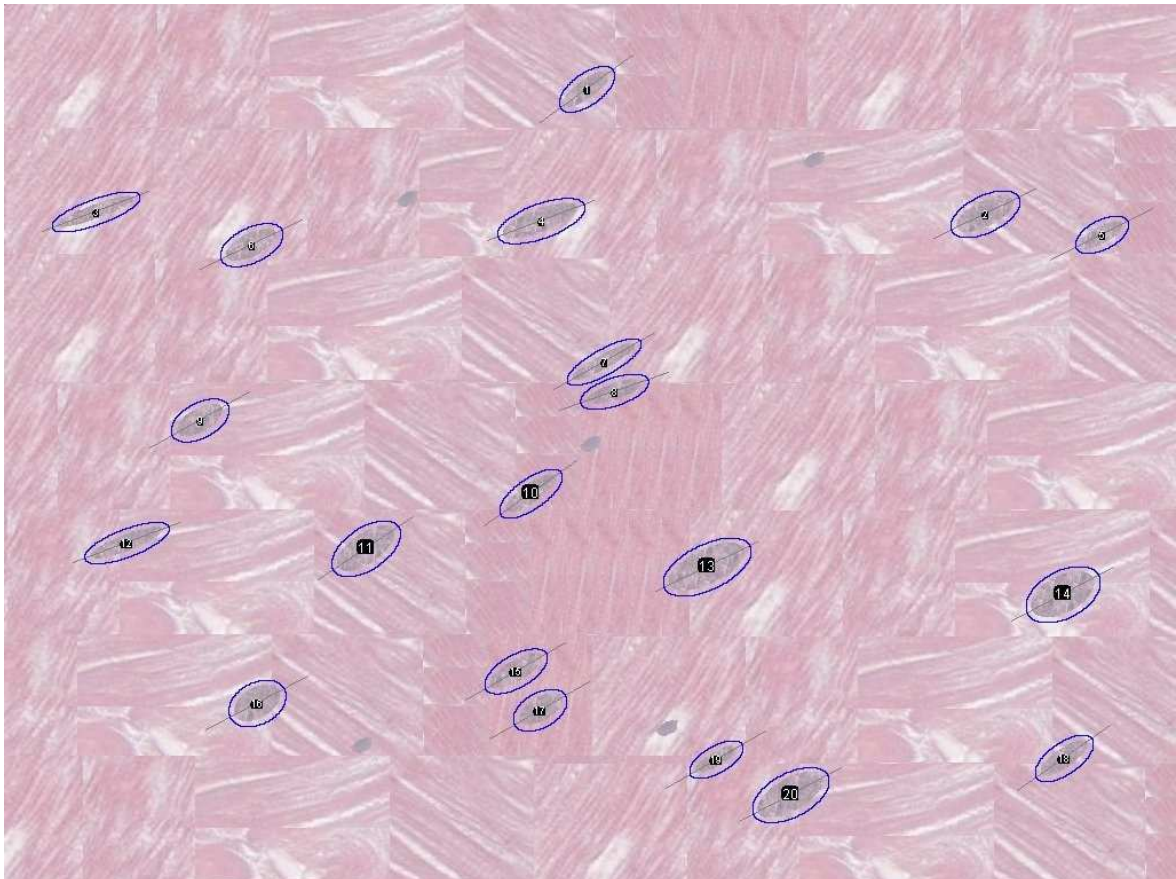


Abbildung 38: Darstellung der segmentierten Zellkerne inklusive Richtungsvektor der ersten Simulation. Die Winkel  $\varphi_{\text{def}}$  befinden sich in einem Bereich zwischen  $20^\circ$  und  $35^\circ$ .

Die Ergebnisse der Winkelmessungen der ersten Simulation sind folgender Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10: Detaillierte Ergebnisse der Winkelmessung der ersten Simulation. Es konnten alle 20 Ellipsen, die Schnittflächen von Kardiomyozyten repräsentieren, korrekt identifiziert werden. Die Abweichung von  $\Delta\bar{\varphi}_{\text{det}}$ , dem detektierten durchschnittlichen Winkel, zu  $\Delta\bar{\varphi}_{\text{def}}$ , dem definierten Winkel betrug  $0,7^\circ$ .

<b>Zellkern</b> („Nr.“ gibt die Nummer des Kerns in Abbildung 38 an)	<b>Zellkern korrekt identifiziert</b>	$\varphi_{\text{def}}$	$\varphi_{\text{det}}$
1 (Nr. 10)	Ja	35°	35°
2 (Nr. 15)	Ja	30°	30°
3 (Nr. 20)	Ja	30°	28°
4 (Nr. 19)	Ja	31°	29°
5 (Nr. 12)	Ja	21°	21°
6 (Nr. 4)	Ja	21°	20°
7 (Nr. 11)	Ja	35°	34°
8 (Nr. 18)	Ja	35°	35°
9 (Nr. 7)	Ja	29°	29°
10 (Nr. 2)	Ja	27°	26°
11 (Nr. 8)	Ja	20°	19°
12 (Nr. 13)	Ja	26°	26°
13 (Nr. 4)	Ja	20°	20°
14 (Nr. 6)	Ja	26°	26°
15 (Nr. 5)	Ja	29°	27°
16 (Nr. 9)	Ja	31°	29°
17 (Nr. 16)	Ja	31°	28°
18 (Nr. 1)	Ja	35°	36°
19 (Nr. 14)	Ja	28°	28°
20 (Nr. 17)	Ja	30°	30°
Mittelwert		28,5°	27,8°
Fibrozyt 1	Ja		
Fibrozyt 2	Ja		
Fibrozyt 3	Ja		
Fibrozyt 4	Ja		
Fibrozyt 5	Ja		

## Simulation 2

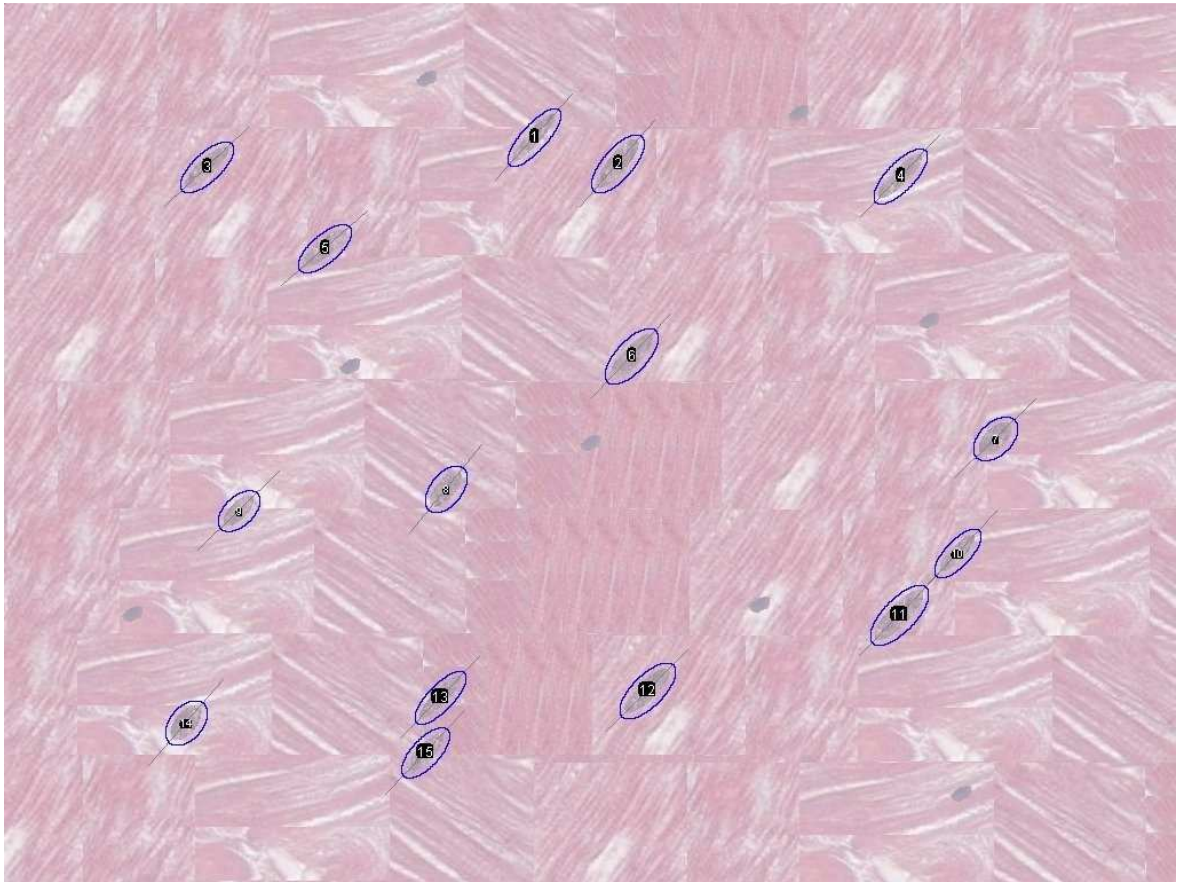


Abbildung 39: Segmentierte Zellkerne inklusive Richtungsvektor der zweiten Simulation. Die Winkel  $\varphi_{\text{def}}$  befinden sich in einem Bereich zwischen  $40^\circ$  und  $50^\circ$ .

Die Ergebnisse der Winkelmessungen der zweiten Simulation sind folgender Tabelle 11 zu entnehmen.

Tabelle 11: Detaillierte Ergebnisse der Winkelmessung der zweiten Simulation. Es konnten alle 15 Ellipsen, die Schnittflächen von Kardiomyozyten repräsentieren, korrekt identifiziert werden. Keine der Ellipsen, welche die Schnittflächen von Fibrozyten repräsentieren, wurde fälschlicherweise als Schnittfläche von Kardiomyozyten identifiziert. Die Abweichung von  $\Delta_{\overline{\varphi}_{\text{det}}}$ , dem detektierten durchschnittlichen Winkel, zu  $\Delta_{\overline{\varphi}_{\text{def}}}$ , dem definierten Winkel betrug  $0,07^\circ$ .

<b>Zellkern</b> („Nr.“ gibt die Nummer des Kerns in Abbildung 39 an)	<b>Zellkern korrekt identifiziert</b>	$\varphi_{\text{def}}$	$\varphi_{\text{det}}$
1 (Nr. 8)	Ja	50°	51°
2 (Nr. 7)	Ja	44°	44°
3 (Nr. 14)	Ja	50°	49°
4 (Nr. 3)	Ja	43°	43°
5 (Nr. 4)	Ja	45°	46°
6 (Nr. 11)	Ja	46°	46°
7 (Nr. 5)	Ja	40°	41°
8 (Nr. 9)	Ja	45°	44°
9 (Nr. 10)	Ja	47°	47°
10 (Nr. 12)	Ja	44°	45°
11 (Nr. 2)	Ja	50°	49°
12 (Nr. 13)	Ja	46°	46°
13 (Nr. 6)	Ja	47°	47°
14 (Nr. 15)	Ja	47°	47°
15 (Nr. 1)	Ja	48°	48°
Mittelwert		46,13°	46,2°
Fibrozyt 1	Ja		
Fibrozyt 2	Ja		
Fibrozyt 3	Ja		
Fibrozyt 4	Ja		
Fibrozyt 5	Ja		
Fibrozyt 6	Ja		
Fibrozyt 7	Ja		
Fibrozyt 8	Ja		

### Simulation 3

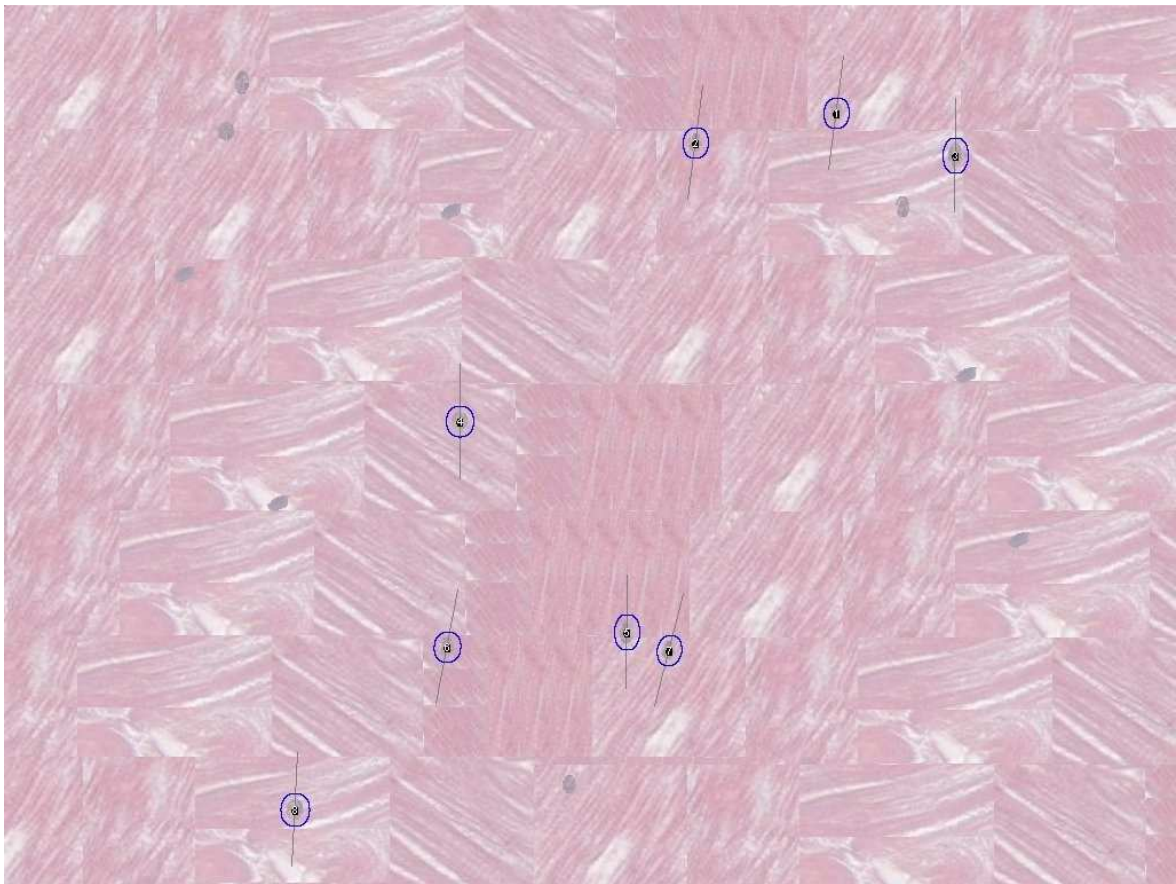


Abbildung 40: Segmentierte Zellkerne inklusive Richtungsvektor der dritten Simulation. Die Winkel  $\varphi_{\text{def}}$  befinden sich in einem Bereich zwischen  $80^\circ$  und  $90^\circ$ .

Die Ergebnisse der Winkelmessungen der dritten Simulation sind folgender Tabelle 12 zu entnehmen.

Tabelle 12: Detaillierte Ergebnisse der Winkelmessung der dritten Simulation. Es konnten 8 von 12 Ellipsen, die Schnittflächen von Kardiomyozyten repräsentieren, korrekt identifiziert werden. Keine der Ellipsen, welche die Schnittflächen von Fibrozyten repräsentieren, wurde fälschlicherweise als Schnittfläche von Kardiomyozyten identifiziert. Die Abweichung von  $\Delta_{\overline{\varphi}_{\text{det}}}$ , dem detektierten durchschnittlichen Winkel, zu  $\Delta_{\overline{\varphi}_{\text{def}}}$ , dem definierten Winkel betrug  $1^\circ$ .

<b>Zellkern</b> („Nr.“ gibt die Nummer des Kerns in Abbildung 40 an)	<b>Zellkern korrekt identifiziert</b>	$\varphi_{\text{def}}$	$\varphi_{\text{det}}$
1 (Nr. 4)	Ja	80°	90°
2 (Nr. 5)	Ja	86°	89°
3 (nicht segmentiert)	Nein	87°	-
4 (Nr. 6)	Ja	86°	79°
5 (Nr. 3)	Ja	87°	89°
6 (nicht segmentiert)	Nein	82°	
7 (Nr. 2)	Ja	90°	83°
8(nicht segmentiert)	Nein	82°	
9 (Nr. 8)	Ja	85°	87°
10 (Nr. 7)	Ja	82°	76°
11 (Nr. 1)	Ja	90°	83°
12 (nicht segmentiert)	Nein	82°	
Mittelwert		85,5°	84,5°
Fibrozyt 1	Ja		
Fibrozyt 2	Ja		
Fibrozyt 3	Ja		
Fibrozyt 4	Ja		
Fibrozyt 5	Ja		

### ***3.7.7.2 Zusammenfassung der Simulationsergebnisse***

In diesen Versuchen wurden insgesamt 47 Zellkerne simuliert, wovon 43 erfolgreich segmentiert wurden. Dies entspricht einer Rate von 91,5%. Es wurden 18 Fibrozyten erzeugt, wovon keiner fälschlicherweise als Kardiomyozyt erkannt wurde. Dies entspricht einer korrekten Identifizierung in 100% der Fälle.

Der durchschnittliche Winkel der 47 simulierten Zellkerne betrug 52,95°, für die 43 erfolgreich detektierten Zellkerne wurde ein durchschnittlicher Winkel von 52,83° errechnet. Dies entspricht einer Abweichung von 0,12°.

In Simulation 3 wurden die Kerne bewusst sehr klein gewählt, die kleinere Fläche führt zu einer ungenaueren Identifizierung. In der Regel haben die Kerne eine weitaus größere Fläche als in Simulation 3 gewählt, dennoch wurden 2/3 der Kerne korrekt identifiziert.

**3.7.7.3 Bestimmung der Faserorientierung: Vergleich von manueller Vermessung und NBO Methode mit Hesse Matrix, Fourier Transformation, lokalen Gradienten, grey level co-occurrence matrix und Structure Tensor**

In der nachfolgenden Tabelle 13 erfolgt der Vergleich zwischen manueller Bestimmung der Faserorientierung, Methoden zur Richtungsdetektion welche in Kapitel 2.7.1 beschrieben sind und der neu entwickelten NBO Methode.

Tabelle 13: Ergebnisse der Bestimmung der Faserorientierung in  $x/y$ -Richtung ( $\varphi$ ) sowie in  $z$ -Richtung (Neigungswinkel  $\alpha$ ).

<b>Methode</b>	<b><math>\varphi</math></b>	<b><math>\alpha</math></b>
Manuelle Vermessung	75,69°	-
Hesse Matrix	Nur Werte für einzelne Bildpunkte	-
Fourier Transformation	73,37° / 77,35°	-
Lokale Gradienten	76,34°	-
Grey level co-occurrence matrix	75°	-
Structure Tensor	72,66°	-
„Nucleus Based Orientation“ Methode (NBO)	76,25°	27°

Die Richtungsbestimmungen mittels Lokalen Gradienten, grey level co-occurrence matrix und der NBO Methode zeigten die besten Resultate wobei die NBO Methode mit einer Abweichung von 0,56° der tatsächlichen Faserorientierung am nächsten kam. Zusätzlich ist es mittels der NBO Methode möglich, auch den Neigungswinkel  $\alpha$  ( $z$ -Richtung) und die Position der Zellkerne bzw. der Kardiomyozyten zu bestimmen. Dies ist mit keiner der anderen Methoden möglich.

### 3.8 Auswertung

Die detaillierte Darstellung aller im Referenzbild (Abbildung 11) bestimmten Parameter findet sich in Tabelle 14.

Tabelle 14: Zusammenfassung der Ergebnisse der morphometrischen Studie welche am Referenzbild (Abbildung 11) durchgeführt wurde.

<b>Merkmal</b>	<b>Ergebnis</b>
Bindegewebsanteil	6,2% (größerer Bildausschnitt um Referenzbild, Abbildung 25) - 9,8% (Referenzbild, Abbildung 11)
Fibrosetyp	Der geringe Anteil an Bindegewebe repräsentiert am ehesten kompakte Fibrose
Anzahl und Fläche der Zellkerne	16 (berechnet aus segmentierten Zellkernen/Segmentierungserfolg = 9/0,57) 0,12% Flächenanteil pro Zellkern
Anzahl der Kardiomyozyten	30-34
Flächenanteil der Kardiomyozyten	70,4%
Durchschnittlicher Flächenanteil je Kardiomyozyt	2,35%
Verhältnis von Kardiomyozyten-Fläche zu Kardiomyozytenzellkern-Fläche	14,7:1. Die Fläche der Kardiomyozyten ist somit im Durchschnitt ca. 15 mal so groß wie die Kardiomyozytenzellkerne
$\varphi$ (Faserorientierung x/y)	76,25°
$SD_{\varphi}$ (Homogenität)	Mit einer Standardabweichung von ca. 8 Grad ist das Gewebe als durchaus homogen in Bezug auf die Ausrichtung zu bezeichnen
$\alpha$ (Faserorientierung z)	27°
$SD_{\alpha}$ (Homogenität)	11°

Entscheidend für die schnelle Beurteilung des Betrachters ist die geeignete Visualisierung, welche die Zellkerne mit der jeweiligen Orientierung, die Muskelfasern, und das

Bindegewebe beinhaltet. In Abbildung 41 ist die Visualisierung der durchgeführten Bildverarbeitungsschritte dargestellt.

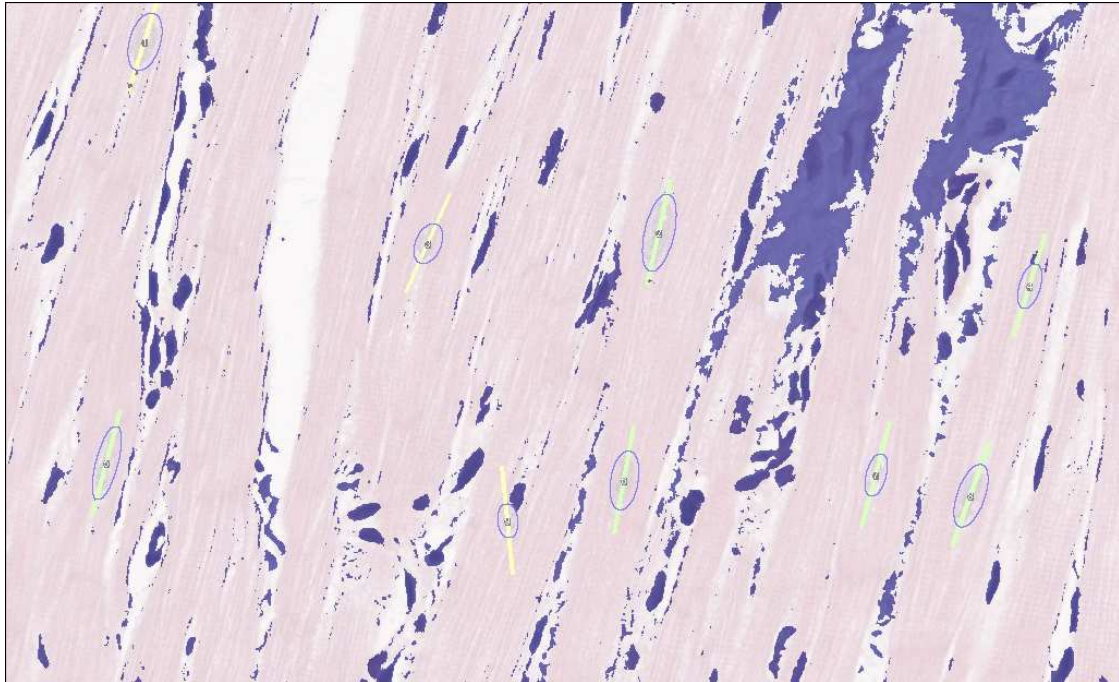


Abbildung 41: Zellkerne, Faserorientierung und Bindegewebe auf einen Blick. Die Zellkerne sind mit Ellipsen umrandet und mit Nummern versehen. Die Faserorientierung in  $x/y$  ist durch die Richtung der farbigen Linien durch die Ellipsen gekennzeichnet. Die Farbe definiert den Neigungswinkel  $\alpha$ , wobei die Einteilung in drei Klassen erfolgte. Ein flacher Neigungswinkel von  $0^\circ$ - $30^\circ$  wird grün dargestellt, ein mittlerer Neigungswinkel von  $31^\circ$ - $60^\circ$  wird gelb dargestellt. In Rot würde ein sehr stark ( $61^\circ$ - $90^\circ$ ) geneigter Zellkern dargestellt werden.

## 4 Diskussion

Es zeigte sich, dass basierend auf geeigneten histologischen Schnitten und mithilfe des Bildverarbeitungsprogrammes Fiji eine sehr detaillierte automatisierte morphometrische Studie an kardialem Gewebe durchgeführt werden konnte. Pathologen könnten daraus Schlüsse über den Zustand des Gewebes und eventuell aufgetretene pathologische Prozesse im Herzen ziehen. Der genau vermessene Zellkern eines Kardiomyozyten ist ein sehr guter Indikator für die automatisierte Charakterisierung des Herzgewebes und in weiterer Folge für die Erkennung pathologischer Prozesse im Herzgewebe. Der Richtungsverlauf der Zellkerne und somit der Kardiomyozyten im zweidimensionalen Bild lässt sich anhand der Gewebebestandteile Zellkern, Glanzstreifen, Zellmembran und Myofibrillen mit verschiedenen Methoden detektieren. Schlussendlich blieben jedoch nur der Zellkern und die Myofibrillen für eine exakte automatisierte Auswertung mittels manueller Winkelmessung und in weiterer Folge mit den vorgestellten Texturerkennungs- und Analyseverfahren über. Der Grund für diese Einschränkung ist einerseits, dass die Zellmembran durch die histologischen Methoden nur ungeeignet dargestellt wird und andererseits, dass die Glanzstreifen leider nicht in jedem Zellkern sichtbar waren. Außerdem sind selbst dargestellte Glanzstreifen nur ein sehr schlechter Indikator für die Faserorientierung.

Die Zellkerne der Kardiomyozyten präsentierten sich schlussendlich als die geeignetste Struktur für die Bestimmung der Faserorientierung in der zweidimensionalen Ebene und die einzige Struktur, die einen Hinweis auf die Orientierung der Faser im dreidimensionalen Raum geben kann. Andere Methoden, welche das gesamte Bild für die Bestimmung der Faserorientierung heranziehen, wie die Bestimmung der lokalen Gradienten oder die Fourier-Transformation, messen auch Elemente wie Fibrozyten, Fibrozytenzellkerne, Endothelzellkerne oder die Querstreifung der Muskulatur, welche das Ergebnis selbst im zweidimensionalen Raum verfälschen können. Des Weiteren sind dies Methoden, welche für sich noch keine Information über die Orientierung des Gewebes an einer bestimmten Position im Bild, sondern nur eine globale Aussage über die vorliegende Orientierung des Gewebes liefern. Genau diese exakte Zuordnung einer Orientierung zu einem Gewebebestandteil ist aber für eine möglichst genaue elektroanatomische Korrelation erforderlich.

Der Schlüsselprozess in der Bildverarbeitungskette war die Unterscheidung zwischen den Zellkernen der Kardiomyozyten und den Zellkernen anderer Zellelemente wie z.B. Fibrozyten- und Endothelzellkerne, welche teilweise eine gänzlich andere Orientierung aufweisen als die Zellkerne der Kardiomyozyten. Für den Erfolg der „Nucleus Based Orientation“ Methode (NBO) war wesentlich, dass die Bilderzeugung und die Bildverarbeitung in hoher Qualität durchgeführt wurden. Besonders die Segmentierung der Zellkerne mit dem ersten präsentierten Algorithmus erfordert gegebenenfalls Anpassungen, beispielsweise in Abhängigkeit der Färbemethode oder der Chromatinverteilung im Zellkern. Der zweite vorgestellte Algorithmus war weniger anfällig auf Änderungen im Bildmaterial. In Summe wurden 87% bzw. 57% der Kardiomyozytenzellkerne bei verschwindend geringer Anzahl an falsch positiven Ergebnissen korrekt identifiziert.

Die Orientierung des Gewebes konnte mithilfe der Zellkerndimensionen außerordentlich genau bestimmt werden, dies konnte mittels einer Simulation bestätigt werden. Darüber hinaus kann der Algorithmus eine Aussage über die Lage der Zelle im Raum geben.

Allerdings gibt es auch eine Limitierung der NBO Methode: Die Berechnung der dreidimensionalen Faserorientierung kann zwei Ergebnisse erzeugen,  $\alpha$  und  $\alpha + 90^\circ$ . Dies ist begründet auf der Tatsache, dass das Ergebnis eines Schnittes durch einen Kreiszyylinder eine Ellipse ist, welche keinen Rückschluss darauf lässt, ob die berechnete Faserorientierung im Winkel  $\alpha$  oder orthogonal dazu verläuft.

Ergibt sich z.B. aus der Berechnung ein Neigungswinkel von 13 Grad könnte die Faser aber in die dazu orthogonale Richtung mit -167 Grad verlaufen, um dies zu verdeutlichen folgt Abbildung 42:

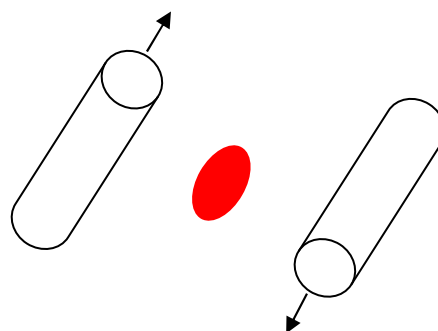


Abbildung 42: Möglicher Faserverlauf im Raum, wenn die Schnittfläche (rote Ellipse) des Zellkerns als Basis für die Orientierungsbestimmung herangezogen wird. Rechts ist ein Zellkern dargestellt der orthogonal zum linken Zellkern verläuft. Die Schnittfläche der zwei Zellkerne ist identisch.

Das bedeutet, aus dem Breiten/Längenverhältnis der Schnittfläche (Ellipse) kann zwar das Ausmaß der Orientierung bzw. des Winkels (spitzer Winkel, flacher Winkel) bestimmt werden, jedoch bleibt die Frage nach der genauen Richtung ( $\pm 90^\circ$ ) unbeantwortet. Die Information, in welche Raumrichtung die Faser bzw. der Zellkern verläuft muss daher aus geometrischen Informationen aus einem benachbarten Gewebeschnitt gewonnen werden. Bei einer Zellkernlänge von  $15\ \mu\text{m}$  und einer Breite von  $4\text{-}5\ \mu\text{m}$  sowie bei einer Schnittdicke von ca.  $1\text{-}2\ \mu\text{m}$  muss sich in einem benachbarten Schnitt ein Teil des Zellkerns befinden. Selbst wenn der Zellkern der Länge nach geschnitten wurde. Eine Überlagerung der Bilder mit entsprechender Registrierung (z.B. durch Stanzung) würde schlussendlich Auskunft über den tatsächlichen Richtungsverlauf liefern.

Darüber hinaus können kleine Artefakte in der segmentierten Form der Zellkerne dazu führen, dass die Berechnung der Faserorientierung im zweidimensionalen Raum zu etwas verfälschten Ergebnissen führt. Die histologischen Schnitte müssen daher in hoher Präzision und mit geringer Artefaktanfälligkeit durchgeführt werden. Dies ist durch die gewählten Einbettungs- und Färbemethoden gegeben. Aufgrund der Ähnlichkeit von Kardiomyozytenzellkernen und Zellkernen der Fibrozyten und Endothelzellen, welche die größte Herausforderung bei der automatisierten Bildverarbeitung mit sich bringt, ist es dennoch überlegenswert immunhistochemische Färbungen beispielsweise mit Antimyomesin (Kardiomyozyten), Anti Vimentin (Fibrozyten) und DAPI für eine bessere Unterscheidung zwischen Kardiomyozyten und Fibroblasten zu verwenden. Der Aufwand in der Bilderzeugung wird dadurch jedoch ungleich höher.

Abgesehen von der Faserorientierung ist es gelungen weitere interessante Charakteristika des Gewebes zu bestimmen, beispielsweise sind das die Anzahl der Kardiomyozyten im Bild, der Flächenanteil des Bindegewebes, der Flächenanteil bzw. die Größe der Zellkerne und das Verhältnis von Kardiomyozytenfläche zu Zellkernfläche. Es ist zu beachten, dass einige dieser Parameter nur in Zusammenhang mit dem Neigungswinkel  $\alpha$  betrachtet werden dürfen, da beispielsweise die Flächen der Zellkerne bzw. die Flächen der durch den Schnitt entstehenden Ellipsen, immer abhängig vom Neigungswinkel sind. Außerdem sollte die Homogenität des Neigungswinkels  $\alpha$  bei der Betrachtung des Gesamtergebnisses eine Rolle spielen, da es durchaus Regionen im Myokard und somit auch in potentiell von diesen Regionen vorliegenden Bildern gibt wo sich die Faserorientierungen ändern.

Es gibt durchaus Potential für die klinische Anwendbarkeit dieser morphometrischen Studie und der dafür entwickelten Algorithmen. Eine Voraussetzung wäre die Evaluierung des Algorithmus auf humanes Gewebe. Wenn humanes Gewebe bei der histologischen Färbung Unterschiede in den Farbtönen zeigt, oder sich die Chromatinverteilung unterschiedlich darstellt sind entsprechende Anpassungen im Algorithmus erforderlich. Bei Proben von verstorbenen Patienten ist der Zellkern, abhängig von der Zeitspanne vom Eintritt des Todes bis zur Probenentnahme, bereits geschädigt und kann für eine Analyse nur bedingt herangezogen werden. Die invasive Entnahme von Proben im Herzkatheterlabor könnte jedoch den gewünschten Erfolg bringen. Zu analysierende Gewebeproben können mittels Myokardbiopsie entnommen werden, ein Verfahren, welches mittlerweile zu den Standardprozeduren in einem Herzkatheterlabor zählt. Auf diese Weise und bei detaillierterer Analyse der Ergebnisse der morphometrischen Daten der Zellkerne, könnte eine automatisierte Analyse der pathologischen Prozesse wie Hypertrophie, Kardiomyopathie oder Hyperplasie durchgeführt werden. Zu beachten ist, dass bei Hypertrophie die Faserorientierung nicht mittels des Zellkerns detektierbar ist, da der Zellkern sich in seiner Form verändert und polymorph erscheint.

# Literaturverzeichnis

Agocha AE, Eghbali-Webb M (1997) A simple method for preparation of cultured cardiac fibroblasts from adult human ventricular tissue. *Mol Cell Biochem.* 172(1-2):195-198.

Auada MP, Adam R L, Leite NJ, Puzzi M B, Cintra ML, Rizzo WB, Metze K (2006) Texture Analysis of the Epidermis Based on Fast Fourier Transformation in Sjögren-Larsson Syndrome. *Anal Quant Cytol Histol* 28(4): 219–227.

Bauer N (2007) *Handbuch zur industriellen Bildverarbeitung: Qualitätssicherung in der Praxis.* Stuttgart: Fraunhofer IRB Verlag, 2007.

Betz O, Wegst U, Weide D, Heethoff M, Helfen L, Lee W-K, Cloetens P (2007). Imaging applications of synchrotron X-ray phase-contrast microtomography in biological morphology and biomaterials science. I. General aspects of the technique and its advantages in the analysis of millimetre-sized arthropod structure. *Journal of Microscopy*, Vol. 227: 51–71.

Beyersdorf F (1983) *Ultrastrukturelle Veränderungen der Myokardzellen während Herzhypertrophie, -degeneration und -ischämie.* Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.

Camelliti P, K. Borg T, Kohl P (2005) Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovascular Research* 65: 40– 51.

Chen Y (1998) *Image Analysis Methods for Paper Formation Evaluation*, Thesis. Department of Electrical Engineering, University of Toronto.

Daniels F, ter Haar Romeny BM, Rubbens M, van Assen H (2006) Quantification of Collagen Orientation in 3D Engineered Tissue. 3<sup>rd</sup> Kuala Lumpur International Conference on Biomedical Engineering, Volume 15 of the series IFMBE Proceedings: 282-286.

De Jong S, van Veen TA, van Rijen HV, de Bakker JM (2011) Fibrosis and Cardiac Arrhythmias. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 57(6):630-638.

De Jong AM, Maass AH, Oberdorf-Maass SU, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH, van Gelder IC (2010) Mechanisms of atrial structural changes caused by stretch occurring before and during early atrial fibrillation. *Cardiovascular Research* 89: 754–765.

Elbischger PJ., Bischof H, Regitnig P, Holzapfel GA (2004) Automatic analysis of collagen fiber orientation in the outer most layer of human arteries. *Pattern Anal. Applic.* 7: 269-284.

Elbischger PJ, Bischof H, Holzapfel GA, Regitnig P (2005) Computer Vision Analysis of Collagen Fiber Bundles in the Adventitia of Human Blood Vessels. *Stud Health Technol Inform.* 113:97-129.

Enomae T, Han YH, Isogai A (2006) Nondestructive determination of fibre orientation distribution of paper surface by image analysis. *Nordic Pulp and Paper Research Journal* 21(2): 253-259.

Eroschenko VP (2012) DiFiore's Atlas of Histology: With Functional Correlations. Lippincott Raven 2012.

Gamper U, Boesiger P, Kozerke S (2007) Diffusion Imaging of the In Vivo Heart Using Spin Echoes—Considerations on Bulk Motion Sensitivity. *Magn Reson Med* 57:331–337.

Genova D (2007) Histomorphometrische Untersuchungen von Herzmuskelzellen bei organspendern, Patienten mit koronarer Herzkrankheit und Patienten mit Aortenklappenstenose - Eine Studie der Herzhypertrophie [Dissertation]. Berlin: Medizinischen Fakultät Charité, Universitätsmedizin Berlin.

Handels H (2009) Medizinische Bildverarbeitung – Bildanalyse, Mustererkennung und Visualisierung für die computergestützte ärztliche Diagnostik und Therapie. Wiesbaden: Vieweg+Teubner Verlag, 2009.

Heinzeller T (2001) *Histologie, Histopathologie und Zytologie für den Einstieg*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2001.

Hu W, Li H, Wang C, Gou S, Fua L (2012) Characterization of collagen fibers by means of texture analysis of second harmonic generation images using orientation-dependent gray level co-occurrence matrix method. *Journal of Biomedical Optics* 17(2), 026007.

Ilea DE, Ghita O, Whelan PF (2008) Evaluation of local orientation for texture classification. In: *VISAPP 2008 - 3rd International Conference on Computer Vision Theory and Applications*, 22-25 January 2008, Madeira, Portugal.

Karathanassi V, Topouzelis K, Sarantopoulos D, Iossifidis C (2004) Texture methods for sea waves' classification with the use of SAR images. *Proc. SPIE 5574, Remote Sensing for Environmental Monitoring, GIS Applications and Geology IV*, 22 October 2004.

Karlon WJ., Hsu PP, Li S, Chien S, McCulloch AD, Omens JH (1999) Measurement of Orientation and Distribution of Cellular Alignment and Cytoskeletal Organization. *Ann Biomed Eng.* 27(6): 712-720.

Khorasani H, Zheng Z, Nguyen C, Zara J, Zhang X, Wang J, Ting K, Soo C (2011) A Quantitative Approach to Scar Analysis. *The American Journal of Pathology*. Vol. 178(2): 621-628.

Klima M, Burns TR, Chopra A (1990) Myocardial fibrosis in the elderly. *Arch Pathol Lab Med.* 114: 938 –942.

Kohl P, Noble D (2009) Systems biology and the virtual physiological human. *Nature Molecular Systems Biology*. Vol 5: 202.

Korecky B, Sweet S, Rakusan K (1979) Number of nuclei in mammalian cardiac myocytes. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. Vol. 57, No. 10: 1122-1129

Kühnel W (2014): *Taschenatlas Histologie*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 2014.

Lewalter T, Lüderitz B (2010) Herzrhythmusstörungen: Diagnostik und Therapie. 6.Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2010.

Liu ZQ (1991) Scale space approach to directional analysis of images. Appl.Opt., 1991, Vol. 30(11): 1369-1373.

Renate Lüllmann-Rauch: Taschenlehrbuch Histologie. 3. Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 2009.

Mayrhofer-Reinhartshuber M, Kainz P, Sánchez-Quintana D, Macías Y, Asslaber M, Hofer E, Ahammer H (2014) Semi-Automated Analysis of Myocardial Fibrosis by Fractal Characterization of Histological Images. International Biophysics Congress, Brisbane, Australia; 08/2014.

Mewton N, Liu CY, Croisille P, Bluemke D, Lima JAC (2011) Assessment of Myocardial Fibrosis With Cardiovascular Magnetic Resonance. Journal of the American College of Cardiology, Vol 57(8): 891-903.

Michels G, Jaspers N (2012) Sonographie organ- und leitsymptomorientiert. Grundlagen, Diagnostik, Differentialdiagnostik, Befundung, Dokumentation. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 2012.

Nakano S, Muramatsu T, Nishimura S, Senbonmatsu T (2012) Cardiomyocyte and Heart Failure. In: Harou Sugi, Hrsg. Current Basic and Pathological Approaches to the Function of Muscle Cells and Tissues - From Molecules to Humans. InTech, 161-182.

Niessen W, Lopez A, Van Enk W, Van Roermund P, ter Haar Romeny B, Viergever M (1997) In Vivo Analysis of Trabecular Bone Architecture. In J. S. Duncan and G. Gindi, editors, Information Processing and Medical Imaging, volume 1230 of Lecture Notes in Computer Science: 435-440.

Olivetti G, Cigola E, Maestri R, Corradi D, Lagrasta C, Gambert SR, Anversa P (1996) Aging, cardiac hypertrophy and ischemic cardiomyopathy do not affect the proportion of

mononucleated and multinucleated myocytes in the human heart. *J Mol Cell Cardiol* 28(7):1463-1477.

Oberholzer M (1983) *Morphometrie in der klinischen Pathologie*. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo : Springer Verlag.

Pangonytė D, Stalioraitytė E, Žiuraitienė R, Kazlauskaitė D, Palubinskienė J, Balnytė I (2008) Cardiomyocyte remodeling in ischemic heart disease. *Medicina (Kaunas)* 44(11): 848-854.

Palmer B, Bizios R (1997) Quantitative characterization of vascular endothelial cell morphology and orientation using Fourier transform analysis. *J Biomech Eng.* 119:159–165.

Plank G, Burton R B, Hales P, Bishop M, Mansoor T, Bernabeu M O, Garny A, Prassl A J, Bollensdorff C, Mason F, Mahmood F, Rodriguez B, Grau V, Schneider J E, Gavaghan D, Kohl P (2009) Generation of histo-anatomically representative models of the individual heart: tools and application. *Phil Trans Roy Soc A*, 367: 2257-2292.

Reeves A (1990) *Optimized Fast Hartley Transform for the MC68000 with applications in image processing [Masterarbeit]*. Hanover: Thayer School of Engineering, Dartmouth College.

Rezakhaniha R, Agianniotis A, Schrauwen JTC, Griffa A, Sage D, Bouten CVC, van de Vosse FN, Unser M, Stergiopoulos N (2011) Experimental investigation of collagen waviness and orientation in the arterial adventitia using confocal laser scanning microscopy. *Biomech Model Mechanbiol*, 11(3-4): 461-473.

Sauvola J, Pietikäinen M (1995) Skew angle detection using texture direction analysis. In *Proc. of the 9<sup>th</sup> Scandinavian Conference in Image Analysis*. 09/1995.

Schindelin J et al. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 2012; 9:676–82.

Siew Yen Ho (2009) Anatomy and myoarchitecture of the left ventricular wall in normal and in disease. *European Journal of Echocardiography*. 10(8): iii3–iii7

Stoeck CT, Toussaint N, Boesiger P, Kozerke S (2012) Dual heart-phase cardiac DTI using Local-look STEAM. *Proc. Int. Soc. Mag. Reson. Med.* 20: 227.

Thévenaz P, Blu T, Unser M (2000) Interpolation Revisited. *IEEE Transactions on Medical Imaging*. 19(7): 739-758.

Thomas C (1998) *Histopathologie: Lehrbuch und Atlas zur allgemeinen und speziellen Pathologie*. 12. Auflage. Stuttgart, New York: Schattauer Verlag, 1998.

Tracy RE, Sander GE (2011) Histologically Measured Cardiomyocyte Hypertrophy Correlates with Body Height as Strongly as with BodyMass Index. *Cardiology Research and Practice*. 2011, Article ID 658958, 9 pages.

Toussaint N, Sermesant M, Stoeck CT, Kozerke S, Batchelor PG (2010) In vivo human 3D cardiac fibre architecture: reconstruction using curvilinear interpolation of diffusion tensor images. *Med Image Comput Comput Assist Interv*. 13(Pt 1):418-25.

Wohlschlaeger J, Levkau B, Brockhoff G, Schmitz KJ, von Winterfeld M, Takeda A, Takeda N, Stypmann J, Vahlhaus C, Schmid CPomjanski N, Böcking A, Baba HA (2010) Hemodynamic Support by Left Ventricular Assist Devices Reduces Cardiomyocyte DNA Content in the Failing Human Heart. *Circulation*. 121(8): 989-996.

Van Zuijlen PP, de Vries HJ, Lamme EN, Coppens JE, van Marle J, Kreis RW, Middelkoop E (2012) Morphometry of dermal collagen orientation by Fourier analysis is superior to multi-observer assessment. *J Pathol*. 198(3):284-91.

Vélez-García GM, Wapperom P, Kunc V, Baird DG, Zink-Sharp A (2012) Sample preparation and image acquisition using optical-reflective microscopy in the measurement of fiber orientation in thermoplastic composites. *Journal of Microscopy*. 248:23–33. doi: 10.1111/j.1365-2818.2012.03646.x. pmid:22971217.

Zach B, Hofer E, Asslaber M, Ahammer H (2016) Automated Texture Analysis and Determination of Fibre Orientation of Heart Tissue: A Morphometric Study. PLoS ONE 11(8): e0160735. doi: 10.1371/journal.pone.0160735.

Zhang J, Tan T (2002) Brief review of invariant texture analysis methods. Pattern Recognition. 35: 735–747.

# Anhang

## Programmcode

### Flächenanteil Bindegewebe

```
open(„Pfad\DateinameSegmentierteKerne.jpg“);
open("Pfad\Dateiname.jpg");
run("Colour Deconvolution", "vectors=Giemsa");
selectWindow("Dateiname.jpg -(Colour_1)");
setOption("BlackBackground", false);
run("Make Binary");
run("Fill Holes");
imageCalculator("Subtract create", "Dateiname.jpg-(Colour_1)", "DateinameSegmentierteKerne.jpg ");
selectWindow("Result of DateinameSegmentierteKerne.jpg -(Colour_1)");
run("Measure");
```

### Zellkerne segmentieren – Algorithmus 1

```
selectWindow("Dateiname des Bildes.jpg");
run("Duplicate...", "title=[Dateiname des Bildes -1.jpg]");
run("Unsharp Mask...", "radius=10 mask=0.90");
imageCalculator("Multiply create", "Dateiname des Bildes.jpg", "Dateiname des Bildes -1.jpg");
selectWindow("Result of Dateiname des Bildes.jpg");
run("Remove Outliers...", "radius=5 threshold=50 which=Dark");
selectWindow("Result of Dateiname des Bildes.jpg");
run("Colour Deconvolution", "vectors=[User values] [r1]=0.57735026 [g1]=0.57735026 [b1]=0.57735026 [r2]=0.9999995 [g2]=0.0007063186 [b2]=0.0007063186 [r3]=0.0007063186 [g3]=0.9999995 [b3]=0.0007063186");
selectWindow("Result of Dateiname des Bildes.jpg-(Colour_2)");
run("Median...", "radius=2");
run("Gaussian Blur...", "sigma=10");
setAutoThreshold("IsoData");
setThreshold(0, 241);
setOption("BlackBackground", false);
run("Convert to Mask");
run("Convert to Mask");
imageCalculator("Add create", "Dateiname des Bildes.jpg", "Result of Dateiname des Bildes.jpg -(Colour_2)");
min=newArray(3);
max=newArray(3);
filter=newArray(3);
a=getTitle();
run("RGB Stack");
run("Convert Stack to Images");
```

```

selectWindow("Red");
rename("0");
selectWindow("Green");
rename("1");
selectWindow("Blue");
rename("2");
min[0]=0;
max[0]=148;
filter[0]="pass";
min[1]=0;
max[1]=125;
filter[1]="pass";
min[2]=0;
max[2]=148;
filter[2]="pass";
for (i=0;i<3;i++){
    selectWindow(""+i);
    setThreshold(min[i], max[i]);
    run("Convert to Mask");
    if (filter[i]=="stop") run("Invert");
}
imageCalculator("AND create", "0","1");
imageCalculator("AND create", "Result of 0","2");
for (i=0;i<3;i++){
    selectWindow(""+i);
    close();
}
selectWindow("Result of 0");
close();
selectWindow("Result of Result of 0");
rename(a);

run("Gaussian Blur...", "sigma=3");
setOption("BlackBackground", false);
run("Make Binary");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=[Bare Outlines] display exclude include
summarize record add in_situ");
roiManager("Show All with labels");
roiManager("Show All");
selectWindow("Dateiname des Bildes.jpg");
selectWindow("Result of Dateiname des Bildes.jpg");
run("Set Measurements...", "area centroid center perimeter bounding fit shape feret's integrated stack limit add
redirect=None decimal=3");
saveAs("Results", "Laufwerk:\\Verzeichnis\\Dateiname");

```

## Zellkerne segmentieren – Algorithmus 2

```
run("Duplicate...", "title=Dateiname.jpg");
min=newArray(3);
max=newArray(3);
filter=newArray(3);
a=getTitle();
run("HSB Stack");
run("Convert Stack to Images");
selectWindow("Hue");
rename("0");
selectWindow("Saturation");
rename("1");
selectWindow("Brightness");
rename("2");
min[0]=0;
max[0]=255;
filter[0]="pass";
min[1]=0;
max[1]=255;
filter[1]="pass";
min[2]=0;
max[2]=145;
filter[2]="pass";
for (i=0;i<3;i++){
  selectWindow(""+i);
  setThreshold(min[i], max[i]);
  run("Convert to Mask");
  if (filter[i]=="stop") run("Invert");
}
imageCalculator("AND create", "0","1");
imageCalculator("AND create", "Result of 0","2");
for (i=0;i<3;i++){
  selectWindow(""+i);
  close();
}
selectWindow("Result of 0");
close();
selectWindow("Result of Result of 0");
rename(a);

run("Set Measurements...", "area mean standard modal min centroid center perimeter bounding fit shape area_fraction
stack limit add redirect=None decimal=3");
run("Analyze Particles...", "size=10-Infinity circularity=0.00-1.00 show=[Bare Outlines] display include");
roiManager("Show All with labels");
```

```

roiManager("Show All");
selectWindow("Dateiname.jpg");

saveAs("Results", " Laufwerk:\Pfad\Dateiname.jpg ");
newImage("Bildname", "RGB White", 1024, 623, 1);
pathfile=File.openDialog("Choose the file to Open:");
filestring=File.openAsString(pathfile);
rows=split(filestring, "\n");
x=newArray(rows.length);
y=newArray(rows.length);
al=newArray(rows.length);
ak=newArray(rows.length);
w=newArray(rows.length);
st=newArray(rows.length);
m=newArray(rows.length);
ar=newArray(rows.length);
for(i=0; i<rows.length; i++){

columns=split(rows[i], "\t");
x[i]=parseInt(columns[7]);
y[i]=parseInt(columns[8]);
al[i]=parseInt(columns[16]);
ak[i]=parseInt(columns[17]);
w[i]=parseInt(columns[18]);
st[i]=parseInt(columns[3]);
m[i]=parseInt(columns[2]);
ar[i]=parseInt(columns[20]);

if (ar[i]<=99.5){

drawEllipse(x[i], y[i], (al[i]/2)+3, (ak[i]/2)+3, w[i]);
run("Make Binary");
run("Fill Holes");
}
}

selectWindow("Bildname");
run("RGB Color");
open(" Laufwerk:\Pfad\Dateiname.jpg ");
imageCalculator("Add create", "Bildname", "Dateiname.jpg");

selectWindow("Result of Bildname");
run("16-bit");
setAutoThreshold("MaxEntropy");

```

```

run("Set Measurements...", "area mean standard modal min centroid center perimeter bounding fit shape area_fraction
stack limit add redirect=None decimal=3");
run("Analyze Particles...", "size=10-Infinity circularity=0.00-1.00 show=[Bare Outlines] display include add");
selectWindow("Result of Bildname");
roiManager("Show All with labels");
roiManager("Show All");
selectWindow("Result of Bildname");
saveAs("Results", " Laufwerk:\Pfad\Dateiname.jpg ");

selectWindow("ZellkernSimulation");
saveAs("Jpeg", " Laufwerk:\Pfad\Dateiname.jpg ");
exit;

requires("1.42i");
if (selectionType==1)
    exit("Area selection required");
List.setMeasurements;
x = List.getValue("X");
y = List.getValue("Y");
a = List.getValue("Major");
b = List.getValue("Minor");
angle = List.getValue("Angle");
getVoxelSize(w, h, d, unit);
drawEllipse(x/w, y/w, (a/w)/2, (b/w)/2, angle);
exit;

function drawEllipse(x, y, a, b, angle) {
    autoUpdate(false);
    setLineWidth(2);
    beta = -angle * (PI/180);
    for (i=0; i<=360; i+=2) {
        alpha = i*(PI/180) ;
        X = x + a*cos(alpha)*cos(beta) - b*sin(alpha)*sin(beta);
        Y = y + a*cos(alpha)*sin(beta) + b*sin(alpha)*cos(beta);
        if (i==0) moveTo(X, Y); else lineTo(X,Y);
        if (i==0) {ax1=X; ay1=Y;}
        if (i==90) {bx1=X; by1=Y;}
        if (i==180) {ax2=X; ay2=Y;}
        if (i==270) {bx2=X; by2=Y;}
    }
    drawLine(ax1, ay1, ax2, ay2);
    drawLine(bx1, by1, bx2, by2);
    updateDisplay;
}
newImage("Bildname", "RGB White", 1024, 623, 1);

```

```

pathfile=File.openDialog("Choose the file to Open:");
filestring=File.openAsString(pathfile);
rows=split(filestring, "\n");
x=newArray(rows.length);
y=newArray(rows.length);
al=newArray(rows.length);
ak=newArray(rows.length);
w=newArray(rows.length);
m=newArray(rows.length);
st=newArray(rows.length);
wz=newArray(rows.length);

for(i=1; i<rows.length; i++){

columns=split(rows[i], "\t");
x[i]=parseInt(columns[7]);
y[i]=parseInt(columns[8]);
al[i]=parseInt(columns[16]);
ak[i]=parseInt(columns[17]);
w[i]=parseInt(columns[18]);
m[i]=parseInt(columns[2]);
st[i]=parseInt(columns[3]);
if (m[i]<=150){
if (st[i]<=35){
if (st[i]>=15){
if ((st[i]+m[i])<165){
drawEllipse(x[i], y[i], (al[i]/2), (ak[i]/2), w[i]);
run("Make Binary");
run("Fill Holes");
}
}
}
}
}
selectWindow("Bildname");
run("RGB Color");
open("Laufwerk:\\Pfad\\Dateiname.jpg ");
imageCalculator("Add create", "Bildname", "Dateiname.jpg");

selectWindow("Bildname");

setOption("BlackBackground", false);
run("Make Binary");
run("Set Measurements...", "area mean standard modal min centroid center perimeter bounding fit shape area_fraction
stack limit add redirect=None decimal=3");

```

```

run("Analyze Particles...", "size=10-Infinity circularity=0.00-1.00 show=[Bare Outlines] display exclude include
summarize record add in_situ");
selectWindow("Result of Bildname");
roiManager("Show All with labels");
roiManager("Show All");
saveAs("Results", " Laufwerk:\Pfad\Dateiname.jpg ");

selectWindow("Bildname");
saveAs("Jpeg", " Laufwerk:\Pfad\Dateiname.jpg ");
exit;

```

## Kardiomyozyten – Flächenanteil

```

selectWindow("Colour Deconvolution");
selectWindow("Dateiname.jpg-(Colour_1)");
run("Median...", "radius=10");
run("Make Binary");
run("Measure");

```

## Bestimmung der Faserorientierung in x/y-Richtung (

```

selectWindow("Bildname");

setOption("BlackBackground", false);
run("Make Binary");
run("Set Measurements...", "area mean standard modal min centroid center perimeter bounding fit shape area_fraction
stack limit add redirect=None decimal=3");
run("Analyze Particles...", "size=10-Infinity circularity=0.00-1.00 show=[Bare Outlines] display exclude include
summarize record add in_situ");
selectWindow("Result of Bildname");
roiManager("Show All with labels");
roiManager("Show All");
saveAs("Results", " Laufwerk:\Pfad\Dateiname.jpg ");

```

## Berechnung der Faserorientierung in z-Richtung inklusive Visualisierung

```

selectWindow("Dateiname.jpg");
pathfile=File.openDialog("Choose the file to Open:");
filestring=File.openAsString(pathfile);
rows=split(filestring, "\n");
X=newArray(rows.length);

```

```

Y=newArray(rows.length);
al=newArray(rows.length);
ak=newArray(rows.length);
An=newArray(rows.length);
wz=newArray(rows.length);

for(xi=0; xi<rows.length; xi++){
columns=split(rows[xi],"t");
X[xi]=parseInt(columns[7]);
Y[xi]=parseInt(columns[8]);
al[xi]=parseInt(columns[16]);
ak[xi]=parseInt(columns[17]);
An[xi]=parseInt(columns[18]);
wz[xi]=asin(ak[xi]/al[xi])*(180/PI);

run("Line Width...", "line=4");
makeLine(X[xi]-50, Y[xi], X[xi]+50, Y[xi]);
run("Rotate...", "angle="+An[xi]*(-1));

if (wz[xi] <15){
setForegroundColor(0, 255, 0);
} else {
if (wz[xi] <30){
setForegroundColor(118, 255,0);
} else {
if (wz[xi] <45){
setForegroundColor(255, 255, 0);
} else {
if (wz[xi] <60){
setForegroundColor(255, 105, 0);
} else {
if (wz[xi] <75){
setForegroundColor(255, 0, 0);
} else {
if (wz[xi] <90){
setForegroundColor(139, 0, 99);
}
}}}}
run("Fill", "slice");
}

selectWindow("Dateiname2.jpg");
run("Duplicate...", "title=Dateiname2Dup.jpg");
selectWindow("Dateiname2Dup.jpg");

```

```

pathfile=File.openDialog("Choose the file to Open:");
filestring=File.openAsString(pathfile);
rows=split(filestring, "\n");
X=newArray(rows.length);
Y=newArray(rows.length);
M=newArray(rows.length);
An=newArray(rows.length);

for(xi=0; xi<rows.length; xi++){
columns=split(rows[xi], "\t");
X[xi]=parseInt(columns[7]);
Y[xi]=parseInt(columns[8]);
al[xi]=parseInt(columns[16]);
ak[xi]=parseInt(columns[17]);
An[xi]=parseInt(columns[18]);
wz[xi]=asin(ak[xi]/al[xi])*(180/PI);

run("Line Width...", "line=2");
makeLine(X[xi]-50, Y[xi], X[xi]+50, Y[xi]);
run("Rotate...", "angle="+An[xi]*(-1));

if (wz[xi] <15){
setForegroundColor(0, 255, 0);
} else {
if (wz[xi] <30){
setForegroundColor(118, 255, 0);
} else {
if (wz[xi] <45){
setForegroundColor(166, 255, 0);
} else {
if (wz[xi] <60){
setForegroundColor(255, 255, 0);
} else {
if (wz[xi] <75){
setForegroundColor(255, 105, 0);
} else {
if (wz[xi] <90){
setForegroundColor(255, 0, 0);
}
}}}}
run("Fill", "slice");
}
saveAs("Jpeg", " Laufwerk:\\Pfad\\Dateiname.jpg");
setForegroundColor(0, 0, 0);
selectWindow("Dateiname2.jpg");

```

```
run("Add Image...", "image=Dateiname.jpg x=0 y=0 opacity=50");
saveAs("Jpeg", " Laufwerk:\\Pfad\\Dateiname.jpg");
```

## Simulation

```
newImage("ZellkernSimulation", "RGB White", 1024, 768, 1);
pathfile=File.openDialog("Choose the file to Open:");
filestring=File.openAsString(Dateiname);
rows=split(filestring, "\n");
x=newArray(rows.length);
y=newArray(rows.length);
z=newArray(rows.length);
a=newArray(rows.length);
b=newArray(rows.length);
for(i=0; i<rows.length; i++){
columns=split(rows[i], "\t");
x[i]=parseInt(columns[0]);
y[i]=parseInt(columns[1]);
z[i]=parseInt(columns[2]);
a[i]=parseInt(columns[3]);
b[i]=parseInt(columns[4]);
drawEllipse(x[i], y[i], z[i], a[i], b[i]);
run("Make Binary");
run("Fill Holes");
}
selectWindow("Dateiname");
run("RGB Color");
open("Pfad\\DateinameMaske.jpg");
imageCalculator("Add create", "Dateiname", "ZellkernMaske.jpg");

requires("1.42i");
if (selectionType==1)
    exit("Area selection required");
List.setMeasurements;
//print(List.getList); // list all measurements
x = List.getValue("X");
y = List.getValue("Y");
a = List.getValue("Major");
b = List.getValue("Minor");
angle = List.getValue("Angle");
getVoxelSize(w, h, d, unit);
drawEllipse(x/w, y/w, (a/w)/2, (b/w)/2, angle);
exit;
```

```

function drawEllipse(x, y, a, b, angle) {
  autoUpdate(false);
  setLineWidth(2);
  beta = -angle * (PI/180);
  for (i=0; i<=360; i+=2) {
    alpha = i*(PI/180) ;
    X = x + a*cos(alpha)*cos(beta) - b*sin(alpha)*sin(beta);
    Y = y + a*cos(alpha)*sin(beta) + b*sin(alpha)*cos(beta);
    if (i==0) moveTo(X, Y); else lineTo(X,Y);
    if (i==0) {ax1=X; ay1=Y;}
    if (i==90) {bx1=X; by1=Y;}
    if (i==180) {ax2=X; ay2=Y;}
    if (i==270) {bx2=X; by2=Y;}
  }
  drawLine(ax1, ay1, ax2, ay2);
  drawLine(bx1, by1, bx2, by2);
  updateDisplay;
}

```

## Färbeprotokolle

Die Färbeprotokolle entsprechen jenen des Instituts für Pathologie der Medizinischen Universität Graz.

- **Azan nach Heidenhain**
  - Schnitte entparaffinieren und in Wasser bringen (evtl. Sublimatniederschläge entfernen),
  - Färben in vorgewärmter Azokarminlösung im Wärmeschrank bei 56° C 10-15 min.
  - Abspülen in Aqua dest.
  - Differenzieren in Anilinalkohol (100 µl Anilin auf 100 ml 100 % Alkohol) bis nur noch die Zellkerne gefärbt sind.
  - Auswaschen in Essigsäure-Ethanol 30-60 sec.
  - Beizen in 5% Phosphorwolframsäure 15 min bei ca. 60° C.
  - Spülen in Aqua dest. 1 Teil Anilinblau-Orange-Gemisch +Essigsäure (1:1 verdünnt) 15 min bei ca. 60° C.
  - Kurz abspülen in Aqua dest.
  - Differenzieren mit 96%igem Ethanol.
  - Entwässern in abs. Isopropanol. Xylol, Harzeinschluß.

- **Gomori**
  - Schnitte entparaffinieren
  - 1 % Kaliumpermanganat 1 min
  - Abspülen in Aqua dest.
  - 2 % Kaliummetabisulfit bis Schnitt entfärbt
  - Abspülen in Aqua dest.
  - 2 % Eisenalaun 1 min.
  - Abspülen in Aqua dest.
  - Silberlösung 1-2 min.
    - 10 ml 10 % Silbernitrat
    - 2 ml 10 % Kalilauge
  - Abspülen in Aqua dest.
  - 3-5 % Formalin
  - Alkoholreihe, Harzeinschluß.
- **Trichrome nach Gieson**
  - Schnitte entparaffinieren
  - Giesonfarbstoff 2 min.
  - Bläuen mit heißem Wasser 5 min.
  - 0,5 % Essigsäure 1 min.
  - Bläuen mit heißem Wasser 5 min.
  - Trichromlösung 5 min
    - Lösung A: 1 g Säurefuchsin, 0,5 ml Eisessig, 100 ml Aqua dest.
    - Lösung B: 1 g Ponceau de Xylidine, 1ml Eisessig, 100 ml Aqua dest
    - 1 Teil Lösung A und 3 Teile Lösung B mischen
  - Kurz abspülen mit Aqua dest.
  - Molybdätosphorsäure 1 min. auftropfen
  - Abkippen ohne abwaschen
  - Anilinblau 1 min. auftropfen
    - 0,5 g Anilinblau, 2,5 ml Eisessig, 100 ml Aqua dest.
  - Abspülen mit Aqua dest.
  - 0,5 % Essigsäure 5 min.
  - Alkoholreihe, Harzeinschluß
- **Sudanschwarz**
  - Schnitte entparaffinieren

- Kernechtrot 5 min.
- Abspülen mit Aqua dest.
- Sudanschwarz B Lösung 10 min., verschließen, abdunkeln
  - 1 g Sudanschwarz B, 100 ml 70 % Alkohol
  - Sudanschwarz B wird mit Alkohol übergossen und auf dem Wasserbad bis zum Kochen erhitzt, abgekühlt und filtriert
  - 3 Tage Reifung
- Abspülen mit Aqua dest.
- Mit Gelatine eindecken
- **Siriusrot**
  - Schnitte entparaffinieren
  - Coelestineblau 7 min.
    - 2,5g Eisenalaun in 50 ml Aqua dest. Lösen
    - 0,25 g Coelestineblau
    - Gemisch 3 min. kochen und filtrieren
    - 7 ml Glycerin beimischen
  - Schnitte direkt in Häkalaun 7 min.
  - Kurz differenziert in Salzsäure-Alkohol
  - Bläuen 5-10 min.
  - Pikro-Siriusrot 30 min.
    - 0,1 % Siriusrot in gesättigter Pikrinsäure
    - 15 g Pikrinsäure in 950 ml Aqua dest. lösen
  - Rasch entwässern in 3 Portionen absolutem Alkohol
  - Xylol und eindecken
- **HE**
  - Xylol 3 x 2 min.
  - 100 % Alkohol 2 x 2 min
  - Aqua dest.
  - GiII II 4 min.
  - Aqua dest.
  - GiII II 4 min.
  - Eosin
  - 100 % Alkohol 3 x 1.20 min.
  - Alkohol / Xylol 2 min.

- Xylol 2 min.
- **Oelrot**
  - Schnitte entparaffinieren
  - 60 % Isopropanol 5 min.
  - Ölrot 10 min.
    - Stammlösung:
      - 0,5 g Oil-Red-O (Stammlösung)
      - 100 ml 99 % Isopropanol (Stammlösung)
    - Gebrauchslösung
      - 30 ml Stammlösung + 20 ml Aqua dest
  - 60 % Isopropanol kurz differenzieren
  - Spülen mit Aqua dest.
  - Hämalaun nach Mayer 3 min.
  - Bläuen mit heißem Wasser 5 min.
  - Eindecken mit Gelatine