

**Diplomarbeit**

# **FRAKTALE ANALYSE KARDIALER FIBROSE**

eingereicht von

**Dominik Bajzek**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor(in) der gesamten Heilkunde  
(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt am

**Gottfried Schatz Forschungszentrum  
für zelluläre Signaltransduktion, Stoffwechsel und Altern  
Lehrstuhl für Biophysik**

unter der Anleitung von

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

Graz, am 14.09.2020

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 14.09.2020

Dominik Bajzek eh.

## Danksagungen

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Personen, insbesondere meiner Familie, die mich sowohl finanziell als auch emotional unterstützt haben bedanken.

Meiner Mutter, welche mir immer wieder Zuversicht gegeben hat, auch in schwierigen Phasen nicht aufzugeben und mein Ziel konsequent weiterzuverfolgen, kommt ein besonderer Dank zu.

Einen sehr wichtigen Beitrag leistete auch mein Betreuer Prof. Helmut Ahammer, indem er stets ein Verständnis für meine Fragestellungen zeigte und mich immer wieder mit sinnvollen Hilfestellungen auf den richtigen Weg führte. Dadurch konnte ich mich besser auf die zentralen Fragestellungen der Arbeit konzentrieren.

Zu guter Letzt will ich mich herzlich bei meiner Lebensgefährtin Sandra für ihr Verständnis und ihre Unterstützung, vor allem aber dem moralischen Beistand beim Erstellen dieser Arbeit bedanken.

# Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung .....	i
Danksagungen .....	ii
Inhaltsverzeichnis .....	iii
Glossar und Abkürzungen .....	vi
Abbildungsverzeichnis.....	vii
Tabellenverzeichnis.....	x
Zusammenfassung .....	xii
Abstract .....	xiii
1 Einleitung.....	1
1.1 Anatomie und Physiologie des Herzens.....	1
1.1.1 Erregungsleitungssystem des Herzens .....	2
1.1.2 Histologie des Herzens .....	4
1.2 Kardiale Fibrose .....	7
1.2.1 Arten der kardialen Fibrose.....	7
1.2.2 Pathophysiologie und Biomarker .....	11
1.2.3 Arrhythmogenität bei kardialer Fibrose .....	14
1.2.4 Nicht-invasive Bildgebung.....	18
1.3 Mathematische Grundlagen .....	20
1.3.1 Grundlagen eines Fraktals.....	20
1.3.2 Eigenschaften eines Fraktals.....	21
1.3.3 Berechnungsmethoden der fraktalen Dimension .....	25
2 Material und Methoden .....	30
2.1 Histologische Schnitte .....	30
2.1.1 Färbemethoden .....	31
2.2 IQM .....	33
2.3 Bildbearbeitung .....	34

2.3.1	Erstellung der binären Bilder.....	35
2.3.2	Erstellung der Grauwertbilder .....	38
2.4	Bildverarbeitung .....	40
2.4.1	Anwendung der Box-Counting Methode .....	40
2.4.2	Anwendung der Minkowski-Bouligand Methode .....	41
2.4.3	Anwendung der Higuchi Methode.....	41
2.4.4	Anwendung der Fast Fourier Transformation .....	42
2.4.5	Anwendung der Pyramidendimensionen .....	44
2.5	Statistik.....	45
3	Ergebnisse – Resultate.....	47
3.1	Ergebnisse der binären Bilder .....	47
3.1.1	Picosirius Rot.....	47
3.1.2	Trichrom nach Gieson .....	55
3.2	Ergebnisse der Grauwertbilder.....	63
3.2.1	Picosirius Rot – RGBmean .....	63
3.2.2	Trichrom nach Gieson – RGBmean.....	71
4	Diskussion .....	79
4.1	Erwartungen.....	79
4.2	Bewertung der Ergebnisse der binären Bilder.....	79
4.2.1	Box-Counting Methode .....	79
4.2.2	Minkowski-Bouligand Methode .....	80
4.3	Bewertung der Ergebnisse der Grauwertbilder.....	81
4.3.1	Higuchi Methode.....	81
4.3.2	Fast Fourier Transformation .....	82
4.3.3	Pyramidenmethoden.....	83
4.4	Ähnlichkeiten und Unterschiede der verwendeten Methoden .....	83
4.5	Vor- und Nachteile der verwendeten Methoden .....	84

5	Konklusion .....	85
6	Literaturverzeichnis.....	87

## Glossar und Abkürzungen

FFT	Fast-Fourier Transformation
BCM	Box-Counting Method
H2D	Higuchi-2D Method
PDM	Pyramid-Differences Method
PGM	Pyramid-Gradient Method
MBM	Minkowski-Bouligand Method
pdf	probability density function (Dichtefunktion)
JPEG	Joint Photographic Experts Group
PNG	Portable Network Graphics
RGBmean	Gemittelttes Grauwertbild
RGBrel	Relativer Farbanteil, welcher einen Schwellenwert überschreitet
CIELab	Color space defined by the International Commission on Illumination
IQM	Interactive Quantitative Morphology
sec	Sekunde
TIMP-1	Tissue inhibitor of metalloprotease - 1
PIIINP	N-terminus of procollagen III
PICP	C-terminus of procollagen I
ICTP	C-terminal Telopeptide of Type I Collagen
ECM	Extrazelluläre Matrix
SCN5A	Kodierendes Gen für den Natriumkanal Na <sub>v</sub> 1.5.

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Schema zum Erregungsleitungssystem des Herzens. ....	3
Abbildung 1-2: Form und Fläche eines Kardiomyozyten. ....	4
Abbildung 1-3: Kollagen im Myokard. ....	8
Abbildung 1-4: Interstitielle Fibrose. ....	9
Abbildung 1-5: Kompakte Fibrose. ....	9
Abbildung 1-6: Diffuse Fibrose. ....	10
Abbildung 1-7: Patchy Fibrose. ....	11
Abbildung 1-8: Schematische Darstellung des Kollagenumsatzes. ....	12
Abbildung 1-9: Verteilungsmuster der verschiedenen Komponenten der extrazellulären Matrix. ....	13
Abbildung 1-10: Unterschied der Erregungsverzögerung zwischen patchy und diffuser Fibrose. ....	16
Abbildung 1-11: Schematische Darstellung der räumlichen Erregungsausbreitung in einem Areal der patchy Fibrose. ....	17
Abbildung 1-12: Beispiele für fraktale Objekte. ....	20
Abbildung 1-13: Kreis als geometrische Figur. ....	21
Abbildung 1-14: Sierpinski-Dreieck. ....	22
Abbildung 1-15: Schematische Darstellung der statistischen Selbstähnlichkeit. ...	23
Abbildung 1-16: Doppellogarithmischer Plot von verschiedenen Küstenlängen...	24
Abbildung 1-17: Prinzip der Box-Counting Methode. ....	26
Abbildung 1-18: Prinzip der Fourier-Transformation. ....	28
Abbildung 1-19: Prinzip der Triangular-Prism Methode. ....	29
Abbildung 2-1: Single whole-slide scan. ....	30
Abbildung 2-2: Färbemethoden des Myokards. ....	32
Abbildung 2-3: RGB-Histogramm einer kompakten Fibrose. ....	34
Abbildung 2-4: Generierung eines binären Bildes mit dem RGBrel-Algorithmus..	36
Abbildung 2-5: Vereinfachte Darstellung des Lab-Farbraumes als Koordinatensystem. ....	37
Abbildung 2-6: Generierung eines binären Bildes im CIELab-Farbraum. ....	37
Abbildung 2-7: Darstellung einzelner Farbkanäle. ....	38
Abbildung 2-8: Darstellung eines RGBmean Bildes. ....	39
Abbildung 2-9: Histogramm eines modifizierten RGBmean-Bildes. ....	39

Abbildung 2-10: Doppellogarithmischer Plot der Box-Counting Methode.....	40
Abbildung 2-11: Doppellogarithmischer Plot der Minkowski-Bouligand Methode.	41
Abbildung 2-12: Doppellogarithmischer Plot der Higuchi 2D Methode.....	42
Abbildung 2-13: Doppellogarithmischer Plot der Fast-Fourier Transformation.....	43
Abbildung 3-1: Boxplot der fraktalen Dimension $D_b$ (Picrosirius, RGBrel, Box- Counting Methode).....	48
Abbildung 3-2: Boxplot der fraktalen Dimension $D_b$ (Picrosirius, CIELab, Box- Counting Methode).....	49
Abbildung 3-3: Boxplot der fraktalen Dimension $D_m$ (Picrosirius, RGBrel, Minkowski-Bouligand Methode).....	51
Abbildung 3-4: Boxplot der fraktalen Dimension $D_m$ (Picrosirius, CIELab, Minkowski-Bouligand Methode).....	53
Abbildung 3-5: Boxplot der fraktalen Dimension $D_b$ (Trichrom, RGBrel, Box- Counting Methode).....	55
Abbildung 3-6: Boxplot der fraktalen Dimension $D_b$ (Trichrom, CIELab, Box- Counting Methode).....	57
Abbildung 3-7: Boxplot der fraktalen Dimension $D_m$ (Trichrom, RGBrel, Minkowski-Bouligand Methode).....	59
Abbildung 3-8: Boxplot der fraktalen Dimension $D_m$ (Trichrom, CIELab, Minkowski-Bouligand Methode).....	61
Abbildung 3-9: Boxplot der fraktalen Dimension $D_h$ (Picrosirius, RGBmean, Higuchi-2D Methode).....	63
Abbildung 3-10: Boxplot der fraktalen Dimension $D_f$ (Picrosirius, RGBmean, Fast- Fourier Transformation).....	65
Abbildung 3-11: Boxplot der fraktalen Dimension $D_p$ (Picrosirius, RGBmean, Pyramid-Differences Methode).....	67
Abbildung 3-12: Boxplot der fraktalen Dimension $D_p$ (Picrosirius, RGBmean, Pyramid-Gradient Methode).....	69
Abbildung 3-13: Boxplot der fraktalen Dimension $D_h$ (Trichrom, RGBmean, Higuchi-2D Methode).....	71
Abbildung 3-14: Boxplot der fraktalen Dimension $D_f$ (Trichrom, RGBmean, Fast- Fourier Transformation).....	73
Abbildung 3-15: Boxplot der fraktalen Dimension $D_p$ (Trichrom, RGBmean, Pyramid-Differences Methode).....	75

Abbildung 3-16: Boxplot der fraktalen Dimension  $D_p$  (Trichrom, RGBmean, Pyramid-Gradient Methode)..... 77

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Resultate der paarweisen Vergleiche mittels Kruskal-Wallis Test und r-Werte (Picosirius, RGBrel, Box-Counting Methode).....	48
Tabelle 2: Resultate der paarweisen Vergleiche mittels Kruskal-Wallis Test und r-Werte (Picosirius, CIELab, Box-Counting Methode). ....	50
Tabelle 3: Resultate der paarweisen Vergleiche mittels Kruskal-Wallis Test und r-Werte (Picosirius, RGBrel, Minkowski-Bouligand Methode).....	52
Tabelle 4: Resultate der paarweisen Vergleiche mittels Kruskal-Wallis Test und r-Werte (Picosirius, CIELab, Minkowski-Bouligand Methode).....	54
Tabelle 5: Resultate der paarweisen Vergleiche mittels Kruskal-Wallis Test und r-Werte (Trichrom, RGBrel, Box-Counting Methode). ....	56
Tabelle 6: Resultate der paarweisen Vergleiche mittels Kruskal-Wallis Test und r-Werte (Trichrom, CIELab, Box-Counting Methode).....	58
Tabelle 7: Resultate der paarweisen Vergleiche mittels Kruskal-Wallis Test und r-Werte (Trichrom, RGBrel, Minkowski-Bouligand Methode). ....	60
Tabelle 8: Resultate der paarweisen Vergleiche mittels Kruskal-Wallis Test und r-Werte (Trichrom, CIELab, Minkowski-Bouligand Methode).....	62
Tabelle 9: Resultate der paarweisen Vergleiche mittels Kruskal-Wallis Test und r-Werte (Picosirius, RGBmean, Higuchi-2D Methode).....	64
Tabelle 10: Resultate der paarweisen Vergleiche mittels Kruskal-Wallis Test und r-Werte (Picosirius, RGBmean, Fast-Fourier Transformation).....	66
Tabelle 11: Resultate der paarweisen Vergleiche mittels Kruskal-Wallis Test und r-Werte (Picosirius, RGBmean, Pyramid-Differences Methode).....	68
Tabelle 12: Resultate der paarweisen Vergleiche mittels Kruskal-Wallis Test und r-Werte (Picosirius, RGBmean, Pyramid-Gradient Methode). ....	70
Tabelle 13: Resultate der paarweisen Vergleiche mittels Kruskal-Wallis Test und r-Werte (Trichrom, RGBmean, Higuchi-2D Methode). ....	72
Tabelle 14: Resultate der paarweisen Vergleiche mittels Kruskal-Wallis Test und r-Werte (Trichrom, RGBmean, Fast-Fourier Transformation). ....	74
Tabelle 15: Resultate der paarweisen Vergleiche mittels Kruskal-Wallis Test und r-Werte (Trichrom, RGBmean, Pyramid-Differences Methode). ....	76
Tabelle 16: Resultate der paarweisen Vergleiche mittels Kruskal-Wallis Test und r-Werte (Trichrom, RGBmean, Pyramid-Gradient Methode).....	78

Tabelle 17: Mittlere benötigte Rechenzeit der verwendeten fraktalen Methoden für  
Bilder mit einer Auflösung von 2048 x 2048 Pixel. .... 84

## Zusammenfassung

Mehrere Faktoren haben einen Einfluss auf Erregungsleitungsstörungen des Myokards. So erhöht sich im alternden, als auch im kranken Herzen die Kollagen Typ I / Typ III Ratio. Weiters findet man insbesondere im vorgeschädigten Herzmuskel spezielle differenzierte Myofibroblasten, welche ebenfalls einen großen Einfluss auf die Entwicklung von Herzrhythmusstörungen ausüben. Auch auf molekularbiologischer Ebene findet man bestimmte Marker, welche für die fibrotischen Veränderungen von Bedeutung sind. So führt eine verringerte Expression von spannungsgesteuerten Natriumionenkanälen (SCN5A) oder *gap-junctions*-bildenden Transmembranproteinen (Cx43) wiederum zu einer erhöhten Suszeptibilität für Rhythmusstörungen und indirekt zur Fibrosierung. Natürlich spielt die Menge an Fibrose im Herzmuskel eine große Rolle für Herzinsuffizienz und Erregungsausbreitungsstörungen. Jedoch scheint die dreidimensionale Struktur der Fibrose in Bezug auf ventrikuläre und supraventrikuläre Rhythmusstörungen mit eventueller hämodynamischer Instabilität eine weit wichtigere Rolle einzunehmen. Je nach Fibrosetyp ist das Herzmuskelgewebe unterschiedlich vulnerabel für Arrhythmien. Morphologisch lassen sich vier verschiedene Arten von myokardialer Fibrose unterscheiden.

Diese Diplomarbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung der myokardialen Fibrose mittels objektiver Methoden. Dafür wurden in dieser Arbeit verschiedene Analysemethoden für die Berechnung der fraktalen Dimension von digitalisierten Myokardschnitten verwendet. Insgesamt wurden 149 Trichrom nach Gieson gefärbte Schnitte und 168 Picrosirius-Rot gefärbte Schnitte verwendet. Die Gewebsschnitte wurden als Grauwertbilder (RGBmean) und als binäre Bilder (RGBrel, CIELab) mittels fraktaler Methoden analysiert. Die binären Bilder ließen bis auf die Unterscheidung zwischen keiner und interstitieller Fibrose als auch zwischen diffuser und interstitieller Fibrose Differenzierungen der untersuchten Entitäten zu. Bei der Analyse der Grauwertbilder zeigten sich signifikante Unterschiede aller myokardialer Fibrosetypen. Diese Resultate könnten bei der histopathologischen Befundung eine zusätzliche, objektive Entscheidungshilfe darstellen. Weiters könnten in der Zukunft fraktale Methoden bei automatischen Analysen mittels neuronaler Netzwerke von Bedeutung sein.

## Abstract

Several factors affect myocardial conduction disorders. This increases the collagen type I / type III ratio in the aging and the sick heart. Furthermore, you can find special differentiated myofibroblasts in the muscle of the heart, which also have great influence on the development of cardiac arrhythmias. Certain markers can also be found at the molecular biological level, which play another important role. The reduced expression of voltage-gated sodium channels (SCN5A) or transmembrane proteins forming gap junctions (Cx43) successively leads to increased susceptibility for arrhythmias and indirectly to fibrosis. Of course, the amount of fibrosis in the heart muscle plays an important role in relation to the heart failure and conduction delay from a certain size. However, the three-dimensional structure of fibrosis seems to play a much more important role in relation to ventricular and supraventricular arrhythmias with potential hemodynamic instability. Depending on the type of fibrosis, the heart muscle tissue is vulnerable to arrhythmias in different ways. Morphologically, four different types of myocardial fibrosis can be differentiated.

This diploma thesis deals with the characterization of myocardial fibrosis using objective methods. Various analysis methods for determining the fractal dimension of the digitized myocardial slices were used in this thesis. A total of 149 Gieson's trichrome stained slices and 168 Sirius red stained slices were used. The slices were analysed as gray value images (RGBmean) and as binary images (RGBrel, CIELab) using fractal methods. Except for the distinction between none and interstitial fibrosis and between diffuse and interstitial fibrosis, the binary images allowed differentiations of the examined entities. When analysing the gray value images, there are significant differences in all types of myocardial fibrosis. These results can provide an additional, objective decision-making aid for histopathological findings. Furthermore, fractal methods could be important in the future by using neuronal networks for automatic analysis.

# 1 Einleitung

In dieser Arbeit werden die Charakteristiken vier morphologisch unterschiedlicher kardialer Fibrosen mittels mathematischer, fraktaler Methoden analysiert. Es ist derzeit noch nicht abschließend geklärt, durch welche Mechanismen bzw. Entitäten die morphologisch differenzierbaren Fibrosearten induziert werden. Man weiß aber, dass je nach Textur des Narbengewebes die Suszeptibilität für Arrhythmien unterschiedlich ausgeprägt ist. Diese Arbeit soll bei der histopathologischen Befundung einen zusätzlichen Schritt in Richtung eines objektiven diagnostischen Instruments liefern. In nicht eindeutigen Fällen könnte die Messgröße der fraktalen Dimension zur Hilfestellung für die Beschreibung der Fibrose verwendet werden.

## ***1.1 Anatomie und Physiologie des Herzens***

Das menschliche Herz ist das zentrale Organ des Blutkreislaufs. Hierbei handelt es sich um ein muskuläres Hohlorgan, welches pro Minute ca. 5 – 6 Liter Blut durch den Körper und die Lungen pumpt. Im Mittel wiegt das Herz, welches nur etwas größer als die geschlossene Faust ist, ungefähr 300g und besitzt ein durchschnittliches Organvolumen von 785ml. Hämodynamisch am wichtigsten ist die Funktion als elektrisch gesteuerte mechanische Druck- und Saugpumpe für den beständigen, rezirkulierenden Transport des Blutes innerhalb des Blutkreislaufs. Jede Herzhälfte besteht aus zwei separaten Hohlräumen, getrennt durch Klappen und Septen. Das rechte Herz stellt hierbei die Pumpstation für den Transport des Blutes in den Lungenkreislauf (kleiner Kreislauf) dar, das linke Herz die für den Körperkreislauf (großer Kreislauf) (Robb, Robb, 1942). Vom Atrium dextrum strömt das durch die Hohlvenen (Vena cava superior und Vena cava inferior) kommende desoxygenierte Blut durch die Trikuspidalklappe in den rechten Ventrikel. Während der Systole pumpt das Herz das Blut durch die Pulmonalklappe in den Lungenkreislauf, in welchem die Reoxygenation erfolgt. Über die Pulmonalvenen gelangt das Blut schließlich während der Diastole vom linken Vorhof über die Mitralklappe in den Ventriculus sinister. Schließlich wird von dort das oxygenierte Blut über die Aortenklappe in die Aorta und somit in den großen Körperkreislauf gepumpt (Junqueira et al., 2005).

Die Blutversorgung des Herzens erfolgt über zwei Koronararterien, welche direkt aus dem Sinus aortae der Aortenklappe entspringen. Die rechte Koronararterie verläuft zwischen dem Conus arteriosus und dem rechten Herzohr zum rechten Abschnitt des Sulcus coronarius. Diesem folgt sie im weiteren Verlauf zur dorsalen Herzfläche und endet dort als Ramus interventricularis posterior. Somit versorgt die rechte Koronararterie das rechte Herz sowie dorsale Anteile des linken Ventrikels. Außerdem werden aufgrund dieser anatomischen Lage auch große Bereiche des Erregungsleitungssystems von der rechten Koronararterie versorgt. Die meist stärker ausgeprägte linke Koronararterie verläuft ein kurzes Stück zwischen dem Conus arteriosus und dem linken Herzohr, um sich dann in den Ramus circumflexus und den Ramus interventricularis anterior zu verzweigen. Das linke Herz und die vorderen 2/3 des Kammerseptums werden von der linken Koronarie versorgt (Robb, Robb, 1942).

Die mit den Herzkranzarterien verlaufenden Venen vereinigen sich im Sinus coronarius. Von dort aus fließt ungefähr 75% des venösen Blutes des Herzens über die Mündungsstelle, dem Ostium sinus coronarii, zum rechten Herzvorhof. Kleinere Venenäste auf der Herzoberfläche, die oberhalb der Trikuspidalklappe in der Nähe des Sulcus coronarius verlaufen, durchstoßen die Herzwand und münden direkt im rechten Atrium. Venen aus der inneren Myokardschicht (Thebesius-Venen), können direkt in die verschiedenen Herzhöhlen einmünden (Anderhuber, Pera & Streicher, 2012).

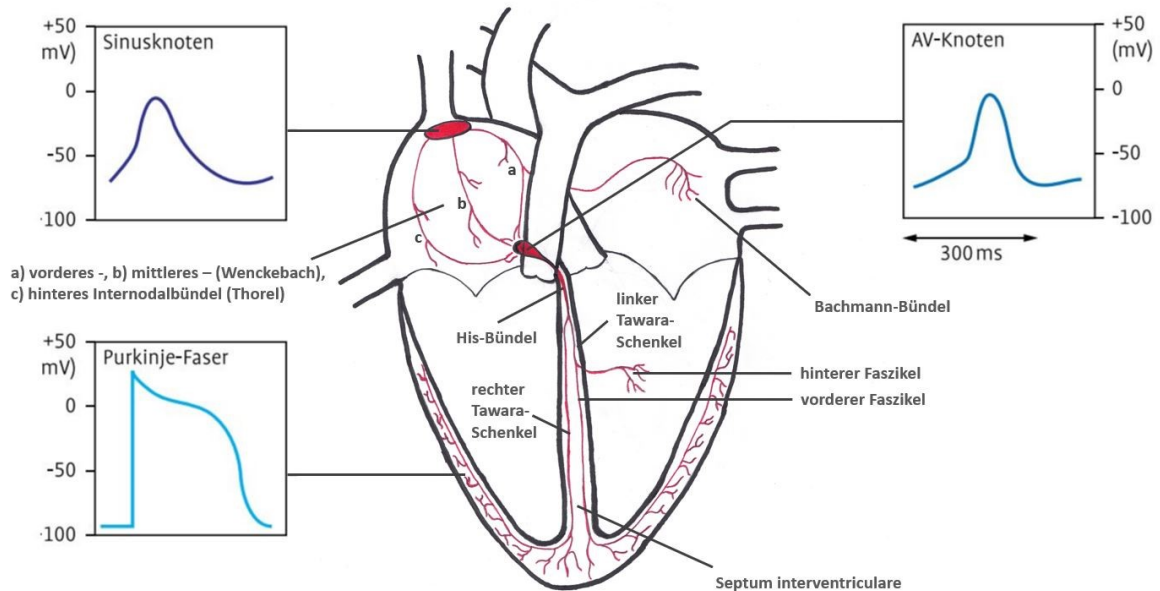
Die Innervation des Herzens umfasst viszeroafferente und viszeroefferente Nerven welche zusammen den Plexus cardiacus bilden.

### **1.1.1 Erregungsleitungssystem des Herzens**

In einem kleinen Knoten, in der Nähe der Mündung der Vena cava superior in den rechten Vorhof, entstehen rhythmische Erregungen im sogenannten Sinusknoten. Von dieser Region breiten sich die elektrischen Erregungen in weniger als 0,1 sec über beide Vorhöfe aus und veranlassen die Vorhofkontraktion. Da die Ventrikel von den Vorhöfen vollständig durch die Ventilebene getrennt sind, springt die Erregung nicht auf die Herzkammern über (Abbildung 1-1).

Für die Erregungsweiterleitung liegt ca. auf Höhe der Ventilebene ein weiterer Knoten (AV-Knoten) in der Vorhofscheidewand. Bei diesem atrioventrikulären

Übergang wird die Erregung mit etwa 0,1 sec Verzögerung für die Herzkammern weitergeleitet. Diese Verzögerung ist notwendig, um in der späten Diastole die Herzkammern weiter zu füllen.



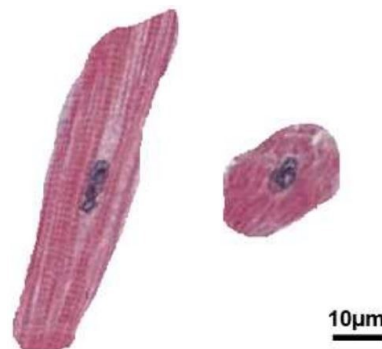
**Abbildung 1-1: Schema zum Erregungsleitungssystem des Herzens.** Das Erregungsbildungssystem und -leitungssystem besteht aus dem Sinusknoten, dem AV-Knoten und dem His-Bündel mit einem rechten und linken Tawara-Schenkel, die mit Purkinje-Fasern im Myokard enden. Zusätzlich sind für die jeweiligen Abschnitte des Erregungsleitungssystems die charakteristischen Änderungen des Membranpotentials dargestellt (angelehnt an Anderhuber, Pera & Streicher, 2012, S481, Abb. 5.55, mit Genehmigung von Walter de Gruyter GmbH & Co. KG). Eigene Darstellung, modifiziert mit Microsoft PowerPoint (Microsoft Office 365).

Ausgehend vom AV-Knoten erfolgt die Erregungsausbreitung über das His-Bündel, welches das Trigonum fibrosum dextrum auf Höhe der Ventilebene perforiert (Anderhuber, Pera & Streicher, 2012). In der Pars membranacea des Ventrikelseptums teilt sich das His-Bündel in zwei Schenkel auf. Auf jeder Seite der Kammerscheidewand zieht einer dieser Tawara-Schenkel in Richtung Herzspitze (links meist zweigeteilt). Jeder Schenkel spaltet sich in zahlreiche Purkinje-Fasern auf, über welche die Erregung zu den Muskelzellen der Herzkammerwand und der Papillarmuskeln gelangt.

## 1.1.2 Histologie des Herzens

Die Wand des Herzens besteht wie die der Blutgefäße aus drei Hauptschichten, welche durch zwei lockere Verschiebeschichten getrennt werden. Die drei Hauptschichten sind:

- **Endokard:** Diese innerste Herzschicht besteht aus einem sehr flachen einschichtigen Deckgewebe, welches einem feinfaserigen elastischen Bindegewebe aufliegt. Die Herzinnenhaut ist frei von Blutgefäßen. Die Versorgung erfolgt einerseits über das Blut in den Herzhöhlen und andererseits über die Blutgefäße der angrenzenden Verschiebeschicht. Die Segel und Taschen der Herzklappen bestehen aus dem mit Faserplatten verstärkten Endokard.
- **Myokard:** Der größte Teil der Herzwand besteht aus Herzmuskelgewebe. Es handelt sich um eine Sonderform der quergestreiften Muskulatur, welche besonders gut an die Dauerleistung angepasst ist. Die Zellkerne liegen konzentrisch in den einzelnen Kardiomyozyten und sind ca. 10-25 µm dick und 50-100 µm lang (Abbildung 1-2). Es sei hier noch darauf hingewiesen, dass kein Synzytium wie in der Skelettmuskulatur gebildet wird (Zach, 2016).



**Abbildung 1-2: Form und Fläche eines Kardiomyozyten.** Links ist ein Längsschnitt durch die Zelle, rechts ein Querschnitt abgebildet. In beiden Darstellungen lässt sich der konzentrisch gelegene Nukleus gut von der Querstreifung des Kardiomyozyten, welche durch die longitudinal verlaufenden Myofibrillen bedingt ist, auseinanderhalten (Zach, 2016, S4, Abb. 2, [Open Access]).

Die einzelnen Herzmuskelzellen sind von der ECM (extrazellulären Matrix) umgeben. Zusammen mit den Blutgefäßen und Nerven ergibt sich eine

komplexe dreidimensionale Struktur, welche man als *cardiac interstitium* bezeichnet (White et al., 2012). Die ECM ist hauptsächlich aus Kollagen Typ I (ca. 80%) und Kollagen Typ III (11%) aufgebaut (Bashey, Martinez-Hernandez & Jimenez, 1992). Natürlich sind noch andere molekulare und zelluläre Bestandteile wie Proteoglykane, Glykosaminoglykane, Fibroblasten und Immunzellen im Interstitium vorhanden (Weber, 1989, Manasek, 1976, White et al., 2012). Die Fibroblasten des Herzens können bis zu 60% der myokardialen Zellpopulation ausmachen. Außerdem sind diese morphologisch unterschiedlich im Vergleich zu Fibroblasten in anderen Organen und formen im Myokard ein dreidimensionales Support-Netzwerk über welches sie mit *gap junctions* (Connexin 43 und 45) in Verbindung stehen (Baum, Duffy, 2011). Die Herzmuskelzellen sind lichtmikroskopisch durch Glanzstreifen aneinandergesetzt. Die Kontraktion der Aktin- und Myosinfilamente erfolgt wie bei anderen Muskelarten durch einen plötzlichen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, welches aus einem T-Tubuli bereitgestellt wird. Im Vergleich zur Skelettmuskulatur grenzt der Transversaltubulus nur an eine Terminalzisterne und bildet somit eine Diade und keine Triade aus (Horn, 2012).

Elektronenmikroskopisch lassen sich drei verschiedene Verbindungen zwischen den Myozyten feststellen. Die Fascia adhaerens liegt in den transversalen Abschnitten der Glanzstreifen. Die Aktinfilamente sind hier mit einem Adhäsionsmolekül der Zellmembran verbunden und damit für die mechanische Übertragung der Kontraktionskraft verantwortlich. Die Desmosomen liegen am Rand der transversalen Abschnitte und dienen den Intermediärfilamenten als Ankerstruktur. Somit stabilisieren sie das Gewebe gegenüber Zug- und Scherkräften. In den longitudinalen Abschnitten der Glanzstreifen befinden sich große Nexus. Diese bestehen aus Connexinen und dienen der elektrischen Koppelung zwischen den Kardiomyozyten (Robb, Robb, 1942).

Eine spezialisierte Form der Herzmuskelzellen bilden die Kardiomyozyten des Erregungsleitungssystems. Somit erfolgt die Erregungsausbreitung nicht über Nervenzellen (chemische Synapsen), sondern mittels elektrischer Synapsen (*gap junctions*).

Die Dicke des Herzmuskels in der Wand der Herzhöhlen ist von den darin erzeugten Drücken abhängig. Diese Beziehung zwischen Dicke, Wandspannung und dem Druck kann mittels dem Laplace-Gesetz beschrieben werden. Die Anzahl der Kapillaren ändert sich bei massiver Größenzunahme allerdings nicht.

- Epikard: Aufgrund der dauernden rhythmischen Bewegung und Verformung des Herzens wird eine Schicht zur Reibungsverminderung benötigt. Dies wird über die glatte Außenhaut des Herzens mit Flüssigkeitsschmierung bewerkstelligt. Als Glätte der Oberfläche dient ein einschichtiges, plattes bis kubisches Deckgewebe. Das Epikard ist somit ein Teil des Herzbeutels und wird auch als Lamina visceralis pericardii bezeichnet.
- Perikard: Der Herzbeutel ist zwar keine eigene Schicht des Herzens, sollte aber dennoch beschrieben werden. Das Herz steckt im Herzbeutel wie der Darm im Peritoneum oder die Lunge in der Pleura. Während sich Brust- und Bauchfell an die Leibeswand anlegen können, muss sich der Herzbeutel die Außenwand seiner Höhle selbst schaffen. Dieser liegt als derber Beutel mit zugfestem Bindegewebe im unteren Mediastinum. Die äußere Schicht wird als Pericardium fibrosum bezeichnet. Dieses straffe Bindegewebe wird dreischichtig überlagert und strahlt in das Zwerchfell sowie in das Mediastinum ein. Das Pericardium serosum besteht aus dem Mesothel und einer Lamina propria und bildet somit das viszerale und parietale Blatt der Herzhöhle. Zwischen den beiden Laminae existiert ein Spaltraum welcher mit 10-12 ml Liquor pericardii gefüllt ist.

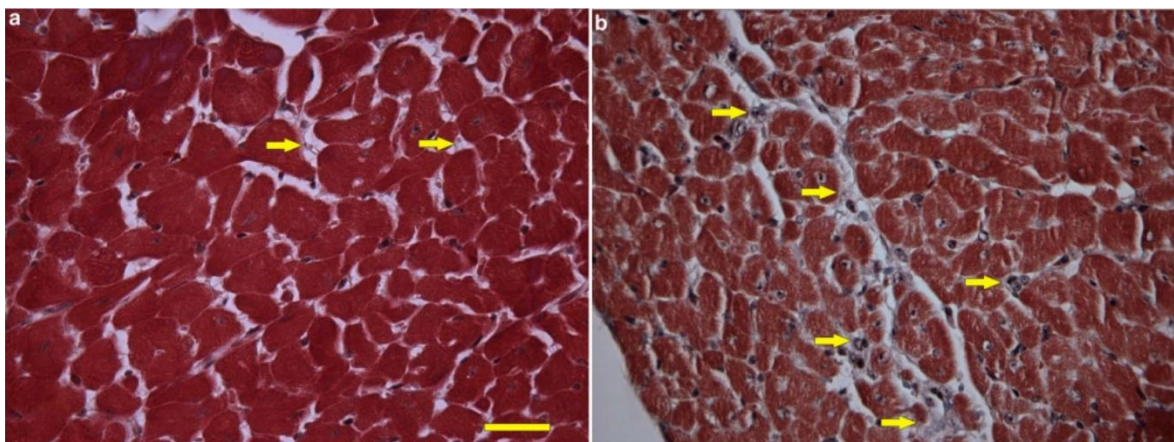
## **1.2 Kardiale Fibrose**

Durch diverse Erkrankungen, mechanischem Stress oder Entzündungen wird ein interstitielles Remodeling induziert. Diese Veränderungen treten bei chronischer Überbeanspruchung als auch bei akuten vaskulären Ereignissen auf. Im Mittelpunkt dieser Veränderungen im Myokard stehen die Fibroblasten. Diese Bindegewebszellen sezernieren große Mengen an extrazellulären Matrixproteinen, welche im Interstitium abgelagert werden. Die kontinuierliche Ablagerung der extrazellulären Matrixproteine führt zum Ersatz der normalen Gewebearchitektur durch verschiedene Arten von Bindegewebe. Die dadurch entstehende Fibrose führt im weiteren Verlauf zu einem zunehmenden und hämodynamisch wirksamen Funktionsverlust des Herzens. Molekularbiologisch erhöht sich dabei die Menge an Kollagen Typ I relativ zur Menge des Kollagen Typ III (Querejeta et al., 2004). Diese Zusammensetzung der Kollagentypenverschiebung kann gerade in der Anfangsphase einer kardialen Überbeanspruchung noch physiologisch ablaufen. Länger andauernde, aber auch akut großflächige Schädigungen führen im pathophysiologischen Sinne zu einer Veränderung der myokardialen Kontraktionsfunktion. Da der Herzmuskel nicht zu ausgedehnten reparativen Vorgängen fähig ist, findet keine nennenswerte Regeneration im Sinne einer Restitutio ad integrum statt. Je nach Art und Zusammensetzung, Fläche und Lokalisation der Fibrose besteht eine gewisse Vulnerabilität für Arrhythmien und hämodynamischen Beeinträchtigungen. Diese Störungen gehen auch mit einer erhöhten Sterblichkeit einher. Hierbei nimmt die erhöhte Synthese und Ablagerung des Kollagen Typ I eine, wenn auch nicht die einzige Rolle in der Entwicklung einer myokardialen Fibrose ein. Die Art der Fibrose, also auch das Muster bzw. die Verteilung sind somit teilweise krankheitsspezifisch (White et al., 2012, Moon et al., 2004).

### **1.2.1 Arten der kardialen Fibrose**

Funktionell unterscheidet man zwei Arten der Fibrose. Diese Definition betrachtet einen Teilaspekt der Pathophysiologie für die Entstehung einer myokardialen Fibrose. Es wird unterschieden, ob bei dem ursprünglichen Ereignis, welches zu einer Fibrose führt, Myokardzellen zerstört werden oder nicht. Werden die

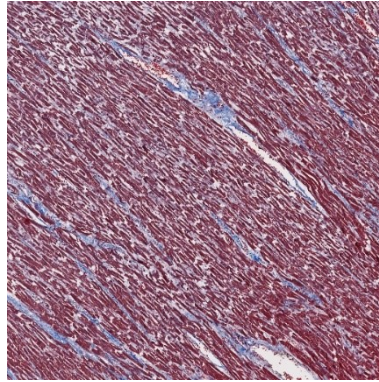
abgestorbenen Herzmuskelzellen durch Narbengewebe ersetzt, spricht man von einer *replacement fibrosis* (Zouein et al., 2014). Wird zum Beispiel durch erhöhte mechanische Überbelastung eine Fibrose ohne Verlust von Myokardzellen induziert, wird dies als *reactive fibrosis* bezeichnet (Abbildung 1-3). Beide Arten der Entstehung von Narbengewebe können eine systolische und diastolische Dysfunktion verursachen. Jedoch besteht, in Bezug auf die Arrhythmogenität bei der reaktiven Fibrose eine höhere Suszeptibilität (de Jong et al., 2012). Andererseits kann man die myokardiale Fibrose auch anhand der morphologischen Aspekte einteilen (White et al., 2012).



**Abbildung 1-3: Kollagen im Myokard.** Darstellung eines a) normotensiven und b) hypertensiven Herzmuskelgewebes mit Kollagenstrukturen (gelbe Pfeile). Es erfolgt durch die Hypertension kein Verlust an Myozyten, damit spricht man in diesem Fall von einer reaktiven Fibrose (Zouein et al., 2014, S1137, Fig. 1, mit Genehmigung von Microscopy and Microanalysis, Lizenznummer: 4860131297598).

### 1.2.1.1 Interstitielle Fibrose

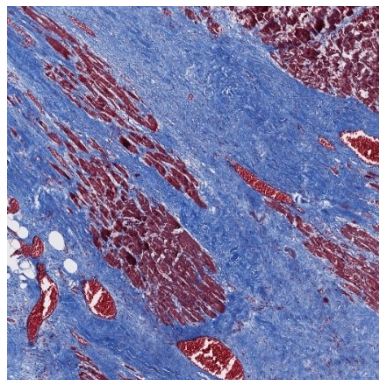
Es handelt es sich um Kollagen, welches in Bündeln verläuft und die extrazelluläre Matrix umhüllt. Mikroskopisch erkennt man die interstitielle Fibrose an dem charakteristisch anisotropen Muster (Abbildung 1-4). Eine große Menge dieser Fibrose im Myokard induziert häufig ventrikuläre Arrhythmien (Almaas et al., 2013). Erklärbar ist dies durch die Ausbreitung der langen Kollagenbündel perpendicular zu den Muskelfasern.



**Abbildung 1-4: Interstitielle Fibrose.** Die interstitielle Fibrose umhüllt die extrazelluläre Matrix und bildet ein charakteristisch anisotropes Muster. Gefärbt ist dieser Gewebeschnitt mit der Trichrom nach Gieson Färbung. Fibrotische Strukturen erscheinen blau, Muskelfasern rot und Lumina weiß. Der dargestellte Bereich des Myokards beträgt 2 mm x 2 mm.

### 1.2.1.2 Kompakte Fibrose

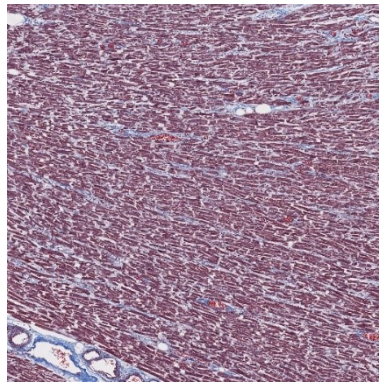
Dieses fokale und kompakte Fibroseareal besteht aus sehr dichtem Kollagen, welches frei von Myokardgewebe ist (Abbildung 1-5). Je nach Größe des Areals hat diese Form der Fibrose Auswirkungen auf die Kontraktilität und damit auch auf die hämodynamischen Verhältnisse in den Herzhöhlen. Trotz des prominenten Erscheinungsbildes dieser Fibrose ist sie im Vergleich zu den anderen Typen am geringsten arrhythmogen.



**Abbildung 1-5: Kompakte Fibrose.** Die kompakte Fibrose besteht aus Bereichen mit dichtem Kollagen ohne myokardiale Gewebestrukturen. Gefärbt ist dieser Gewebeschnitt mit der Trichrom nach Gieson Färbung. Fibrotische Strukturen erscheinen blau, Muskelfasern rot und Lumina weiß. Der dargestellte Bereich des Myokards beträgt 2 mm x 2 mm.

### 1.2.1.3 Diffuse Fibrose

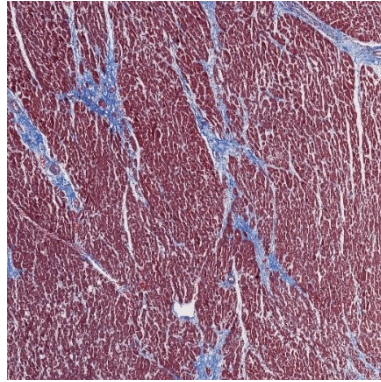
Wenn sich sehr kurze Fibroseabschnitte mit dem physiologischen Myokard vermischen, spricht man von einer diffusen Fibrose (Abbildung 1-6). Die Arrhythmogenität ist zwar nicht so ausgeprägt wie bei der interstitiellen Fibrose, jedoch kommt es proportional mit einer Zunahme der Fibrosemenge zu einer signifikanten Erniedrigung der Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit im Myokard. Darüber hinaus kann diese Art der Fibrose die Zykluslänge einer Reentrytachykardie verlängern und den Übergang zu einer Fibrillation unterdrücken.



**Abbildung 1-6: Diffuse Fibrose.** Bei der diffusen Fibrose vermischen sich die Myokard- und die kurzstreckigen Kollagenfasern. Gefärbt ist dieser Gewebeschnitt mit der Trichrom nach Gieson Färbung. Fibrotische Strukturen erscheinen blau, Muskelfasern rot und Lumina weiß. Der dargestellte Bereich des Myokards beträgt 2 mm x 2 mm.

### 1.2.1.4 Patchy Fibrose

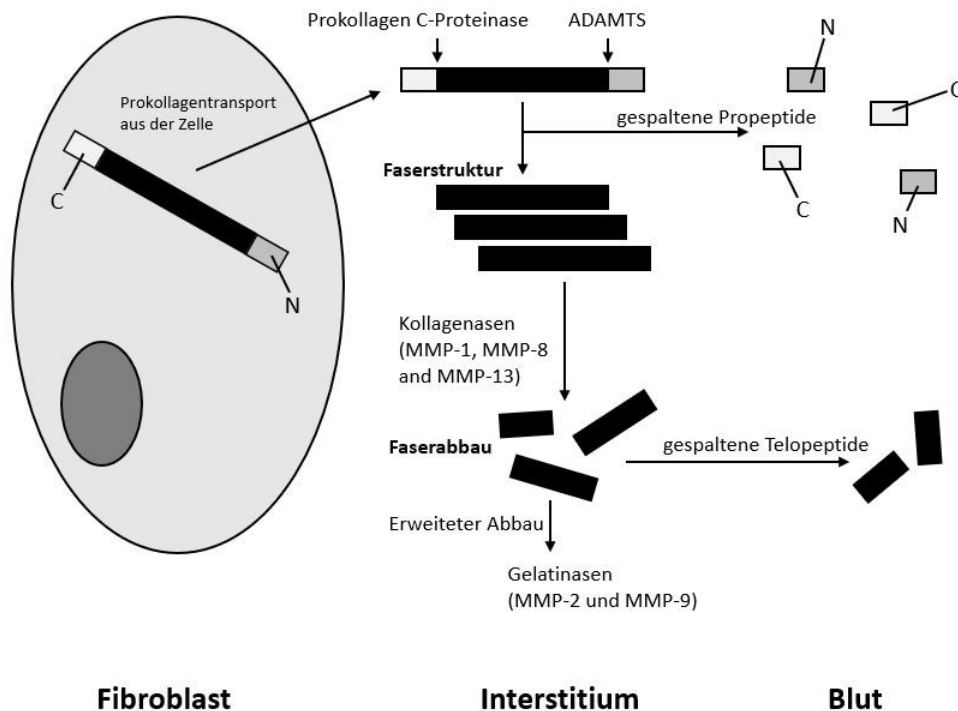
Charakteristisch für diese Fibrose ist eine Vermischung der Herzmuskelbündel und sehr langen Strängen aus Kollagen (Abbildung 1-7). Durch diese Geometrie kommt es zu einer sehr starken Verzögerung der Erregungsausbreitung im Herzen. Das Aktionspotential muss bei dieser speziellen Art der Fibrosearchitektur einen längeren Weg zurücklegen, um das Myokard zu erregen. Aufgrund dieser charakteristischen zick-zack Erregungsausbreitung besteht hier die größte Vulnerabilität für Arrhythmien.



**Abbildung 1-7: Patchy Fibrose.** Die patchy Fibrose besteht aus sehr langen Kollagenbündeln, welche sich mit dem Myokard vermischen. Gefärbt ist dieser Gewebeschnitt mit der Trichrom nach Gieson Färbung. Fibrotische Strukturen erscheinen blau, Muskelfasern rot und Lumina weiß. Der dargestellte Bereich des Myokards beträgt 2 mm x 2 mm.

### **1.2.2 Pathophysiologie und Biomarker**

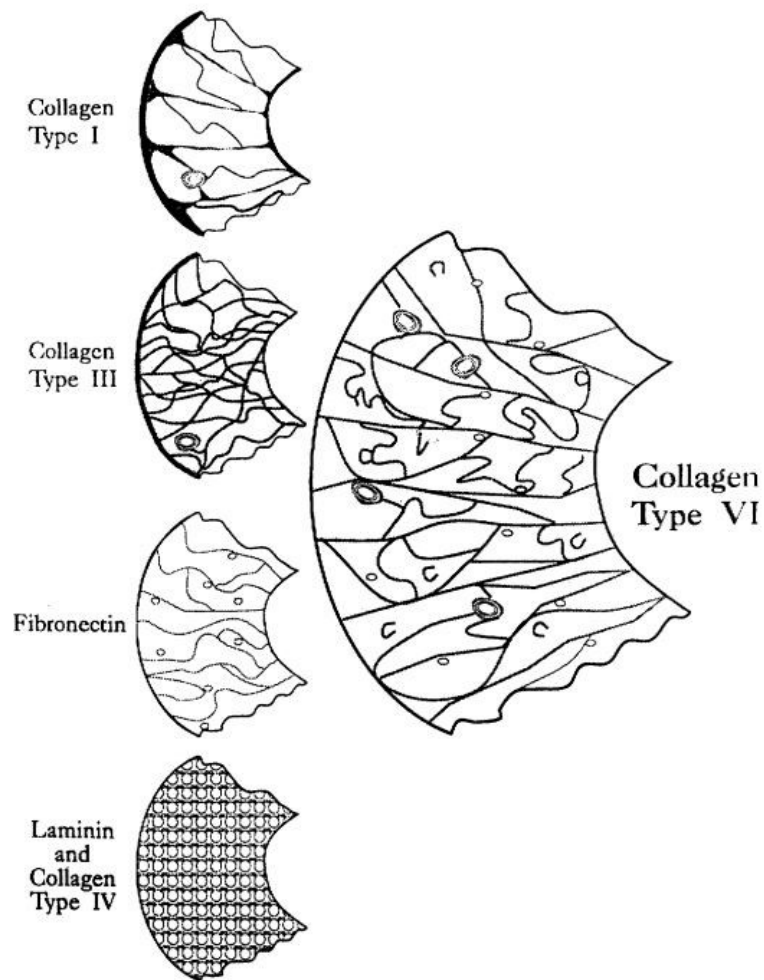
Kollagen ist das Schlüsselprotein bei der Bildung einer Fibrose. Pathophysiologisch von Bedeutung ist vor allem der Umbau der extrazellulären Matrix mit zusätzlicher Akkumulierung der Kollagene im Interstitium. Zusätzlich hat Kollagen, verglichen mit anderen Proteinen, eine relativ lange Halbwertszeit von ungefähr 90-120 Tagen. Wie bereits beschrieben erhöht sich bei den meisten Herzerkrankungen die Kollagen Typ I / Typ III Ratio (Pauschinger et al., 1999).



**Abbildung 1-8: Schematische Darstellung des Kollagensatzes.** Das von Fibroblasten sezernierte Prokollagen wird in das Interstitium transportiert. Dort werden die Propeptide mittels Metalloproteinasen (ADAMTS) und Prokollagen-C-Proteinasen vom Prokollagen abgespalten und somit große Kollagenfasern gebildet. Beim Abbau dieser Fasern mittels Kollagenasen werden Telopeptide in den Blutkreislauf geschwemmt. Der weitere Abbau erfolgt durch Gelatinasen (angelehnt an de Jong, van Veen, de Bakker et al., 2011, S525, Fig. 2). Eigene Darstellung, generiert mit Microsoft PowerPoint (Microsoft Office 365).

Aufgrund des ständigen Umbaus der Fibrose werden kontinuierlich Peptide in den Blutkreislauf abgegeben. So kann man anhand von verschiedensten Blutparametern auf eine Fibrosebildung im Herzmuskelgewebe schließen. Diese Biomarker entstehen meist aufgrund von Spaltungsprozessen bei der Synthese aber auch beim Abbau von Kollagen, siehe Abbildung 1-8. Die vielversprechendsten Biomarker, als ein zusätzliches Diagnostiktool, bei Herzkrankheiten zur Detektion einer Fibrose im Myokard sind PICP, ICTP, PIIINP und TIMP-1 (de Jong, van Veen, de Bakker et al., 2011).

Zusätzlich zur Menge und dem Typ des Kollagens ist auch die Verteilung im Herzmuskel von großer Bedeutung. In der Abbildung 1-9 erkennt man die unterschiedliche Verteilung der sechs bekannten Bindegewebskomponenten der ECM im Herzen.



**Abbildung 1-9: Verteilungsmuster der verschiedenen Komponenten der extrazellulären Matrix.** In dieser Abbildung sind die sechs Komponenten der kardialen ECM dargestellt. Kollagen Typ I bildet die Hauptpfeiler des Herzmuskelgewebes und ist auch in den großen Septen vorhanden. Auch Kollagen Typ III ist in den großen Septen vorhanden, jedoch weniger verbreitet als Typ I. Kollagen Typ VI und Fibronectin erstrecken sich von den feineren Septen bis zum perizellulären Bindegewebe, wo sie an die Basalmembran (Kollagen Typ IV und Laminin) binden (Bashey, Martinez-Hernandez & Jimenez, 1992, S1016, Fig. 8, mit Genehmigung von Circulation Research, Lizenznummer: 4863780558510).

Kollagen Typ I ist vor allem in den großen Septen vorhanden und wirkt damit als mechanisches Stützgerüst für den Herzmuskel. Zusätzlich ist es auch der Hauptbestandteil des Epi- und Endokards. ICTP korreliert als Biomarker stark mit dem Typ I Kollagen. Kollagen Typ III ist ebenfalls in den großen Septen vorhanden, zieht jedoch auch in feineren Septen durch das Myokard. Prominent vertreten ist dieser Typ des Kollagens in der vaskulären Adventitia. Kollagen Typ VI und Fibronectin befinden sich perizellulär, vor allem in Nachbarschaft von

Myozyten und Kapillaren. Hier binden diese Kollagentypen an Komponenten der Basalmembran (Typ IV Kollagen und Laminin) an (Bashey, Martinez-Hernandez & Jimenez, 1992).

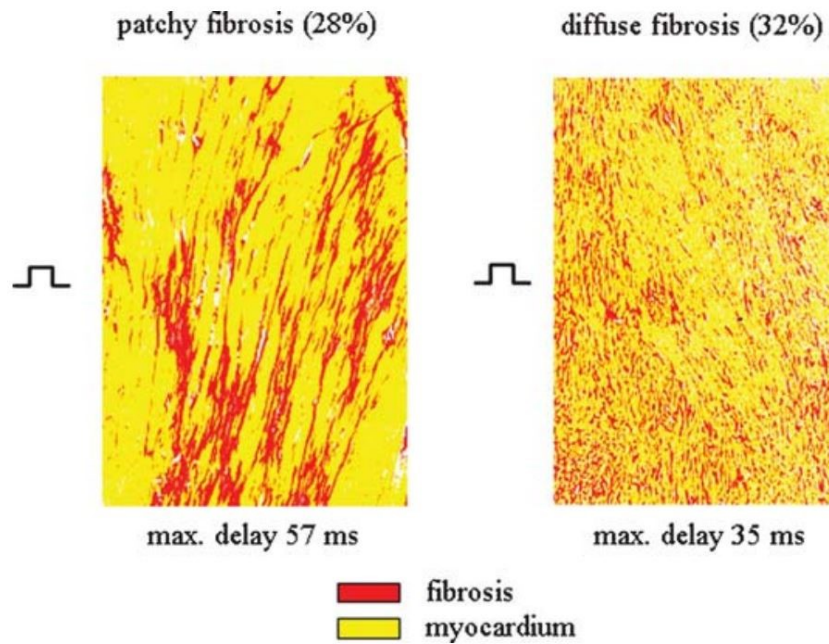
Für die Synthese des Kollagens und damit auch für die Entstehung einer Fibrose ursächlich sind die kardialen Fibroblasten. Diese können in Myofibroblasten differenzieren, proliferieren, migrieren, Zytokine und Wachstumsfaktoren sezernieren, sowie die ECM remodellieren. Zusätzlich zu dieser Anpassungsleistung können auch andere Zellen wie Epithelzellen, mesenchymale Stammzellen und ubiquitär vorkommende Perizyten zu Myofibroblasten differenzieren (Souders, Bowers & Baudino, 2009). Myofibroblasten sind im Herzmuskelgewebe nur unter pathologischen Verhältnissen vorhanden. Diese Zellen haben eine nicht gut abgrenzbare, teils spikulierte Oberfläche und eine hohe Aktivität im endoplasmatischen Retikulum. Sie bilden mittels Mikrofilamenten einen speziellen Adhäsionskomplex, genannt Fibronexus, aus (Eyden, 2008). Dieser wiederum geht eine Verbindung mit extrazellulären Fibronektindomänen ein. Durch diese Verknüpfung können Myofibroblasten kontraktile Kräfte auf ihre Umgebung übertragen. Zusätzlich verstärkt wird dies durch die Zunahme der Kollagenablagerungen in der unmittelbaren Umgebung. Diese einzigartigen Adaptierungsfähigkeiten sind im Körper nur von Myofibroblasten bzw. Fibroblasten des Herzens bekannt und spielen damit bei der Genese der kardialen Fibrose eine wichtige und komplexe Rolle (Baum, Duffy, 2011).

### **1.2.3 Arrhythmogenität bei kardialer Fibrose**

Die Erregungsausbreitung im gesunden Herzen erfolgt größtenteils kontinuierlich und kann mit mathematischen Modellen simuliert werden. Bei verschiedensten Herzerkrankungen, insbesondere bei Arrhythmien, stimmen diese Modelle jedoch nicht mehr, da aufgrund des vermehrt anisotropen Myokardgewebes auch die elektrophysiologische Charakteristik verändert wird. Die damit einhergehende diskontinuierliche Erregungsweiterleitung entsteht, weil sich die zytoplasmatischen Verbindungen der Herzmuskelzellen voneinander distanzieren und so weniger elektrische Synapsen ausgebildet sind. Auch die vorhin bereits erwähnten Myofibroblasten sind für die Unterbrechung der Zell-Zell-Kopplung verantwortlich. Diese Zellen schieben sich zwischen die Herzmuskelzellen und vergrößern damit

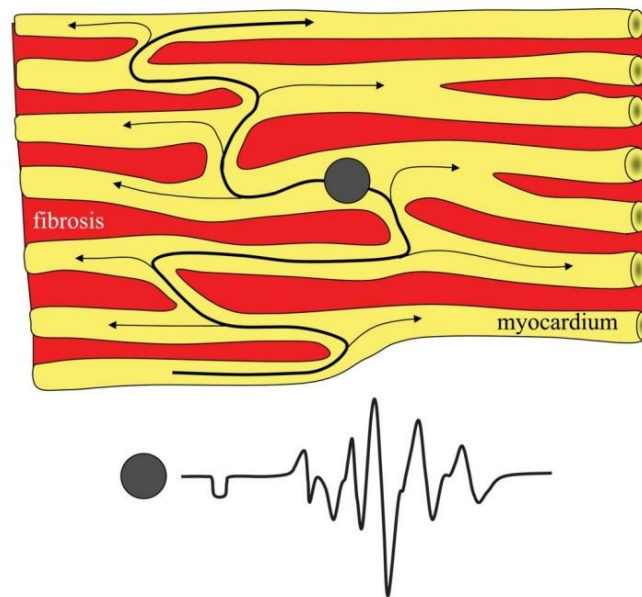
den interzellulären Abstand der Myozytenmembranen. Weiters fungieren Myofibroblasten als eine Art Barriere für die Erregungsweiterleitung, da sie selbst von extern nicht erregbar sind (Baum, Duffy, 2011). Auch die Veränderung der Connexin Expression und dessen Verteilung spielt bei der Arrhythmogenität eine Rolle. Eine Abnahme der Connexin-43 (Cx43) Expression um 50% verändert die Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit noch nicht. Aber eine nur mehr zehnpromzentige Expression von Cx43 führt zu einer Verlangsamung der Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit (van Rijen et al., 2004). Die effektive Refraktärzeit wird durch eine Abnahme der Cx43 Expression nicht beeinflusst. Jedoch kann die Refraktärperiode, bei einer verminderten Expression von SCN5A, vermindert werden. Es konnte gezeigt werden, dass im Alter die natürliche Expression von Cx43 und SCN5A um bis zu 50% reduziert sein kann. Dieser Umstand ist interessant, da durch eine verminderte Refraktärzeit die Entstehung einer Arrhythmie begünstigt wird (de Jong, van Veen, van Rijen et al., 2011). Zusätzlich erhöht sich bei einer verminderten Translation von Natriumkanälen und *gap junctions* die Fibrosemenge im Herzen. So ist auch bei Kanalopathien wie dem Brugada-Syndrom bereits bekannt, dass eine erhöhte Menge an Fibrose im adulten Herzen vorkommt. Zusätzlich zur Fibrosebildung wird auch die Proliferation der Fibroblasten durch die Connexin-43 Expression reguliert (de Jong et al., 2011). So ergibt sich ein komplexes Zusammenspiel humoraler und zellulärer Bestandteile für die erhöhte arrhythmogene Vulnerabilität bei kardialer Fibrose.

Ein weiterer Faktor für die diskontinuierliche Charakteristik der Erregungsausbreitung ist die Art und Menge der Fibrose, wobei die Art und deren räumlicher Verlauf einen viel größeren Effekt auf die Vulnerabilität für Arrhythmien zu haben scheint (de Bakker, van Rijen, 2006). Bei gleicher Menge an Fibrose zeigt sich bei der patchy Fibrose eine höhere Erregungsverzögerung als bei der diffusen Variante (Abbildung 1-10).



**Abbildung 1-10: Unterschied der Erregungsverzögerung zwischen patchy und diffuser Fibrose.** Die Abbildung zeigt zwei unterschiedliche Fibrosetexturen (patchy und diffus) in explantierten Herzen von Patientinnen und Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz. Das Kollagen ist rot und das Myokard ist gelb dargestellt. Trotz gleicher Menge an Fibrose ist die Erregungsleitungsverzögerung nach vorzeitiger Stimulation bei einem Intervall von 400 ms bei der patchy Fibrose stärker ausgeprägt. Die maximale Verzögerung gibt die Verzögerung zwischen frühester und spätester Aktivierung innerhalb des Aufnahmebereichs an (de Bakker, van Rijen, 2006, S571, Fig. 6, mit Genehmigung von Journal of Cardiovascular Electrophysiology, Lizenznummer: 4860141094122).

Die patchy Fibrose zeigt die höchste Arrhythmogenität aller Fibrosearten. Erklärbar ist dies durch die besondere zick-zack förmige Erregungsausbreitung (Abbildung 1-11). Die asynchrone Erregung und Erregungsverzögerung sind auch maßgeblich von der Faserrichtung abhängig. Die arrhythmogene Eigenschaft ist bei perpendikulärem Verlauf der Kollagenfasern zu den Muskelfaserbündeln viel stärker ausgeprägt als bei parallelen Verläufen (de Jong et al., 2011).



**Abbildung 1-11: Schematische Darstellung der räumlichen Erregungsausbreitung in einem Areal der patchy Fibrose.** Die gelben Bündel repräsentieren das Myokard, die roten Streifen stellen die patchy Fibrose dar. Die schwarzen Pfeile visualisieren die zick-zack förmige Erregungsausbreitung des Aktionspotentials. Dadurch kommt es zu einer scheinbaren Leitungsverzögerung des elektrischen Impulses. Aufgrund dieser asynchronen Aktivierung in den verschiedenen Bereichen des Myokards kann es im EKG zur Fraktionierung (lower tracing) kommen (de Jong et al., 2011, S633, Fig. 3, mit Genehmigung von Lippincott Williams & Wilkins, Lizenznummer: 4863780436581).

So beeinflusst die myokardiale Fibrose auch die Konfiguration des QRS-Komplexes im Elektrokardiogramm. Typischerweise finden sich über Fibrosearealen im QRS-Komplex zusätzliche Zacken. Diese Form der Veränderung wird als fraktionierter QRS-Komplex bezeichnet (de Jong et al., 2011). Wie bereits beschrieben ist diese Fraktionierung auch von der Verlaufsrichtung der Kollagenfasern abhängig. Bei parallelem Faserverlauf der Fibrose und Muskelzellbündel entstehen deutlich weniger zusätzliche Ausschläge im EKG. Allerdings ist eine kardiale Fibrose nicht die einzige Ursache für einen fraktionierten Spannungsverlauf im QRS-Komplex. Auch Vorhofflimmern, Aktivitätsänderungen des autonomen Nervensystems oder die technische Messung der Herzwandableitung können im EKG eine Fraktionierung verursachen (de Bakker, Wittkamp, 2010).

Wie bereits beschrieben, ist die Anwesenheit von Fibrose kein statisches Konstrukt, sondern ein dynamischer Prozess mit alternierendem Ab- und Aufbau. Diesen Umstand kann man sich mittels pharmakologischer Therapiemethoden zu

Nutze machen. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist eine der Stellschrauben für die Regulation der Kollagensynthese. So konnte gezeigt werden, dass bei einer Therapie mit Eplerenon und/oder Losartan an Mäusen die Bildung der Fibrose als auch die Arrhythmogenität positiv beeinflusst wird (de Jong et al., 2011).

#### **1.2.4 Nicht-invasive Bildgebung**

Der Goldstandard für die Detektion einer kardialen Fibrose ist die Magnetresonanztomographie (MRT). Häufig wird für diese Untersuchung ein gadoliniumhaltiges Kontrastmittel verwendet und als *late gadolinium enhancement* Technik (LGE) bezeichnet. Mittels der Funktion der *full width at half maximum* Technik (FWHM) lässt sich eine kardialen Fibrose verschiedener Entitäten am besten darstellen (Flett et al., 2011). Da Kontrastmittel aber bestimmte Limitierungen haben, sind auch MRT-Sequenzen ohne Kontrastmittel von großer Wichtigkeit. So zeigte Pop M., et al., dass die diffusionsgewichtete Sequenz (DWI) bei Schweineherzen mit transmuralen Myokardinfarkt der LGE nicht unterlegen ist (Pop et al., 2013). Eine weitere Technik für die Detektion der kardialen Fibrose ist die *ultrashort echo time* (UTE) MRT. Auch bei dieser Sequenz konnte man in Postinfarkt-Mäuseherzen die Fibroseareale nachweisen (de Jong et al., 2012, de Jong, Zwanenburg et al., 2011). Obwohl diese Studien kardiale Fibrose und damit die Vulnerabilität für Arrhythmien gut nachweisen konnten, muss man auch bedenken, dass die Infarktstruktur im Myokard nicht der einzige Einflussfaktor für infarktbedingte Arrhythmien ist (de Jong et al., 2011). Feine Strukturen von vermischtem Myokard und Kollagenfasern sind ebenfalls in Zonen des Myokardinfarktes vorhanden und werden aufgrund der begrenzten räumlichen Auflösung des MRT's nicht gut erkannt.

Ein weiteres nicht-invasives Verfahren zur Bildgebung von Weichgewebe ist die Sonographie. Mittels der Echokardiographie kann man die linksventrikuläre systolische Funktion anhand der Ejektionsfraktion (EF) gut und schnell erfassen. Bei der Interpretation der EF muss aber bedacht werden, dass die Sonographie abhängig von der Expertise der Anwenderinnen und Anwender, der linksventrikulären Geometrie und der Bildqualität ist. Diese Limitierungen spielen bei der automatisierten und quantitativen *global longitudinal speckle strain* (GLS)

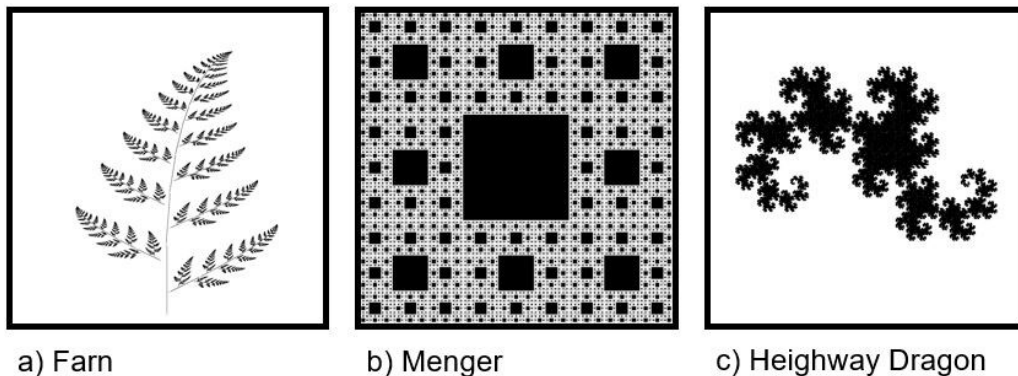
Technik eine unwesentliche Rolle, da sie vom Einschallwinkel unabhängig ist und nur aktive Kontraktion, also keine passiven Gewebeverlagerungen misst (Ersboll et al., 2013). Diese Technik ist bei der Vorhersage des Outcomes der EF oder dem *wall motion score index* (WMSI) überlegen. Mittels der GLS kann man nicht nur die Herzkontraktion evaluieren, sondern diese Technik ist auch dazu fähig reflektierte, interstitielle Veränderungen im Myokard wie Fibrose zu detektieren (Stanton, Leano & Marwick, 2009).

### 1.3 Mathematische Grundlagen

In den Fächern der bildgebenden Verfahren aber auch in der Histomorphologie wird traditionell die euklidische Geometrie zur Beschreibung verwendet. Für viele Objekte reicht diese Annäherung mittels einer ganzzahligen Dimension aus. Jedoch gibt es viele Muster, die mit der euklidischen Geometrie nur unzureichend beschrieben werden können. Außerdem sind viele der zu betrachtenden Strukturen auch von der Auflösung abhängig, so dass je nach Vergrößerung die Geometrie auf andere Art und Weise beschrieben werden kann. Aufgrund dieser Limitierungen eignet sich hier die fraktale Geometrie zur Beschreibung von verschiedensten Strukturen.

#### 1.3.1 Grundlagen eines Fraktals

Der Begriff Fraktal stammt vom lateinischen Wort „*fractus*“ ab, welches auf Deutsch „zersplittern“ bedeutet. Gemeint sind Objekte mit einer unendlichen Rauheit ohne charakteristischen Maßstab.



**Abbildung 1-12: Beispiele für fraktale Objekte.** Ein besonders interessantes Beispiel für fraktale in der Natur sind die a) Farne. Man kann die verkleinerten Kopien ihrer selbst gut erkennen. Weitere bekannte geometrische Beispiele sind das b) Menger-Fraktal und der c) Heighway Dragon (generiert mit IQM, <https://sourceforge.net/projects/iqm/>).

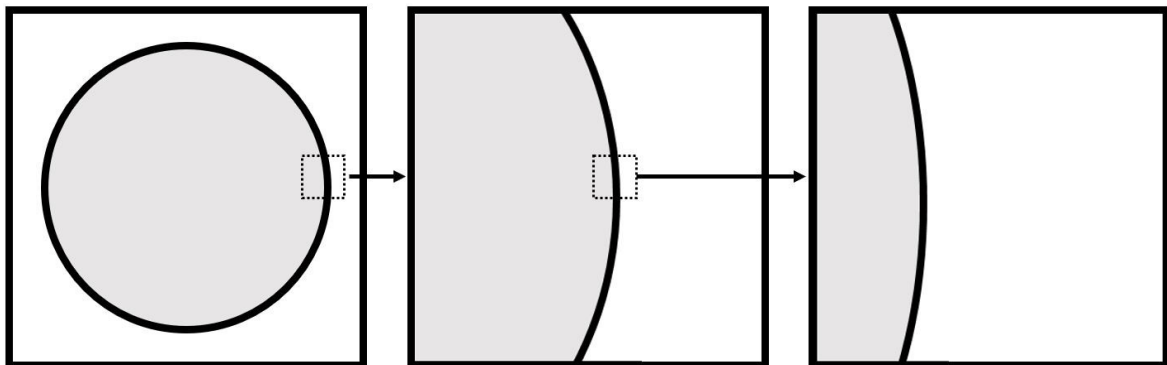
Diese Objekte bzw. Strukturen sind ubiquitär in der Natur vorhanden. Die Geometrie von Fraktalen spielt sowohl im Mikro- als auch im Makrokosmos eine bedeutende Rolle. Sie reicht von Strukturen der DNA über Organsystemen bis hin zur Verteilung von Galaxien (Abbildung 1-12). Selbst in der Technik findet man

fraktale Geometrie, zum Beispiel bei Antennen (Werner, Ganguly, 2003) oder Computersoftware.

### 1.3.2 Eigenschaften eines Fraktals

*„Bottomless wonders spring from rules, which are repeated without end.“* Benoît B. Mandelbrot (Mandelbrot, 1967).

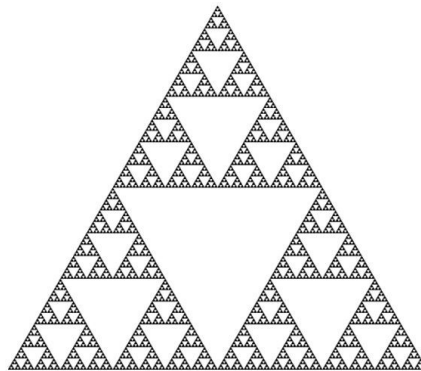
Wie bereits beschrieben haben euklidische Objekte bzw. Gebilde des Raumes einen charakteristischen Maßstab, somit werden bei Vergrößerung des Objektes keine neuen Details sichtbar. Es ist also das kleinste Charakteristikum in diesem Maßstab bereits abgebildet. Als Beispiel soll hier ein Kreis dienen, welcher bei näherer Betrachtung dieser geometrischen Figur, also mit zunehmender Vergrößerung, keine neuen Strukturen sichtbar werden lässt (Abbildung 1-13).



**Abbildung 1-13: Kreis als geometrische Figur.** Bei Vergrößerung des Kreises werden keine neuen Details sichtbar (angelehnt an Liebovitch, 1998, S5). Eigene Darstellung, generiert mit Microsoft PowerPoint (Microsoft Office 365).

Fraktale besitzen keinen charakteristischen Maßstab. Bei einer Veränderung der Größenordnung kommt es zu dem Phänomen, dass Teile „zersplittern“ und so verkleinerte Abbilder des ursprünglichen Objektes dargestellt werden. Diese neuen Details ähneln der ursprünglichen Struktur des Objektes. Ein Beispiel für eine fraktale, geometrische Konstruktion ist das Sierpinski Dreieck, siehe Abbildung 1-14. Dies wird konstruiert, indem man von einem gleichschenkeligen Dreieck alle Seiten halbiert und die Mittelpunkte miteinander verbindet. Dieser Vorgang kann theoretisch beliebig oft wiederholt werden. Man nennt diesen

Prozess auch Iteration (Liebovitch, 1998). In der Natur gibt es jedoch eine obere und untere Auflösungsgrenze, welche durch physikalische Gesetzmäßigkeiten in dieser Welt determiniert sind. Doch nicht nur räumliche Objekte können fraktale Eigenschaften aufweisen, auch zeitliche Abläufe können einem fraktalen Muster zugrunde liegen. So sind zeitliche Fraktale bei der Herzfrequenzvariabilität (Sandercock, Brodie, 2006), der Leitfähigkeit von Ionenkanälen (Liebovitch et al., 2001) und bei Membranspannungs-Fluktuationen von T-Lymphozyten (Churilla et al., 1996) bereits untersucht und bekannt.



**Abbildung 1-14: Sierpinski-Dreieck.** Dieses Dreieck ist eine selbstähnliche Teilmenge eines gleichseitigen Dreiecks. Man teilt das Ausgangsdreieck in vier zueinander kongruente Dreiecke, deren Eckpunkte die Seitenmittelpunkte des ursprünglichen Dreiecks sind. Das mittlere Dreieck wird herausgenommen, nur die drei äußeren Dreiecke bilden Teilmengen des Fraktals. Dieser Vorgang kann beliebig oft wiederholt werden (generiert mit IQM, <https://sourceforge.net/projects/iqm/>).

Damit ein Fraktal nicht als Zufall beschrieben wird, müssen folgende vier Eigenschaften vorhanden sein:

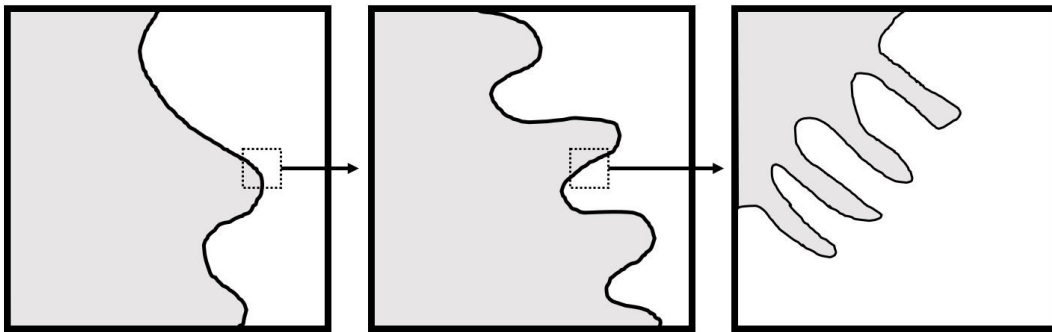
### 1.3.2.1 Selbstähnlichkeit

Wie bereits besprochen, haben fraktale Strukturen in der Natur keine exakte Ähnlichkeit mit dem ursprünglichen Objekt. Wäre dies der Fall spricht man von einer geometrischen Selbstähnlichkeit. Stattdessen verwendet man hier den Begriff der statistische Selbstähnlichkeit (Liebovitch, 1998). Nimmt man einen bestimmten Parameter eines Fraktals  $Q(ar)$  gemessen bei einer Auflösung  $ar$ , dann ist dieser proportional zu dem gleichwertigen Parameter  $Q(r)$  bei einer anderen Auflösung  $r$ .

$$Q(ar) = k * Q(r) \quad (1-1)$$

In dieser Formel beschreibt  $k$  den Proportionalitätsfaktor.

Ein gutes Beispiel für die Selbstähnlichkeit im menschlichen Körper ist die Dünndarmschleimhaut. Bei Vergrößerung erkennt man die Ausstülpungen der Lamina propria mucosae als einzelne Dünndarmzotten. Bei noch größerer Auflösung kann man die Mikrovilli als Bürstensaum an der apikalen Zellmembran sichtbar machen. Schematisch ist die statistische Selbstähnlichkeit in der Abbildung 1-15 dargestellt.



**Abbildung 1-15: Schematische Darstellung der statistischen Selbstähnlichkeit.** Die statistische Selbstähnlichkeit soll hier schematisch anhand der Dünndarmschleimhaut erläutert werden. Bei stärkerer Auflösung des fraktalen Objektes werden immer weitere Details erkennbar, welche eine statistische Selbstähnlichkeit aufweisen (angelehnt an Liebovitch, 1998, S5). Eigene Darstellung, generiert mit Microsoft PowerPoint (Microsoft Office 365).

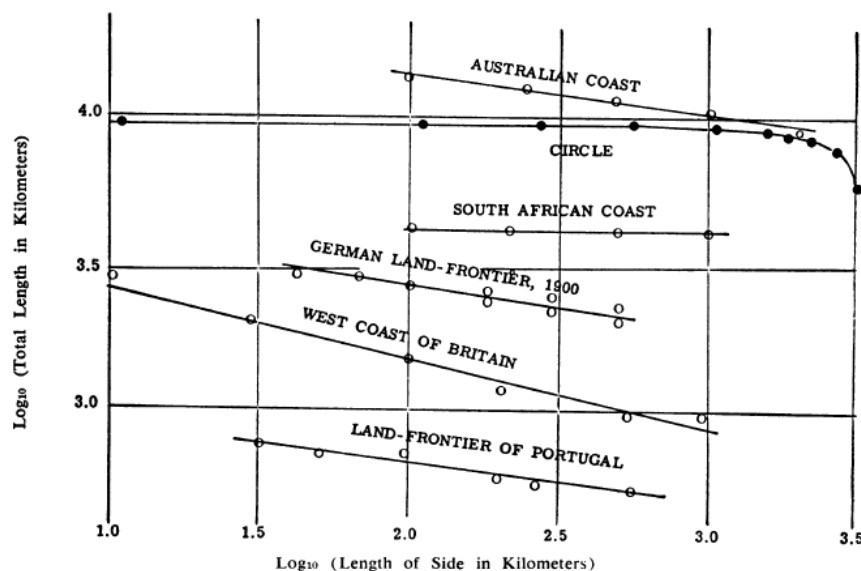
### 1.3.2.2 Dimensionsdefinition

Ein Objekt kann mittels der topologischen Dimension beschrieben werden. Diese ist immer eine Ganzzahl und beschreibt wie Punkte innerhalb eines Körpers verbunden sind. Der Raum, in dem sich ein Objekt befindet, muss ebenfalls eine ganzzahlige Dimension einnehmen. Hier spricht man von der Einbettungsdimension. So kann sich eine ideale Linie (also unendlich dünn) mit einer topologischen Dimension von eins in einem dreidimensionalen Raum (Einbettungsdimension von drei) befinden. Die Einbettungsdimension kann dabei niemals kleiner als die Topologische sein. Diese Linie kann sich nun in diesem dreidimensionalen Raum ausbreiten. Am besten vorstellen kann man sich das, in

dem sich diese Linie zusammengeknäuelte. Die Dimension der Linie bleibt dabei weiterhin eins. Zur Beschreibung wie diese Linie den Raum ausfüllt, wird die fraktale Dimension benötigt (Liebovitch, 1998). Diese siedelt sich also zwischen der topologischen Dimension und der Einbettungsdimension an und muss keine Ganzzahl einnehmen. Nimmt man also nochmals die Formel (1-1) vom Kapitel 1.3.2.1 für  $Q(ar)$  her und stellt sie sich als doppellogarithmischen Plot dar, also  $\log(Q(ar))$  auf der Ordinate und  $\log(Q(r))$  auf der Abszisse, so ist nach der allgemeinen bekannten linearen Geradengleichung der Proportionalitätsfaktor  $k$  gleich der fraktalen Dimension. Einfach ausgedrückt ist in diesem Fall die Steigung mit der fraktalen Dimension gleichzusetzen.

### 1.3.2.3 Skalierbarkeit

Die Skalierbarkeit besagt, dass die gemessenen Parameter abhängig von der Auflösung sind, weil dies durch die Selbstähnlichkeit induziert wird. Eine der ersten Beschreibungen dieses Prinzipes diente Benoit B. Mandelbrot für die Vermessung der Küste Großbritanniens (Mandelbrot, 1967). Der Umfang der Insel führt bei steigender Auflösung bzw. Vergrößerung bis ins Unendliche, wenngleich die Fläche endlich ist (Abbildung 1-16).



**Abbildung 1-16: Doppellogarithmischer Plot von verschiedenen Küstenlängen.** Messung geographischer Kurven mit Hilfe von gleichseitigen Polygonen, deren Ecken auf der Kurve liegen (Mandelbrot, 1967, S636, Fig. 1, mit Genehmigung von American Association for the Advancement of Science, Lizenznummer: 4860141405049).

### **1.3.2.4 Statistische Signifikanz**

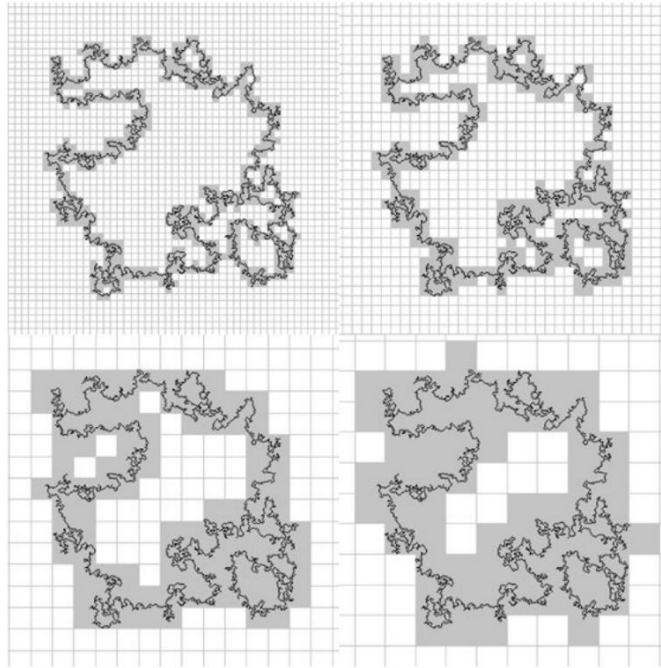
Klassische Statistik orientiert sich an dem Verteilungsmuster der Gauß'schen Glockenkurve. Umso mehr Werte man zur Verfügung hat, desto genauer wird dabei der Mittelwert. Bei Fraktalen zeigt sich bei stark zunehmender Anzahl von Werten eine Verschiebung in Richtung Null oder Unendlich. Auch die Varianz verschiebt sich in gleichem Maße, da bei Fraktalen die statistisch selbstähnlichen Anteile sehr stark variieren (Liebovitch, 1998). Trotzdem kann man Mittelwert, Varianz und Standardabweichung bei fraktalen Strukturen statistisch verwenden. Man muss dabei nur beachten, dass diese Parameter stark skalierungsabhängig sind.

### **1.3.3 Berechnungsmethoden der fraktalen Dimension**

Die fraktale Dimension ist ein Parameter, der mittels verschiedener Methoden ermittelt werden kann. In den nächsten Kapiteln wird auf die Berechnung der fraktalen Dimension von Flächen eingegangen. Zusätzlich wird noch zwischen binären Bildern und Grauwertbildern unterschieden.

#### **1.3.3.1 Box-Counting Methode**

Die Box-Counting Methode ist die populärste aller Berechnungsmethoden für die fraktale Dimension. Diese Methode beruht auf dem Prinzip, die zu analysierende Struktur in immer kleinere und kleinere Teile zu zerlegen. Zu Beginn wird über die zu untersuchende Struktur ein Quadrat gelegt. Jeder einzelne Pixel muss sich am Anfang in diesem Bereich befinden. Nun wird bei jedem weiteren Schritt die Kantenlänge des Quadrates halbiert, so entstehen aus jedem Quadrat vier neue. Bei jeder Iteration wird analysiert ob sich in den Quadraten mindestens ein Pixel der zu untersuchenden Struktur befindet und so die Anzahl der Boxen ermittelt, welche Teile des Objektes beinhalten (Landini, 2011, Liebovitch, 1998). Alle Ergebnisse werden in einem doppellogarithmischen Plot (Anzahl der Boxen mit Strukturinhalt gegen den Kehrwert der Kantenlänge) eingetragen. Aus der Steigung der Geraden ergibt sich die fraktale Dimension.



**Abbildung 1-17: Prinzip der Box-Counting Methode.** Die Box-Counting Methode beruht auf der Zählung der Boxen, welche das zu untersuchende Objekt beinhalten. Nur grau hinterlegte Quadrate beinhalten Teile des Objektes (Landini et al., 2011, S3, Fig. 2, mit Genehmigung von Journal of Microscopy, Lizenznummer: 4860141234428)

### 1.3.3.2 Minkowski-Bouligand Methode

Weil die BCM auch Nachteile wie die determinierte Anfangsposition des Objektes im Bild oder die festgelegten Skalen der Kastengrößen aufweist, wird in dieser Arbeit zusätzlich für binäre Bilder die Minkowski Methode verwendet. Bei dieser Methode wird jeder Punkt, der zur Kontur des Objektes gehört, dilatiert oder mit Scheiben eines bestimmten Radius ( $\varepsilon$ ) bedeckt. Dadurch werden bei langgezogenen Objekten Bänder gebildet, die auch als Minkowski-Würste bekannt sind und eine bestimmte Fläche ( $A$ ) besitzen. In der Formel (1-2) entspricht  $D_m(A)$  der fraktalen Dimension bei einer Einbettungsdimension von zwei. Diese Methode eignet sich besonders gut für dünne Linien beziehungsweise auch für längliche Strukturen wie sie bei der kardialen Fibrose vorkommen (Liebovitch, 1998).

$$D_m(A) = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \left( 2 - \frac{\ln A(\varepsilon)}{\ln \varepsilon} \right) \quad (1-2)$$

### 1.3.3.3 Higuchi Methode

Bei der Higuchi-Methode werden Differenzen berechnet, über das ganze Signal aufsummiert und eine Länge  $L$  bestimmt. Im ersten Schritt werden nur die Differenzen der direkt benachbarten Punkte  $X(i-1)$  und  $X(i)$  summiert. Bei der nächsten Iteration wird der direkte Nachbar übersprungen und die Differenzen der übernächsten Punkte  $X(i-2)$  und  $X(i)$  summiert. Dann werden zwei Nachbarn übersprungen, und die Differenzen der dahinterliegenden Punkte summiert. So kann diese Methode bis zu einem gegebenen Wert  $k$  fortgesetzt werden. Hinzu kommen Faktoren zur Normierung der Kurve und eine Variation des Startpunktes  $m$  (Higuchi, 1988, Ahammer, 2011). Das Symbol  $[ ]$  steht für die Gaußsche Abrundungsfunktion.

$$L_m(k) = \left\{ \left( \sum_{i=1}^{\lfloor \frac{N-m}{k} \rfloor} |X(m+ik) - X(m+(i-1) * ik)| \right) \frac{N-1}{\lfloor \frac{N-m}{k} \rfloor * k} \right\} / k \quad (1-3)$$

Formel für den Mittelwert aufgrund der Variation des Startpunktes  $m$ :

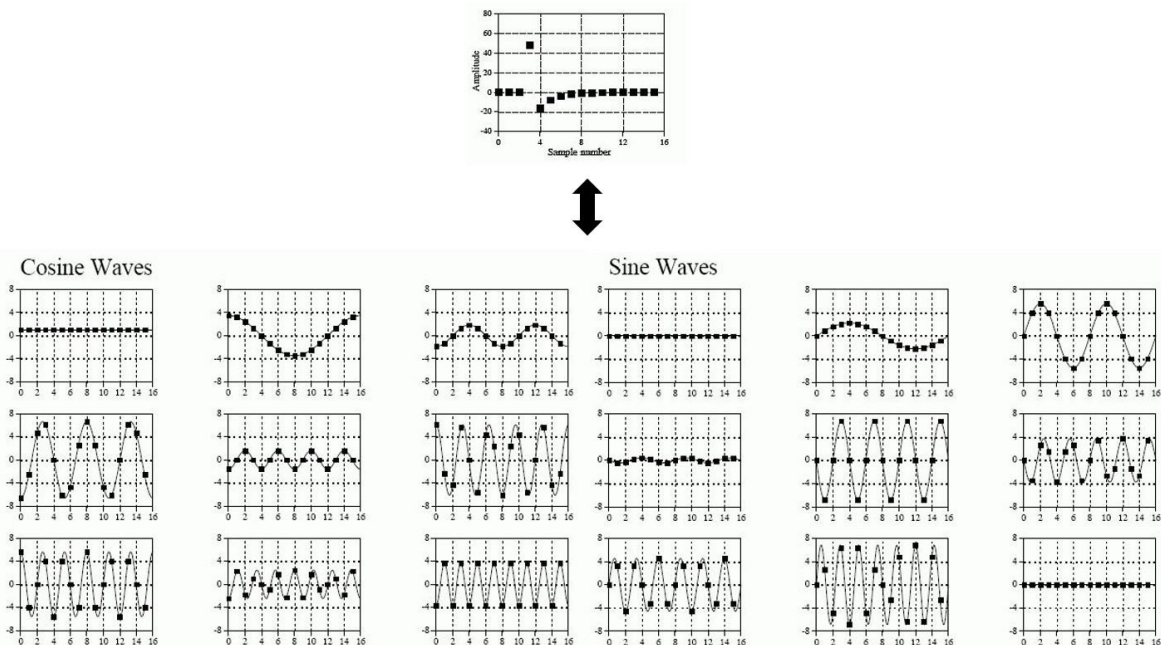
$$L(k) = \frac{1}{k} \sum_{m=1}^k L_m(k) \quad (1-4)$$

### 1.3.3.4 Fast Fourier Transformation (FFT)

Die Fourier Transformation ist eine mathematische Methode, um die einzelnen Frequenzen eines komplexen Frequenzmusters abzubilden. Mittels der errechneten Einzelfrequenzen kann man dann die Häufigkeit jeder Frequenz in einem Balkendiagramm darstellen.

Die diskrete Fourier Transformation (DFT) ersetzt das ursprüngliche Signal durch eine Summe aus Sinus- und Cosinus-Wellen (Abbildung 1-18). Diese Wellen beginnen im negativen Unendlichen und erstrecken sich von dort bis in das positive Unendliche, deshalb muss man das Ausgangssignal so anpassen, dass es ebenfalls unendlich erscheint. Dies wird durch unendliches Kopieren des

Signales sowohl nach links und auch nach rechts durchgeführt, um ein periodisches Signal zu erhalten und die Fourier Transformation anwenden zu können (Smith, 1997).



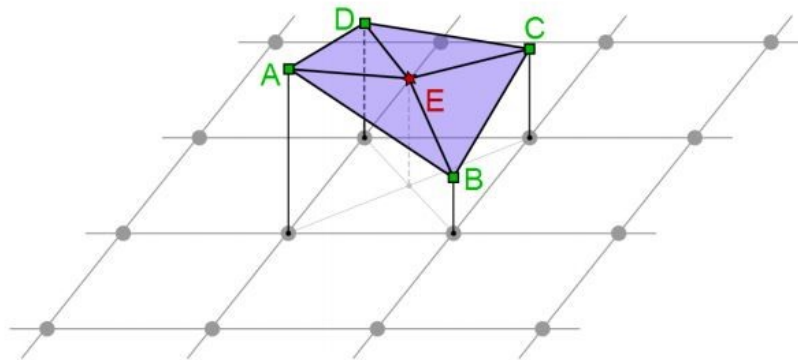
**Abbildung 1-18: Prinzip der Fourier-Transformation.** Das Ausgangssignal (oben) wird mittels der diskreten Fourier Transformation in separaten Sinus- und Cosinus-Wellen dargestellt (modifiziert Smith, 1997, Abgerufen 01.07.2020, <http://www.dspguide.com/ch8/1.htm>, [Open Access]).

Die FFT ist ein schnellerer Algorithmus als die diskrete Fourier Transformation. Der Algorithmus beruht auf einer geschickten Zusammenfassung von Summanden, um gewisse Symmetrieeigenschaften auszunutzen.

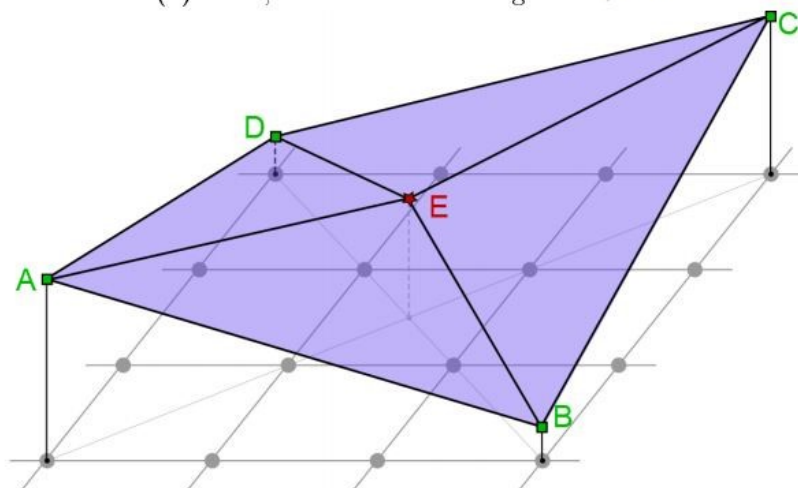
### 1.3.3.5 Pyramidenmethoden

Die *triangular prism method* (TPM) wurde schon 1986 von Clarke et al. für die Berechnung der fraktalen Dimension von topographischen Flächen verwendet (Clarke, 1986). Der Algorithmus nutzt das Verhältnis zwischen der Schrittlänge  $s$  eines Gitters und der Oberfläche eines dreieckigen Prismas. Das zu untersuchende Bild wird also in mehrere Quadrate mit spezifischer Länge eingeteilt. Die Grauwerte der Eckpixel der Quadrate fungieren als Z-Achse dieser Punkte. So ergibt sich ein neuer Punkt in der Mitte eines jeden Basisquadrates.

Durch die Verbindung der Eckpixel mit dem neuen Mittelpunkt ergeben sich vier neue Dreiecke (Abbildung 1-19). Die Summe der Flächen und die Schrittlänge  $s$  werden nach jeder Iteration in einem doppellogarithmischen Plot dargestellt. Aus der nun gebildeten Geraden kann mittels der Steigung die fraktale Dimension errechnet werden.



(a) TPM, Creation of the triangles for  $s = 2$



(b) TPM, Creation of the triangles for  $s = 4$

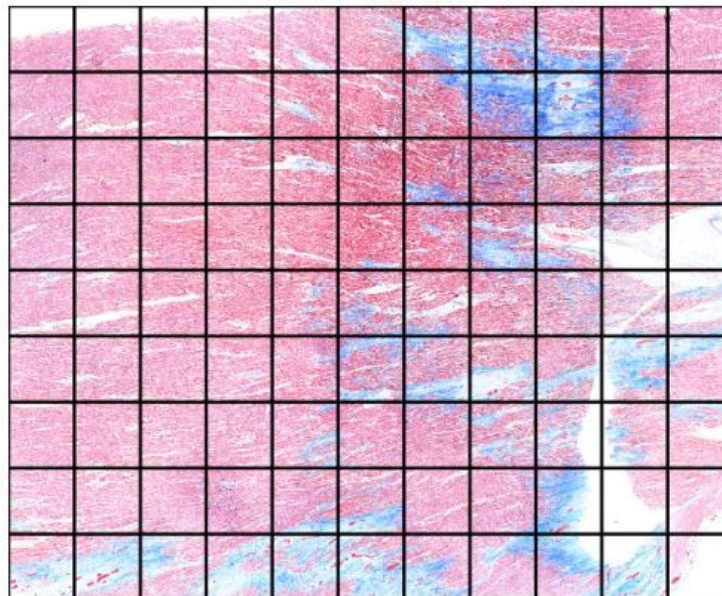
**Abbildung 1-19: Prinzip der Triangular-Prism Methode.** Dieses Konzept ist für zwei Iterationsstufen dargestellt (Mayrhofer-Reinhartshuber, 2015, S40, Fig. 4.4, mit Genehmigung von Mayrhofer-Reinhartshuber, [Open Access]).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Histologische Schnitte

Für die lichtmikroskopische Befundung benutzen Pathologinnen und Pathologen in der Regel einen Vergrößerungsbereich von 1 x – 5 x. Die zu untersuchenden fibrotischen Areale des mikroskopisch betrachteten Myokardgewebes liegen bei etwa 1 – 4 mm<sup>2</sup>.

Für diese Arbeit wurden histologische Myokardschnitte von Routineobduktionen verwendet. Diese lagen zu Beginn dieser Arbeit bereits in digitalisierter Form als PNG-Datei vor und waren zum Teil bereits für die Dissertation *Pyramid Dimension of Histological Images of the Heart* als Image Set IIa und IIb in Verwendung (Mayrhofer-Reinhartshuber, 2015). Insgesamt wurden für die genannte Dissertation 25 Gewebeproben mit myokardialen Fibrosearealen ausgewählt und mittels *Aperio ScanScope AT whole-slide imaging scanner* digitalisiert (Mayrhofer-Reinhartshuber, 2015). Weiters wurden diese *whole-slide* Bilder in 99 gleich große quadratische Bilder unterteilt (Abbildung 2-1).



**Abbildung 2-1: Single whole-slide scan.** Unterteilung eines whole-slide scans in 99 quadratische Einzelbilder mit einer Größe von 2 mm x 2 mm. Die so entstehenden neuen Bilder eignen sich ideal für die Klassifizierung von verschiedenen Fibrosetypen. Mayrhofer-Reinhartshuber, 2015, S103, Fig. 10.1, mit Genehmigung von Mayrhofer-Reinhartshuber, [Open Access]).

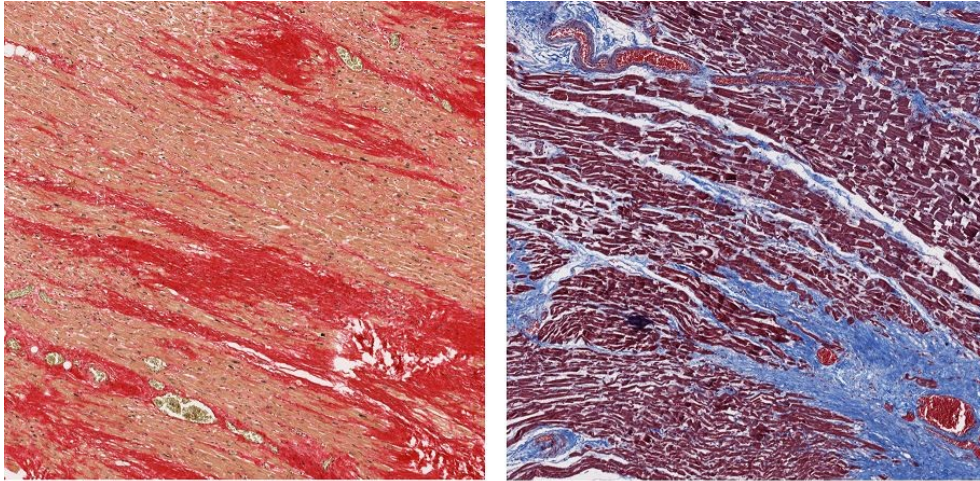
### 2.1.1 Färbemethoden

Insgesamt standen 562 digitalisierte Myokardschnitte mit fibrotischen Anteilen zur Verfügung. Zudem wurden diese Gewebeschnitte in zwei verschiedene Färbungen unterteilt. Als Referenzmethode für die Klassifikation der kardialen Fibrosebilder wurde in der Dissertation *Pyramid Dimension of Histological Images of the Heart* der Goldstandard, also die histopathologische Befundung durch drei humane Expertinnen und Experten verwendet (Mayrhofer-Reinhartshuber, 2015).

- Dr. Damián Sánchez-Qintana,  
Department of Anatomy and Cell Biology, University of Extremadura,  
Badajoz, Spain.
- Dr. Yolanda Macías,  
Department of Anatomy and Cell Biology, University of Extremadura,  
Badajoz, Spain.
- Dr. Sergio Alama Carrizo,  
Instituto de Medicina Legal de Badajoz, Badajoz, Spain.

In dieser Arbeit wurden nur myokardiale Bilder verwendet, welche von allen drei Expertinnen und Experten ident klassifiziert worden sind. Die Expertinnen und Experten zeigten in 62,6% der Fälle eine hundertprozentige Übereinstimmung. Somit wurden bei dieser Arbeit 181 Bilder gefärbt mit Picrosirius Rot und 171 Bilder mit der Gieson´s Trichrom Färbung als Grundwahrheit verwendet. Zusätzlich wurden 30 Schnitte aufgrund des geringen Anteils an Herzgewebe (<50%) im digitalisierten Bild aussortiert. Somit ergab sich eine Gesamtzahl von 322 verwendeten Bildern.

In der Abbildung 2-2 sieht man die deutlichen Unterschiede der zwei Färbemethoden. Bei der Trichromfärbung nach Gieson erscheinen die Kerne und Sekretgranula schwarz, die Muskelfasern und Keratin, sowie Gliafibrillen rot, das Kollagen und saure Mukosubstanzen blau und das Zytoplasma ziegelrot. Die Picrosirius Rot Technik färbt das Kollagen hellrot und die Muskelfasern orange bis gelb.



**Abbildung 2-2: Färbemethoden des Myokards.** Für diese Arbeit wurden zwei verschiedene Färbemethoden verwendet. Links ist die Picrosirius Rot Färbung einer patchy Fibrose mit 2 mm x 2 mm (Kollagen ist hellrot, Myokard ist orange bis gelb) und rechts die Trichrom nach Gieson Färbung einer patchy Fibrose mit 2 mm x 2 mm (Kollagen ist blau, Myokard ist rot) dargestellt.

### 2.1.1.1 Trichrom nach Gieson – Färbeprotokoll

- Entparaffinieren und rehydrieren
- Waschen mit Aqua dest
- Färbung mittels Giesonfarbstoff – 2 min
- Bläuen mit heißem Wasser – 5 min
- 0,5% - 1% Essigsäure – 1 min
- Bläuen mit heißem Wasser – 5 min
- Färben mit der Trichromlösung (1 Teil A + 3 Teile B) – 5 min  
Lösung A: 1 g Säurefuchsin + 0,5 ml Eisessig + 100 ml Aqua dest  
Lösung B: 1 g Ponceau de Xylidine + 1 ml Eisessig + 100 ml Aqua dest
- Kurz mit Aqua dest spülen
- Molybdätophosphorsäure auftropfen – 1 min
- Flüssigkeit abkippen, nicht waschen
- Anilinblau - Lösung auftropfen – 1 min  
Anilinblau - Lösung: 0,5 g Anilinblau + 2,5 ml Eisessig + 100 ml Aqua dest
- Spülen mit Aqua dest
- 0,5% - 1% Essigsäure – 5 min
- Dehydrieren mit steigender Alkoholkonzentration und eindeckeln

### 2.1.1.2 Picrosirius Rot – Färbeprotokoll

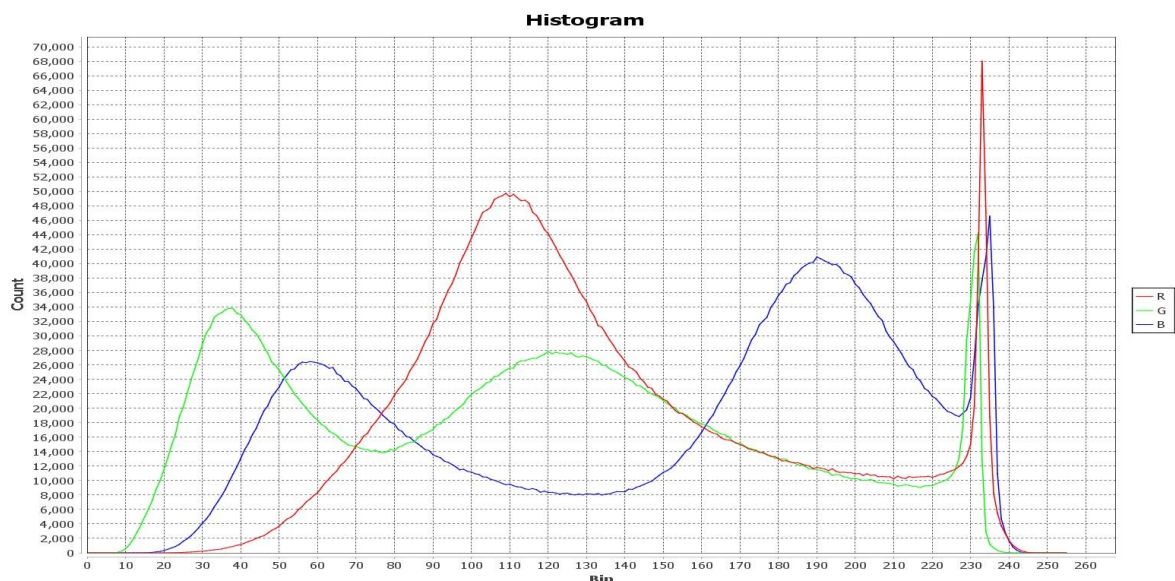
- Entparaffinieren und rehydrieren
- Waschen mit Aqua dest
- Färbung mittels Coelestineblau - Lösung – 7 min  
Coelestineblau - Lösung: 5% Eisenalaun über Nacht in 50 ml Aqua dest lösen + 0,25 g Coelestineblau, dann 3 min kochen lassen und filtrieren + 7 ml Glycerin
- Schnitte direkt in Hämalaun legen – 7 min
- Differenzieren in Salzsäure - Alkohol
- Bläuen – 5-10 min
- Färbung mit Picrosirius Rot – 30 min  
Picrosirius Rot: 0,1% Siriusrot (Siriusrot F3BA Chroma 1 A 280) in gesättigter, wässriger Pikrinsäure (15 g Pikrinsäure + 950 ml Aqua dest) – einige Tage stehen lassen
- Rasch in 3 Portionen absolutem Alkohol entwässern
- Xylol und eindeckeln

## 2.2 IQM

Für diese Arbeit wurde das Programm IQM „Interactive Quantitative Morphology“ in der Version 3.3.0 mit Plugins für zusätzliche fraktale Analysen verwendet. Neben der Möglichkeit der fraktalen Analyse sind in dieser Software auch die Möglichkeiten der Bildbearbeitung inkludiert. IQM ist unter: <https://sourceforge.net/projects/iqm/> kostenlos erhältlich.

## 2.3 Bildbearbeitung

Die Bildbearbeitung erfolgte mit der Software IQM. Die PNG-Bilder hatten eine Auflösung von 2048 x 2048 Pixel. Für die verschiedenen Bildverarbeitungsmethoden wurden sowohl Grauwertbilder als auch binäre Bilder benötigt. Die digitalisierten Gewebeschnitte sind Farbbilder und bestehen somit aus jeweils drei Farbkanälen (RGB = rot, grün, blau). Jedem einzelnen Kanal stehen acht Bit Farbtiefe zur Verfügung. Somit nehmen alle Pixel, je nach Intensität, einen Wert von 0 bis 255 an. Als Beispiel ist in der Abbildung 2-3 ein RGB-Histogramm der kompakte Fibrose mit der Gieson's Trichrom Färbung dargestellt. Auf der Abszisse sind die 256 möglichen Werte und auf der Ordinate die Anzahl der Pixel aufgetragen. Im rechten Bereich des Histogramms (Abbildung 2-3) sind Peaks aller drei Farbkanäle abgebildet. Diese repräsentieren den weißen Bereich des Bildes, welcher aufgrund von Lumina und Bereichen ohne Herzmuskelgewebe zustande kommt.



**Abbildung 2-3: RGB-Histogramm einer kompakten Fibrose.** Dargestellt ist ein RGB-Histogramm eines myokardialen Gewebeschnitts mit kompakter Fibrose in der Trichrom nach Gieson Färbung. Auf der Abszisse sind die 256 Farbwerte und auf der Ordinate die Anzahl der Pixel aufgetragen. Der Peak rechts im Diagramm repräsentiert die weißen Bereiche des Bildes, welche aufgrund von Lumina und gewebefreie Gebiete zustande kommt (generiert mit IQM, <https://sourceforge.net/projects/iqm/>).

### 2.3.1 Erstellung der binären Bilder

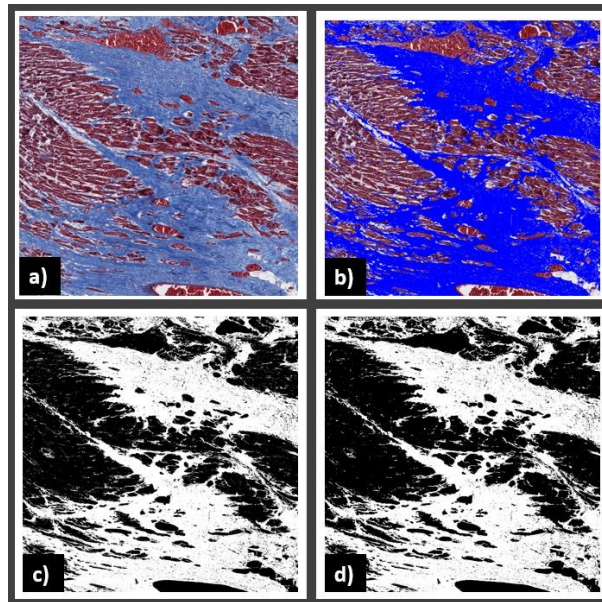
Für manche Bildverarbeitungsmethoden der fraktalen Analyse werden binäre Bilder benötigt. Diese müssen anhand von im Vorhinein manuell festgelegten Schwellenwerten generiert werden. Dies führt unumgänglich zu einem Informationsverlust und ist auch sehr vom Anwender abhängig. Für diese Arbeit wurden zwei Arten der Generierung für binäre Bilder verwendet.

#### 2.3.1.1 RGBrel

Für die Generierung eines binären Bildes wurde im IQM der Algorithmus „RGB relativ“ verwendet. Dieser Algorithmus nutzt die Tatsache, dass ein Farbkanal in der zu untersuchenden Struktur dominant auftritt. So weist die Zielstruktur (Fibrose) bei der Färbemethode Trichrom nach Gieson einen höheren Blauanteil und bei der Picrosirius Rot Färbung einen höheren Rotanteil auf. RGBrel erkennt die Pixel, welche den manuell definierten Wert für einen relativen Farbkanalanteil überschreiten. Wie in Abbildung 2-4 dargestellt, ergibt sich folgende Formel für den relativen Blaukanal der Trichrom nach Gieson Färbung einer kompakten Fibrose:

$$\text{relativer Blauanteil} = \frac{B}{R + B + G} \quad (2-1)$$

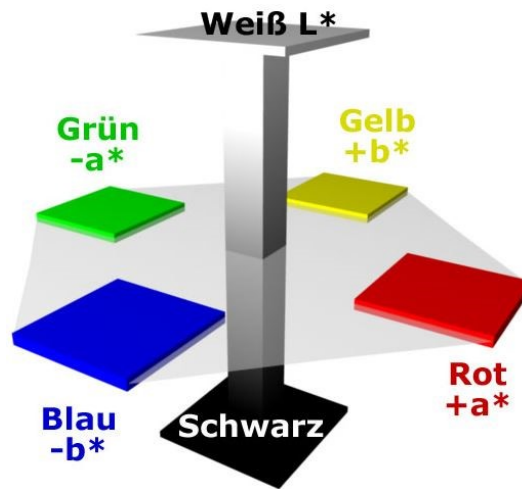
Alle Pixel, welche den vorgegeben Schwellenwert überschreiten werden auf R=0, G=0, B=255 gesetzt. Bei der weiteren Bearbeitung zu binären Bildern, werden diese absolut blau gefärbten Pixel eins (weiß) und die restliche Umgebung null (schwarz) gesetzt. Mithilfe des Opening-Operators können Artefakte, welche als kleine Anhäufungen von Punkten zu sehen sind, entfernt werden (Abbildung 2-4).



**Abbildung 2-4: Generierung eines binären Bildes mit dem RGBrel-Algorithmus.** a) originales RGB-Bild einer kompakten Fibrose mit der Trichrom nach Gieson Färbung, b) gut erkennbare Fibrose durch den RGBrel Algorithmus (Schwellenwert über 38% beim B-Kanal), c) binäres Bild ohne und d) mit der Anwendung des Opening-Operators (generiert mit IQM, <https://sourceforge.net/projects/iqm/>).

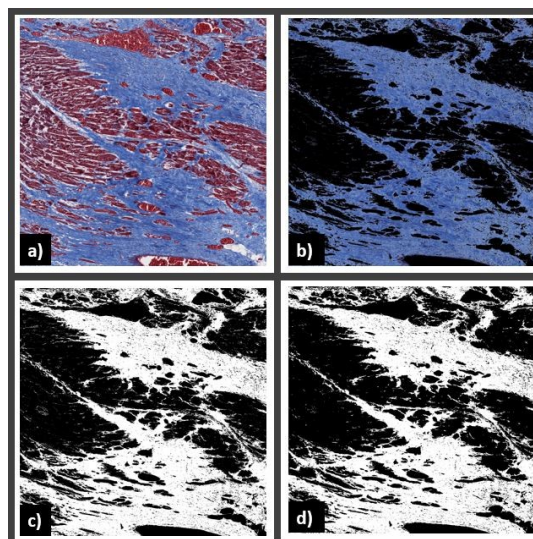
### 2.3.1.2 CIELab

Von der CIE (Comission Internationale de l'Eclairage), auch Internationale Beleuchtungskommission genannt, wurde 1976 der CIELAB-Farbraum definiert. Die offizielle Homepage lautet: <http://cie.co.at/>.  $L$  beschreibt die Helligkeitsachse von 0 (schwarz) bis +100 (weiß),  $a$  die Grün-Magenta-Achse mit Werten von -170 (grün) bis +100 (magenta) und  $b$  die Gelb-Blau-Achse mit Werten von -100 (gelb) bis +150 (blau) (Scheilde, 2020). Die Achsen stehen im Koordinatensystem normal zueinander und basieren auf der Gegenfarbentheorie nach Ewald Hering (Abbildung 2-5). Die Berechnung erfolgt unter Berücksichtigung eines Standardlichts und einer Normalbeobachterin/eines Normalbeobachters. Dieses Farbmodell ist somit objektiv und geräteunabhängig. Es definiert die Farben unabhängig davon, wie sie erzeugt und dargestellt werden. Außerdem versucht CIELAB den geometrischen Abstand zwischen den Farben dem menschlichen Wahrnehmungsvermögen anzupassen. Aufgrund dieser wahrnehmungsbezogenen Gleichabständigkeit beschreibt dieser Farbenraum unser Farbempfindungsvermögen besser als das RGB-Modell.



**Abbildung 2-5: Vereinfachte Darstellung des Lab-Farbraumes als Koordinatensystem.** Die L-Achse beschreibt die Helligkeit von 0 (schwarz) bis +100 (weiß), a) die Grün-Rot-Achse (-a\* bis +a\*) mit Werten von -170 (grün) bis +100 (rot) und b) die Gelb-Blau-Achse (-b\* bis +b\*) mit Werten von -100 (gelb) bis +150 (blau) (Scheide, Abgerufen 09.01.2020, <http://www.cielab.de/>, [Open Access]).

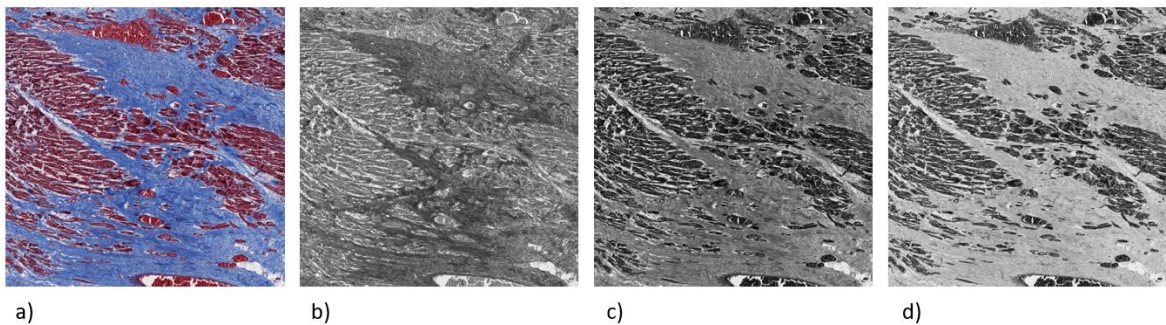
Bei dieser Arbeit wurden je nach Färbemethode bei allen myokardialen Gewebeschnitten die gleichen Schwellenwerte für den Lab-Farbenraum verwendet und speziell für die fibrotischen Strukturen der Myokardbilder ermittelt (Abbildung 2-6).



**Abbildung 2-6: Generierung eines binären Bildes im CIELab-Farbraum.** a) originales RGB-Bild einer kompakten Fibrose mit der Trichrom nach Gieson Färbung, b) fibrotische Areale im CIELab-Farbenraum mit definierten Schwellenwerten (L: 0-221; a: 125-145; b: 75-122), c) binäres Bild ohne und d) mit der Anwendung des Opening-Operators (generiert mit IQM, <https://sourceforge.net/projects/iqm/>).

### 2.3.2 Erstellung der Grauwertbilder

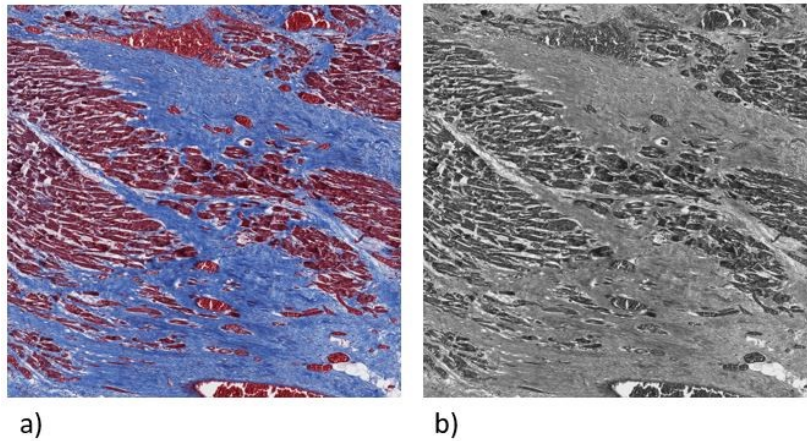
Um Grauwertbilder zu generieren kann jeder einzelne Farbkanal isoliert dargestellt werden. Der Grauwert stellt somit den Intensitätswert eines einzelnen Pixels dar. In Abbildung 2-7 wird das Bild zum zugehörigen Histogramm der Abbildung 2-3 in den isolierten Farbkanälen dargestellt. Für diese Arbeit wurden die RGB-Bilder jedoch vor der Konvertierung mit dem RGBrel-Algorithmus bearbeitet. Dadurch konnten die Zielstrukturen in den Grauwertbildern besser dargestellt werden.



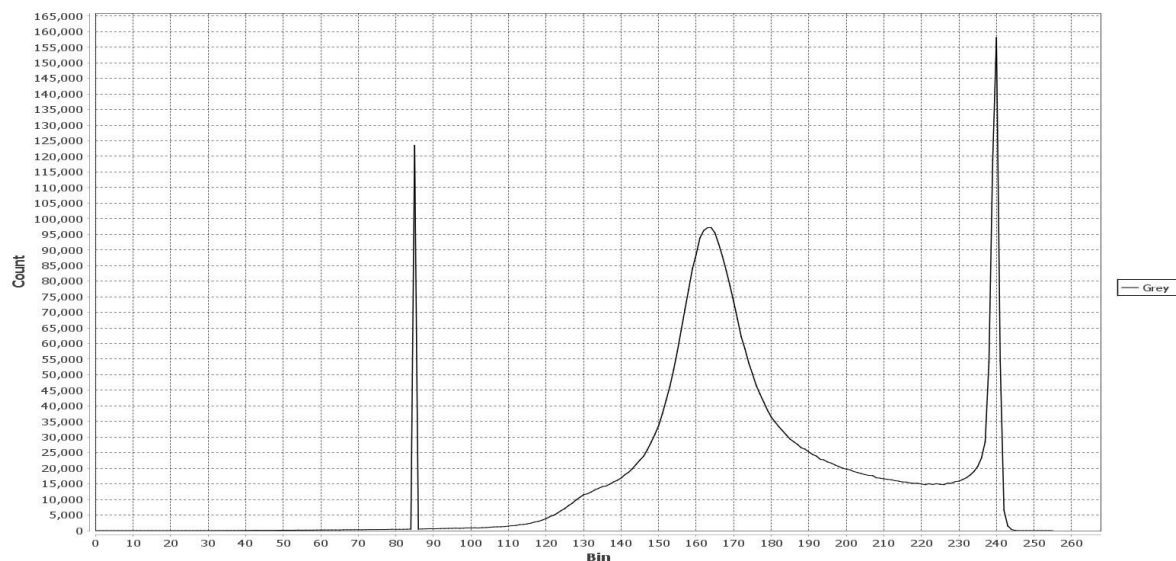
**Abbildung 2-7: Darstellung einzelner Farbkanäle.** a) RGB-Bild einer kompakten Fibrose mit der Trichrom nach Gieson Färbung und isolierte b) rote, c) grüne und d) blaue Farbkanäle (generiert mit IQM, <https://sourceforge.net/projects/iqm/>).

#### 2.3.2.1 RGBmean

Ein Grauwertbild kann durch Mitteilung der Helligkeitswerte der drei RGB Kanäle erzeugt werden, siehe Abbildung 2-8. Bei der Konvertierung der mittels dem RGBrel Algorithmus modifizierten Bilder, siehe Abbildung 2-4 b), entsteht bei einem bestimmten Grauwert ein Peak im Histogramm. In der Abbildung 2-9 ist dieser Peak beim Grauwert von 85 dargestellt. Dieser Peak führt bei der weiteren Bildverarbeitung mittels fraktaler Methoden zu einer besseren Analyse der fraktalen Dimension der Zielstruktur.



**Abbildung 2-8: Darstellung eines RGBmean Bildes.** a) originales RGB-Bild einer kompakten Fibrose mit der Trichrom nach Gieson Färbung und b) korrespondierendes RGBmean-Bild durch Mittelung der Aufsummierten Helligkeitswerte der einzelnen Farbkanäle (generiert mit IQM, <https://sourceforge.net/projects/iqm/>).



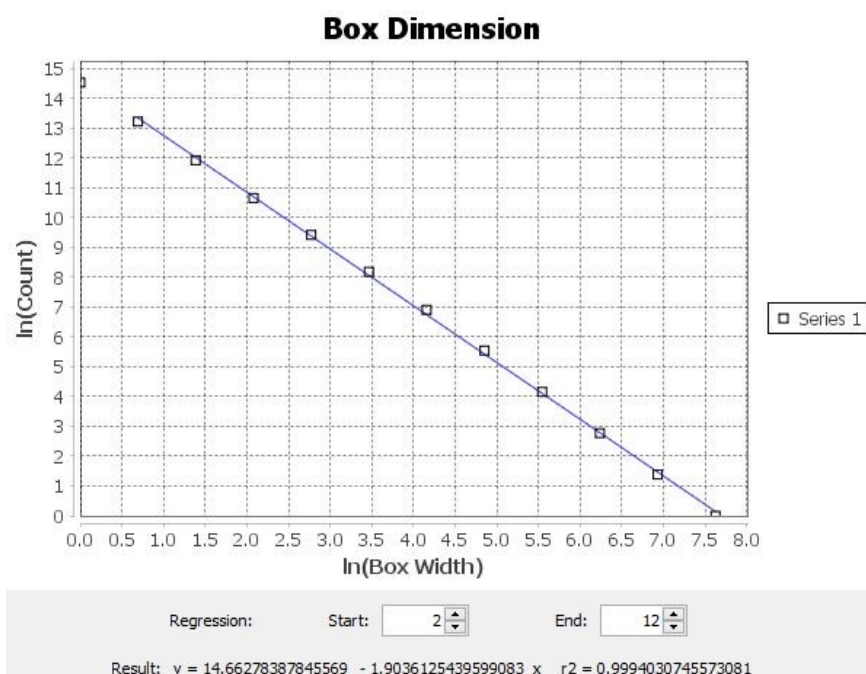
**Abbildung 2-9: Histogramm eines modifizierten RGBmean-Bildes.** Darstellung des Grauerthistogramms einer interstitieller Fibrose in der Picosirius Rot Färbung. Vor der RGBmean-Grauwertkonvertierung erfolgt eine Modifizierung des Bildes mit dem RGBrel-Algorithmus (Schwellenwert über 90% beim R-Kanal). Der Peak bei dem Grauwert von 85 repräsentiert die Fibroseareale (generiert mit IQM, <https://sourceforge.net/projects/iqm/>).

## 2.4 Bildverarbeitung

In der Dissertation *Pyramid Dimension of Histological Images of the Heart* wurden bereits für verschiedene Bildgrößen die optimalen Regressionsbereiche der verschiedenen Methoden ermittelt (Mayrhofer-Reinhartshuber, 2015). Bei den in dieser Arbeit verwendeten Methoden wurde die Modifikation des Regressionsbereichs an diese Einstellungen angepasst. Ohne diese Modifikationen wäre eine signifikante Differenzierung zwischen den Fibrosearten nicht möglich gewesen.

### 2.4.1 Anwendung der Box-Counting Methode

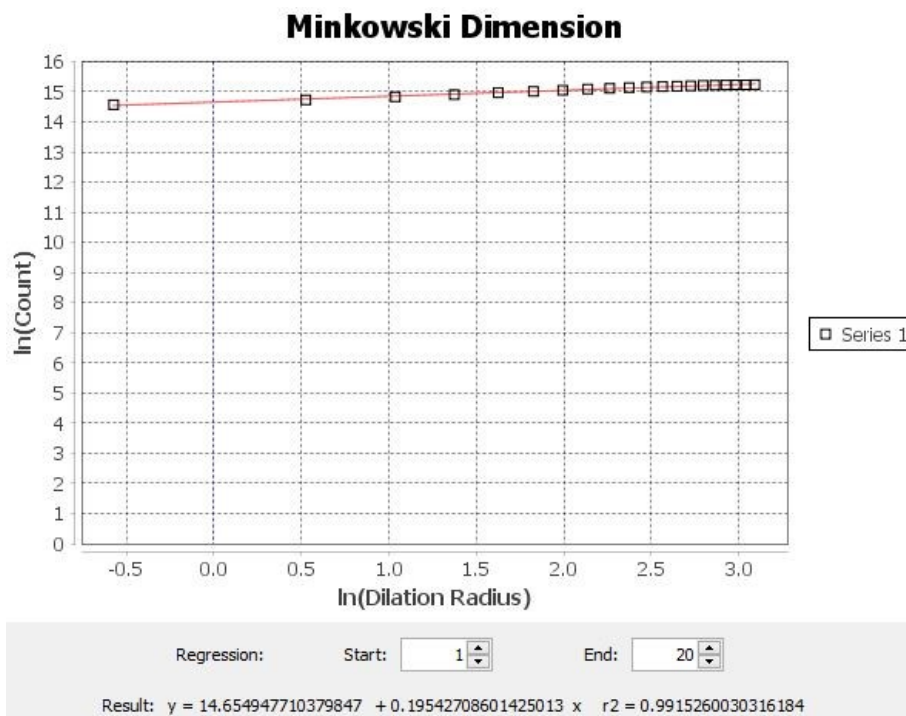
Mit der Box-Counting Methode wird die Anzahl der Boxen  $N_r$ , welche das Objekt beinhalten, auf der Ordinate und die Seitenlänge der Boxen  $r$  auf der Abszisse in einem doppellogarithmischen Plot dargestellt. Die fraktale Dimension wird bei dieser Methode mittels der Steigung berechnet, welche sich nach der Interpolation durch eine Gerade ergibt. In der Abbildung 2-10 wird eine fraktale Dimension  $D_b$  von 1,9 errechnet.



**Abbildung 2-10: Doppellogarithmischer Plot der Box-Counting Methode.** Auf der Abszisse wird die Seitenlänge der Boxen und auf der Ordinate die Anzahl der objektbeinhaltenen Boxen aufgetragen. Aus der Steigung ergibt sich die fraktale Dimension  $D_b$  (generiert mit IQM, <https://sourceforge.net/projects/iqm/>).

## 2.4.2 Anwendung der Minkowski-Bouligand Methode

Bei binären Bildern kann für die Berechnung der fraktalen Dimension neben der Box-Counting Methode die sogenannte Minkowski-Bouligand Methode verwendet werden. Wichtige Parameter für diese Methode sind die Fläche und die verschiedenen Dilatationsradien ( $\varepsilon$ ). Die fraktale Dimension ergibt sich aus der Differenz der Steigung  $k$  des doppellogarithmischen Plots und der Einbettungsdimension. Bei dem Beispiel der Abbildung 2-11 ergibt sich eine fraktale Dimension  $D_m$  von 1,8. Diese wird mittels dem beschriebenen Rechenweg von  $2 - k$  errechnet.

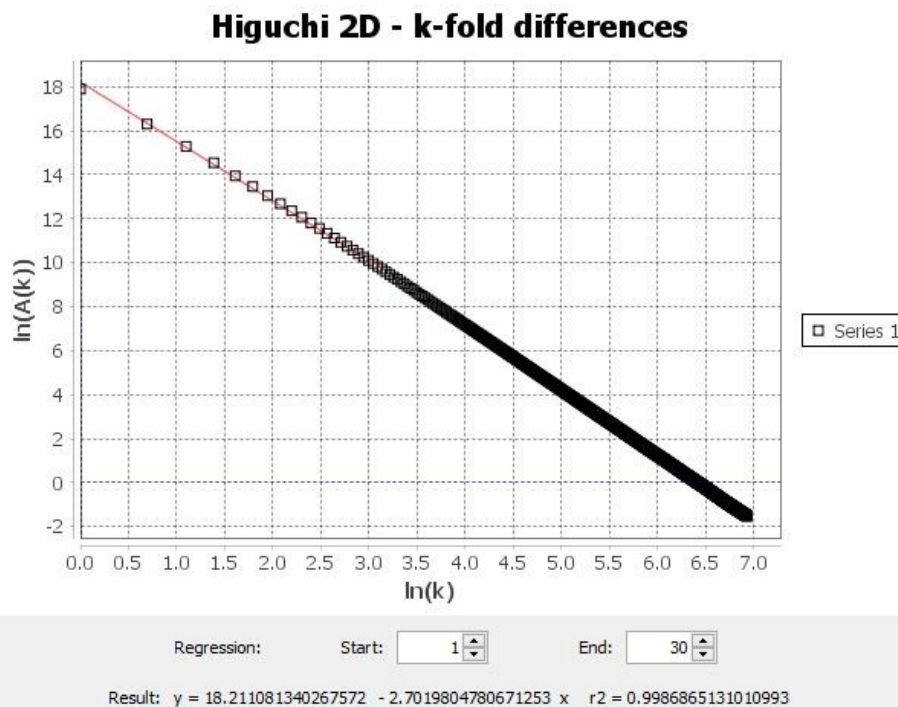


**Abbildung 2-11: Doppellogarithmischer Plot der Minkowski-Bouligand Methode.** Auf der Abszisse wird der Dilatationsradius und auf der Ordinate die Anzahl der Pixel aufgetragen. Aus der Differenz der Einbettungsdimension und der Steigung der Geraden ergibt sich die fraktale Dimension  $D_m$  (generiert mit IQM, <https://sourceforge.net/projects/iqm/>).

## 2.4.3 Anwendung der Higuchi Methode

Für diese Arbeit wird die *K-fold Differences Method*, eine Higuchi 2D Methode für Grauwertbilder, verwendet. Ursprünglich wurde die Higuchi Methode nur für eindimensionale Daten eingesetzt. Ahammer et al. (Ahammer, Sabathiel & Reiss,

2015) zeigte, dass verschiedene Anwendungen für eine 2D Implementierung zufriedenstellende Ergebnisse ohne signifikante Unterschiede ergeben. Die *K-fold Differences Method* basiert auf der Berechnung der Differenzbereiche. Diese Bereiche sind über die Grauwertdifferenzen multipliziert mit der Distanz zu zwei benachbarten Punkten definiert. Beiträge aus Bereichen, welche durch Paare von vier benachbarten Datenpunkten erstellt wurden, werden zusammengefasst. Dieses Prozedere wird für verschiedene Skalen  $k$  wiederholt. Die fraktale Dimension  $D_h$  wird aus der Steigung, welche sich durch den doppellogarithmischen Plot aus  $A(k)$  (Summe der Differenzbereiche) versus  $k$  ergibt, geschätzt (Abbildung 2-12). Bei dieser Arbeit wurde aufgrund des hohen Rechenaufwandes ein maximales  $k$  von 30 angewendet.



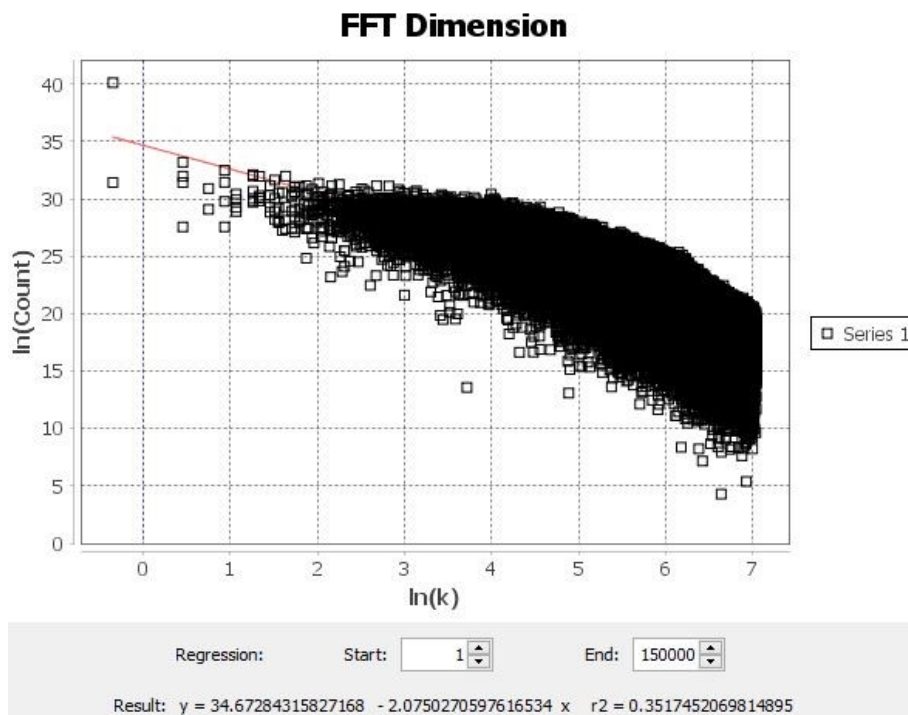
**Abbildung 2-12: Doppellogarithmischer Plot der Higuchi 2D Methode.** Bei der angewendeten *k-fold-differences* Methode werden auf der Abszisse verschiedene Skalen von  $k$  und auf der Ordinate die Summe der Differenzbereiche aufgetragen. Aus der Steigung der Geraden ergibt sich die fraktale Dimension  $D_h$  (generiert mit IQM, <https://sourceforge.net/projects/iqm/>).

#### 2.4.4 Anwendung der Fast Fourier Transformation

Wie bereits in Kapitel 1.3.3.4 beschrieben, dient die FFT zur Analyse von Frequenzen. Hierzu werden die Abstände zwischen den Pixel mit demselben

Grauwert in Frequenzen umgewandelt. Die erzeugten Frequenzen der Grauwerte sind bei wiederholten kleinen Abständen hoch und bei den großen Abständen dementsprechend tief. Dargestellt werden diese Frequenzen als Punktwolke in einem doppellogarithmischen Plot, in die durch Anpassung eine Gerade gelegt wird. Mittels der daraus resultierenden Steigung  $k$  kann die fraktale Dimension berechnet werden:

$$D_f = \frac{8 - k}{2} \quad (2-2)$$



**Abbildung 2-13: Doppellogarithmischer Plot der Fast-Fourier Transformation.** Auf der Abszisse wird die Schwingung/Einheit und auf der Ordinate die vorhandenen Frequenzen aufgetragen. Mit der Formel (2-2) kann die fraktale Dimension  $D_f$  berechnet werden (generiert mit IQM, <https://sourceforge.net/projects/iqm/>).

In der Abbildung 2-13 wird ein solcher doppellogarithmischer Plot abgebildet. Die Anzahl der vorhandenen Frequenzen wird auf der Ordinate und die Schwingungen/Einheit ( $k$ ) auf der Abszisse dargestellt. Für die Modifikation der Regressionsgeraden wurde ein minimales  $\Delta k$  von 1000 im  $k$ -Raum verwendet.

### 2.4.5 Anwendung der Pyramidendimensionen

Die *Triangular Prism Method* nutzt die Fläche als Parameter um die fraktale Dimension zu berechnen. Die Flächenberechnung kann aber auch mittels Gradienten kalkuliert werden. Diese Methode wird als *Pyramid Gradient Method* (PGM) bezeichnet (Mayrhofer-Reinhartshuber, 2015). Die z-Achse kann auch als eine gesampelte Darstellung einer kontinuierlichen Höhenfunktion mit  $h$  als kürzeste laterale Distanz zwischen den Positionen zweier bekannter Werte interpretiert werden.

$$(x_i, y_j) = (ih, jh), \quad i = 1, \dots, N_0, \quad j = 1, \dots, N_0 \quad (2-3)$$

Die partiellen Ableitungen der neuen Funktion können mittels zentrierter Finite-Differenzen-Methoden angenähert werden. Die Ableitungen müssen von jedem Bildpunkt berechnet und mittels folgender Funktion (Mayrhofer-Reinhartshuber, 2015) für die Fläche aufsummiert werden:

$$A = \sum_{i,j} \sqrt{1 + \left( \frac{\partial z}{\partial x} \Big|_{(x_i, y_j)} \right)^2 + \left( \frac{\partial z}{\partial y} \Big|_{(x_i, y_j)} \right)^2} \quad (2-4)$$

Die fraktale Dimension  $D_P$  ergibt sich wieder aus der Steigung eines doppellogarithmischen Plots, in welchem auf der Ordinate die Fläche  $A$  und auf der Abszisse  $h$  aufgetragen werden. In dieser Arbeit erfolgte die Anwendung dieser Methode bei bilinearer Interpolation mit einer Skala von  $2^0$ - $2^3$ .

Eine weitere Methode für die Bestimmung der fraktalen Dimension ist die *Pyramid Differences Method* (PDM). Diese Methode macht sich zunutze, dass man über die Rauheit eines Bildes bei unterschiedlichen Skalen auf die fraktale Dimension schließen kann. Die z-Achse bezeichnet den Grauwert eines Bildes an einer bestimmten Position. Die Unterschiede dieser Grauwerte erhält man durch die Zusammenfassung aller horizontalen und vertikalen Anteile. Diese Methode kann auch als eine vereinfachte Version der Higuchi-2D-Methode angesehen werden. Für die pyramidale Implementierung dieser Methode werden wie bei der TPM

mehrere Bildpyramiden erzeugt (Kapitel 1.3.3.5). Von diesen Bildern werden die Differenzen mit der folgenden Formel berechnet:

$$\Delta = \sum_{i,j} |z(x_{i+1}, x_j) - z(x_i, x_j)| + |z(x_i, x_{j+1}) - z(x_i, x_j)| \quad (2-5)$$

Die fraktale Dimension  $D_P$  wird auch hier aus der Steigung der Geraden eines doppellogarithmischen Plots berechnet. Im Unterschied zur PGM wird auf der Ordinate die Differenz aufgetragen. Für die PDM eignete sich für diese Arbeit die bilineare Interpolation und eine Skala von  $2^1$ - $2^4$  am besten.

## 2.5 Statistik

Für die statistische Analyse wurde SPSS 25 (International Business Machines Corporation) verwendet. Die Daten wurden mittels der Software IQM generiert und in Excel-Dateien deskriptiv bearbeitet und archiviert. Anschließend wurden die Daten in Gruppen nach Bildbearbeitungsprozedere (RGBmean, RGBrel, CIELab), nach Färbemethoden (Trichrom nach Gieson & Picrosirius Rot) und nach Methodik der fraktalen Analyse (BCM, MBM, H2D, FFT, PGM, PDM) in SPSS importiert. Jede Gruppe wurde nach Art der kardialen Fibrose (keine Fibrose, interstitielle Fibrose, kompakte Fibrose, diffuse Fibrose, patchy Fibrose) unterteilt. In SPSS erfolgte zunächst die graphische Analyse der Daten mit besonderem Blick auf Schiefe und Kurtosis. Die Untersuchung auf Normalverteilung wurde anschließend mit dem Shapiro-Wilk-Test durchgeführt. Im Anschluss erfolgte bei nicht normalverteilten Daten ein Kruskal-Wallis-Test samt Post-hoc-Tests. Dieser nichtparametrische Test vergleicht mehr als zwei unabhängige Stichproben anhand der Ränge der abhängigen Variablen auf signifikante Unterschiede. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  (\*) angenommen. Hoch signifikante Werte wiesen ein  $p < 0,01$  (\*\*) auf.

Zusätzlich wurde die Effektstärke (r-Wert) des signifikanten Unterschieds mit folgender Formel berechnet:

$$r = \left| \frac{z}{\sqrt{n}} \right| \quad (2-6)$$

Die Formel ergibt sich aus der Anzahl  $n$  der Individuen der Stichprobe (im paarweisen Vergleich natürlich nur die Anzahl der zwei verglichenen Gruppen) und dem  $z$ -standardisierten Wert (Cohen, 1992). Ab einer Effektstärke von 0,1 spricht man von einem schwachen Effekt, ab 0,3 von einem mittleren Effekt und bei  $>0,5$  von einem starken Effekt.

Für diese Arbeit wurden 168 Bilder mit Picrosirius Rot (54 ohne Fibrose, 31 mit interstitieller Fibrose, 15 mit kompakter Fibrose, 23 mit diffuser Fibrose und 45 mit patchy Fibrose) und 149 Bilder mit Trichrom nach Gieson (28 ohne Fibrose, 22 mit interstitieller Fibrose, 30 mit kompakter Fibrose, 32 mit diffuser Fibrose und 37 mit patchy Fibrose) verwendet.

## **3 Ergebnisse – Resultate**

### **3.1 Ergebnisse der binären Bilder**

Die zu untersuchenden Daten wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung getestet. Aufgrund der nicht-normalverteilten Datenlage ( $p < 0,05$ ) wurden die verschiedenen Fibrosearten mit dem Kruskal-Wallis-Test auf signifikante Unterschiede untersucht.

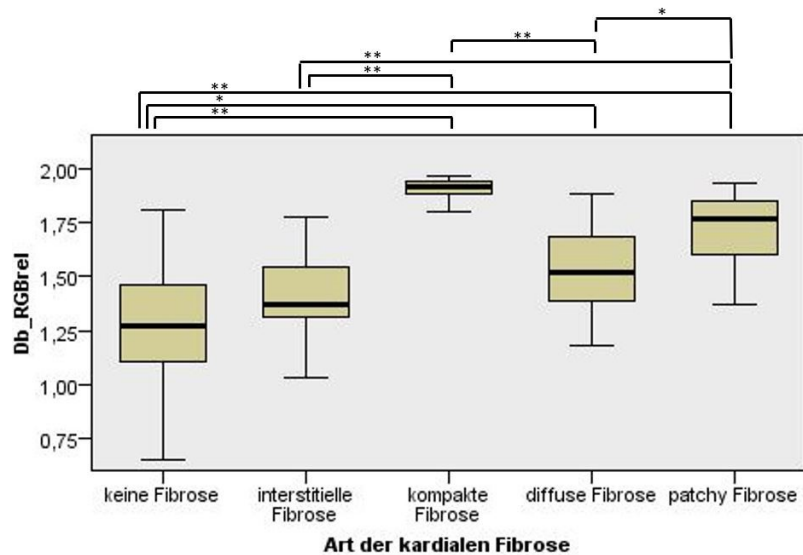
#### **3.1.1 Picrosirius Rot**

Die Daten wurden mittels der Box-Counting Methode und der Minkowski-Bouligand Methode für die mittels RGBrel und CIELab erstellten binären Bilder generiert.

##### **3.1.1.1 Box-Counting Methode**

###### **3.1.1.1.1 RGBrel**

Die mittels der Box-Counting-Methode für RGBrel-Bilder errechneten fraktalen Dimensionen, unterscheiden sich hoch signifikant und mit einem starken Effekt ( $r$ -Wert  $> 0,5$ ) zwischen der ersten und dritten Gruppe, der ersten und fünften Gruppe, der zweiten und dritten Gruppe, der zweiten und fünften Gruppe und der dritten und vierten Gruppe. Ein signifikanter Unterschied und mittlerer Effekt ( $r$ -Wert zwischen  $0,3$  und  $0,5$ ) besteht auch zwischen der ersten und vierten Gruppe, als auch zwischen der vierten und fünften Gruppe. Den niedrigsten Wert der fraktalen Dimension weist die erste Gruppe (keine Fibrose) mit  $0,65$  auf. Der höchste Wert ( $1,96$ ) stammt aus der Gruppe der kompakten Fibrose (Abbildung 3-1). Die Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests.



**Abbildung 3-1: Boxplot der fraktalen Dimension  $Db$  (Picosirius, RGBrel, Box-Counting Methode).**

**Tabelle 1: Resultate der paarweisen Vergleiche mittels Kruskal-Wallis Test und r-Werte (Picosirius, RGBrel, Box-Counting Methode).**

Sample 1-Sample 2	r-Wert	Std.-Fehler	z-Wert	Sig.	Korr. Sig. <sup>a</sup>
keine Fibrose-interstitielle Fibrose		10,961	-1,413	,158	1,000
keine Fibrose-diffuse Fibrose	0,36	12,111	-3,202	,001	,014
keine Fibrose-patchy Fibrose	0,77	9,818	-7,689	,000	,000
keine Fibrose-kompakte Fibrose	0,88	14,197	-7,700	,000	,000
interstitielle Fibrose-diffuse Fibrose		13,386	-1,740	,082	,819
interstitielle Fibrose-patchy Fibrose	0,6	11,353	-5,285	,000	,000
interstitielle Fibrose-kompakte Fibrose	0,9	15,299	-6,133	,000	,000
diffuse Fibrose-patchy Fibrose	0,36	12,468	-2,945	,003	,032
diffuse Fibrose-kompakte Fibrose	0,71	16,143	4,369	,000	,000
patchy Fibrose-kompakte Fibrose		14,502	2,332	,020	,197

Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind. Asymptotische Signifikanz (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.

a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.

### 3.1.1.1.2 CIELab

Auch bei den mittels CIELab erstellten binären Bildern bestehen hochsignifikante Unterschiede der fraktalen Dimensionen mit einem starken Effekt ( $r$ -Wert  $>0,5$ ) zwischen der ersten und dritten Gruppe, der ersten und fünften Gruppe, der zweiten und dritten Gruppe, der zweiten und fünften Gruppe sowie der dritten und vierten Gruppe. Der Unterschied der ersten (keine Fibrose) und vierten Gruppe (diffuse Fibrose) ist ebenfalls hochsignifikant, jedoch besteht nur eine mittlere Effektstärke. Zudem ergibt sich ein signifikanter Unterschied und mittlerer Effekt ( $r$ -Wert zwischen  $0,3$  und  $0,5$ ) zwischen der vierten und fünften Gruppe. Wieder weist die erste Gruppe den niedrigsten Wert der fraktalen Dimension ( $0,79$ ) auf. Auch der Maximalwert von  $1,93$  stammt wieder aus der dritten Gruppe (Abbildung 3-2). Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests.

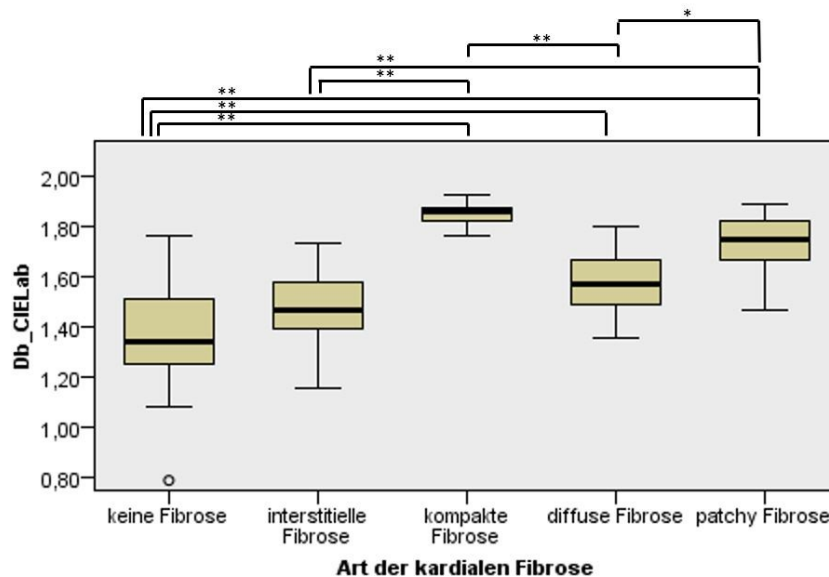


Abbildung 3-2: Boxplot der fraktalen Dimension  $Db$  (Picrosirius, CIELab, Box-Counting Methode).

**Tabelle 2: Resultate der paarweisen Vergleiche mittels Kruskal-Wallis Test und r-Werte (Picrosirius, CIELab, Box-Counting Methode).**

Sample 1-Sample 2	r-Wert	Std.-Fehler	z-Wert	Sig.	Korr. Sig. <sup>a</sup>
keine Fibrose-interstitielle Fibrose		10,961	-1,734	,083	,829
keine Fibrose-diffuse Fibrose	0,41	12,111	-3,632	,000	,003
keine Fibrose-patchy Fibrose	0,82	9,818	-8,125	,000	,000
keine Fibrose-kompakte Fibrose	0,88	14,197	-7,708	,000	,000
interstitielle Fibrose-diffuse Fibrose		13,386	-1,867	,062	,620
interstitielle Fibrose-patchy Fibrose	0,61	11,353	-5,352	,000	,000
interstitielle Fibrose-kompakte Fibrose	0,87	15,299	-5,911	,000	,000
diffuse Fibrose-patchy Fibrose	0,35	12,468	-2,869	,004	,041
diffuse Fibrose-kompakte Fibrose	0,66	16,143	4,054	,000	,001
patchy Fibrose-kompakte Fibrose		14,502	2,046	,041	,408
Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind. Asymptotische Signifikanzen (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.					
a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.					

### 3.1.1.2 Minkowski-Bouligand Methode

#### 3.1.1.2.1 RGBrel

Die fraktalen Dimensionen der RGBrel-Bilder, errechnet mit der Minkowski-Bouligand-Methode, unterscheiden sich wie schon bei der BCM hochsignifikant und mit einer großen Effektstärke ( $r$ -Wert  $>0,5$ ) zwischen der ersten und dritten Gruppe, der ersten und fünften Gruppe, der zweiten und dritten Gruppe, der zweiten und fünften Gruppe sowie der dritten und vierten Gruppe. Ebenfalls bestehen signifikante Unterschiede mit mittlerer Effektstärke ( $r$ -Wert zwischen  $0,3$  und  $0,5$ ) zwischen der ersten und vierten Gruppe und der vierten und fünften Gruppe. Die Grenzwerte der fraktalen Dimension sind ebenfalls gleich, wie bei der Box-Counting Methode. Der Minimumwert ( $0,48$ ) stammt aus der ersten Gruppe und die kompakte Fibrose erreicht den höchsten Wert von  $0,91$  (Abbildung 3-3). Die Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests.

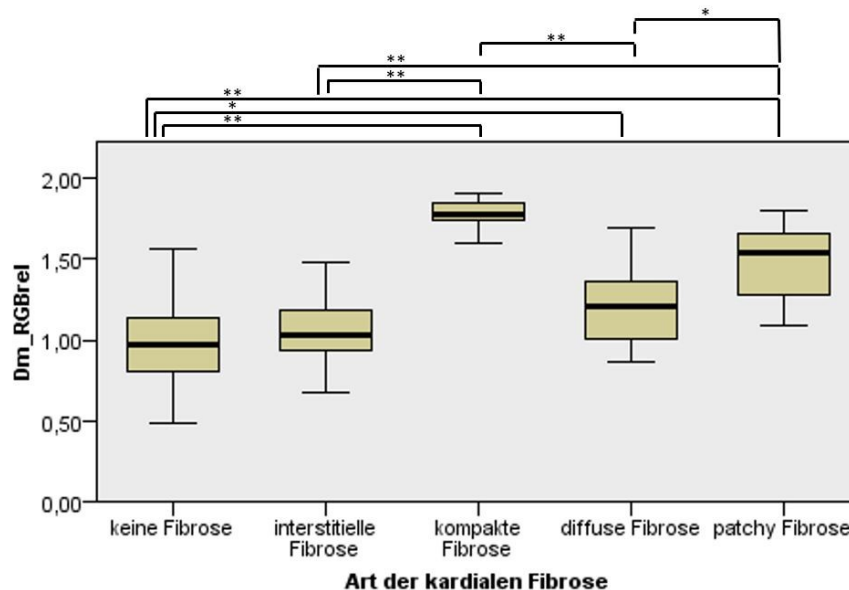


Abbildung 3-3: Boxplot der fraktalen Dimension  $D_m$  (Picrosirius, RGBrel, Minkowski-Bouligand Methode).

**Tabelle 3: Resultate der paarweisen Vergleiche mittels Kruskal-Wallis Test und r-Werte (Picrosirius, RGBrel, Minkowski-Bouligand Methode).**

Sample 1-Sample 2	r-Wert	Std.-Fehler	z-Wert	Sig.	Korr. Sig. <sup>a</sup>
keine Fibrose-interstitielle Fibrose		10,961	-,857	,392	1,000
keine Fibrose-diffuse Fibrose	0,33	12,111	-2,900	,004	,037
keine Fibrose-patchy Fibrose	0,74	9,818	-7,405	,000	,000
keine Fibrose-kompakte Fibrose	0,88	14,197	-7,687	,000	,000
interstitielle Fibrose-diffuse Fibrose		13,386	-1,923	,054	,545
interstitielle Fibrose-patchy Fibrose	0,64	11,353	-5,577	,000	,000
interstitielle Fibrose-kompakte Fibrose	0,96	15,299	-6,519	,000	,000
diffuse Fibrose-patchy Fibrose	0,37	12,468	-3,014	,003	,026
diffuse Fibrose-kompakte Fibrose	0,74	16,143	4,584	,000	,000
patchy Fibrose-kompakte Fibrose		14,502	2,512	,012	,120
Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind. Asymptotische Signifikanzen (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.					
a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.					

### 3.1.1.2.2 CIELab

Wie erwartet bestehen auch bei den mittels CIELab erstellten binären Bildern hochsignifikante Unterschiede der fraktalen Dimensionen mit einem starken Effekt (r-Wert >0,5) zwischen der ersten und dritten Gruppe, der ersten und fünften Gruppe, der zweiten und dritten Gruppe, der zweiten und fünften Gruppe und der dritten und vierten Gruppe. Ebenfalls hochsignifikant ist der Unterschied zwischen der ersten und vierten Gruppe, jedoch besteht hier nur eine mittlere Effektstärke. Es besteht außerdem ein signifikanter Unterschied und mittlerer Effekt (r-Wert zwischen 0,3 und 0,5) zwischen der vierten (diffuse Fibrose) und fünften Gruppe (patchy Fibrose). Wieder weist die erste Gruppe den Minimalwert der fraktalen Dimension von 0,64 auf. Der dritten Gruppe entstammt der Höchstwert von 0,86 (Abbildung 3-4). Die Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests.

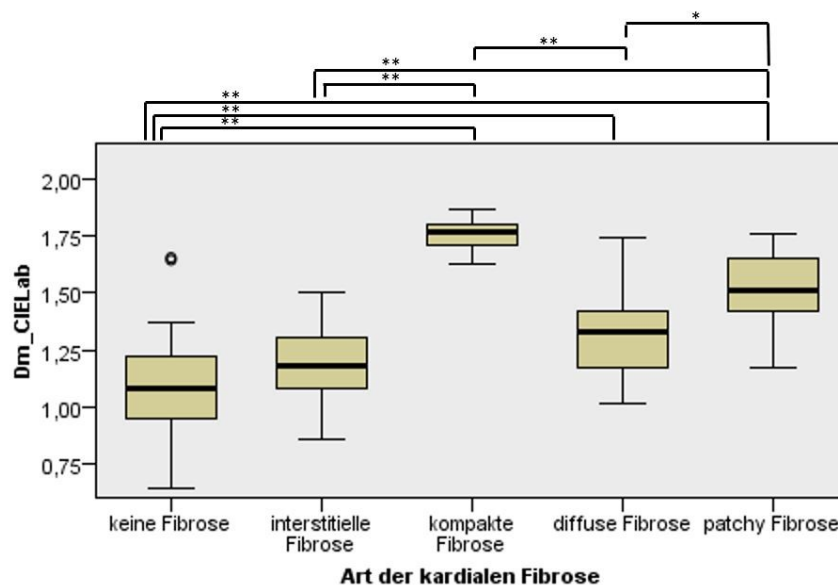


Abbildung 3-4: Boxplot der fraktalen Dimension  $D_m$  (Picosirius, CIELab, Minkowski-Bouligand Methode).

**Tabelle 4: Resultate der paarweisen Vergleiche mittels Kruskal-Wallis Test und r-Werte (Picrosirius, CIELab, Minkowski-Bouligand Methode).**

Sample 1-Sample 2	r-Wert	Std.-Fehler	z-Wert	Sig.	Korr. Sig. <sup>a</sup>
keine Fibrose-interstitielle Fibrose		10,961	-1,546	,122	1,000
keine Fibrose-diffuse Fibrose	0,39	12,111	-3,434	,001	,006
keine Fibrose-patchy Fibrose	0,81	9,818	-8,097	,000	,000
keine Fibrose-kompakte Fibrose	0,91	14,197	-7,973	,000	,000
interstitielle Fibrose-diffuse Fibrose		13,386	-1,841	,066	,656
interstitielle Fibrose-patchy Fibrose	0,63	11,353	-5,510	,000	,000
interstitielle Fibrose-kompakte Fibrose	0,93	15,299	-6,291	,000	,000
diffuse Fibrose-patchy Fibrose	0,37	12,468	-3,040	,002	,024
diffuse Fibrose-kompakte Fibrose	0,72	16,143	4,435	,000	,000
patchy Fibrose-kompakte Fibrose		14,502	2,323	,020	,202
Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind. Asymptotische Signifikanzen (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.					
a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.					

### 3.1.2 Trichrom nach Gieson

Auch für die Färbung Trichrom nach Gieson wurden die Datensätze mittels Box-Counting Methode und der Minkowski-Bouligand Methode für die mittels RGBrel und CIELab erstellten binären Bilder analysiert.

#### 3.1.2.1 Box-Counting Methode

##### 3.1.2.1.1 RGBrel

Für die binärisierten RGBrel-Bilder wurden die fraktalen Dimensionen mittels der Box-Counting Methode generiert. Dabei unterscheiden sich die Daten der ersten und dritten Gruppe, der ersten und fünften Gruppe, der zweiten und dritten Gruppe sowie der dritten und vierten Gruppe hochsignifikant und weisen eine große Effektstärke auf ( $r$ -Wert  $>0,5$ ). Ebenfalls hochsignifikant aber nur mittlerer Effektstärke sind die Unterschiede der zweiten und fünften Gruppe als auch der dritten und fünften Gruppe. Ein signifikanter Unterschied und mittlerer Effekt ( $r$ -Wert zwischen  $0,3$  und  $0,5$ ) besteht zudem zwischen der vierten und fünften Gruppe. Der niedrigste Wert ( $1,2$ ) der fraktalen Dimension stammt aus der Gruppe keine Fibrose. Das Maximum von  $1,9$  wird von der kompakten Fibrose erreicht (Abbildung 3-5). Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests.

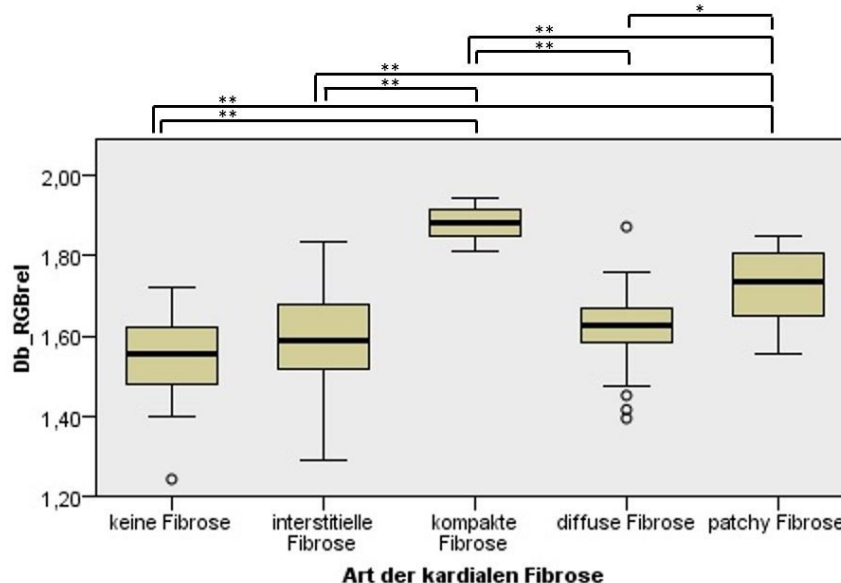


Abbildung 3-5: Boxplot der fraktalen Dimension  $Db$  (Trichrom, RGBrel, Box-Counting Methode).

**Tabelle 5: Resultate der paarweisen Vergleiche mittels Kruskal-Wallis Test und r-Werte (Trichrom, RGBrel, Box-Counting Methode).**

Sample 1-Sample 2	r-Wert	Std.-Fehler	z-Wert	Sig.	Korr. Sig. <sup>a</sup>
keine Fibrose-interstitielle Fibrose		12,295	-,959	,338	1,000
keine Fibrose-diffuse Fibrose		11,168	-1,820	,069	,688
keine Fibrose-patchy Fibrose	0,6	10,810	-4,854	,000	,000
keine Fibrose-kompakte Fibrose	1,1	11,340	-8,528	,000	,000
interstitielle Fibrose-diffuse Fibrose		11,952	-,714	,475	1,000
interstitielle Fibrose-patchy Fibrose	0,46	11,619	-3,501	,000	,005
interstitielle Fibrose-kompakte Fibrose	0,97	12,114	-7,010	,000	,000
diffuse Fibrose-patchy Fibrose	0,37	10,418	-3,086	,002	,020
diffuse Fibrose-kompakte Fibrose	0,88	10,968	6,964	,000	,000
patchy Fibrose-kompakte Fibrose	0,51	10,603	4,172	,000	,000
Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind. Asymptotische Signifikanzen (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.					
a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.					

### 3.1.2.1.2 CIELab

Die fraktalen Dimensionen wurden auch von binärisierten CIELab-Bildern mittels der Box-Counting Methode ermittelt. Dabei unterscheiden sich die Daten der ersten und dritten Gruppe, der ersten und fünften Gruppe, der zweiten und dritten Gruppe sowie der dritten und vierten Gruppe wieder hochsignifikant und weisen ebenfalls einen starken Effekt auf ( $r$ -Wert  $>0,5$ ). Hochsignifikant aber nur mittlerer Effektstärke sind die Unterschiede der ersten und vierten Gruppe als auch der vierten und fünften Gruppe. Ein signifikanter Unterschied und mittlerer Effekt ( $r$ -Wert zwischen  $0,3$  und  $0,5$ ) besteht auch zwischen der zweiten und fünften Gruppe sowie der dritten und fünften Gruppe. Die erste Gruppe (keine Fibrose) weist wieder den kleinsten Wert von  $0,9$  auf. Der maximale Wert von  $1,9$  stammt wiederum aus der dritten Gruppe (kompakte Fibrose), siehe Abbildung 3-6. Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests.

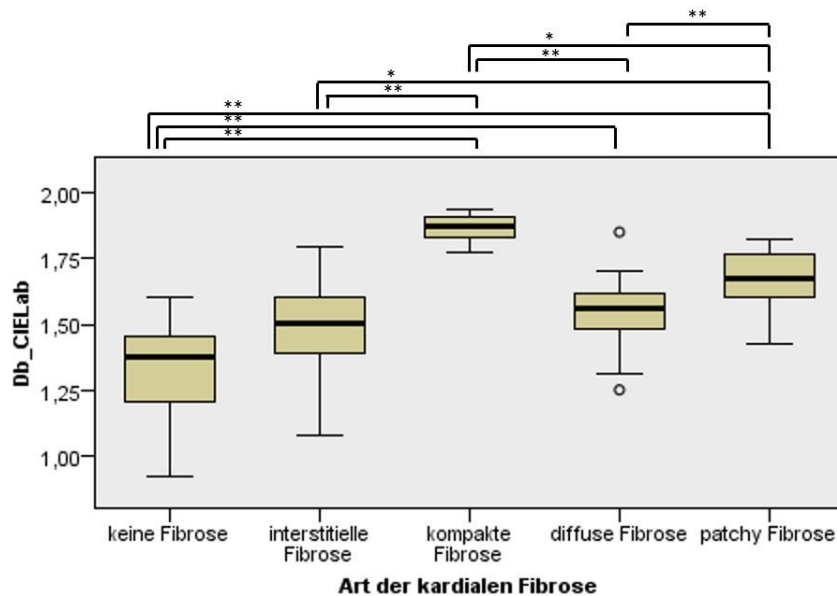


Abbildung 3-6: Boxplot der fraktalen Dimension  $Db$  (Trichrom, CIELab, Box-Counting Methode).

**Tabelle 6: Resultate der paarweisen Vergleiche mittels Kruskal-Wallis Test und r-Werte (Trichrom, CIELab, Box-Counting Methode).**

Sample 1-Sample 2	r-Wert	Std.-Fehler	z-Wert	Sig.	Korr. Sig. <sup>a</sup>
keine Fibrose-interstitielle Fibrose		12,295	-2,377	,017	,174
keine Fibrose-diffuse Fibrose	0,42	11,168	-3,278	,001	,010
keine Fibrose-patchy Fibrose	0,77	10,810	-6,219	,000	,000
keine Fibrose-kompakte Fibrose	1,26	11,340	-9,614	,000	,000
interstitielle Fibrose-diffuse Fibrose		11,952	-,617	,537	1,000
interstitielle Fibrose-patchy Fibrose	0,43	11,619	-3,270	,001	,011
interstitielle Fibrose-kompakte Fibrose	0,91	12,114	-6,587	,000	,000
diffuse Fibrose-patchy Fibrose	0,35	10,418	-2,939	,003	,033
diffuse Fibrose-kompakte Fibrose	0,84	10,968	6,603	,000	,000
patchy Fibrose-kompakte Fibrose	0,48	10,603	3,942	,000	,001
Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind. Asymptotische Signifikanzen (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.					
a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.					

### 3.1.2.2 Minkowski-Bouligand Methode

#### 3.1.2.2.1 RGBrel

Die mittels der Minkowski-Bouligand Methode generierten Dimensionen unterscheiden sich zwischen der ersten und dritten Gruppe, der ersten und fünften Gruppe, der zweiten und dritten Gruppe sowie der dritten und vierten Gruppe hochsignifikant und weisen eine große Effektstärke auf ( $r$ -Wert  $>0,5$ ). Ein mittlerer Effekt aber ebenfalls hochsignifikanter Unterschied ergibt sich zwischen der ersten und vierten Gruppe, der zweiten und fünften Gruppe sowie der vierten und fünften Gruppe. Ein signifikanter Unterschied und mittlerer Effekt ( $r$ -Wert zwischen  $0,3$  und  $0,5$ ) besteht zudem zwischen der dritten (kompakte Fibrose) und fünften Gruppe (patchy Fibrose). Die Gruppe eins weist mit einem Wert von  $0,65$  den Minimalwert auf. Der höchste Wert ( $1,88$ ) stammt aus der Gruppe kompakte Fibrose (Abbildung 3-7). Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests.

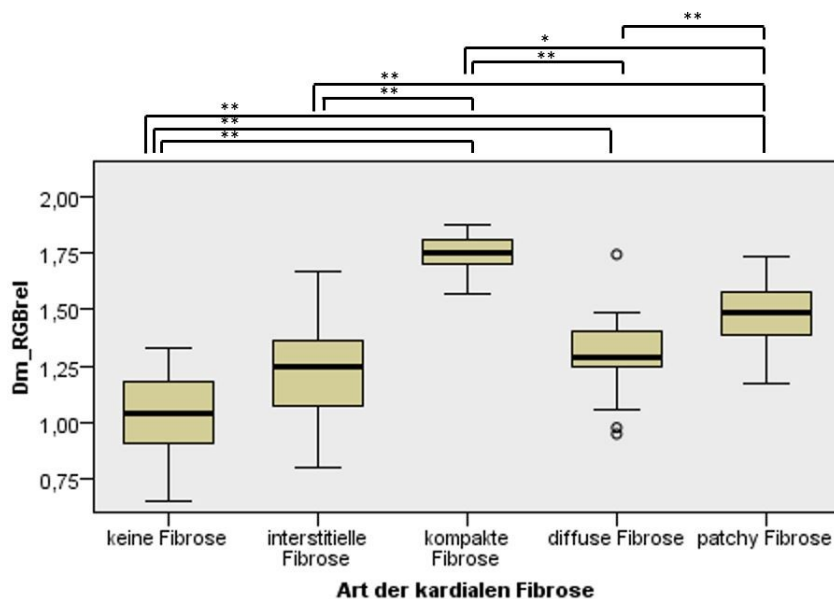


Abbildung 3-7: Boxplot der fraktalen Dimension  $D_m$  (Trichrom, RGBrel, Minkowski-Bouligand Methode).

**Tabelle 7: Resultate der paarweisen Vergleiche mittels Kruskal-Wallis Test und r-Werte (Trichrom, RGBrel, Minkowski-Bouligand Methode).**

Sample 1-Sample 2	r-Wert	Std.-Fehler	z-Wert	Sig.	Korr. Sig. <sup>a</sup>
keine Fibrose-interstitielle Fibrose		12,295	-2,347	,019	,189
keine Fibrose-diffuse Fibrose	0,44	11,168	-3,405	,001	,007
keine Fibrose-patchy Fibrose	0,78	10,810	-6,285	,000	,000
keine Fibrose-kompakte Fibrose	1,23	11,340	-9,583	,000	,000
interstitielle Fibrose-diffuse Fibrose		11,952	-,767	,443	1,000
interstitielle Fibrose-patchy Fibrose	0,44	11,619	-3,363	,001	,008
interstitielle Fibrose-kompakte Fibrose	0,91	12,114	-6,589	,000	,000
diffuse Fibrose-patchy Fibrose	0,35	10,418	-2,871	,004	,041
diffuse Fibrose-kompakte Fibrose	0,82	10,968	6,442	,000	,000
patchy Fibrose-kompakte Fibrose	0,47	10,603	3,843	,000	,001
Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind. Asymptotische Signifikanzen (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.					
a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.					

### 3.1.2.2.2 CIELab

Die Daten der Minkowski-Bouligand Methode von CIELab-Bildern unterscheiden sich zwischen der ersten und dritten Gruppe, der ersten und fünften Gruppe, der zweiten und dritten Gruppe sowie der dritten und vierten Gruppe hochsignifikant und weisen eine große Effektstärke auf ( $r$ -Wert  $>0,5$ ). Die Unterschiede zwischen der zweiten und fünften, der dritten und fünften Gruppe als auch der vierten und fünften sind hochsignifikant, weisen aber nur einen mittleren Effekt auf ( $r$ -Wert zwischen  $0,3$  und  $0,5$ ). Der minimale Dimensionswert von  $0,7$  stammt aus der ersten Gruppe (keine Fibrose). Den Höchstwert von  $1,87$  erreicht wiederum die dritte Gruppe (kompakte Fibrose), siehe Abbildung 3-8. Tabelle 8 zeigt die Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests.

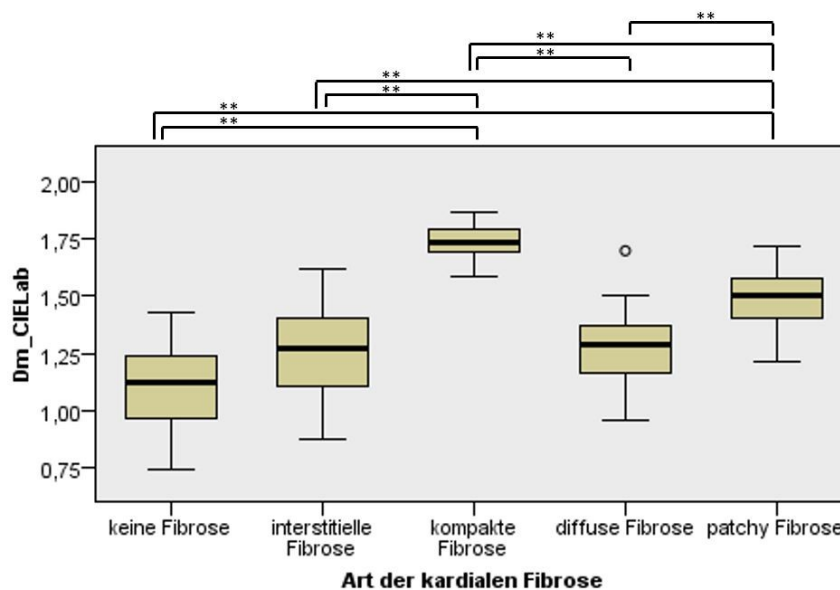


Abbildung 3-8: Boxplot der fraktalen Dimension  $D_m$  (Trichrom, CIELab, Minkowski-Bouligand Methode).

**Tabelle 8: Resultate der paarweisen Vergleiche mittels Kruskal-Wallis Test und r-Werte (Trichrom, CIELab, Minkowski-Bouligand Methode).**

Sample 1-Sample 2	r-Wert	Std.-Fehler	z-Wert	Sig.	Korr. Sig. <sup>a</sup>
keine Fibrose-diffuse Fibrose		11,168	-2,007	,045	,447
keine Fibrose-interstitielle Fibrose		12,295	-1,827	,068	,678
keine Fibrose-patchy Fibrose	0,72	10,810	-5,815	,000	,000
keine Fibrose-kompakte Fibrose	1,18	11,340	-9,014	,000	,000
diffuse Fibrose-interstitielle Fibrose		11,952	,004	,997	1,000
diffuse Fibrose-patchy Fibrose	0,47	10,418	-3,882	,000	,001
diffuse Fibrose-kompakte Fibrose	0,92	10,968	7,277	,000	,000
interstitielle Fibrose-patchy Fibrose	0,45	11,619	-3,477	,001	,005
interstitielle Fibrose-kompakte Fibrose	0,91	12,114	-6,585	,000	,000
patchy Fibrose-kompakte Fibrose	0,45	10,603	3,712	,000	,002
Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind. Asymptotische Signifikanzen (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.					
a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.					

## 3.2 Ergebnisse der Grauwertbilder

Auch die mit IQM generierten Daten der Grauwertbilder wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung getestet. Aufgrund der nicht-normalverteilten Datenlage ( $p < 0,05$ ) wurden die verschiedenen Fibrosearten mit dem Kruskal-Wallis-Test auf signifikante Unterschiede untersucht.

### 3.2.1 Picrosirius Rot – RGBmean

Für diese Färbemethode wurden vier verschiedene fraktale Methoden zur Analyse der fraktalen Dimension verwendet.

#### 3.2.1.1 Higuchi 2D-Methode

Mittels der Higuchi Methode, genauer der *K-fold Differences Method* besteht zwischen der diffusen Fibrose und den anderen Gruppen ein hochsignifikanter Unterschied. Nur bei der Unterscheidung zwischen diffuser und patchy Fibrose besteht ein mittlerer Effekt (r-Wert zwischen 0,3 und 0,5), ansonsten besteht ein starker Effekt der Effektstärke. Den niedrigsten Wert der fraktalen Dimension weist die zweite Gruppe (interstitielle Fibrose) mit 2,59 auf. Der höchste Wert (2,87) stammt aus der ersten Gruppe. Beide sind als Ausreißer in Abbildung 3-9 dargestellt. Die Tabelle 9 zeigt die Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests.

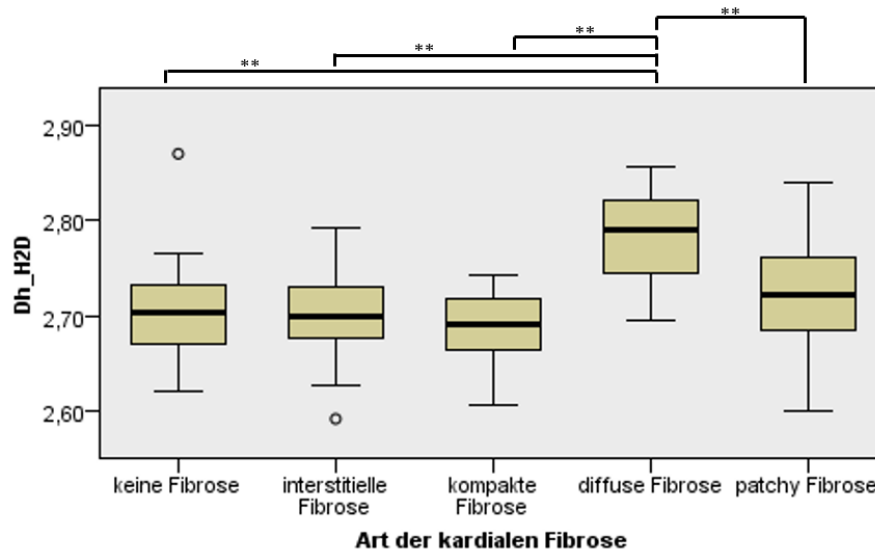


Abbildung 3-9: Boxplot der fraktalen Dimension  $D_h$  (Picrosirius, RGBmean, Higuchi-2D Methode).

**Tabelle 9: Resultate der paarweisen Vergleiche mittels Kruskal-Wallis Test und r-Werte (Picrosirius, RGBmean, Higuchi-2D Methode).**

Sample 1-Sample 2	r-Wert	Std.-Fehler	z-Wert	Sig.	Korr. Sig. <sup>a</sup>
kompakte Fibrose-keine Fibrose		14,197	,770	,441	1,000
kompakte Fibrose-interstitielle Fibrose		15,299	,837	,403	1,000
kompakte Fibrose-patchy Fibrose		14,502	-2,375	,018	,175
kompakte Fibrose-diffuse Fibrose	0,82	16,143	-5,067	,000	,000
keine Fibrose-interstitielle Fibrose		10,961	-,171	,865	1,000
keine Fibrose-patchy Fibrose		9,818	-2,395	,017	,166
keine Fibrose-diffuse Fibrose	0,67	12,111	-5,852	,000	,000
interstitielle Fibrose-patchy Fibrose		11,353	-1,906	,057	,566
interstitielle Fibrose-diffuse Fibrose	0,7	13,386	-5,155	,000	,000
patchy Fibrose-diffuse Fibrose	0,46	12,468	3,798	,000	,001
Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind. Asymptotische Signifikanzen (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.					
a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.					

### 3.2.1.2 Fast Fourier Transformation

Die Daten der Fast-Fourier Transformation weisen zwischen der ersten Gruppe (keine Fibrose) und den Gruppen drei bis fünf als auch zwischen der zweiten Gruppe (diffuse Fibrose) und den Gruppen drei bis fünf einen hochsignifikanten Unterschied auf. Diese Unterschiede weisen eine große Effektstärke auf (r-Wert  $>0,5$ ). Nur zwischen Gruppe eins (keine Fibrose) und drei (kompakte Fibrose) besteht lediglich ein mittlerer Effekt (r-Wert zwischen 0,3 und 0,5). Der minimale Dimensionswert von 2,67 stammt aus der ersten Gruppe. Den Höchstwert von 3,2 erreicht die Gruppe patchy Fibrose (Abbildung 3-10). Die Tabelle 10 zeigt die Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests.

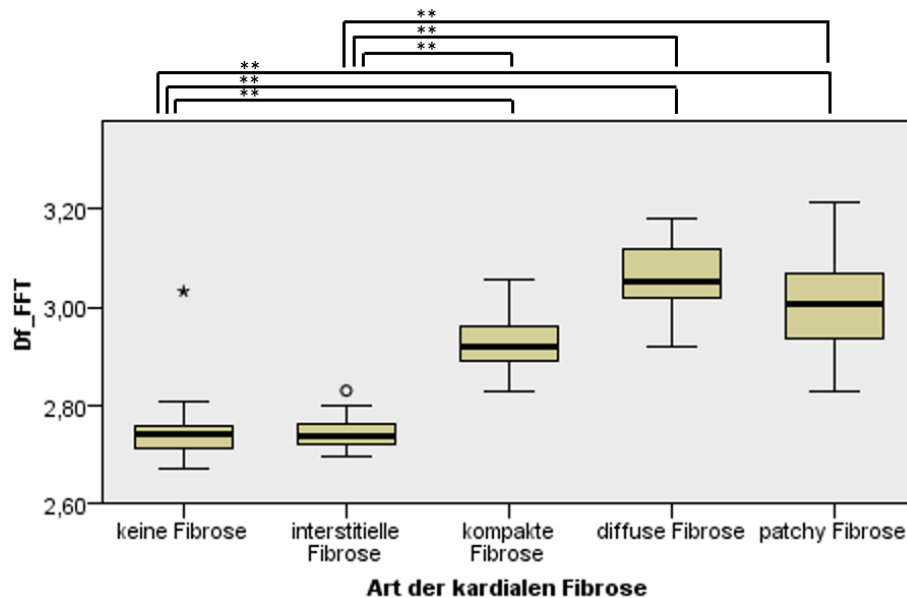


Abbildung 3-10: Boxplot der fraktalen Dimension  $D_f$  (Picosirius, RGBmean, Fast-Fourier Transformation).

**Tabelle 10: Resultate der paarweisen Vergleiche mittels Kruskal-Wallis Test und r-Werte (Picrosirius, RGBmean, Fast-Fourier Transformation).**

Sample 1-Sample 2	r-Wert	Std.-Fehler	z-Wert	Sig.	Korr. Sig. <sup>a</sup>
keine Fibrose-interstitielle Fibrose		10,961	-,065	,948	1,000
keine Fibrose-kompakte Fibrose	0,48	14,197	-4,253	,000	,000
keine Fibrose-patchy Fibrose	0,85	9,818	-8,432	,000	,000
keine Fibrose-diffuse Fibrose	0,92	12,111	-8,113	,000	,000
interstitielle Fibrose-kompakte Fibrose	0,58	15,299	-3,900	,000	,001
interstitielle Fibrose-patchy Fibrose	0,83	11,353	-7,229	,000	,000
interstitielle Fibrose-diffuse Fibrose	0,99	13,386	-7,287	,000	,000
kompakte Fibrose-patchy Fibrose		14,502	-1,545	,122	1,000
kompakte Fibrose-diffuse Fibrose		16,143	-2,346	,019	,190
patchy Fibrose-diffuse Fibrose		12,468	1,241	,215	1,000
Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind. Asymptotische Signifikanzen (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.					
a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.					

### 3.2.1.3 Pyramid-Differences Methode

Durch die PDM generierten fraktalen Dimensionen bestehen hochsignifikante Unterschiede der fraktalen Dimensionen mit einem starken Effekt ( $r$ -Wert  $>0,5$ ) zwischen der ersten und zweiten Gruppe, der ersten und dritten Gruppe, der ersten und vierten Gruppe, der zweiten und fünften Gruppe und der dritten und fünften Gruppe. Außerdem bestehen ein signifikanter Unterschied und mittlerer Effekt ( $r$ -Wert zwischen  $0,3$  und  $0,5$ ) zwischen der dritten und vierten Gruppe als auch der vierten und fünften Gruppe. Beide Grenzwerte (Minimum von  $2,49$  und Maximum von  $3,15$ ) der verwendeten Daten stammen aus der ersten Gruppe (keine Fibrose). Der Höchstwert ist in der Abbildung 3-11 als Ausreißer dargestellt. Die Tabelle 11 zeigt die Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests.

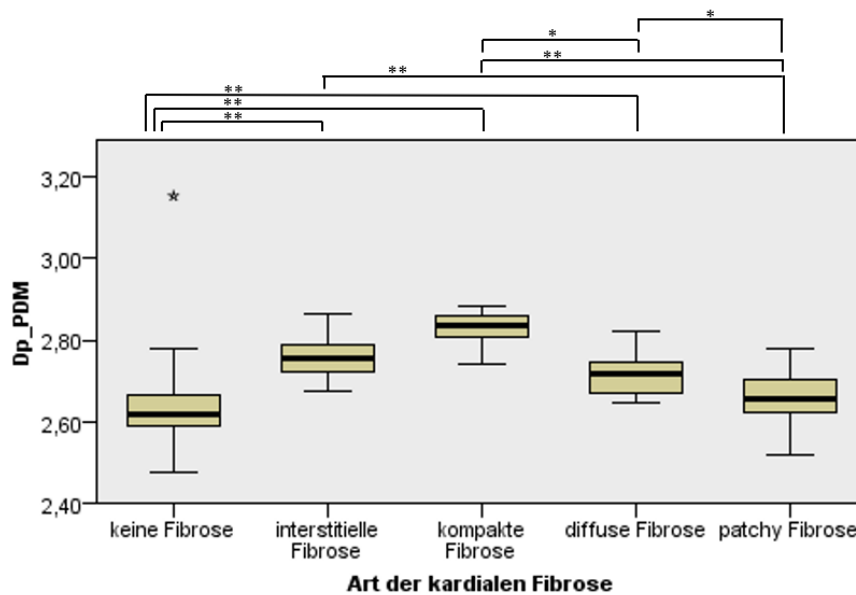


Abbildung 3-11: Boxplot der fraktalen Dimension  $D_p$  (Picrosirius, RGBmean, Pyramid-Differences Methode).

**Tabelle 11: Resultate der paarweisen Vergleiche mittels Kruskal-Wallis Test und r-Werte (Picrosirius, RGBmean, Pyramid-Differences Methode).**

Sample 1-Sample 2	r-Wert	Std.-Fehler	z-Wert	Sig.	Korr. Sig. <sup>a</sup>
keine Fibrose-patchy Fibrose		9,818	-2,371	,018	,178
keine Fibrose-diffuse Fibrose	0,56	12,111	-4,916	,000	,000
keine Fibrose-interstitielle Fibrose	0,81	10,961	-7,436	,000	,000
keine Fibrose-kompakte Fibrose	0,87	14,197	-7,656	,000	,000
patchy Fibrose-diffuse Fibrose	0,35	12,468	2,909	,004	,036
patchy Fibrose-interstitielle Fibrose	0,59	11,353	5,129	,000	,000
patchy Fibrose-kompakte Fibrose	0,76	14,502	5,890	,000	,000
diffuse Fibrose-interstitielle Fibrose		13,386	1,640	,101	1,000
diffuse Fibrose-kompakte Fibrose	0,49	16,143	3,045	,002	,023
interstitielle Fibrose- kompakte Fibrose		15,299	-1,778	,075	,755
Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind. Asymptotische Signifikanzen (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.					
a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.					

### 3.2.1.4 Pyramid-Gradient Methode

Die modifizierten RGBmean-Grauwertbilder wurden auch mit einer weiteren Pyramidenmethode analysiert. Dabei unterscheiden sich die Daten der ersten und dritten Gruppe, der ersten und fünften Gruppe, der zweiten und dritten Gruppe, der dritten und vierten Gruppe sowie der vierten und fünften Gruppe hochsignifikant und weisen eine große Effektstärke auf ( $r$ -Wert  $>0,5$ ). Ebenfalls hochsignifikant aber nur von mittlerer Effektstärke ( $r$ -Wert zwischen  $0,3$  und  $0,5$ ) sind die Unterschiede der ersten und zweiten Gruppe als auch der zweiten und fünften Gruppe. Der niedrigste Wert der fraktalen Dimension stammt aus der Gruppe eins (keine Fibrose) mit einem Wert von  $2,1$ . Der maximale Wert ( $2,9$ ) kommt aus der Gruppe der kompakten Fibrose, siehe Abbildung 3-12. Die Tabelle 12 zeigt die Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests.

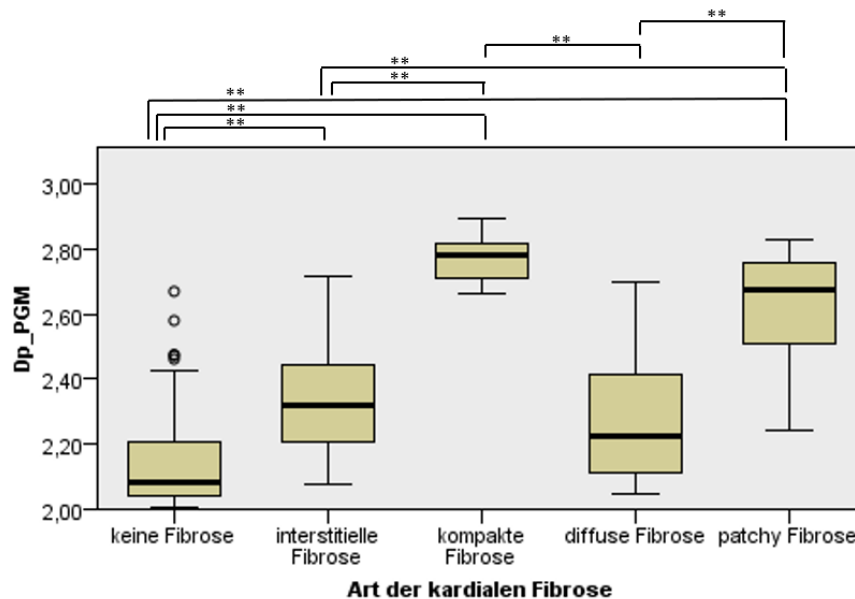


Abbildung 3-12: Boxplot der fraktalen Dimension  $D_p$  (Picosirius, RGBmean, Pyramid-Gradient Methode).

**Tabelle 12: Resultate der paarweisen Vergleiche mittels Kruskal-Wallis Test und r-Werte (Picrosirius, RGBmean, Pyramid-Gradient Methode).**

Sample 1-Sample 2	r-Wert	Std.-Fehler	z-Wert	Sig.	Korr. Sig. <sup>a</sup>
keine Fibrose-diffuse Fibrose		12,111	-2,330	,020	,198
keine Fibrose-interstitielle Fibrose	0,38	10,961	-3,500	,000	,005
keine Fibrose-patchy Fibrose	0,89	9,818	-8,864	,000	,000
keine Fibrose-kompakte Fibrose	0,88	14,197	-7,705	,000	,000
diffuse Fibrose-interstitielle Fibrose		13,386	,758	,449	1,000
diffuse Fibrose-patchy Fibrose	0,57	12,468	-4,717	,000	,000
diffuse Fibrose-kompakte Fibrose	0,82	16,143	5,028	,000	,000
interstitielle Fibrose-patchy Fibrose	0,49	11,353	-4,287	,000	,000
interstitielle Fibrose- kompakte Fibrose	0,68	15,299	-4,643	,000	,000
patchy Fibrose-kompakte Fibrose		14,502	1,542	,123	1,000
Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind. Asymptotische Signifikanzen (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.					
a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.					

### 3.2.2 Trichrom nach Gieson – RGBmean

Auch für diese Färbemethode wurden die gleichen vier fraktale Methoden zur Analyse der fraktalen Dimension verwendet.

#### 3.2.2.1 Higuchi-2D Methode

Auch für diese Färbemethode wurde die Higuchi Methode, genauer als *K-fold-Differences-Method* bezeichnet, für die Generierung der Dimensionsdaten benutzt. Zwischen der kompakten Fibrose und den anderen Fibrosearten besteht ein hochsignifikanter Unterschied. Bis auf die interstitielle Fibrose lässt sich bei der Gruppe eins zu den anderen Gruppen ebenfalls ein hochsignifikanter Unterschied darstellen. Alle genannten Unterschiede weisen eine große Effektstärke auf ( $r > 0,5$ ). Den niedrigsten Wert der fraktalen Dimension weist die dritte Gruppe (kompakte Fibrose) mit 2,56 auf. Der höchste Wert von 2,95 stammt aus der ersten Gruppe (Abbildung 3-13). Die Tabelle 13 zeigt die Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests.

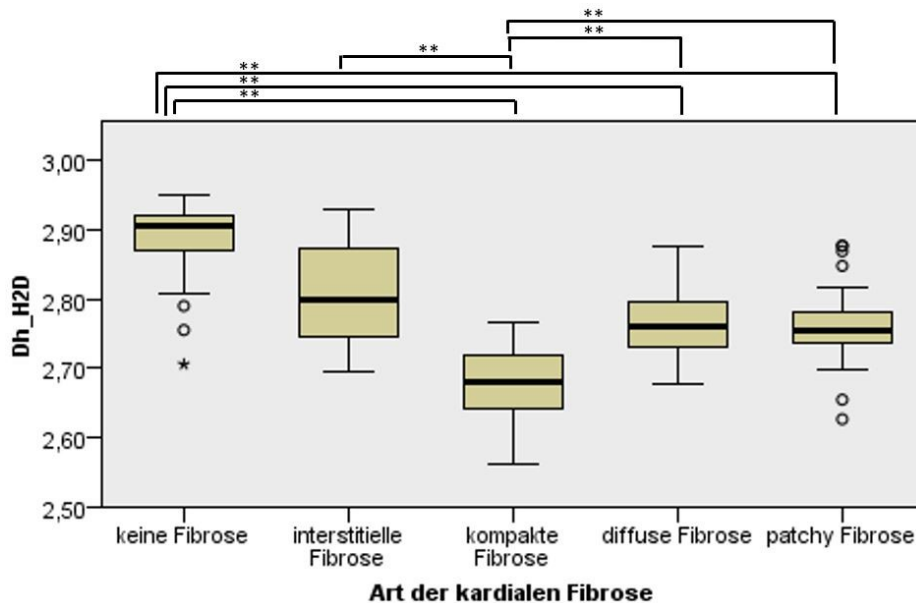


Abbildung 3-13: Boxplot der fraktalen Dimension  $Dh$  (Trichrom, RGBmean, Higuchi-2D Methode).

**Tabelle 13: Resultate der paarweisen Vergleiche mittels Kruskal-Wallis Test und r-Werte (Trichrom, RGBmean, Higuchi-2D Methode).**

Sample 1-Sample 2	r-Wert	Std.-Fehler	z-Wert	Sig.	Korr. Sig. <sup>a</sup>
kompakte Fibrose-patchy Fibrose	0,51	10,603	-4,184	,000	,000
kompakte Fibrose-diffuse Fibrose	0,53	10,968	-4,173	,000	,000
kompakte Fibrose-interstitielle Fibrose	0,75	12,114	5,397	,000	,000
kompakte Fibrose-keine Fibrose	1,15	11,340	8,776	,000	,000
patchy Fibrose-diffuse Fibrose		10,418	,134	,893	1,000
patchy Fibrose-interstitielle Fibrose		11,619	1,809	,070	,704
patchy Fibrose-keine Fibrose	0,63	10,810	5,103	,000	,000
diffuse Fibrose-interstitielle Fibrose		11,952	1,641	,101	1,000
diffuse Fibrose-keine Fibrose	0,62	11,168	4,814	,000	,000
interstitielle Fibrose-keine Fibrose		12,295	2,777	,005	,055
Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind. Asymptotische Signifikanzen (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.					
a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.					

### 3.2.2.2 Fast Fourier Transformation

Zwischen der diffusen Fibrose und allen anderen Gruppen lässt sich bei den generierten Daten der FFT ein hochsignifikanter Unterschied mit einem starken Effekt ( $r > 0,5$ ) erkennen (Abbildung 3-14). Der Minimalwert von 2,58 stammt aus der Gruppe der diffusen Fibrose. Der höchste Wert (2,81) befindet sich in der zweiten Gruppe (interstitielle Fibrose). Die Tabelle 14 zeigt die Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests.

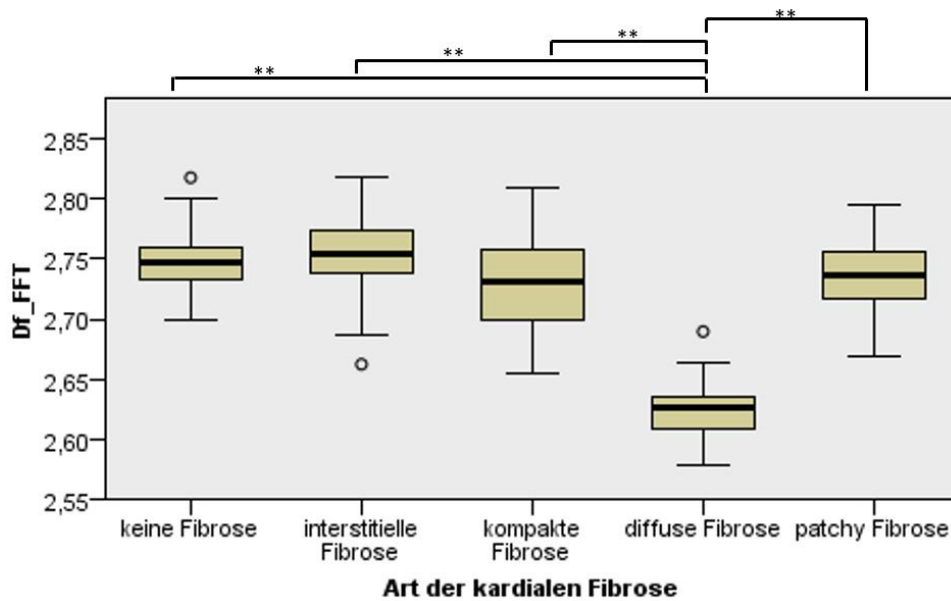


Abbildung 3-14: Boxplot der fraktalen Dimension  $D_f$  (Trichrom, RGBmean, Fast-Fourier Transformation).

**Tabelle 14: Resultate der paarweisen Vergleiche mittels Kruskal-Wallis Test und r-Werte (Trichrom, RGBmean, Fast-Fourier Transformation).**

Sample 1-Sample 2	r-Wert	Std.-Fehler	z-Wert	Sig.	Korr. Sig. <sup>a</sup>
diffuse Fibrose-kompakte Fibrose	0,77	10,968	6,042	,000	,000
diffuse Fibrose-patchy Fibrose	0,79	10,418	-6,629	,000	,000
diffuse Fibrose-keine Fibrose	0,93	11,168	7,175	,000	,000
diffuse Fibrose-interstitielle Fibrose	0,96	11,952	7,090	,000	,000
kompakte Fibrose-patchy Fibrose		10,603	-,264	,792	1,000
kompakte Fibrose-keine Fibrose		11,340	1,223	,221	1,000
kompakte Fibrose-interstitielle Fibrose		12,114	1,526	,127	1,000
patchy Fibrose-keine Fibrose		10,810	1,024	,306	1,000
patchy Fibrose-interstitielle Fibrose		11,619	1,350	,177	1,000
keine Fibrose-interstitielle Fibrose		12,295	-,375	,708	1,000
Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind. Asymptotische Signifikanzen (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.					
a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.					

### 3.2.2.3 Pyramid-Differences Methode

Die generierten Daten der PDM zeigen hochsignifikante Unterschiede der fraktalen Dimensionen mit einem starken Effekt ( $r$ -Wert  $>0,5$ ) zwischen der ersten und dritten Gruppe, der ersten und fünften Gruppe, der zweiten und dritten Gruppe, der zweiten und fünften Gruppe, der dritten und vierten Gruppe sowie der vierten und fünften Gruppe. Außerdem bestehen ein signifikanter Unterschied und mittlerer Effekt ( $r$ -Wert zwischen  $0,3$  und  $0,5$ ) zwischen der ersten (keine Fibrose) und vierten Gruppe (diffuse Fibrose). Der Höchstwert der fraktalen Dimensionen liegt bei  $2,89$  und stammt aus der ersten Gruppe. Der niedrigste Wert von  $2,36$  zeigt sich aus der Gruppe kompakte Fibrose, siehe Abbildung 3-15. Die Tabelle 15 zeigt die Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests.

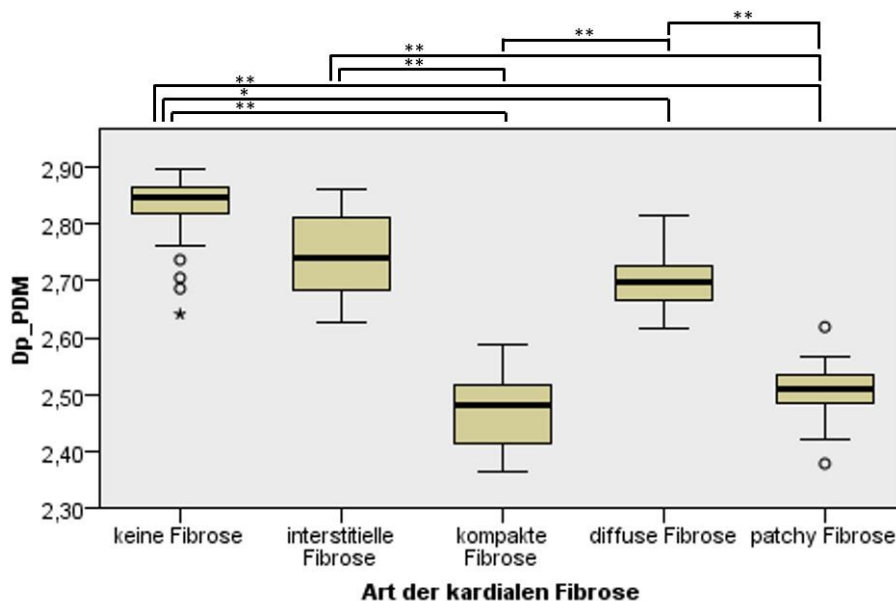


Abbildung 3-15: Boxplot der fraktalen Dimension  $D_p$  (Trichrom, RGBmean, Pyramid-Differences Methode).

**Tabelle 15: Resultate der paarweisen Vergleiche mittels Kruskal-Wallis Test und r-Werte (Trichrom, RGBmean, Pyramid-Differences Methode).**

Sample 1-Sample 2	r-Wert	Std.-Fehler	z-Wert	Sig.	Korr. Sig. <sup>a</sup>
kompakte Fibrose-patchy Fibrose		10,603	-1,078	,281	1,000
kompakte Fibrose-diffuse Fibrose	0,75	10,968	-5,914	,000	,000
kompakte Fibrose-interstitielle Fibrose	0,89	12,114	6,479	,000	,000
kompakte Fibrose-keine Fibrose	1,17	11,340	8,889	,000	,000
patchy Fibrose-diffuse Fibrose	0,62	10,418	5,128	,000	,000
patchy Fibrose-interstitielle Fibrose	0,75	11,619	5,771	,000	,000
patchy Fibrose-keine Fibrose	1,03	10,810	8,267	,000	,000
diffuse Fibrose-interstitielle Fibrose		11,952	1,139	,255	1,000
diffuse Fibrose-keine Fibrose	0,42	11,168	3,218	,001	,013
interstitielle Fibrose-keine Fibrose		12,295	1,815	,069	,695
Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind. Asymptotische Signifikanzen (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.					
a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.					

### 3.2.2.4 Pyramid-Gradient Methode

Bei den mittels der PGM generierten fraktalen Dimensionen bestehen hochsignifikante Unterschiede mit einer großen Effektstärke ( $r$ -Wert  $>0,5$ ) zwischen der ersten und dritten Gruppe, der ersten und vierten Gruppe, der zweiten und dritten Gruppe, der zweiten und vierten Gruppe, der dritten und fünften Gruppe sowie der vierten und fünften Gruppe. Bei dieser Methode stammt der Minimalwert (2,3) aus der Gruppe der diffusen Fibrose. Der höchste Datenpunkt (2,96) stammt aus der ersten Gruppe (Abbildung 3-16). Die Tabelle 16 zeigt die Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests.

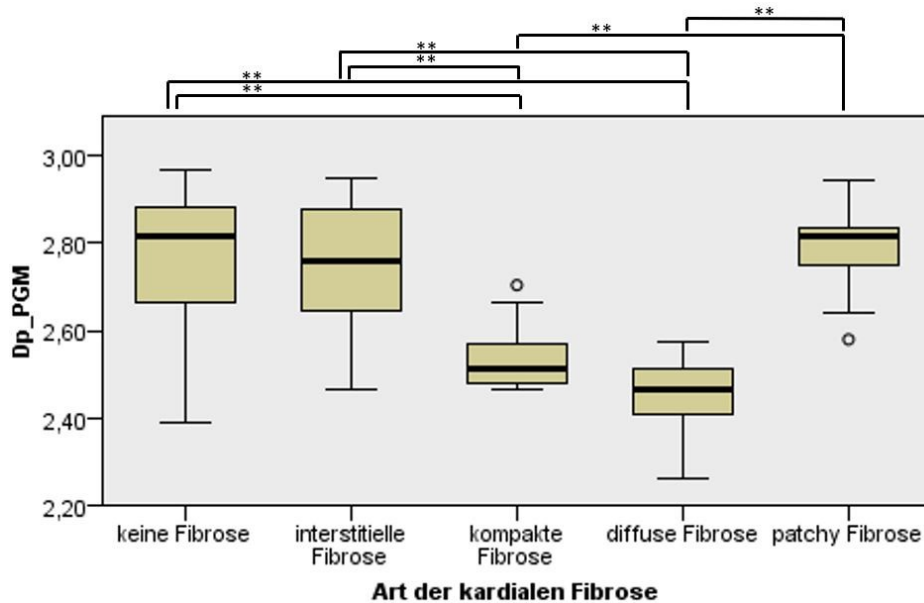


Abbildung 3-16: Boxplot der fraktalen Dimension  $D_p$  (Trichrom, RGBmean, Pyramid-Gradient Methode).

**Tabelle 16: Resultate der paarweisen Vergleiche mittels Kruskal-Wallis Test und r-Werte (Trichrom, RGBmean, Pyramid-Gradient Methode).**

Sample 1-Sample 2	r-Wert	Std.-Fehler	z-Wert	Sig.	Korr. Sig. <sup>a</sup>
diffuse Fibrose-kompakte Fibrose		10,968	1,856	,063	,634
diffuse Fibrose-interstitielle Fibrose	0,84	11,952	6,143	,000	,000
diffuse Fibrose-keine Fibrose	0,89	11,168	6,899	,000	,000
diffuse Fibrose-patchy Fibrose	0,94	10,418	-7,822	,000	,000
kompakte Fibrose-interstitielle Fibrose	0,61	12,114	4,381	,000	,000
kompakte Fibrose-keine Fibrose	0,66	11,340	4,999	,000	,000
kompakte Fibrose-patchy Fibrose	0,7	10,603	-5,766	,000	,000
interstitielle Fibrose-keine Fibrose		12,295	,294	,768	1,000
interstitielle Fibrose-patchy Fibrose		11,619	-,694	,488	1,000
keine Fibrose-patchy Fibrose		10,810	-,411	,681	1,000
Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind. Asymptotische Signifikanzen (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.					
a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.					

## 4 Diskussion

### 4.1 Erwartungen

Vor allem für neoplastische Veränderungen beziehungsweise deren Präkanzerosen wurde der Parameter fraktale Dimension bereits in mehreren Arbeiten untersucht. So zeigten sich signifikante Unterschiede bei analen intraepithelialen Neoplasien (Kröpfl, 2007), bei zervikalen intraepithelialen Neoplasien (Fabrizii, 2013) als auch bei Neuroglioma (Etschmaier, 2014) durch fraktale Methoden wie der FFT, Box-Counting Methode und der Minkowski-Bouligand Methode. Ebenfalls zeigten die, für die Dissertation *Pyramid Dimension of Histological Images of the Heart*, neu entwickelten Pyramidendimensionen (PDM, PGM, PTPM) signifikante Unterschiede zwischen den Typen der kardialen Fibrose (Mayrhofer-Reinhartshuber, 2015). Weiters sind in der Literatur mehrere Themen zur Analyse mittels fraktaler Methoden für die Gefäßarchitektur zu finden (Di Ieva et al., 2011). Aufgrund dieser ähnlichen Arbeiten ist es von Bedeutung die kardiale Fibrose mittels verschiedener Färbemethoden, Bildbearbeitungs- und Bildverarbeitungstechniken auf signifikante Unterschiede in dieser Arbeit zu prüfen. Im Vergleich zu der oben erwähnten Dissertation, erfolgte die Selektion der Bilder für diese Arbeit weitaus unkritischer und soll somit den Selektionsbias minimieren. Außerdem wurden alle Bildbearbeitungen und -verarbeitungen mit nur einem Programm (IQM) durchgeführt.

### 4.2 Bewertung der Ergebnisse der binären Bilder

In den folgenden Kapiteln werden die Box-Counting Methode und die Minkowski-Bouligand Methode auf ihre Ergebnisse der berechneten fraktalen Dimension von binären Bildern besprochen.

#### 4.2.1 Box-Counting Methode

Für die Analyse von binären Bildern scheint die Box-Counting Methode die Effektivere zu sein. Die fraktalen Dimensionen sind bei der kompakten Fibrose am

höchsten und grenzen an den erwarteten, theoretischen Höchstwert von zwei. Zudem zeigt sich bei dieser Gruppe vor allem in der Picrosirius Rot Färbung eine sehr geringe Spannweite in den Boxplot-Diagrammen, siehe Abbildung 3-1 und Abbildung 3-2). Bei der Trichrom-Färbung besteht zwischen jeder Art der Fibrose und der kompakten Fibrose ein signifikanter Unterschied (Abbildung 3-5 und Abbildung 3-6). Bei optischer Betrachtung lässt sich dieses Ergebnis sehr gut reproduzieren. Auch die patchy Fibrose zeigt sehr hohe Werte der fraktalen Dimension und lässt sich ebenfalls gut von den anderen Arten der Fibrose differenzieren. Erklärbar wäre dies durch die morphologisch erkennbare, unregelmäßige Struktur des Bindegewebes. Zur Unterscheidung von kompakter Fibrose und patchy Fibrose erweist sich ebenfalls die Trichrom-Färbung als geeignetere Färbemethode, siehe Abbildung 3-5 und Abbildung 3-6. Besonders die digitalisierten Bilder mittels RGBrel-Algorithmus zeigen signifikante Unterschiede dieser beiden Fibrosearten, siehe Abbildung 3-5. Diese Unterscheidung ist aufgrund der deutlich unterschiedlichen Vulnerabilität für arrhythmogene Ereignisse dieser beiden Fibrosearten als sehr wichtig zu betrachten. Die diffuse Fibrose ist morphologisch schwierig von einer möglichen interstitiellen oder einer patchy Fibrose zu unterscheiden. Dies spiegelt sich auch in den generierten fraktalen Daten wider. Der Median der fraktalen Dimension liegt bei der diffusen Fibrose zwischen den beiden genannten Fibrosearten, wobei hier kein signifikanter Unterschied zur interstitiellen Fibrose besteht, siehe Kapitel 3.1. Auch zwischen gesundem Myokard und der interstitiellen Fibrose lässt sich kein statistisch signifikanter Unterschied feststellen. Die niedrigsten fraktalen Dimensionen stammen in allen generierten Datensätzen von Kapitel 3.1 aus der Gruppe des vitalen Myokards ohne Fibrose. Aufgrund der ungleichmäßigen Färbungsintensität der Kollagenstrukturen, lässt sich bei der interstitiellen Fibrose und dem gesunden Gewebe die große Spannweite der fraktalen Dimension erklären. Dies ist vor allem in der Abbildung 3-1 für die Gruppe keine Fibrose deutlich zu erkennen.

#### **4.2.2 Minkowski-Bouligand Methode**

Die Ergebnisse dieser Methode zeigen annähernd gleiche Resultate wie die im Kapitel 4.2.1 bereits beschriebene Box-Counting Methode. Die kompakte Fibrose

zeichnet sich wieder durch einen sehr geringen Interquartilabstand und hohen Werten der fraktalen Dimension aus (Kapitel 3.1.1.2 und Kapitel 3.1.2.2). Auch die patchy Fibrose unterscheidet sich, vor allem in der Trichrom-Färbung von den anderen Fibrosetypen signifikant, siehe Abbildung 3-7 und Abbildung 3-8. Im Vergleich zur Box-Counting Methode entstehen durch diese Methode auch kleinere fraktale Dimensionswerte. Vor allem bei der interstitiellen Fibrose und dem gesunden Myokard ohne Fibrose sind viele Werte unter dem theoretisch niedrigsten Wert von eins. Der kleinste Wert beträgt nur 0,48 und stammt aus der Gruppe keine Fibrose, siehe Abbildung 3-3. Der signifikante Unterschied zwischen den Gruppen wird jedoch nicht beeinflusst. Somit ist auch die Minkowski-Bouligand Methode gut für die Unterscheidung der kardialen Fibrosetypen geeignet.

Beide verwendeten Methoden zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen der diffusen und interstitiellen Fibrose als auch der interstitiellen und diffusen Fibrose (Kapitel 3.1). Auch bei genauer optischer Betrachtung ist die Unterscheidung dieser Gruppen meist sehr schwierig.

Allgemein soll hier noch erwähnt werden, dass bei der Generierung der binären Daten die Bildbearbeitung eine überaus wichtige Rolle einnimmt. Bei jedem Datensatz müssen unterschiedliche Schwellenwerte für die Binärisierung gesetzt werden, sodass nur die Strukturen der Fibrose weiß dargestellt werden. Gründe dafür sind zum Beispiel eine unterschiedlich starke Anfärbung der Gewebsschnitte, oder das eventuelle Auftreten von Färbeartefakten.

### ***4.3 Bewertung der Ergebnisse der Grauwertbilder***

In den folgenden Kapiteln werden die vier verschiedenen fraktalen Methoden auf ihre Ergebnisse der berechneten fraktalen Dimensionen von den modifizierten RGBmean-Bildern besprochen.

#### **4.3.1 Higuchi Methode**

Die Higuchi-2D Methode zeigt deutliche Unterschiede zwischen den verwendeten Färbemethoden. Zwischen der kompakten Fibrose und allen anderen Typen, der

mittels Trichrom gefärbten Schnitte, ist ein signifikanter Unterschied vorhanden (Abbildung 3-13). Das reziproke Verhalten der fraktalen Dimensionen der kompakten Fibrose im Vergleich zu den im Kapitel 4.2 beschriebenen Ergebnissen, lässt sich durch die Modifizierung der Grauwertbilder mit dem RGBrel-Algorithmus erklären. Bei der Trichromfärbung zeigen die Projektionen der Farbkanäle Ähnlichkeiten untereinander. Durch die Erzeugung der Grauwertbilder (RGBmean) kommt es dadurch zu einem Summationseffekt, welcher wiederum die Rauigkeit des Bildes beeinflusst. Bei den Picrosirius-gefärbten Geweben lässt sich nur die diffuse Fibrose von den anderen Typen unterscheiden, siehe Abbildung 3-9. Eine Erklärung für diese Ergebnisse ist optisch nicht nachvollziehbar. Aufgrund der Funktionsweise dieser Methode entstehen durch die Projektion der Grauwertbilder neue Signale. Diese beinhalten jedoch nicht den spezifischen Informationsgehalt der ursprünglich vorhandenen Bilder.

#### **4.3.2 Fast Fourier Transformation**

Die fraktalen Dimensionen der FFT liegen nur mittels erweiterter Bildbearbeitung (Opening Operator - Abbildung 2-4) im erwarteten Bereich ( $2 \leq D_f \leq 3$ ). Außerdem sind sinnvolle Daten nur mittels der Modifikation des linearen Regressionsbereiches zu akquirieren, siehe Kapitel 2.4.4. Trotzdem weisen viele Dimensionsdaten der patchy, diffusen und interstitiellen Fibrose Werte über drei auf. Das nichtfibröse Myokard und die interstitielle Fibrose weisen durch ihre homogenere Struktur eine erhöhte Anzahl an tieferen Frequenzen auf. Somit lassen sich bei den Picrosiriusbildern das nichtfibröse Myokard und die interstitielle Fibrose von den anderen Fibrosetypen unterscheiden, siehe Abbildung 3-10. Die Dimensionsdaten der Trichrom-gefärbten Bilder verhalten sich, wie im Kapitel 4.3.1 bereits beschrieben, reziprok. Hier besteht ein signifikanter Unterschied zwischen der diffusen Fibrose und den anderen Arten der kardialen Fibrose (Abbildung 3-14). Die ähnliche Verteilung der anderen Fibrosetypen lässt sich optisch nicht verifizieren.

### **4.3.3 Pyramidenmethoden**

Obwohl auch die anderen fraktalen Methoden (FFT und H2D) sehr gute Ergebnisse produzieren, zeigen die Pyramidenmethoden ein noch qualitativ höherwertigeres Verhalten für die Analyse von Grauwertbildern. Vor allem bei größeren Bildern ( $\geq 1024 \times 1024$  Pixel) sind beide Pyramidenmethoden mit einer bilinearen Interpolation den anderen Methoden überlegen. Bei den mittels Trichrom-gefärbten Bildern, ist unter Einbeziehung beider Methoden (PDM und PGM) nur die Unterscheidung zwischen interstitieller Fibrose und keiner Fibrose nicht möglich (Abbildung 3-15 und Abbildung 3-16). Bei den Picrosiriusbildern findet sich unter Einbeziehung beider Pyramidenmethoden auch nur zwischen zwei Gruppen (interstitieller und diffuser Fibrose) kein signifikanter Unterschied der fraktalen Dimension (Abbildung 3-11 und Abbildung 3-12). Vergleicht man die Ergebnisse der PDM beider Färbemethoden, so zeigt sich hier ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen diffuser und interstitieller Fibrose (Abbildung 3-11 und Abbildung 3-15). Bei der PGM sind unter Berücksichtigung beider Färbemethoden alle Gruppen signifikant voneinander zu unterscheiden (Abbildung 3-12 und Abbildung 3-16). Wichtig im Vergleich zur PDM, ist hierbei die mögliche Differenzierung zwischen diffuser und interstitieller Fibrose, siehe Abbildung 3-16.

### **4.4 Ähnlichkeiten und Unterschiede der verwendeten Methoden**

Aufgrund der individuellen Bildbearbeitung für binäre fraktale Methoden sind diese in geringerem Maße für eine weitere Anwendung zur Differenzierung kardialer Fibrosen geeignet. Auch die Bildbearbeitung für Grauwertbilder kann sehr komplex sein, diese ist aber weitaus weniger sensibel als für die Generierung binärer Bilder. Die meisten fraktalen Methoden weisen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen kompakter und patchy Fibrose, diffuser und interstitieller Fibrose sowie keiner Fibrose und interstitielle Fibrose auf. Am besten eignen sich die Pyramidenmethoden für die Differenzierung der einzelnen Fibrosotypen in beiden Färbemethoden.

#### **4.5 Vor- und Nachteile der verwendeten Methoden**

Wie bereits in den vorherigen Kapiteln gezeigt, besitzen die verschiedenen fraktalen Methoden eine unterschiedliche Effektivität für die Unterscheidung der Fibrosearten. Ein weiterer wichtiger Parameter, für die Praktikabilität einer Methode ist die benötigte Rechenzeit, welche sich je nach Methode erheblich unterscheidet und natürlich auch von der Hardware der Benutzerin/des Benutzers abhängig ist. Die PDM erweist sich als schnellste Methode in dieser Arbeit (Tabelle 17). Die Bildbearbeitung nimmt auch eine Anspruchsvolle Rolle bei der fraktalen Analyse ein. Diese kann je nach Art der fraktalen Methodik sehr anspruchsvoll sein und mit einem mehr oder weniger großen Informationsverlust einhergehen. In Bezug auf die mögliche klinische Anwendbarkeit müssen für bestimmte Fragestellungen genormte oder automatisierte Bildbearbeitungstechniken verwendet werden.

**Tabelle 17: Mittlere benötigte Rechenzeit der verwendeten fraktalen Methoden für Bilder mit einer Auflösung von 2048 x 2048 Pixel.** (Hardware-Spezifikation: Vierkernprozessor, 2,6 GHz, 8 GB DDR3 RAM)

	<b>Benötigte Rechenzeit pro Bild (arithmetisches Mittel)</b>
Box-Counting Methode	11 sec
Minkowski-Bouligand Methode	52 sec
Higuchi-2D Methode	38 sec
Fast-Fourier Transformation	13 sec
Pyramid-Differences Methode	0,7 sec
Pyramid-Gradient Methode	1,4 sec

## 5 Konklusion

Die Anwendung der fraktalen Analysemethoden auf binäre Bilder weisen zwischen fast allen Fibrosearten eine Unterscheidung auf. Nur zwischen Myokard ohne Strukturen einer Fibrose und der interstitiellen Fibrose, als auch zwischen der diffusen und interstitiellen Fibrose sind keine signifikanten Unterschiede vorhanden. Alle signifikanten und hochsignifikanten Unterschiede haben mindestens einen mittleren Effekt in Bezug auf die Effektstärke. Zusätzlichen Einfluss auf die Resultate zeigen die verschiedenen Färbemethoden. So kommen die signifikanten Unterschiede zwischen der kompakten und patchy Fibrose nur mittels der Gieson's Trichrom Färbung zustande. Diese Unterscheidung ist sehr wichtig, da hier die größte Diskrepanz für die Vulnerabilität einer Herzrhythmusstörung aufzutreten scheint. Zusätzlich weist die Box-Counting Methode für diese Färbemethode bei den RGBrel-Bildern als einzige bei der Effektstärke einen starken Effekt auf. Für die bessere Unterscheidung zwischen der interstitiellen und patchy Fibrose eignet sich die Picrosirius-Rot Färbung. Ebenfalls zeigt sich im Gegensatz zur Trichromfärbung bei der Picrosirius-Rot Färbung ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen der diffusen und keiner Fibrose für beide Bildbearbeitungsmethoden. Für die verschiedenen fraktalen Analysemethoden der Grauwertbilder mittels RGBmean kann ein signifikanter Unterschied aller Fibrosearten dargestellt werden. Die meisten Unterschiede gehen mit einer großen Effektstärke einher. Nur wenige Differenzierungen weisen einen mittleren Effekt auf. Bei genauerer Betrachtung der Daten lässt sich sagen, dass die Pyramidenmethoden am besten für die Differenzierung der Fibrosearten geeignet sind. Zudem ist sowohl die PDM als auch die PGM sehr praktikabel und leichter anzuwenden als die FFT oder die Higuchi 2D Methode.

Um die Resultate weiter zu verbessern stehen mehrere Optionen zur Verfügung:

- Die genauere Selektion der histologischen Schnitte für die Digitalisierung der Bilder könnte zu besseren Ergebnissen führen.
- Im humanen Myokard kommen alle vier Arten der Fibrose, je nach Pathomechanismus in unterschiedlicher Ausprägung vor. Um eine höhere Vortestwahrscheinlichkeit zu erhalten, könnten zukünftige Studien die

morphologisch unterschiedlichen Strukturen der kardialen Fibrose auf deren Ätiologie hin untersuchen.

- Weiters wäre es aufgrund von Färbeartefakten wahrscheinlich sinnvoll, auch andere Färbemethoden anzuwenden.
- Zusätzlich könnte die Verwendung von immunhistochemischen Färbungen die Resultate wahrscheinlich positiv beeinflussen.
- Um die Ergebnisqualität weiter zu verbessern, wäre es auch sinnvoll zusätzliche fraktale Methoden für binäre Bilder zu verwenden.
- Die Erstellung der binären Bilder, also die Bildbearbeitung und Schwellenwertkalkulierung, sollte in Zukunft für bestimmte Färbungen genormt und damit besser vergleichbar gemacht werden.

Es gibt schon mehrere Arbeiten, welche sich für die Unterscheidung von anderen Entitäten mathematischer, fraktaler und somit objektiver Methoden bedienen. Verschiedene Neoplasien sind zurzeit am häufigsten auf deren fraktalen Dimension untersucht. Aber auch eine Ausweitung auf andere Entitäten, wie in dieser Arbeit gezeigt, ist gut möglich und eine sinnvolle Ergänzung. In der Zukunft könnte die Berechnung der fraktalen Dimension von digitalisierten Gewebsschnitten eine zusätzliche, objektive Entscheidungshilfe darstellen. Die Software für die Berechnung ist bereits in vielen Instituten vorhanden oder kann auch als Freeware kostenlos benutzt werden. Aufgrund des technischen Fortschritts des 21. Jahrhundert gibt es für die Verwendung dieser Programme und Tools keine speziellen Anforderungen an die Hardware und kann somit auf den meisten Computern ausgeführt werden. Für die Bildbearbeitung und Verarbeitung wird jedoch eigens geschultes Personal benötigt, da diese sehr komplex und zeitaufwändig sein können. Hierfür könnten automatische Analyseverfahren mittels eines neuronalen Netzwerks CNN (*convolutional neuronal network*) eine Bereicherung darstellen (Fu et al., 2018).

## 6 Literaturverzeichnis

- Ahammer, H. 2011, "Higuchi dimension of digital images", *PLoS One*, vol. 6, no. 9, pp. 1-8.
- Ahammer, H., Sabathiel, N. & Reiss, M.A. 2015, "Is a two-dimensional generalization of the Higuchi algorithm really necessary?", *Chaos (Woodbury, N.Y.)*, vol. 25, no. 7, pp. 1-8.
- Almaas, V.M., Haugaa, K.H., Strom, E.H., Scott, H., Dahl, C.P., Leren, T.P., Geiran, O.R., Endresen, K., Edvardsen, T., Aakhus, S. & Amlie, J.P. 2013, "Increased amount of interstitial fibrosis predicts ventricular arrhythmias, and is associated with reduced myocardial septal function in patients with obstructive hypertrophic cardiomyopathy", *Europace*, vol. 15, no. 9, pp. 1319-1327.
- Anderhuber, F., Pera, F. & Streicher, J. 2012, "Innere Organe in Thorax, Abdomen und Becken" in *Waldeyer Anatomie des Menschen*, 19th edn, De Gruyter, Berlin, pp. 478-481.
- Bashey, R.I., Martinez-Hernandez, A. & Jimenez, S.A. 1992, "Isolation, characterization, and localization of cardiac collagen type VI. Associations with other extracellular matrix components", *Circulation research*, vol. 70, no. 5, pp. 1006-1017.
- Baum, J. & Duffy, H.S. 2011, "Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about?", *Journal of cardiovascular pharmacology*, vol. 57, no. 4, pp. 376-379.
- Churilla, A.M., Gottschalke, W.A., Liebovitch, L.S., Selector, L.Y., Todorov, A.T. & Yeandle, S. 1996, "Membrane potential fluctuations of human T-lymphocytes have fractal characteristics of fractional Brownian motion", *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 24, no. 1, pp. 99-108.
- Clarke, K.C. 1986, "Computation of the fractal dimension of topographic surfaces using the triangular prism surface area method", *Computers & Geoscience*, vol. 12, no. 5, pp. 713-722.
- Cohen, J. 1992, "A power primer", *Psychological bulletin*, vol. 112, no. 1, pp. 155-159.
- de Bakker, J.M. & van Rijen, H.M. 2006, "Continuous and discontinuous propagation in heart muscle", *Journal of cardiovascular electrophysiology*, vol. 17, no. 5, pp. 567-573.
- de Bakker, J.M. & Wittkampf, F.H. 2010, "The pathophysiologic basis of fractionated and complex electrograms and the impact of recording techniques on their detection and interpretation", *Circulation. Arrhythmia and electrophysiology*, vol. 3, no. 2, pp. 204-213.

- de Jong, S., van Veen, T.A., de Bakker, J.M. & van Rijen, H.V. 2012, "Monitoring cardiac fibrosis: a technical challenge", *Netherlands heart journal : monthly journal of the Netherlands Society of Cardiology and the Netherlands Heart Foundation*, vol. 20, no. 1, pp. 44-48.
- de Jong, S., van Veen, T.A., de Bakker, J.M., Vos, M.A. & van Rijen, H.V. 2011, "Biomarkers of myocardial fibrosis", *Journal of cardiovascular pharmacology*, vol. 57, no. 5, pp. 522-535.
- de Jong, S., van Veen, T.A., van Rijen, H.V. & de Bakker, J.M. 2011, "Fibrosis and cardiac arrhythmias", *Journal of cardiovascular pharmacology*, vol. 57, no. 6, pp. 630-638.
- de Jong, S., Zwanenburg, J.J., Visser, F., der Nagel, R., van Rijen, H.V., Vos, M.A., de Bakker, J.M. & Lijntjens, P.R. 2011, "Direct detection of myocardial fibrosis by MRI", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 51, no. 6, pp. 974-979.
- Di Ieva, A., Grizzi, F., Sherif, C., Matula, C. & Tschabitscher, M. 2011, "Angioarchitectural heterogeneity in human glioblastoma multiforme: a fractal-based histopathological assessment", *Microvascular research*, vol. 81, no. 2, pp. 222-230.
- Ersboll, M., Valeur, N., Mogensen, U.M., Andersen, M.J., Moller, J.E., Velazquez, E.J., Hassager, C., Sogaard, P. & Kober, L. 2013, "Prediction of all-cause mortality and heart failure admissions from global left ventricular longitudinal strain in patients with acute myocardial infarction and preserved left ventricular ejection fraction", *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 61, no. 23, pp. 2365-2373.
- Etschmaier, M. 2014, *Fraktalanalyse von Neuroglioma*, Medizinische Universität Graz; [Diplomarbeit].
- Eyden, B. 2008, "The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine", *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 12, no. 1, pp. 22-37.
- Fabrizii, M. 2013, *Fraktalanalyse zervikaler intraepithelialer Neoplasien.*, Medizinische Universität Graz; [Diplomarbeit].
- Flett, A.S., Hasleton, J., Cook, C., Hausenloy, D., Quarta, G., Ariti, C., Muthurangu, V. & Moon, J.C. 2011, "Evaluation of techniques for the quantification of myocardial scar of differing etiology using cardiac magnetic resonance", *JACC. Cardiovascular imaging*, vol. 4, no. 2, pp. 150-156.
- Fu, X., Liu, T., Xiong, Z., Smail, B.H., Stiles, M.K. & Zhao, J. 2018, "Segmentation of histological images and fibrosis identification with a convolutional neural network", *Computers in biology and medicine*, vol. 98, pp. 147-158.

- Higuchi, T. 1988, "Approach to an irregular time series on the basis of the fractal theory", *Physica D: Nonlinear Phenomena*, vol. 31, no. 2, pp. 277-283.
- Horn, F. 2012, "Molekularbiologie" in *Biochemie des Menschen*, 5th edn, Thieme, Würzburg, pp. 584-592.
- Junqueira, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O. & Gratzl, M. 2005, *Histologie*, 7th edn, Springer.
- Kröpfl, J.M. 2007, *Fractal dimension and data mining related to image processing in medical research*, Karl-Franzens-Universität Graz; [Diplomarbeit].
- Landini, G. 2011, "Fractals in microscopy", *Journal of microscopy*, vol. 241, no. 1, pp. 1-8.
- Liebovitch, L.S. 1998, *Fractals and Chaos Simplified for the Life Sciences*, Oxford University Press, U.S.A., New York.
- Liebovitch, L.S., Scheurle, D., Rusek, M. & Zochowski, M. 2001, "Fractal methods to analyze ion channel kinetics", *Methods (San Diego, Calif.)*, vol. 24, no. 4, pp. 359-375.
- Manasek, F.J. 1976, "Macromolecules of the extracellular compartment of embryonic and mature hearts", *Circulation research*, vol. 38, no. 5, pp. 331-337.
- Mandelbrot, B. 1967, "How long is the coast of Britain? Statistical self-similarity and fractional dimension", *New York Science Journal*, vol. 156, no. 3775, pp. 636-638.
- Mayrhofer-Reinhartshuber, M. 2015, *Pyramid Dimension of Histological Images of the Heart*, Medical University of Graz, Institute of Biophysics; [Dissertation].
- Moon, J.C., Reed, E., Sheppard, M.N., Elkington, A.G., Ho, S.Y., Burke, M., Petrou, M. & Pennell, D.J. 2004, "The histologic basis of late gadolinium enhancement cardiovascular magnetic resonance in hypertrophic cardiomyopathy", *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 43, no. 12, pp. 2260-2264.
- Pauschinger, M., Knopf, D., Petschauer, S., Doerner, A., Poller, W., Schwimmbeck, P.L., Kuhl, U. & Schultheiss, H.P. 1999, "Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio", *Circulation*, vol. 99, no. 21, pp. 2750-2756.
- Pop, M., Ghugre, N.R., Ramanan, V., Morikawa, L., Stanisz, G., Dick, A.J. & Wright, G.A. 2013, "Quantification of fibrosis in infarcted swine hearts by ex vivo late gadolinium-enhancement and diffusion-weighted MRI methods", *Physics in Medicine and Biology*, vol. 58, no. 15, pp. 5009-5028.

- Querejeta, R., Lopez, B., Gonzalez, A., Sanchez, E., Larman, M., Martinez Ubago, J.L. & Diez, J. 2004, "Increased collagen type I synthesis in patients with heart failure of hypertensive origin: relation to myocardial fibrosis", *Circulation*, vol. 110, no. 10, pp. 1263-1268.
- Robb, J.S. & Robb, R.C. 1942, "The normal heart: Anatomy and physiology of the structural units.", *American Heart Journal*, vol. 23, no. 4, pp. 455-467.
- Sandercock, G. & Brodie, D. 2006, "The use of heart rate variability measures to assess autonomic control during exercise", *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, vol. 16, no. 5, pp. 302-313.
- Scheilde, W. 2020, *CIELab.de - Der Farbraum CIELab*. Available: <http://www.cielab.de/> [2020, January 9].
- Smith, S.W. 1997, *The Scientist and Engineer's Guide to Digital Signal Processing*. Available: <http://www.dspguide.com/ch8/1.htm/> [2020, June 1].
- Souders, C.A., Bowers, S.L. & Baudino, T.A. 2009, "Cardiac fibroblast: the renaissance cell", *Circulation research*, vol. 105, no. 12, pp. 1164-1176.
- Stanton, T., Leano, R. & Marwick, T.H. 2009, "Prediction of all-cause mortality from global longitudinal speckle strain: comparison with ejection fraction and wall motion scoring", *Circulation Cardiovascular imaging*, vol. 2, no. 5, pp. 356-364.
- van Rijen, H.V., Eckardt, D., Degen, J., Theis, M., Ott, T., Willecke, K., Jongsma, H.J., Opthof, T. & de Bakker, J.M. 2004, "Slow conduction and enhanced anisotropy increase the propensity for ventricular tachyarrhythmias in adult mice with induced deletion of connexin43", *Circulation*, vol. 109, no. 8, pp. 1048-1055.
- Weber, K.T. 1989, "Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network", *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 13, no. 7, pp. 1637-1652.
- Werner, D.H. & Ganguly, S. 2003, "An overview of fractal antenna engineering research", *IEEE Antennas and Propagation Magazine*, vol. 45, no. 1, pp. 38-57.
- White, S.K., Sado, D.M., Flett, A.S. & Moon, J.C. 2012, "Characterising the myocardial interstitial space: the clinical relevance of non-invasive imaging", *Heart (British Cardiac Society)*, vol. 98, no. 10, pp. 773-779.
- Zach, B. 2016, *Morphometrische Texturanalyse des Herzens und der Herzmuskelfasern*, Medizinische Universität Graz, Institut für Biophysik; [Dissertation].

Zouein, F.A., Kurdi, M., Booz, G.W. & Fuseler, J.W. 2014, "Applying fractal dimension and image analysis to quantify fibrotic collagen deposition and organization in the normal and hypertensive heart.", *Microscopy and Microanalysis*, vol. 20, no. 4, pp. 1134-1144.

# Anhang

## Inhaltsverzeichnis

Statistische Detailergebnisse: Trichrom nach Gieson, RGBrel, Box-Counting Methode .....	1
Statistische Detailergebnisse: Trichrom nach Gieson, RGBrel, Minkowski-Bouligand Methode .....	2
Statistische Detailergebnisse: Trichrom nach Gieson, CIELab, Box-Counting Methode .....	3
Statistische Detailergebnisse: Trichrom nach Gieson, CIELab, Minkowski-Bouligand Methode .....	4
Statistische Detailergebnisse: Picrosirius Rot, RGBrel, Box-Counting Methode ....	5
Statistische Detailergebnisse: Picrosirius Rot, RGBrel, Minkowski-Bouligand Methode .....	6
Statistische Detailergebnisse: Picrosirius Rot, CIELab, Box-Counting Methode ....	7
Statistische Detailergebnisse: Picrosirius Rot, CIELab, Minkowski-Bouligand Methode .....	8
Statistische Detailergebnisse: Trichrom nach Gieson, Higuchi-2D Methode.....	9
Statistische Detailergebnisse: Trichrom nach Gieson, Fast-Fourier Transformation .....	10
Statistische Detailergebnisse: Trichrom nach Gieson, Pyramid-Differences Methode .....	11
Statistische Detailergebnisse: Trichrom nach Gieson, Pyramid-Gradient Methode .....	12
Statistische Detailergebnisse: Picrosirius Rot, Higuchi-2D Methode.....	13
Statistische Detailergebnisse: Picrosirius Rot, Fast-Fourier Transformation .....	14
Statistische Detailergebnisse: Picrosirius Rot, Pyramid-Differences Methode ....	15
Statistische Detailergebnisse: Picrosirius Rot, Pyramid-Gradient Methode.....	16
Projekt-Plan.....	17

## Statistische Detailergebnisse: Trichrom nach Gieson, RGBrel, Box-Counting Methode

Test auf Normalverteilung:

		Statistik	Standard Fehler
Db_RGBrel	Mittelwert	1,6817071	,01247312
	95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	1,6570587
		Obergrenze	1,7063556
	5% getrimmtes Mittel	1,6858115	
	Median	1,6577191	
	Varianz	,023	
	Standard Abweichung	,15225377	
	Minimum	1,24288	
	Maximum	1,94448	
	Spannweite	,70160	
	Interquartilbereich	,22848	
	Schiefe	-,228	,199
	Kurtosis	-,420	,395

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Db_RGBrel	,092	149	,004	,973	149	,005

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Kruskal-Wallis-Test, Mehrfachvergleiche:

Sample 1-Sample 2	Teststatistik	Std.-Fehler	Standardteststatistik	Sig.	Korr. Sig. <sup>a</sup>
keine Fibrose-interstitielle Fibrose	-11,789	12,295	-,959	,338	1,000
keine Fibrose-diffuse Fibrose	-20,326	11,168	-1,820	,069	,688
keine Fibrose-patchy Fibrose	-52,472	10,810	-4,854	,000	,000
keine Fibrose-kompakte Fibrose	-96,707	11,340	-8,528	,000	,000
interstitielle Fibrose-diffuse Fibrose	-8,537	11,952	-,714	,475	1,000
interstitielle Fibrose-patchy Fibrose	-40,683	11,619	-3,501	,000	,005
interstitielle Fibrose-kompakte Fibrose	-84,918	12,114	-7,010	,000	,000
diffuse Fibrose-patchy Fibrose	-32,146	10,418	-3,086	,002	,020
diffuse Fibrose-kompakte Fibrose	76,381	10,968	6,964	,000	,000
patchy Fibrose-kompakte Fibrose	44,235	10,603	4,172	,000	,000

Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind.

Asymptotische Signifikanz (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.

a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.

## Statistische Detailergebnisse: Trichrom nach Gieson, RGBrel, Minkowski-Bouligand Methode

Test auf Normalverteilung:

		Statistik	Standard Fehler	
Dm_RGBrel	Mittelwert	1,3791144	,02309473	
	95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	1,3334764	
		Obergrenze	1,4247524	
	5% getrimmtes Mittel	1,3840615		
	Median	1,3734019		
	Varianz	,079		
	Standard Abweichung	,28190708		
	Minimum	,65277		
	Maximum	1,88084		
	Spannweite	1,22807		
	Interquartilbereich	,41652		
	Schiefe	-,155	,199	
	Kurtosis	-,711	,395	

Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk			
Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz	
Dm_RGBrel	,061	149	,200*	,978	149	,017

\*. Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Kruskal-Wallis-Test, Mehrfachvergleiche:

Sample 1-Sample 2	Teststatistik	Std.-Fehler	Standardteststatistik	Sig.	Korr. Sig. <sup>a</sup>
keine Fibrose-interstitielle Fibrose	-28,860	12,295	-2,347	,019	,189
keine Fibrose-diffuse Fibrose	-38,022	11,168	-3,405	,001	,007
keine Fibrose-patchy Fibrose	-67,935	10,810	-6,285	,000	,000
keine Fibrose-kompakte Fibrose	-108,679	11,340	-9,583	,000	,000
interstitielle Fibrose-diffuse Fibrose	-9,162	11,952	-,767	,443	1,000
interstitielle Fibrose-patchy Fibrose	-39,075	11,619	-3,363	,001	,008
interstitielle Fibrose-kompakte Fibrose	-79,818	12,114	-6,589	,000	,000
diffuse Fibrose-patchy Fibrose	-29,913	10,418	-2,871	,004	,041
diffuse Fibrose-kompakte Fibrose	70,656	10,968	6,442	,000	,000
patchy Fibrose-kompakte Fibrose	40,743	10,603	3,843	,000	,001

Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind.

Asymptotische Signifikanz (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.

a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.

## Statistische Detailergebnisse: Trichrom nach Gieson, CIELab, Box-Counting Methode

Test auf Normalverteilung:

		Statistik	Standard Fehler	
Db_CIELab	Mittelwert	1,5991262	,01764301	
	95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	1,5642614	
		Obergrenze	1,6339909	
	5% getrimmtes Mittel	1,6090397		
	Median	1,6043227		
	Varianz	,046		
	Standard Abweichung	,21536043		
	Minimum	,91785		
	Maximum	1,93696		
	Spannweite	1,01911		
	Interquartilbereich	,31281		
	Schiefe	-,522	,199	
	Kurtosis	-,049	,395	

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Db_CIELab	,070	149	,071	,966	149	,001

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

## Kruskal-Wallis-Test, Mehrfachvergleiche

Sample 1-Sample 2	Teststatistik	Std.-Fehler	Standardteststatistik	Sig.	Korr. Sig. <sup>a</sup>
keine Fibrose-interstitielle Fibrose	-29,231	12,295	-2,377	,017	,174
keine Fibrose-diffuse Fibrose	-36,603	11,168	-3,278	,001	,010
keine Fibrose-patchy Fibrose	-67,227	10,810	-6,219	,000	,000
keine Fibrose-kompakte Fibrose	-109,021	11,340	-9,614	,000	,000
interstitielle Fibrose-diffuse Fibrose	-7,372	11,952	-,617	,537	1,000
interstitielle Fibrose-patchy Fibrose	-37,996	11,619	-3,270	,001	,011
interstitielle Fibrose-kompakte Fibrose	-79,791	12,114	-6,587	,000	,000
diffuse Fibrose-patchy Fibrose	-30,624	10,418	-2,939	,003	,033
diffuse Fibrose-kompakte Fibrose	72,419	10,968	6,603	,000	,000
patchy Fibrose-kompakte Fibrose	41,795	10,603	3,942	,000	,001

Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind.

Asymptotische Signifikanzen (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.

a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.

## Statistische Detailergebnisse: Trichrom nach Gieson, CIELab, Minkowski-Bouligand Methode

Test auf Normalverteilung:

		Statistik	Standard Fehler	
Dm_CIELab	Mittelwert	1,3884747	,02203052	
	95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	1,3449397	
		Obergrenze	1,4320097	
	5% getrimmtes Mittel	1,3953059		
	Median	1,3979562		
	Varianz	,072		
	Standard Abweichung	,26891675		
	Minimum	,73910		
	Maximum	1,87139		
	Spannweite	1,13229		
	Interquartilbereich	,38665		
	Schiefe	-,240	,199	
	Kurtosis	-,579	,395	

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Dm_CIELab	,058	149	,200 <sup>*</sup>	,980	149	,031

\*. Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

## Kruskal-Wallis-Test, Mehrfachvergleiche

Sample 1-Sample 2	Teststatistik	Std.-Fehler	Standardteststatistik	Sig.	Korr. Sig. <sup>a</sup>
keine Fibrose-diffuse Fibrose	-22,415	11,168	-2,007	,045	,447
keine Fibrose-interstitielle Fibrose	-22,458	12,295	-1,827	,068	,678
keine Fibrose-patchy Fibrose	-62,862	10,810	-5,815	,000	,000
keine Fibrose-kompakte Fibrose	-102,221	11,340	-9,014	,000	,000
diffuse Fibrose-interstitielle Fibrose	,043	11,952	,004	,997	1,000
diffuse Fibrose-patchy Fibrose	-40,447	10,418	-3,882	,000	,001
diffuse Fibrose-kompakte Fibrose	79,806	10,968	7,277	,000	,000
interstitielle Fibrose-patchy Fibrose	-40,404	11,619	-3,477	,001	,005
interstitielle Fibrose-kompakte Fibrose	-79,764	12,114	-6,585	,000	,000
patchy Fibrose-kompakte Fibrose	39,359	10,603	3,712	,000	,002

Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind.

Asymptotische Signifikanz (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.

a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.

## Statistische Detailergebnisse: Picrosirius Rot, RGBrel, Box-Counting Methode

Test auf Normalverteilung:

		Statistik	Standard Fehler	
Db_RGBrel	Mittelwert	1,5233638	,02176980	
	95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	1,4803843	
		Obergrenze	1,5663432	
	5% getrimmtes Mittel	1,5328798		
	Median	1,5185103		
	Varianz	,080		
	Standard Abweichung	,28216884		
	Minimum	,60024		
	Maximum	1,96486		
	Spannweite	1,36462		
	Interquartilbereich	,47125		
	Schiefe	-,360	,187	
	Kurtosis	-,459	,373	

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Db_RGBrel	,080	168	,010	,965	168	,000

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Kruskal-Wallis-Test, Mehrfachvergleiche:

Sample 1-Sample 2	Teststatistik	Std.-Fehler	Standardteststatistik	Sig.	Korr. Sig. <sup>a</sup>
keine Fibrose-interstitielle Fibrose	-15,487	10,961	-1,413	,158	1,000
keine Fibrose-diffuse Fibrose	-38,779	12,111	-3,202	,001	,014
keine Fibrose-patchy Fibrose	-75,493	9,818	-7,689	,000	,000
keine Fibrose-kompakte Fibrose	-109,315	14,197	-7,700	,000	,000
interstitielle Fibrose-diffuse Fibrose	-23,292	13,386	-1,740	,082	,819
interstitielle Fibrose-patchy Fibrose	-60,006	11,353	-5,285	,000	,000
interstitielle Fibrose-kompakte Fibrose	-93,828	15,299	-6,133	,000	,000
diffuse Fibrose-patchy Fibrose	-36,714	12,468	-2,945	,003	,032
diffuse Fibrose-kompakte Fibrose	70,536	16,143	4,369	,000	,000
patchy Fibrose-kompakte Fibrose	33,822	14,502	2,332	,020	,197

Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind.

Asymptotische Signifikanzen (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.

a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.

## Statistische Detailergebnisse: Picrosirius Rot, RGBrel, Minkowski-Bouligand Methode

Test auf Normalverteilung:

		Statistik	Standard Fehler	
Dm_RGBrel	Mittelwert	1,2321111	,02587229	
	95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	1,1810322	
		Obergrenze	1,2831900	
	5% getrimmtes Mittel	1,2283530		
	Median	1,1882851		
	Varianz	,112		
	Standard Abweichung	,33534315		
	Minimum	,48047		
	Maximum	1,91177		
	Spannweite	1,43130		
	Interquartilbereich	,58705		
	Schiefe	,250	,187	
	Kurtosis	-,998	,373	

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Dm_RGBrel	,089	168	,002	,960	168	,000

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Kruskal-Wallis-Test, Mehrfachvergleiche:

Sample 1-Sample 2	Teststatistik	Std.-Fehler	Standardteststatistik	Sig.	Korr. Sig. <sup>a</sup>
keine Fibrose-interstitielle Fibrose	-9,388	10,961	-,857	,392	1,000
keine Fibrose-diffuse Fibrose	-35,129	12,111	-2,900	,004	,037
keine Fibrose-patchy Fibrose	-72,704	9,818	-7,405	,000	,000
keine Fibrose-kompakte Fibrose	-109,126	14,197	-7,687	,000	,000
interstitielle Fibrose-diffuse Fibrose	-25,741	13,386	-1,923	,054	,545
interstitielle Fibrose-patchy Fibrose	-63,315	11,353	-5,577	,000	,000
interstitielle Fibrose-kompakte Fibrose	-99,738	15,299	-6,519	,000	,000
diffuse Fibrose-patchy Fibrose	-37,575	12,468	-3,014	,003	,026
diffuse Fibrose-kompakte Fibrose	73,997	16,143	4,584	,000	,000
patchy Fibrose-kompakte Fibrose	36,422	14,502	2,512	,012	,120

Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind.

Asymptotische Signifikanzen (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.

a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.

## Statistische Detailergebnisse: Picrosirius Rot, CIELab, Box-Counting Methode

Test auf Normalverteilung:

		Statistik	Standard Fehler	
Db_CIELab	Mittelwert	1,5580329	,01699024	
	95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	1,5244896	
		Obergrenze	1,5915763	
	5% getrimmtes Mittel	1,5650645		
	Median	1,5722682		
	Varianz	,048		
	Standard Abweichung	,22021868		
	Minimum	,79032		
	Maximum	1,92677		
	Spannweite	1,13645		
	Interquartilbereich	,34438		
	Schiefe	-,400	,187	
	Kurtosis	-,293	,373	

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Db_CIELab	,067	168	,062	,970	168	,001

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Kruskal-Wallis-Test, Mehrfachvergleiche:

Sample 1-Sample 2	Teststatistik	Std.-Fehler	Standardteststatistik	Sig.	Korr. Sig. <sup>a</sup>
keine Fibrose-interstitielle Fibrose	-19,005	10,961	-1,734	,083	,829
keine Fibrose-diffuse Fibrose	-43,993	12,111	-3,632	,000	,003
keine Fibrose-patchy Fibrose	-79,767	9,818	-8,125	,000	,000
keine Fibrose-kompakte Fibrose	-109,433	14,197	-7,708	,000	,000
interstitielle Fibrose-diffuse Fibrose	-24,987	13,386	-1,867	,062	,620
interstitielle Fibrose-patchy Fibrose	-60,761	11,353	-5,352	,000	,000
interstitielle Fibrose-kompakte Fibrose	-90,428	15,299	-5,911	,000	,000
diffuse Fibrose-patchy Fibrose	-35,774	12,468	-2,869	,004	,041
diffuse Fibrose-kompakte Fibrose	65,441	16,143	4,054	,000	,001
patchy Fibrose-kompakte Fibrose	29,667	14,502	2,046	,041	,408

Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind.

Asymptotische Signifikanz (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.

a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.

## Statistische Detailergebnisse: Picrosirius Rot, CIELab, Minkowski-Bouligand Methode

Test auf Normalverteilung:

		Statistik	Standard Fehler	
Dm_CIELab	Mittelwert	1,3172123	,02123618	
	95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	1,2752863	
		Obergrenze	1,3591382	
	5% getrimmtes Mittel	1,3178186		
	Median	1,3034954		
	Varianz	,076		
	Standard Abweichung	,27525232		
	Minimum	,64550		
	Maximum	1,86699		
	Spannweite	1,22149		
	Interquartilbereich	,42588		
	Schiefe	,067	,187	
	Kurtosis	-,860	,373	

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Dm_CIELab	,071	168	,038	,978	168	,008

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Kruskal-Wallis-Test, Mehrfachvergleiche:

Sample 1-Sample 2	Teststatistik	Std.-Fehler	Standardteststatistik	Sig.	Korr. Sig. <sup>a</sup>
keine Fibrose-interstitielle Fibrose	-16,948	10,961	-1,546	,122	1,000
keine Fibrose-diffuse Fibrose	-41,592	12,111	-3,434	,001	,006
keine Fibrose-patchy Fibrose	-79,500	9,818	-8,097	,000	,000
keine Fibrose-kompakte Fibrose	-113,189	14,197	-7,973	,000	,000
interstitielle Fibrose-diffuse Fibrose	-24,644	13,386	-1,841	,066	,656
interstitielle Fibrose-patchy Fibrose	-62,552	11,353	-5,510	,000	,000
interstitielle Fibrose-kompakte Fibrose	-96,241	15,299	-6,291	,000	,000
diffuse Fibrose-patchy Fibrose	-37,908	12,468	-3,040	,002	,024
diffuse Fibrose-kompakte Fibrose	71,597	16,143	4,435	,000	,000
patchy Fibrose-kompakte Fibrose	33,689	14,502	2,323	,020	,202

Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind.

Asymptotische Signifikanz (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.

a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.

## Statistische Detailergebnisse: Trichrom nach Gieson, Higuchi-2D Methode

Test auf Normalverteilung:

		Statistik	Standard Fehler
Dh_H2D	Mittelwert	2,775942374	,0070989944
	95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	2,761913892
		Obergrenze	2,789970857
	5% getrimmtes Mittel	2,776725204	
	Median	2,758767676	
	Varianz	,008	
	Standard Abweichung	,0866542698	
	Minimum	2,56121983	
	Maximum	2,95020028	
	Spannweite	,38898045	
	Interquartilbereich	,12578085	
	Schiefe	,102	,199
	Kurtosis	-,483	,395

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Dh_H2D	,092	149	,004	,974	149	,006

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Kruskal-Wallis-Test, Mehrfachvergleiche:

Sample 1-Sample 2	Teststatistik	Std.-Fehler	Standardteststatistik	Sig.	Korr. Sig. <sup>a</sup>
kompakte Fibrose-patchy Fibrose	-44,362	10,603	-4,184	,000	,000
kompakte Fibrose-diffuse Fibrose	-45,762	10,968	-4,173	,000	,000
kompakte Fibrose-interstitielle Fibrose	65,382	12,114	5,397	,000	,000
kompakte Fibrose-keine Fibrose	99,521	11,340	8,776	,000	,000
patchy Fibrose-diffuse Fibrose	1,400	10,418	,134	,893	1,000
patchy Fibrose-interstitielle Fibrose	21,020	11,619	1,809	,070	,704
patchy Fibrose-keine Fibrose	55,159	10,810	5,103	,000	,000
diffuse Fibrose-interstitielle Fibrose	19,619	11,952	1,641	,101	1,000
diffuse Fibrose-keine Fibrose	53,759	11,168	4,814	,000	,000
interstitielle Fibrose-keine Fibrose	34,140	12,295	2,777	,005	,055

Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind.

Asymptotische Signifikanz (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.

a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.

## Statistische Detailergebnisse: Trichrom nach Gieson, Fast-Fourier Transformation

Test auf Normalverteilung:

		Statistik	Standard Fehler
Df_FFT	Mittelwert	2,715897696	,0047212725
	95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	2,706567883
		Obergrenze	2,725227509
	5% getrimmtes Mittel	2,717541449	
	Median	2,732849239	
	Varianz	,003	
	Standard Abweichung	,0576304747	
	Minimum	2,57776715	
	Maximum	2,81793996	
	Spannweite	,24017281	
	Interquartilbereich	,08027479	
	Schiefe	-,593	,199
	Kurtosis	-,535	,395

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Df_FFT	,121	149	,000	,944	149	,000

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Kruskal-Wallis-Test, Mehrfachvergleiche:

Sample 1-Sample 2	Teststatistik	Std.-Fehler	Standardteststatistik	Sig.	Korr. Sig. <sup>a</sup>
diffuse Fibrose-kompakte Fibrose	66,263	10,968	6,042	,000	,000
diffuse Fibrose-patchy Fibrose	-69,062	10,418	-6,629	,000	,000
diffuse Fibrose-keine Fibrose	80,134	11,168	7,175	,000	,000
diffuse Fibrose-interstitielle Fibrose	84,744	11,952	7,090	,000	,000
kompakte Fibrose-patchy Fibrose	-2,800	10,603	-,264	,792	1,000
kompakte Fibrose-keine Fibrose	13,871	11,340	1,223	,221	1,000
kompakte Fibrose-interstitielle Fibrose	18,482	12,114	1,526	,127	1,000
patchy Fibrose-keine Fibrose	11,071	10,810	1,024	,306	1,000
patchy Fibrose-interstitielle Fibrose	15,682	11,619	1,350	,177	1,000
keine Fibrose-interstitielle Fibrose	-4,610	12,295	-,375	,708	1,000

Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind.

Asymptotische Signifikanzen (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.

a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.

## Statistische Detailergebnisse: Trichrom nach Gieson, Pyramid-Differences Methode

Test auf Normalverteilung:

		Statistik	Standard Fehler	
Dp_PDM	Mittelwert	2,637045156	,0123729073	
	95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	2,612594775	
		Obergrenze	2,661495536	
	5% getrimmtes Mittel	2,637677195		
	Median	2,652461124		
	Varianz	,023		
	Standard Abweichung	,1510305815		
	Minimum	2,36461532		
	Maximum	2,89793296		
	Spannweite	,53331764		
	Interquartilbereich	,25378656		
	Schiefe	,045	,199	
	Kurtosis	-1,244	,395	

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Dp_PDM	,128	149	,000	,945	149	,000

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Kruskal-Wallis-Test, Mehrfachvergleiche:

Sample 1-Sample 2	Teststatistik	Std.-Fehler	Standardteststatistik	Sig.	Korr. Sig. <sup>a</sup>
kompakte Fibrose-patchy Fibrose	-11,435	10,603	-1,078	,281	1,000
kompakte Fibrose-diffuse Fibrose	-64,862	10,968	-5,914	,000	,000
kompakte Fibrose-interstitielle Fibrose	78,482	12,114	6,479	,000	,000
kompakte Fibrose-keine Fibrose	100,800	11,340	8,889	,000	,000
patchy Fibrose-diffuse Fibrose	53,427	10,418	5,128	,000	,000
patchy Fibrose-interstitielle Fibrose	67,047	11,619	5,771	,000	,000
patchy Fibrose-keine Fibrose	89,365	10,810	8,267	,000	,000
diffuse Fibrose-interstitielle Fibrose	13,619	11,952	1,139	,255	1,000
diffuse Fibrose-keine Fibrose	35,938	11,168	3,218	,001	,013
interstitielle Fibrose-keine Fibrose	22,318	12,295	1,815	,069	,695

Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind.

Asymptotische Signifikanz (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.

a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.

## Statistische Detailergebnisse: Trichrom nach Gieson, Pyramid-Gradient Methode

Test auf Normalverteilung:

		Statistik	Standard Fehler
Dp_PGM	Mittelwert	2,655202717	,0145061723
	95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	2,626536743
		Obergrenze	2,683868690
	5% getrimmtes Mittel	2,658145414	
	Median	2,645048596	
	Varianz	,031	
	Standard Abweichung	,1770703988	
	Minimum	2,26276519	
	Maximum	2,96546718	
	Spannweite	,70270199	
	Interquartilbereich	,32311082	
	Schiefe	-,102	,199
	Kurtosis	-1,196	,395

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Dp_PGM	,104	149	,000	,946	149	,000

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Kruskal-Wallis-Test, Mehrfachvergleiche:

Sample 1-Sample 2	Teststatistik	Std.-Fehler	Standardteststatistik	Sig.	Korr. Sig. <sup>a</sup>
diffuse Fibrose-kompakte Fibrose	20,356	10,968	1,856	,063	,634
diffuse Fibrose-interstitielle Fibrose	73,429	11,952	6,143	,000	,000
diffuse Fibrose-keine Fibrose	77,049	11,168	6,899	,000	,000
diffuse Fibrose-patchy Fibrose	-81,494	10,418	-7,822	,000	,000
kompakte Fibrose-interstitielle Fibrose	53,073	12,114	4,381	,000	,000
kompakte Fibrose-keine Fibrose	56,693	11,340	4,999	,000	,000
kompakte Fibrose-patchy Fibrose	-61,138	10,603	-5,766	,000	,000
interstitielle Fibrose-keine Fibrose	3,620	12,295	,294	,768	1,000
interstitielle Fibrose-patchy Fibrose	-8,065	11,619	-,694	,488	1,000
keine Fibrose-patchy Fibrose	-4,445	10,810	-,411	,681	1,000

Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind.

Asymptotische Signifikanzen (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.

a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.

## Statistische Detailergebnisse: Picrosirius Rot, Higuchi-2D Methode

### Test auf Normalverteilung:

		Statistik	Standard Fehler
Dh_H2D	Mittelwert	2,717017075	,0042303343
	95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	2,708665249
		Obergrenze	2,725368901
	5% getrimmtes Mittel	2,715700444	
	Median	2,714293720	
	Varianz	,003	
	Standard Abweichung	,0548313989	
	Minimum	2,59157126	
	Maximum	2,87049366	
	Spannweite	,27892240	
	Interquartilbereich	,06338141	
	Schiefe	,337	,187
	Kurtosis	,063	,373

Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk			
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Dh_H2D	,059	168	,200*	,987	168	,136

\*. Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

### Kruskal-Wallis-Test, Mehrfachvergleiche:

Sample 1-Sample 2	Teststatistik	Std.-Fehler	Standardteststatistik	Sig.	Korr. Sig. <sup>a</sup>
kompakte Fibrose-keine Fibrose	10,930	14,197	,770	,441	1,000
kompakte Fibrose-interstitielle Fibrose	12,800	15,299	,837	,403	1,000
kompakte Fibrose-patchy Fibrose	-34,444	14,502	-2,375	,018	,175
kompakte Fibrose-diffuse Fibrose	-81,800	16,143	-5,067	,000	,000
keine Fibrose-interstitielle Fibrose	-1,870	10,961	-,171	,865	1,000
keine Fibrose-patchy Fibrose	-23,515	9,818	-2,395	,017	,166
keine Fibrose-diffuse Fibrose	-70,870	12,111	-5,852	,000	,000
interstitielle Fibrose-patchy Fibrose	-21,644	11,353	-1,906	,057	,566
interstitielle Fibrose-diffuse Fibrose	-69,000	13,386	-5,155	,000	,000
patchy Fibrose-diffuse Fibrose	47,356	12,468	3,798	,000	,001

Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind.

Asymptotische Signifikanz (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.

a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.

## Statistische Detailergebnisse: Picosirius Rot, Fast-Fourier Transformation

Test auf Normalverteilung:

		Statistik	Standard Fehler	
Df_FFT	Mittelwert	2,873701819	,0115685726	
	95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	2,850862322	
		Obergrenze	2,896541316	
	5% getrimmtes Mittel	2,867566765		
	Median	2,827849271		
	Varianz	,022		
	Standard Abweichung	,1499458388		
	Minimum	2,67038515		
	Maximum	3,21397462		
	Spannweite	,54358948		
	Interquartilbereich	,27155437		
	Schiefe	,434	,187	
	Kurtosis	-1,191	,373	

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Df_FFT	,173	168	,000	,901	168	,000

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Kruskal-Wallis-Test, Mehrfachvergleiche:

Sample 1-Sample 2	Teststatistik	Std.-Fehler	Standardteststatistik	Sig.	Korr. Sig. <sup>a</sup>
keine Fibrose-interstitielle Fibrose	-,713	10,961	-,065	,948	1,000
keine Fibrose-kompakte Fibrose	-60,381	14,197	-4,253	,000	,000
keine Fibrose-patchy Fibrose	-82,781	9,818	-8,432	,000	,000
keine Fibrose-diffuse Fibrose	-98,257	12,111	-8,113	,000	,000
interstitielle Fibrose-kompakte Fibrose	-59,669	15,299	-3,900	,000	,001
interstitielle Fibrose-patchy Fibrose	-82,069	11,353	-7,229	,000	,000
interstitielle Fibrose-diffuse Fibrose	-97,544	13,386	-7,287	,000	,000
kompakte Fibrose-patchy Fibrose	-22,400	14,502	-1,545	,122	1,000
kompakte Fibrose-diffuse Fibrose	-37,875	16,143	-2,346	,019	,190
patchy Fibrose-diffuse Fibrose	15,475	12,468	1,241	,215	1,000

Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind.

Asymptotische Signifikanz (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.

a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.

## Statistische Detailergebnisse: Picrosirius Rot, Pyramid-Differences Methode

### Test auf Normalverteilung:

		Statistik	Standard Fehler
Dp_PDM	Mittelwert	2,690293646	,0069990869
	95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	2,676475552
		Obergrenze	2,704111740
	5% getrimmtes Mittel	2,687653891	
	Median	2,680588105	
	Varianz	,008	
	Standard Abweichung	,0907185350	
	Minimum	2,47655284	
	Maximum	3,15365162	
	Spannweite	,67709878	
	Interquartilbereich	,12176183	
	Schiefe	,863	,187
	Kurtosis	3,019	,373

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Dp_PDM	,049	168	,200 <sup>*</sup>	,959	168	,000

\*. Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

### Kruskal-Wallis-Test, Mehrfachvergleiche:

Sample 1-Sample 2	Teststatistik	Std.-Fehler	Standardteststatistik	Sig.	Korr. Sig. <sup>a</sup>
keine Fibrose-patchy Fibrose	-23,274	9,818	-2,371	,018	,178
keine Fibrose-diffuse Fibrose	-59,543	12,111	-4,916	,000	,000
keine Fibrose-interstitielle Fibrose	-81,501	10,961	-7,436	,000	,000
keine Fibrose-kompakte Fibrose	-108,696	14,197	-7,656	,000	,000
patchy Fibrose-diffuse Fibrose	36,269	12,468	2,909	,004	,036
patchy Fibrose-interstitielle Fibrose	58,227	11,353	5,129	,000	,000
patchy Fibrose-kompakte Fibrose	85,422	14,502	5,890	,000	,000
diffuse Fibrose-interstitielle Fibrose	21,958	13,386	1,640	,101	1,000
diffuse Fibrose-kompakte Fibrose	49,154	16,143	3,045	,002	,023
interstitielle Fibrose-kompakte Fibrose	-27,196	15,299	-1,778	,075	,755

Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind.

Asymptotische Signifikanz (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.

a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.

## Statistische Detailergebnisse: Picrosirius Rot, Pyramid-Gradient Methode

Test auf Normalverteilung:

		Statistik	Standard Fehler	
Dp_PGM	Mittelwert	2,389575387	,0210600397	
	95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	2,347997162	
		Obergrenze	2,431153612	
	5% getrimmtes Mittel	2,385181634		
	Median	2,365331045		
	Varianz	,075		
	Standard Abweichung	,2729693128		
	Minimum	2,00752481		
	Maximum	2,89331611		
	Spannweite	,88579130		
	Interquartilbereich	,53553251		
	Schiefe	,207	,187	
	Kurtosis	-1,392	,373	

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Dp_PGM	,119	168	,000	,916	168	,000

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Kruskal-Wallis-Test, Mehrfachvergleiche:

Sample 1-Sample 2	Teststatistik	Std.-Fehler	Standardteststatistik	Sig.	Korr. Sig. <sup>a</sup>
keine Fibrose-diffuse Fibrose	-28,214	12,111	-2,330	,020	,198
keine Fibrose-interstitielle Fibrose	-38,357	10,961	-3,500	,000	,005
keine Fibrose-patchy Fibrose	-87,030	9,818	-8,864	,000	,000
keine Fibrose-kompakte Fibrose	-109,385	14,197	-7,705	,000	,000
diffuse Fibrose-interstitielle Fibrose	10,143	13,386	,758	,449	1,000
diffuse Fibrose-patchy Fibrose	-58,815	12,468	-4,717	,000	,000
diffuse Fibrose-kompakte Fibrose	81,171	16,143	5,028	,000	,000
interstitielle Fibrose-patchy Fibrose	-48,672	11,353	-4,287	,000	,000
interstitielle Fibrose-kompakte Fibrose	-71,028	15,299	-4,643	,000	,000
patchy Fibrose-kompakte Fibrose	22,356	14,502	1,542	,123	1,000

Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind.

Asymptotische Signifikanzen (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.

a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.

## **Projekt-Plan**

### **Wie lautet die Fragestellung?**

Kann man mithilfe fraktaler Parameter eine histologische Diagnose der kardialen Fibrose ergänzen, respektive die Unterformen der Fibrose besser klassifizieren, als dies mit den herkömmlichen visuellen Methoden derzeit möglich ist.

### **Warum ist diese Frage von Bedeutung?**

Die Bedeutung der fraktalen Analyse liegt heutzutage vor allem in der Grundlagenforschung, spätere Arbeiten und Forschungen können auf diese Daten zurückgreifen. Wie groß die Bedeutung in Zukunft tatsächlich sein wird kann a priori nicht abgeschätzt werden. Wir erhoffen uns jedoch eine Verbesserung in der Differenzierung der kardialen Fibrosetypen und in weiterer Folge eine verbesserte Therapie und eine damit verbundene höhere Lebensqualität der betroffenen Patientinnen und Patienten.

### **Welche Ergebnisse sind im Wesentlichen zu erwarten?**

Wir erhoffen uns signifikante Unterschiede der fraktalen Dimension für die einzelnen kardialen Fibrosetypen. Zusätzlich soll die Frage beantwortet werden, ob eine bestimmte Analysemethode den anderen überlegen ist.

### **Worin besteht der theoretische Kern der Arbeit?**

Der Begriff Fraktal leitet sich vom lat. „*frangere*“ ab, was übersetzt „*zersplittern, zerbrechen*“ bedeutet. Gemeint sind Objekte mit einer unendlichen Rauheit welche als Muster in der Geometrie wie auch in der Natur vorkommen.

Die Geometrie von Fraktalen spielt sowohl im Mikro- als auch im Makrokosmos eine große Rolle. Sie reicht von Strukturen der DNA über Schneeflocken, Bakterienkulturen, Organsystemen, Pflanzen bis hin zu den Spiralen der Galaxien. In der euklidischen Geometrie besitzen alle Objekte bzw. Gebilde des Raumes einen charakteristischen Maßstab. Bei einer Vergrößerung dieses Objektes werden keine neuen Details erkennbar. Das bedeutet, dass das kleinste Charakteristikum in diesem Maßstab bereits abgebildet ist. Als Beispiel soll hier ein Kreis dienen, welcher bei näherer Betrachtung dieser geometrischen Figur, also mit zunehmender Vergrößerung, keine neuen Einzelheiten sichtbar werden

lässt. Fraktale jedoch besitzen keinen solchen charakteristischen Maßstab. Bei einer Veränderung der Größenordnung kommt es zu dem Phänomen, dass Teile des Gebildes zersplittern und somit verkleinerte Abbilder des ursprünglichen Objektes darstellen. Diese müssen nicht ident erscheinen, aber Selbstähnlichkeit aufweisen. Ein Beispiel für geometrische Konstruktion ist das sogenannte *Sierpinski Dreieck*: Halbiert man alle Seiten eines gleichschenkeligen Dreiecks und verbindet man die Mittelpunkte miteinander entstehen neue gleichschenkelige Dreiecke. Dies nennt man auch Iteration und kann theoretisch beliebig oft wiederholt werden. Fraktale Gebilde in der Natur besitzen aber eine obere und untere Grenze, die durch physikalische Gesetzmäßigkeiten vorherbestimmt sind. In der Medizin vorkommende Fraktale sind zum Beispiel Anordnungen des Blutgefäßsystems, Verästelung der Axone von Nervenzellen wie auch das Wachstumsmuster von neoplastischen Veränderungen. Um zwischen zufälliger Geometrie und Fraktalen differenzieren zu können, müssen folgende vier Eigenschaften vorhanden sein:

### **1. Selbstähnlichkeit**

Wie bereits im Obigen dargestellt, haben fraktale Strukturen in der Natur keine exakte Ähnlichkeit mit der ursprünglichen Abbildung. Stattdessen verwendet man hier die statistische Selbstähnlichkeit. Nimmt man einen bestimmten Parameter eines Fraktals  $Q(ar)$  gemessen bei der Auflösung  $ar$ , dann ist dieser proportional zum gleichwertigen Parameter  $Q(r)$  bei einer anderen Auflösung  $r$ . Vereinfacht ausgedrückt – bei Vergrößerung weisen fraktale Objekte aufgrund des nicht vorhandenen charakteristischen Maßstabes dieselbe bzw. ähnliche Strukturen auf wie beim Blick auf das Gesamte. Man sieht somit verkleinerte Abbilder des ursprünglichen Objektes.

### **2. Dimensionsdefinition**

Ein Objekt kann stets durch drei Dimensionen beschrieben werden. Die topologische Dimension ist stets eine ganze Zahl und beschreibt wie Punkte innerhalb eines Körpers verbunden sind. Die Einbettungsdimension beschreibt den Raum den ein Objekt einnimmt. So kann eine ideale Schnur mit einer topologischen Dimension von  $1$  (dies entspricht einer unendlich dünnen Schnur) in einem Knäuel einen dreidimensionalen Raum einnehmen.

Zwischen diesen zwei Dimensionen siedelt sich die fraktale Dimension an und gibt Auskunft darüber, wie stark das Objekt den Raum füllt. Stellt man die im Obigen zwei beschriebenen Parameter mit bestimmter Auflösung als doppellogarithmischen Plot dar, also  $\log(Q(ar))$  auf der Ordinate und  $\log(Q(r))$  auf der Abszisse, so ist nach der allgemein bekannten linearen Geradengleichung die Steigung gleich der *fraktalen Dimension (D)*. Wichtig ist es zu wissen, dass diese Dimension keine ganze Zahl darstellen muss.

### 3. Skalierbarkeit

Diese besagt, dass die gemessenen Parameter abhängig von der Auflösung sind, weil dies durch die Selbstähnlichkeit indiziert wird. Eine der ersten Beschreibungen dieses Prinzips diente Benoît B. Mandelbrot für die Vermessung der Küste Großbritanniens. Der Umfang der Insel führt bei steigender Auflösung bzw. Vergrößerung bis ins Unendliche, obwohl die Fläche aber endlich ist.

### 4. Statistische Eigenschaft

Klassische Statistik orientiert sich an der Gauß'schen Normalverteilung. Je mehr Werte man zur Verfügung hat, desto genauer wird dabei der Mittelwert. Bei fraktalen Gebilden zeigt sich hier bei einer zunehmenden Anzahl von Werten eine Verschiebung Richtung Null oder Unendlich. Da bei Fraktalen auch die Menge der selbstähnlichen Anteile sehr stark variieren, steigt auch die Varianz gegen Null oder Unendlich. Trotzdem sind Mittelwert, Varianz und Standardabweichung bei Fraktalen statistisch verwendbar, jedoch stark skalierungsabhängig.

### Kardiale Fibrose

Kardiale Fibrose ist definiert als die Zunahme des Kollagenfasergehalts pro Gewebseinheit, was zu einer Verhärtung des Gewebes und einem damit verbundenen Funktionsverlust führt.

Die **kompakte Fibrose** besteht aus Regionen, welche nur aus dichtem Kollagen ohne Myokardgewebe bestehen. Trotz des Aussehens verursacht diese Art der Fibrose im Vergleich zu den anderen Typen am wenigsten kardiale Arrhythmien.

Bei der **interstitiellen Fibrose** besteht die umschriebene Region nicht nur aus Kollagen, sondern auch aus der Extrazellulärmatrix. Dieses im Mikroskop erkennbare anisotrope Muster kann auch ganze Myokardbündel trennen. Mit zunehmender Ausbreitung der Fibrose wird diese eher vertikal zur ursprünglichen Faserverlaufsrichtung. Betrifft diese Art der Fibrose eine sehr große Region des Myokards, so kann eine ventrikuläre Arrhythmie die Folge sein.

In der **diffusen Fibrose** vermischen sich die kurzen Kollagenabschnitte mit dem Myokard. Man hat herausgefunden, dass die Leitungsgeschwindigkeit proportional zu der Menge an diffuser Fibrose signifikant abnimmt.

Die Charakteristiken von der sogenannten **patchy fibrosis** sind Areale, in denen sich Myokardbündel und Kollagen vermischen. Die Kollagenfasern organisieren sich zu langen Strängen und dadurch kommt es zu Leitungsverzögerung. Aufgrund dieser Zickzack-Ausbreitung von Ionenströmen besteht hier eine erhöhte Vulnerabilität für kardiale Arrhythmien.

Die Hauptzielgröße ist die fraktale Dimension der einzelnen Fibrosetypen (die Fibrosetypen sollen sich in der fraktalen Dimension signifikant voneinander unterscheiden).

Zuerst werden die erhobenen Daten graphisch dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgt mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung. Im Anschluss wird bei Normalverteilung eine ANOVA mit Tukey HSD Post-hoc-Tests durchgeführt. Bei nicht normalverteilten Daten wird ein Kruskal-Wallis-Test samt Post-hoc-Tests angewendet.

### **Worin besteht der Neuigkeitswert?**

Es gibt bereits zahlreiche Arbeiten zu fraktaler Analyse zu anderen medizinischen Fragestellungen, jedoch gibt es sehr wenige Daten zu fraktaler Analyse bei kardialer Fibrose. Diese Diagnose ist momentan nur durch visuelle Methoden möglich. Mit der Untersuchung soll gezeigt werden, ob man histologische Bilder mit einer Bildbearbeitungssoftware auf ihre fraktale Dimension untersuchen und anhand dieser eine Diagnose erstellen kann.

### **Welche Methoden stehen zur Beantwortung der Frage zur Verfügung?**

Es handelt sich bei den zu untersuchenden Präparaten um humanes Herzmuskelgewebe. Die histologischen Bilder und Daten wurden von der Biobank

der Medizinischen Universität Graz bereitgestellt und von einer spanischen Forschergruppe befundet. Die digitalen Bilder sollen mittels unterschiedlichen Analysemethoden auf die fraktale Dimension untersucht werden:

- Fast-Fourier Transformation (FFT)
- Higuchi Methode (H2D)
- Box-Counting Methode (BCM)
- Minkowski-Bouligand Methode (MBM)
- Pyramidenmethoden (PGM, PDM)

Hierzu soll das vom Institut für Biophysik der Medizinischen Universität Graz mitentwickelte Programm IQM zum Einsatz kommen. Welche der Analysemethoden die nützlichste ist wird sich im Laufe der Arbeit herausstellen.

### **Wieso wählen Sie genau diese Methode?**

Die zur Verfügung stehende Bildbearbeitungs- und Analysesoftware IQM (Interactive Quantitative Morphology) ist vor allem auf fraktale Analysemethoden ausgelegt, welche sich bereits bei vergangenen Forschungsarbeiten als geeignet erwiesen haben. Des Weiteren scheint es aus ethischer und ökonomischer Sicht am sinnvollsten bereits vorhandene Bilder zu verwenden, als erneut unter massivem finanziellem und zeittechnischem Aufwand neue histologische Schnitte anzufertigen.

### **Wann wird mit der Arbeit begonnen?**

Am Anfang 2018 soll mit der Analyse begonnen werden.

### **Wann wird die Grobgliederung des Inhalts vorgelegt?**

Die Grobgliederung erfolgt im Frühjahr 2018.

### **Wann ist voraussichtlich mit der Beendigung der Arbeit zu rechnen?**

Zum Jahreswechsel 2019 / 2020 soll die Arbeit fertiggestellt sein.

## **Welche formalen Schritte sind die für die Umsetzung der Diplomarbeit notwendig?**

Da die Bilder bereits vorhanden sind ist kein Ethikkommissionantrag von Nöten, es genügt die Anmeldung der Arbeit in MugThesis und die Einreichung des Konzeptformulars.

## **Arbeitstitel**

Fraktale Analyse kardialer Fibrose

## **Betreuer/in**

Als Betreuer/in fungiert Herr Ao.Univ.-Prof. Mag. Dr.rer.nat. Helmut Ahammer vom Gottfried Schatz Forschungszentrum für zelluläre Signaltransduktion, Stoffwechsel und Altern, Lehrstuhl für Biophysik.

## **Benötigte Ressourcen**

Für die Analyse wird ein Rechner, der für Bildbearbeitung ausgelegt ist, benötigt, ein Arbeitsplatz von welchem aus dieser bedient werden kann, wird vom Institut zu Verfügung gestellt.

## **Woher kommen die Proben bzw. die Daten?**

Die histologischen Schnitte der fibrosierten Herzen stammen ursprünglich von der Biobank Graz und wurden bereits für die Dissertation *Pyramid Dimension of Histological Images of the Heart* verwendet. Somit stehen zum Beginn der Diplomarbeit die Bilder bereits digital zur Verfügung.