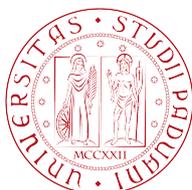


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA



FACOLTÀ DI INGEGNERIA

Corso di laurea in Ingegneria Biomedica

**SEGMENTAZIONE DI IMMAGINI  
DIGITALI DA LEGAMENTI DI  
GINOCCHIO UMANO E  
RICOSTRUZIONE TRIDIMENSIONALE  
DELLE STRUTTURE FASCICOLARI.**

**RELATORE:**

**Prof.ssa Maria Pia Saccomani**

**CORRELATORE:**

**Dott. Marco Bontempi**

**LAUREANDO:**

**Giorgia Rocatello**

---

**Anno Accademico 2011/2012**



# Introduzione

Questo lavoro di tesi è relativo al tirocinio da me svolto presso l'Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna.

Il progetto di cui fa parte questo lavoro ha lo scopo di creare un programma Matlab che sia in grado di elaborare un'immagine tridimensionale di un legamento, selezionando e visualizzando ogni singola fibra che lo compone. La sua utilità sarà quella di determinare l'anatomia dei legamenti umani e favorire la valutazione post-operatoria nella ricostruzione degli stessi.

Sono infatti frequenti gli interventi di ricostruzione dei legamenti del ginocchio che si effettuano ogni settimana presso l'Istituto Ortopedico Rizzoli e presso altre cliniche ortopediche. Nonostante questo tipo di operazioni sia apparentemente semplice, le tecniche di intervento che utilizzano i chirurghi sono varie. Il fatto che non tutti facciano riferimento alla stessa tecnica operatoria è strettamente legato alla scarsa conoscenza anatomica che si ha relativamente ai legamenti. Non è nota, infatti, la relazione che lega struttura e proprietà meccaniche dei legamenti.

Con questo progetto si vuole consentire una valutazione post-operatoria su quali fibre siano le più adatte ad adempire alle funzioni del legamento rotto, se e come varia la struttura del nuovo legamento innestato.

La successione e il contenuto dei capitoli sono così strutturati:

- Il capitolo 1 contiene i principali concetti relativi all'apparato muscolo-scheletrico, in particolare a ginocchio e legamenti.  
Viene poi data una descrizione di quelli che saranno gli obiettivi del progetto.
- Il capitolo 2 illustra le tecniche e i mezzi utilizzati per l'acquisizione e l'elaborazione delle immagini. Presenta in modo dettagliato le considerazioni relative alle tecniche utilizzate e la descrizione del legamento collaterale mediale (LCM) in quanto è quello che utilizzato nello studio.
- Nel capitolo 3 viene descritto passo dopo passo l'algoritmo da me costruito in Matlab e viene realizzata la rappresentazione tridimensionale di alcune fibre di legamento, mediante l'utilizzo del programma Mricro.
- Nel capitolo delle Conclusioni vengono discussi i risultati ottenuti e vengono accennate le prospettive future del progetto.

# Indice

<b>1</b>	<b>Il sistema muscolo-scheletrico</b>	<b>1</b>
1.1	Introduzione . . . . .	1
1.2	L'articolazione del ginocchio . . . . .	2
1.2.1	I legamenti . . . . .	2
1.2.2	I tendini . . . . .	4
1.3	Biomeccanica e trasmissione della forza nei legamenti . . . . .	6
1.4	Obiettivi del lavoro . . . . .	9
<b>2</b>	<b>Materiali e metodi</b>	<b>11</b>
2.1	Introduzione . . . . .	11
2.2	Il legamento collaterale mediale (LCM) . . . . .	11
2.3	Acquisizione dell'immagine . . . . .	13
2.4	Tecniche di elaborazione dell'immagine . . . . .	17
2.4.1	Selezione della Regione di Interesse (ROI) . . . . .	18
2.4.2	Elaborazione morfologica . . . . .	20
2.4.3	Trasformazioni di intensità . . . . .	21
2.4.4	Segmentazione di un'immagine . . . . .	24
<b>3</b>	<b>Elaborazione e Risultati</b>	<b>35</b>
3.1	Introduzione . . . . .	35

---

3.2	Descrizione dell'algoritmo . . . . .	35
3.3	Applicazione dell'algoritmo alle immagini delle sezioni di legamento . . . . .	46
3.4	Rappresentazione tridimensionale . . . . .	51
<b>A</b>	<b>Istituto Ortopedico Rizzoli</b>	<b>57</b>
A.1	Descrizione Struttura . . . . .	57
A.1.1	Divisioni, servizi e dipartimenti. . . . .	60
A.2	Laboratorio di Biomeccanica . . . . .	62
A.3	Laboratorio NaBi . . . . .	63
	<b>Bibliografia</b>	<b>65</b>

# Capitolo 1

## Il sistema muscolo-scheletrico

### 1.1 Introduzione

L'apparato muscolo-scheletrico è altresì chiamato *apparato locomotore*, in quanto ci dà la capacità di poterci spostare da un luogo all'altro e di compiere una vasta gamma di movimenti. È formato da una componente passiva, *l'apparato scheletrico* e da una attiva, *l'apparato muscolare*. Queste due componenti lavorano in sinergia, interagendo continuamente tra di loro al fine di garantire una corretta locomozione. I muscoli infatti ricevono gli stimoli nervosi e li trasferiscono all'apparato scheletrico mediante strutture di tessuto connettivo, i tendini. A loro volta le ossa sono legate tra loro attraverso strutture connettive chiamate legamenti.

L'apparato scheletrico non ha la sola funzione di garantire la locomozione, ma riveste anche un importante ruolo di protezione e sostegno degli organi vitali e di altri tessuti molli, è un'importante riserva di sostanze minerali di vario genere ed infine, è fonte di produzione delle cellule del sangue. Essendo sottoposto continuamente a stress, carichi ed urti, quest'apparato è vittima di una vasta tipologia di traumi, che possono coinvolgere indistintamente le

ossa (fratture), i muscoli (contratture, strappi, stiramenti) e le articolazioni (distorsioni). Questi incidenti possono risultare più frequenti o più importanti se il soggetto è uno sportivo e spesso sono proprio le articolazioni (spalla, anca, ginocchio) ad avere le conseguenze peggiori. Tali traumi possono provocare danni che in alcuni casi richiedono l'intervento della chirurgia, in quanto queste strutture non sempre hanno meccanismi di autoriparazione, specialmente per quel che riguarda i danni ai legamenti.

In questo capitolo si introdurranno i principali concetti di anatomia dell'apparato muscolo-scheletrico, del ginocchio e ci si focalizzerà sulla descrizione dei legamenti e della loro biomeccanica.

## 1.2 L'articolazione del ginocchio

Una delle articolazioni più sollecitate è quella del ginocchio che garantisce la stabilità del corpo durante i movimenti deambulatori e assorbe le sollecitazioni (urti, salti, etc).

Il ginocchio è una struttura complessa, costituita da ossa (femore, tibia e rotula), menischi, legamenti (i cui principali sono i crociati, i collaterali, il patellare e i poplitei), tendini e dalla capsula articolare. Nella maggior parte dei casi, i traumi relativi al ginocchio interessano i legamenti con danni importanti, la cui riparazione richiede l'intervento chirurgico.

### 1.2.1 I legamenti

La funzione principale dei legamenti è quella di tenere legate le ossa e guidare e limitare i movimenti, stabilizzando l'articolazione, al fine di prevenire movimenti anormali durante il moto della stessa e inviare informazioni propriocettive al cervello. La loro struttura è estremamente variabile a se-

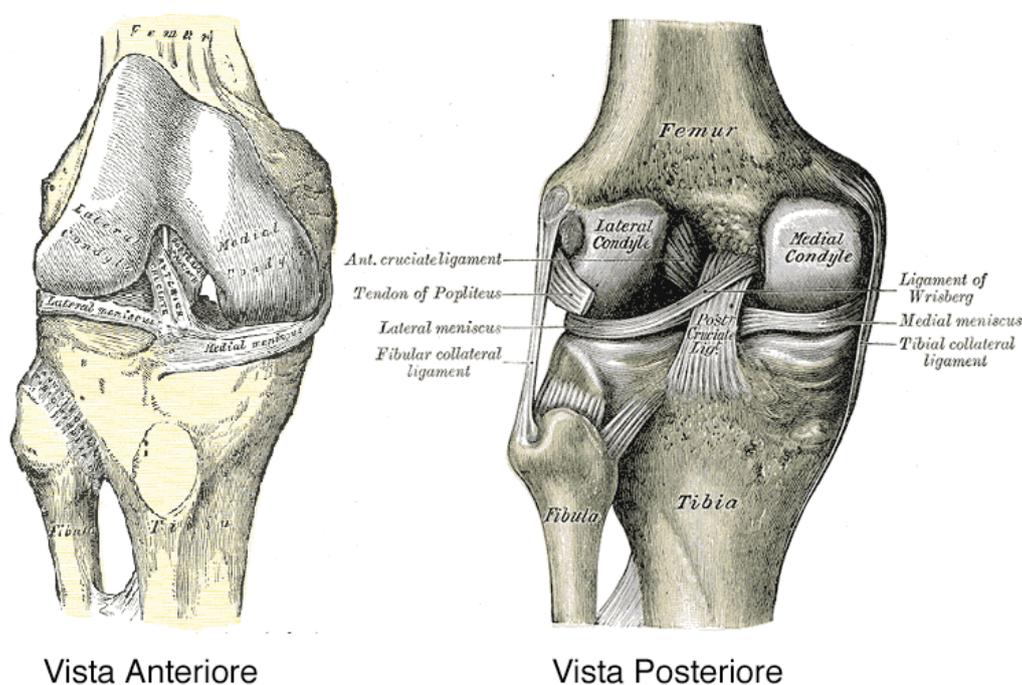


Figura 1.1: Figura del ginocchio aperto in cui si vedono i legamenti interni.

conda della collocazione e funzione che essi hanno (fig. 1.1). I legamenti sono bande dense di collagene che corrono tra le ossa [1]. Nei tessuti ricchi di proteine, proprio come in legamenti e tendini, l'elemento primo strutturale della matrice extra-cellulare è il collagene. Nel caso dei legamenti si tratta di collagene di tipo I. Le fibre di collagene corrono per lo più lungo la direzione longitudinale, parallela all'asse di carico. Altri componenti della matrice extra-cellulare, oltre a collagene e acqua, sono i proteoglicani, varie proteine non collagenose come l'elastina e proteine fibrillari.

I legamenti principali del ginocchio sono quattro: il legamento crociato anteriore (ACL), il legamento crociato posteriore (PCL), il legamento collaterale mediale (MCL) e il legamento collaterale laterale (LCL).

I legamenti crociati sono essenziali per la funzione del ginocchio nella

porzione tibio-femorale. La loro disposizione sembra determinare la forma dell'articolazione tra Femore e Tibia. Sono detti *crociati* poichè si incrociano in corrispondenza del centro del ginocchio [2]. Le funzioni che essi svolgono sono però differenti: il legamento crociato anteriore ha il compito di limitare la rotazione interna della tibia e la tendenza a sublussazione della tibia rispetto al femore, quello posteriore invece ha il compito di stabilizzare il ginocchio e di prevenire lo spostamento posteriore della tibia rispetto al femore (cassetto posteriore) [2]. I due collaterali uniscono, rispettivamente, il femore con tibia e perone, con il compito di impedirne gli spostamenti quando la gamba viene sollecitata verso l'interno o verso l'esterno (stress varo-valgo) [3].

### 1.2.2 I tendini

I tendini sono bande di collagene più rigide rispetto ai legamenti. Essi hanno il compito di collegare muscoli ed ossa e hanno il fondamentale ruolo di trasferire la forza dai muscoli allo scheletro, consentendo il movimento. Per svolgere questo ruolo nel modo ottimale e più efficiente possibile, richiedono una struttura specializzata. È di essenziale importanza che siano in grado di minimizzare la richiesta di energia per i muscoli e di massimizzare l'efficienza durante i movimenti [4]. Per soddisfare entrambe queste richieste è necessario che il materiale che li compone sia forte e rigido sotto le tensioni uniassiali, viscoelastico in ambienti di carico differenti, e flessibile per garantire la funzionalità anche nelle situazioni di pericolo [5].

A partire dagli anni '60 sono stati eseguiti diversi studi *in-vivo* e *in-vitro* per scoprire fino in fondo quali siano le caratteristiche e le proprietà di tendini e legamenti. Tuttavia, nonostante le qualità e le proprietà dei legamenti siano state ben caratterizzate, non è ancora del tutto noto come l'organiz-

zazione e la struttura del materiale che li compone conduca a tali proprietà. Anatomicamente sono strutture estremamente complesse ed hanno la struttura gerarchica del collagene di tipo I. Questa è stata descritta per la prima volta da Kastelic *et al.* nel 1970 [6] e è mostrata nella figura 1.2.

La figura mette in evidenza come i tendini siano costituiti da una o più

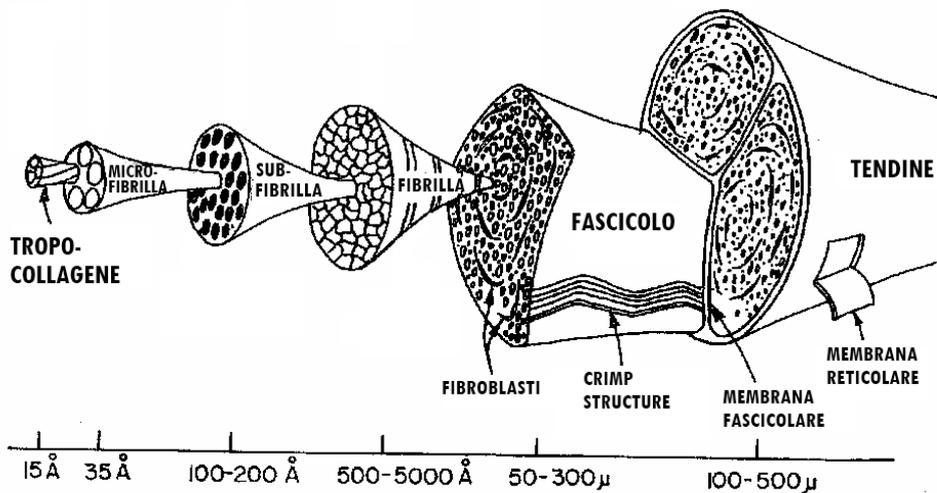


Figura 1.2: Struttura gerarchica di un tendine

sottostrutture, chiamate *fascicoli*, aventi diametro di 80-120  $\mu m$ . Questa suddivisione in segmenti consente una diffusione maggiore del nutrimento all'interno del tendine stesso. I fascicoli si presentano come dei cilindri simmetrici che racchiudono *fibre* di collagene con andamento planare a zig-zag (*crimp pattern*). Ogni fibra ha un diametro che varia da 500-5000 Å. Le fibre non rappresentano il livello gerarchico inferiore ma sono a loro volta formate da lunghe strutture filamentose, le *subfibrille*. Ciascuna di esse è costituita da unità di *microfibrille*. Queste hanno un diametro di circa 35 Å ma la loro

lunghezza è ancora indefinita. Il livello ultimo della scala gerarchica, è rappresentato dal *tropocollagene*. Più precisamente, 5 unità di tropocollagene costituiscono una microfibrilla. Ulteriori dettagli riguardo l'organizzazione del tropocollagene in macrostrutture sono ancora oggi oggetto di ricerca.

### 1.3 Biomeccanica e trasmissione della forza nei legamenti

La biomeccanica è l'applicazione principale dell'ingegneria nello studio delle forze e del moto di sistemi biologici. I movimenti del ginocchio sono governati dai suoi legamenti, da vincoli geometrici sulle superfici, dai muscoli e da altre strutture di supporto. Il ginocchio ha 6 gradi di libertà: 3 rotazioni e 3 traslazioni. Le traslazioni avvengono lungo i tre assi: Proximale-Distale (la Tibia), Mediale-Laterale (l'Epicondilo) e Anteriore-Posteriore (l'Antero-posteriore). I legamenti provvedono a mantenere la stabilità rispetto a più di un grado di libertà. I legamenti del ginocchio hanno il compito di garantire la normale cinematica dell'articolazione, ossia provvedere alla stabilità. Sono unicamente tessuti connettivi e il comportamento meccanico del tessuto connettivo dipende dalla composizione e dall'organizzazione del collagene. Studi *in vivo* [17] hanno dimostrato che con la crescita e lo sviluppo, anche la lunghezza e la larghezza delle fibre variano:

- nella tappa fetale le fibre di collagene sono sovrapposte ed intrecciate, e terminano con biforcazioni/fusioni;
- successivamente iniziano ad esser più chiaramente visibili i fasci;
- nel tessuto adulto il collagene si presenta altamente organizzato ma compaiono ancora regioni la cui organizzazione è casuale;

- nel tessuto maturo non sono più visibili le terminazioni di fibre, ciò significa che le fibre di tendini e legamenti sono continue e dunque che la trasmissione della forza avviene in modo diretto tra fibre e ossa, a prescindere dai ponti di proteoglicani.

Per capire i meccanismi di trasmissione della forza, occorre conoscere come è organizzato il tessuto maturo: con lo sviluppo si può verificare la fusione di fibre adiacenti, col conseguente aumento di diametro [11], di fibre consecutive che portano all'aumento di lunghezza [10], o di entrambi. Presumibilmente queste biforcazioni/fusioni servono a connettere le fibrille, al fine di trasferire la forza. Esaminando l'organizzazione delle fibrille di collagene si nota che vi sono regioni in cui sono ben allineate, parallele all'asse del tessuto e che contengono qualche fibra intrecciata, altre aree in cui l'organizzazione è ancora casuale. Da questo intreccio naturale sembra ragionevole che le fibrille interconnesse contribuiscano alla trasmissione della forza e all'integrità del tessuto. La non uniformità di quest'ambiente, comporta carico e distorsioni cellulari non lineari. I dati dimostrano inoltre che le fibrille non sopportano il carico con uniformità, ma che sono caricate a differenti gradi e slittano le une sulle altre.

Inoltre il *crimp pattern* delle fibrille fa in modo che una forza di trazione maggiore, coinvolga un numero maggiore di fibrille, che saranno in grado di sopportare il carico (fig. 1.3). Quando un legamento è soggetto a tensione, risponde con una elongazione non lineare [19] (fig. 1.4).

La non linearità della curva di deformazione al carico è dovuta all'elevata quantità di piegature delle fibrille: un aumento di fibrille provoca una maggiore deformazione alla trazione, ma provoca anche un aumento della rigidità del tessuto [20]. Quando il ginocchio è sottoposto a carichi eccessivi le proprietà non lineari aiutano i legamenti a difendere e proteggere l'articolazione.

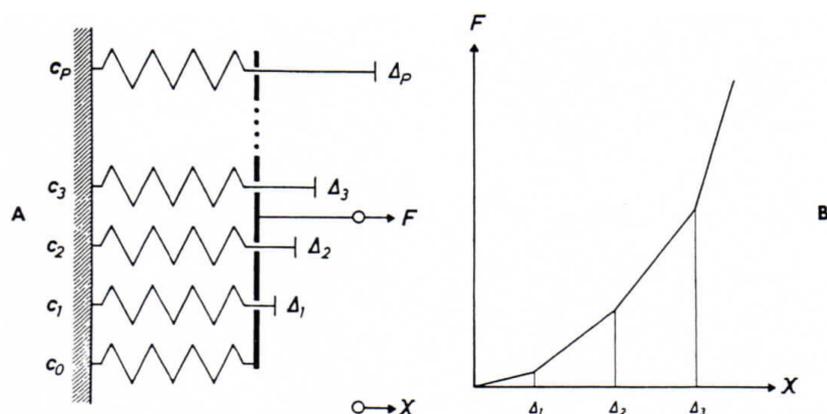


Figura 1.3: A: Modello di elasticità non lineare basato sul reclutamento progressivo dei singoli componenti elastici. B: Curva non lineare di carico-deformazione. (From [20].)

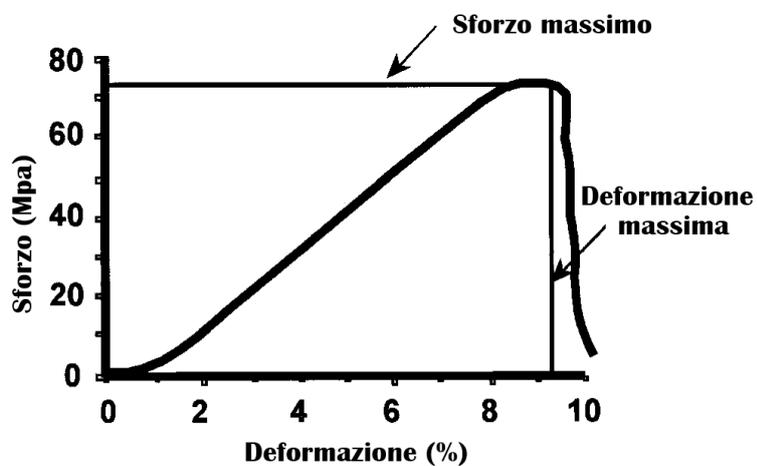


Figura 1.4: Curva sforzo-deformazione risultante da prove di trazione di un legamento.

Un moto eccessivo è limitato dall'aumento di rigidità.

## 1.4 Obiettivi del lavoro

L'obiettivo del mio lavoro è stato quello di creare un programma Matlab(R) (R2009b, MathWorks inc., ) che fosse in grado di elaborare l'immagine di una sezione di legamento, riconoscendo i singoli fascicoli e ricostruendone, se possibile, la struttura tridimensionale. Questo permetterà di avere un modello preciso di come sono strutturati e orientati i fascicoli di un legamento e permetterà di testarne le proprietà biomeccaniche, al fine di osservare la relazione che intercorre tra struttura e proprietà.

Al momento gli interventi ai legamenti vengono fatti con diverse tecniche, a seconda di ciò che ritiene migliore il chirurgo stesso. Alcuni operano la sostituzione del crociato, ad esempio, con fibre prelevate dalla zampa d'oca del paziente stesso, altri le prelevano dal tendine rotuleo. Altre tecniche si basano sulla sostituzione con legamenti presi da banca, vale a dire da cadaveri, oppure da animali, in primis mucche. Con questo progetto sarà possibile, effettuando delle micro-tomografie computerizzate ( $\mu TC$ ), verificare come si comporta il nuovo legamento innestato. Le fibre prese dal tendine rotuleo, dopo l'innesto, si trasformano in crociato a tutti gli effetti? E quelle prelevate dalla zampa d'oca invece? Sono queste domande che oggi non hanno ancora una risposta poiché ancora non si sa se questi nuovi legamenti trasformino la propria struttura al fine di adempire completamente al loro nuovo ruolo e alla loro funzione. Sarà così possibile effettuare sia test biomeccanici che confrontino le diverse proprietà dei legamenti e dei tendini, sia effettuare monitoraggi post-operatori, al fine di confrontare tutte queste tecniche e valutare quale sia effettivamente la migliore.



# Capitolo 2

## Materiali e metodi

### 2.1 Introduzione

Dopo aver illustrato nel capitolo precedente le strutture fondamentali del sistema muscolo-scheletrico, si passerà ad analizzare, in questo capitolo, gli strumenti che sono stati utilizzati per lo sviluppo degli algoritmi di segmentazione. In particolare verranno descritti il Legamento Collaterale Mediale (LCM) del ginocchio umano, gli strumenti hardware e software utilizzati e verranno analizzati in dettaglio gli algoritmi che le tecniche di elaborazione computerizzata mettono a disposizione per segmentare le immagini digitali.

### 2.2 Il legamento collaterale mediale (LCM)

Il Legamento Collaterale Mediale (LCM) è così chiamato in quanto collega il condilo mediale femorale alla Tibia [21] (fig. 2.1). La sua inserzione superiore è a livello della parte posteriore dell'epicondilo mediale, mentre quella inferiore si trova dietro la zona di inserzione dei muscoli della zampa d'oca. La sua funzione è quella di impedire gli stress in varo-valgo durante

l'estensione. Esso infatti, come il legamento collaterale laterale (esterno), è teso durante l'estensione e rilassato durante la flessione. Il LCM è anatomicamente divisibile in 3 livelli, o strati, indicati con numeri romani dal più superficiale al più profondo [7].

Più precisamente si identificano uno strato superficiale e uno profondo e quest'ultimo si divide a sua volta in due porzioni: la menisco-femorale e la menisco-tibiale, che scorrono rispettivamente dal menisco al femore e dal menisco alla tibia.

A metà del suo decorso, le fibre più profonde si attaccano saldamente al menisco mediale. Frequentemente, negli sport, si verificano incidenti che determinano lesioni al LCM, essendo questo legato al menisco, tali traumi comportano il danneggiamento anche del menisco mediale.

Nella sezione posteriore mediale del ginocchio, nel II livello troviamo le fibre posteriori oblique del LCM, che si vanno a fondere con quelle del livello sottostante per circa 1-2 cm. Questi due strati possono essere facilmente separati all'altezza della loro regione mediana. Tra loro scorrono i due tendini *gracile* e *semitendinoso* che si sovrappongono all'attacco tibiale del LCM superficiale.

Le fibre profonde del LCM nel III livello corrono parallele al Legamento Crociato Anteriore (LCA) quando il ginocchio è esteso, mentre quando è flesso l'inserzione femorale del legamento si sposta più avanti cosicché le fibre del legamento si dispongono perpendicolarmente al piatto tibiale.

Le fibre della sezione superficiale del LCM corrono parallele a quelle presenti nel II livello sull'estremità mediale. Durante la flessione esse restano perpendicolari alla superficie articolare della Tibia e si spostano posteriormente sulla Tibia appena il Femore ruota posteriormente. In posizione di flessione le fibre anteriori del legamento si tendono, mentre le posteriori si rilassano.

Warren [8], ha dimostrato che le fibre di questo strato reagiscono differenzialmente alla stessa tensione, e che quindi questo legamento non può essere trattato come una unità singola omogenea. Ad esempio, quando si sottopone il ginocchio a una flessione di 75-105°, le fibre anteriori aumentano la tensione mentre quelle posteriori si rilassano. Quando il ginocchio si flette, il femore e il LCM superficiale scorrono posteriormente sulla tibia, aiutando a mantenere una tensione più uniforme delle fibre.

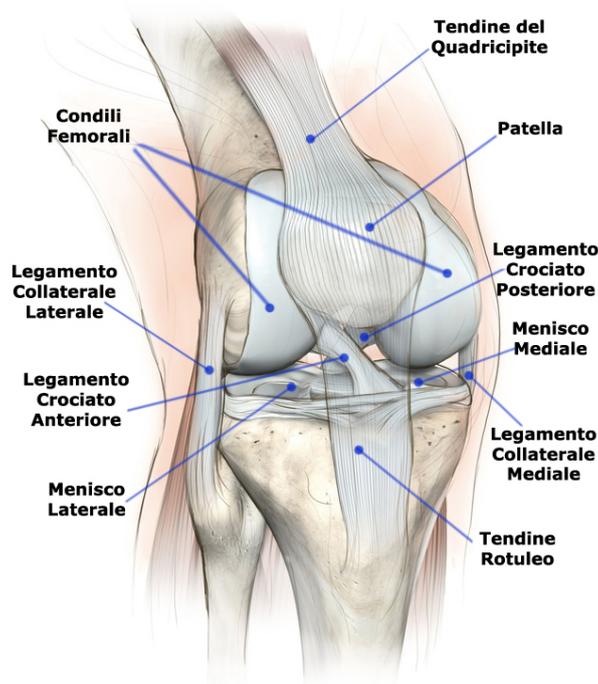


Figura 2.1: Legamento collaterale mediale e le strutture ad esso collegate.

## 2.3 Acquisizione dell'immagine

Il campione di LCM utilizzato proviene da sezioni trasverse della sezione centrale di un legamento di cadavere di ginocchio umano che è stato sezionato

con un microtomo e fissato in una serie di vetrini per analisi di microscopia ottica presso il Dipartimento di Anatomia dell'Università di Bologna. Per effettuare le analisi digitali delle immagini sono state prese 3 sezioni consecutive di legamento e sono state digitalizzate con l'uso di uno scanner ottico di tipo commerciale (fig. 2.2).



Figura 2.2: Foto dello scanner EPSON Expression 1640XL che ho utilizzato per acquisire le immagini.

Dato che queste macchine hanno raggiunto alti livelli di risoluzione spaziale possono, in casi particolari, competere con i microscopi ottici e hanno il vantaggio di essere economici e avere una vasta gamma di opzioni di acquisizione delle immagini.

Lo scanner utilizzato (EPSON Expression 1640XL) è provvisto di due modalità di acquisizione (fig. 2.3): riflessione e trasmissione. Dato che l'oggetto da acquisire era un campione anatomico fissato su vetrino, si è deciso che fosse più conveniente fare un'acquisizione in trasmissione.

Sebbene lo scanner avesse una risoluzione massima di 12800 dpi (dots per inch) si è valutato che per rendere evidenti le caratteristiche salienti dei fascicoli di legamento fosse sufficiente una risoluzione più bassa. Per questo

motivo le sezioni anatomiche sono state acquisite con una risoluzione di 2400 dpi (fig. 2.4, 2.5, 2.6), che garantiscono comunque una dimensione di pixel di  $10\mu m$  che è eccellente per lo scopo di questo lavoro.

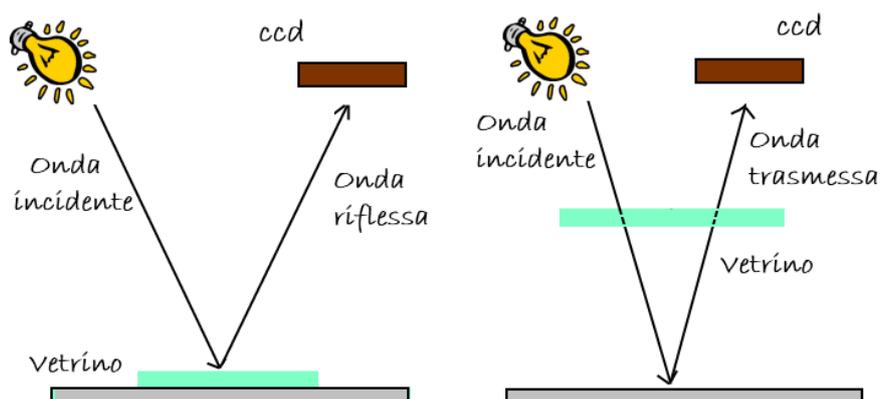


Figura 2.3: Principi di riflessione e trasmissione.

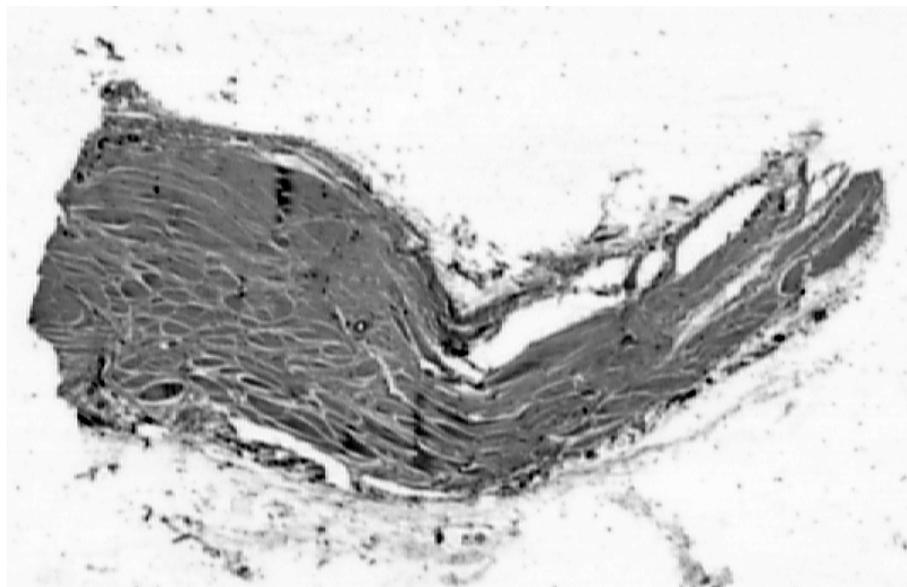


Figura 2.4: Prima sezione di LCM a 2400 dpi.

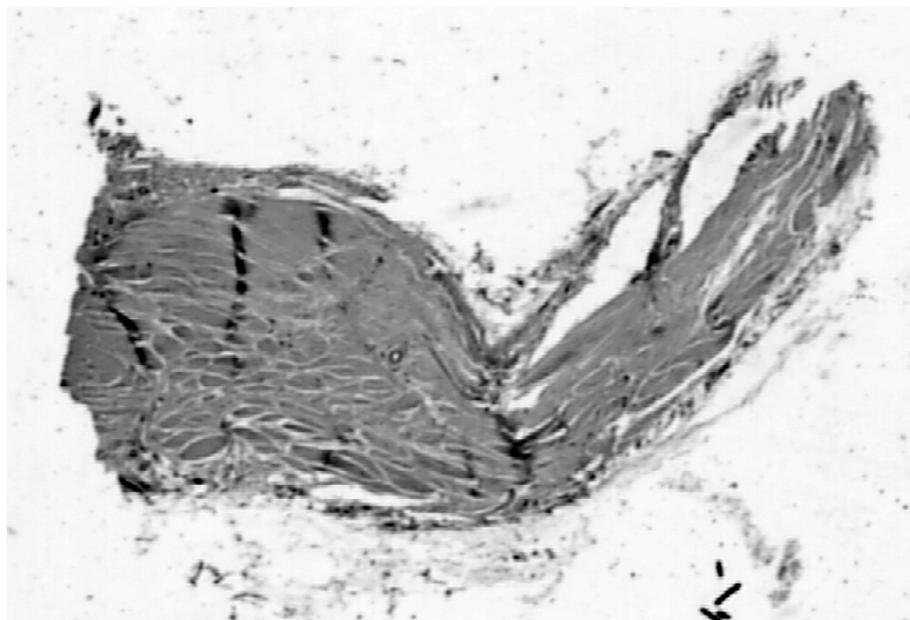


Figura 2.5: Seconda sezione di LCM a 2400 dpi.

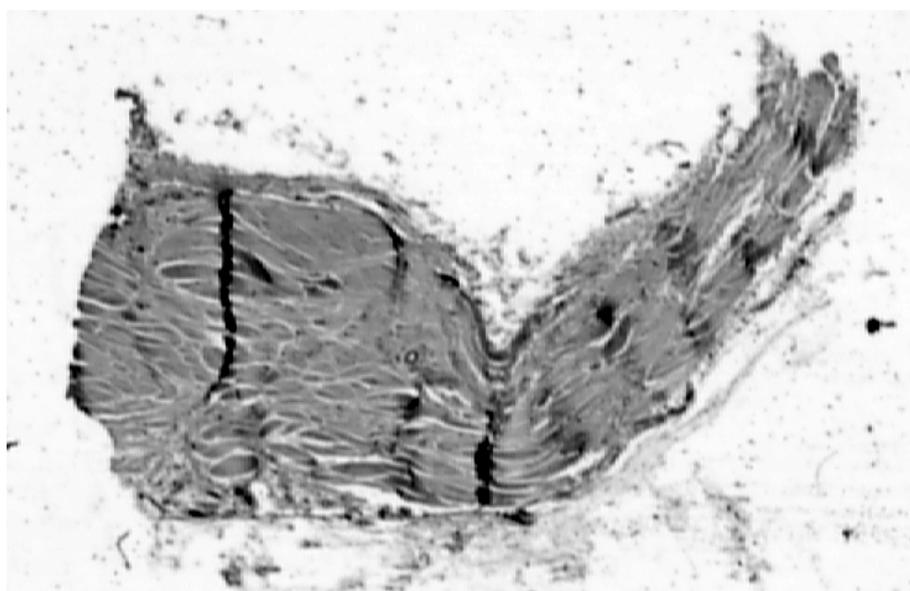


Figura 2.6: Terza sezione di LCM a 2400 dpi.

## 2.4 Tecniche di elaborazione dell'immagine

L'obiettivo del mio lavoro è quello di creare un programma Matlab (Mathworks Inc., USA) che sia in grado di identificare e separare le varie fibre di un legamento, avendo come immagine di partenza la scansione di una sezione dello stesso.

Parallelamente allo sviluppo degli algoritmi in Matlab, sono state fatte alcune prove utilizzando un programma di elaborazione di immagini open source, ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA), in modo da capire quali procedure fossero le più efficaci per la segmentazione delle immagini: riduzione del rumore, miglioramento del contrasto, filtraggio, analisi morfologica.

Il corpo principale delle elaborazioni è stato fatto in Matlab, un programma di calcolo ad alto livello unito a un ambiente interattivo che consente di sviluppare algoritmi e analizzarne le prestazioni più rapidamente rispetto ai linguaggi di programmazione tradizionali come C, C++ e Fortran.

Per fare la visualizzazione tridimensionale mi sono servita invece del programma MRICRO. Esso è un'applicazione che viene utilizzata per visualizzare immagini provenienti da una vasta gamma di dispositivi di acquisizione di immagini. E' molto usato per la visualizzazione di immagini mediche, in particolar modo cerebrali, e con i suoi strumenti permette di selezionare regioni di interesse (ad esempio lesioni) molto utili.

Con questi strumenti le immagini sono state elaborate utilizzando differenti approcci che vanno dalle elaborazioni morfologiche (ricostruzione, watershed), a quelle di trasformazioni di intensità globale e locale [18]. La via principale che ho scelto per le elaborazioni è quella della analisi morfologica,

ossia quell'insieme di tecniche di elaborazione che analizzano le proprietà degli oggetti in una immagine sulla base della loro forma. Dato che i fascicoli hanno una struttura ben definita è sembrato naturale esplorare e utilizzare questo tipo di tecniche.

### 2.4.1 Selezione della Regione di Interesse (ROI)

Osservando le figure 2.4, 2.5 e 2.6, si nota che l'acquisizione delle immagini ha una risoluzione sufficiente per evidenziare i dettagli oggetto dello studio, ma è molto rumorosa. Una risoluzione molto buona rende infatti evidenti tutti i dettagli presenti nel vetrino, compresi polveri e altre tracce che però non sono importanti per l'obiettivo del lavoro ma, al contrario, rischiano di comprometterlo.

Ho ritenuto dunque opportuno, come prima cosa, ripulire le immagini da tutte quelle parti che non forniscono informazioni utili per il raggiungimento degli obiettivi. Tale operazione corrisponde a selezionare una ROI (Region Of Interest).

Per selezionarla ho creato una funzione, *GetROI*, che azzerà tutti i pixel che si riferiscono a strutture che non interessano il lavoro e lascia inalterati gli altri.

La ROI viene selezionata attraverso due passaggi. Il primo esegue una operazione di sogliatura globale dell'immagine utilizzando l'algoritmo di Otsu [22] e successivamente viene fatta una selezione sulla base dell'area delle *regioni connesse* sopravvissute che non sono state tagliate dalla sogliatura.

Una regione connessa è un insieme di pixel che sono vicini e condividono una certa proprietà. Nel caso particolare della sogliatura, la proprietà accmunante è che il valore dei pixel sia diverso da zero. Il termine "vicino" può avere differenti significati e deve essere specificato prima di poter effettua-

re una operazione morfologica su una immagine. In generale la connessione è definita attraverso una matrice, detta *elemento strutturale*, che definisce quali pixel devono essere considerati vicini e quali no. I tipi più utilizzati di elementi strutturali sono quelli 4-connessi e 8-connessi (fig. 2.7). A titolo di esempio nel caso di 4-connessione se  $p_{ij}$  è un pixel dell'immagine, i suoi vicini connessi, indicati con  $(N_4)_p$ , sono i pixel  $p_{i-1j}$ ,  $p_{ij+1}$ ,  $p_{i+1j}$  e  $p_{ij-1}$ . La 8-connessione  $(N_8)$  considera tutti i pixel che circondano il pixel centrale, come mostrato in figura 2.7C. Per poter maneggiare le regioni connesse ri-

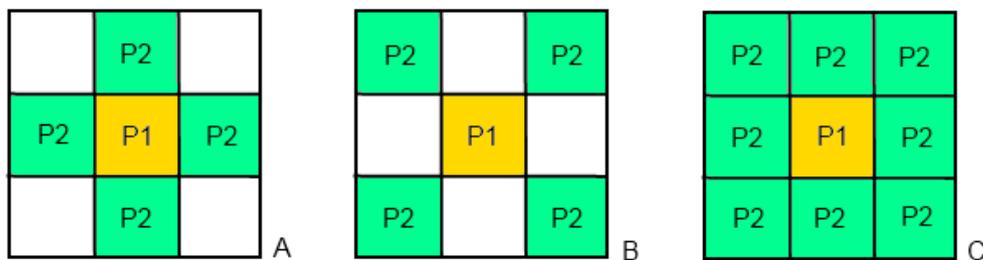


Figura 2.7: Esempi di elementi strutturali con differenti configurazioni. A:  $N_4$ , pixel 4-connessi; B:  $N_{4d}$ , pixel diagonalmente 4-connessi; C:  $N_8$ , pixel 8-connessi.

sultanti dalla sogliatura, si è proceduto a distinguerle assegnandole loro un numero (*label*), tramite la funzione Matlab *bwlabel* utilizzando un elemento strutturale 8-connesso. Per ogni regione è stata, quindi, determinata l'area, in pixel, da essa occupata.

Osservando le immagini delle sezioni risulta evidente che i gruppi di pixel sullo sfondo sono delle “macchie” che nulla hanno a che vedere con la sezione del legamento e sono perciò rumore. La funzione *getROI* identifica, quindi, la regione di area massima e azzerava tutte le altre, selezionando, così la ROI (fig. 2.8).

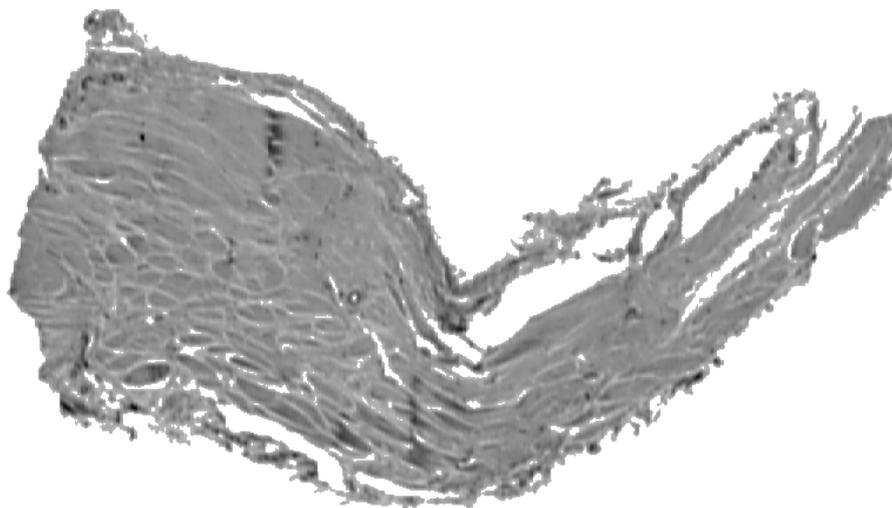


Figura 2.8: Region of Interest

### 2.4.2 Elaborazione morfologica

Una volta selezionata la ROI ho provato ad applicare tecniche morfologiche per separare le fibre del legamento nell'immagine. L'elaborazione morfologica mette a disposizione operazioni di *erosione* e *dilatazione* e quindi *apertura* e *chiusura* [23].

Queste operazioni si applicano di solito a immagini di tipo binario, ossia costituite da pixel di intensità zero, o uno. Dato che queste operazioni sono di tipo morfologico, hanno bisogno di definire un elemento strutturale, come spiegato precedentemente. Dunque, se  $A$  è un'immagine e  $B$  è l'elemento strutturale, l'operatore di erosione è definito come:

$$A \ominus B = \{z | (B)_z \cap A^c \neq \emptyset\}. \quad (2.1)$$

Quello che in pratica fa una erosione è “erodere” il numero di pixel “bianchi” e aumentare quelli nulli. Una dilatazione esegue l'operazione complementare, ossia:

$$A \oplus B = \{z \mid (\widehat{B})_z \cap A \neq \emptyset\} \quad (2.2)$$

e, in pratica, erode le regioni nere dilatando quelle bianche. Alle operazioni di erosione e dilatazione sono collegate le operazioni di apertura e chiusura. Esse sono definite come una successione di erosioni e dilatazioni. L'apertura è definita come:

$$A \circ B = (A \ominus B) \oplus B \quad (2.3)$$

mentre la chiusura è data da:

$$A \bullet B = (A \oplus B) \ominus B \quad (2.4)$$

L'uso di queste operazioni applicate alle immagini avrebbe dovuto permettere una separazione tra le fibre. Tuttavia, anche cambiando gli elementi strutturali, non si sono avuti risultati soddisfacenti, dato che o le fibre non venivano separate a sufficienza, oppure risultavano troppo frammentate. Data la struttura delle immagini ho ritenuto opportuno, quindi, continuare sulla strada dell'elaborazione morfologica, riadattando però l'immagine in modo da rendere più evidenti quelle caratteristiche alle quali le tecniche morfologiche sono sensibili e tornare poi a riapplicare gli algoritmi morfologici.

### 2.4.3 Trasformazioni di intensità

Per poter rendere più esplicite le proprietà morfologiche delle immagini, la via che ho scelto è stata quella di modificare opportunamente i contrasti tra i pixel, utilizzando tecniche di trasformazione di intensità. Queste tecniche agiscono sull'istogramma delle immagini. Un istogramma è una rappresentazione grafica che mette in relazione i livelli di grigio con le rispettive

occorrenze all'interno di un'immagine. Quindi, ogni immagine ha associato ad essa un istogramma.

Le funzioni, già predefinite in Matlab, alle quali sono ricorso sono: *imadjust* e *histeq*.

*Imadjust* permette di passare dal numero di livelli di grigio originale dell'immagine ad un altro intervallo di livelli di grigio. Ciò consente lo *stretching* dei livelli, migliorando il contrasto dell'immagine. Tale tecnica è così chiamata in quanto espande la distribuzione dei livelli di grigio su un intervallo più ampio.

*Histeq* effettua l'equalizzazione dell'istogramma, ossia modifica i livelli di grigio per ottenere un'immagine avente un istogramma uniforme, eguagliando il più possibile il numero di occorrenze per ogni livello di grigio. Anche in questo modo si dovrebbe ottenere un miglioramento del contrasto.

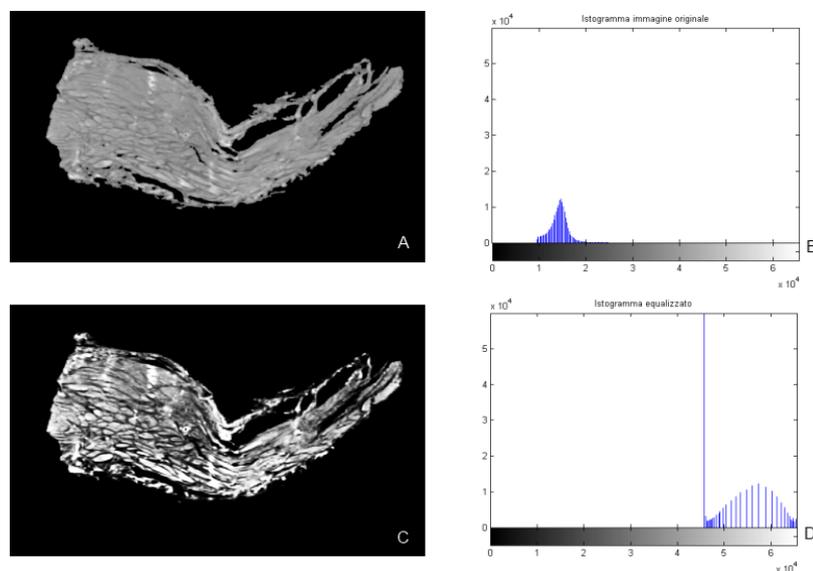


Figura 2.9: A. Immagine originale, B. Istogramma immagine originale, C. Immagine globalmente equalizzata, D. Istogramma globalmente equalizzato.

Il risultato dell'equalizzazione globale non è però stato soddisfacente, dato che livelli non si sono ben distribuiti (fig. 2.9).

Dato che le tecniche di elaborazione globale non hanno funzionato come si sperava, ho deciso di utilizzare una analisi locale delle proprietà dei pixel delle immagini. In particolare ho implementato una funzione (*localeq*) che permettesse di effettuare una equalizzazione locale dei pixel basata sulla distribuzione dei livelli in un intorno di ciascun pixel delle immagini. Questa funzione scandisce un'immagine e per ogni pixel determina l'istogramma di un intorno, le cui dimensioni sono passate come parametro di ingresso. Ogni intorno viene quindi equalizzato e il nuovo valore del pixel centrale dell'intorno viene riassegnato all'immagine. Con questa tecnica ho ottenuto un significativo miglioramento dell'immagine e l'istogramma è risultato ben distribuito su tutto l'intervallo dei livelli, come mostrato dal confronto tra equalizzazione globale e locale in figura 2.10.

Dato che l'equalizzazione locale dipende dalla dimensione dell'intorno considerato per ogni pixel, ho effettuato varie prove per capire quali sono le prestazioni di questo algoritmo e quale è la dimensione ottimale dell'intorno. Per fare questo ho proceduto a equalizzare localmente l'immagine variando la dimensione dell'intorno come mostrato nelle figure 2.11.

Confrontando le immagini ottenute, si nota che aumentando la dimensione dell'intorno, aumenta anche la *granulosità* dell'immagine, ossia i singoli pixel tendono a scomparire e a fondersi, formando grani di dimensioni sempre maggiori. Dal confronto si è ritenuto opportuno procedere l'elaborazione con l'immagine equalizzata con finestra 27x27, in quanto era la giusta via di mezzo per ottenere fibre sufficientemente separate e distinte, evitando un aumento eccessivo della granulosità.

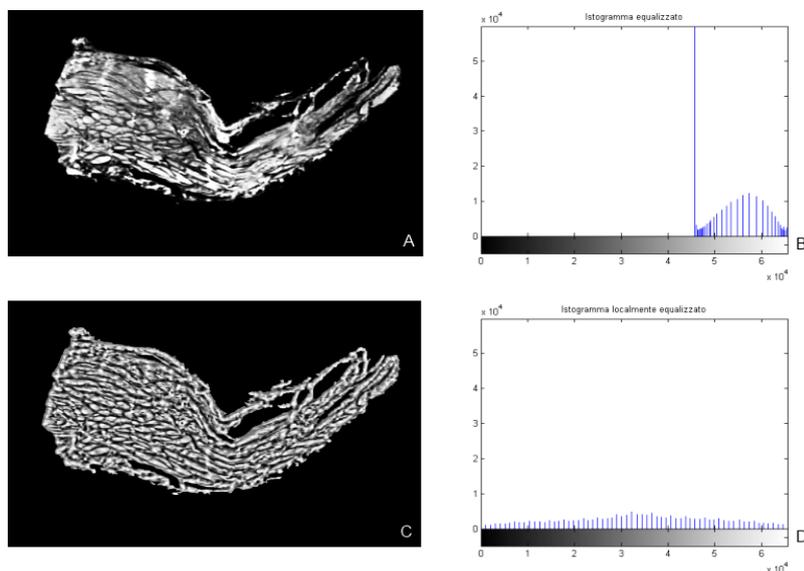


Figura 2.10: A. Immagine globalmente equalizzata, B. Istogramma globalmente equalizzato, C. Immagine localmente equalizzata, D. Istogramma localmente equalizzato.

#### 2.4.4 Segmentazione di un'immagine

Una volta effettuate le trasformazioni di intensità utili a pre-elaborare l'immagine e mettere in risalto gli elementi interessanti, ho proceduto ad analizzare le tecniche di segmentazione per estrarre le fibre. Gli algoritmi di segmentazione si basano su due proprietà fondamentali delle immagini: *discontinuità* e *somiglianze*.

Gli algoritmi che si basano sulle *discontinuità* sono sensibili alle brusche variazioni di intensità, ciò porta a suddividere le immagini in regioni basandosi sui contorni.

Quelli basati sulle *somiglianze* partizionano le immagini in regioni *simili*, secondo dei criteri predefiniti.

Sfruttano queste proprietà le tecniche di *Sogliatura* e di *Watershed*.

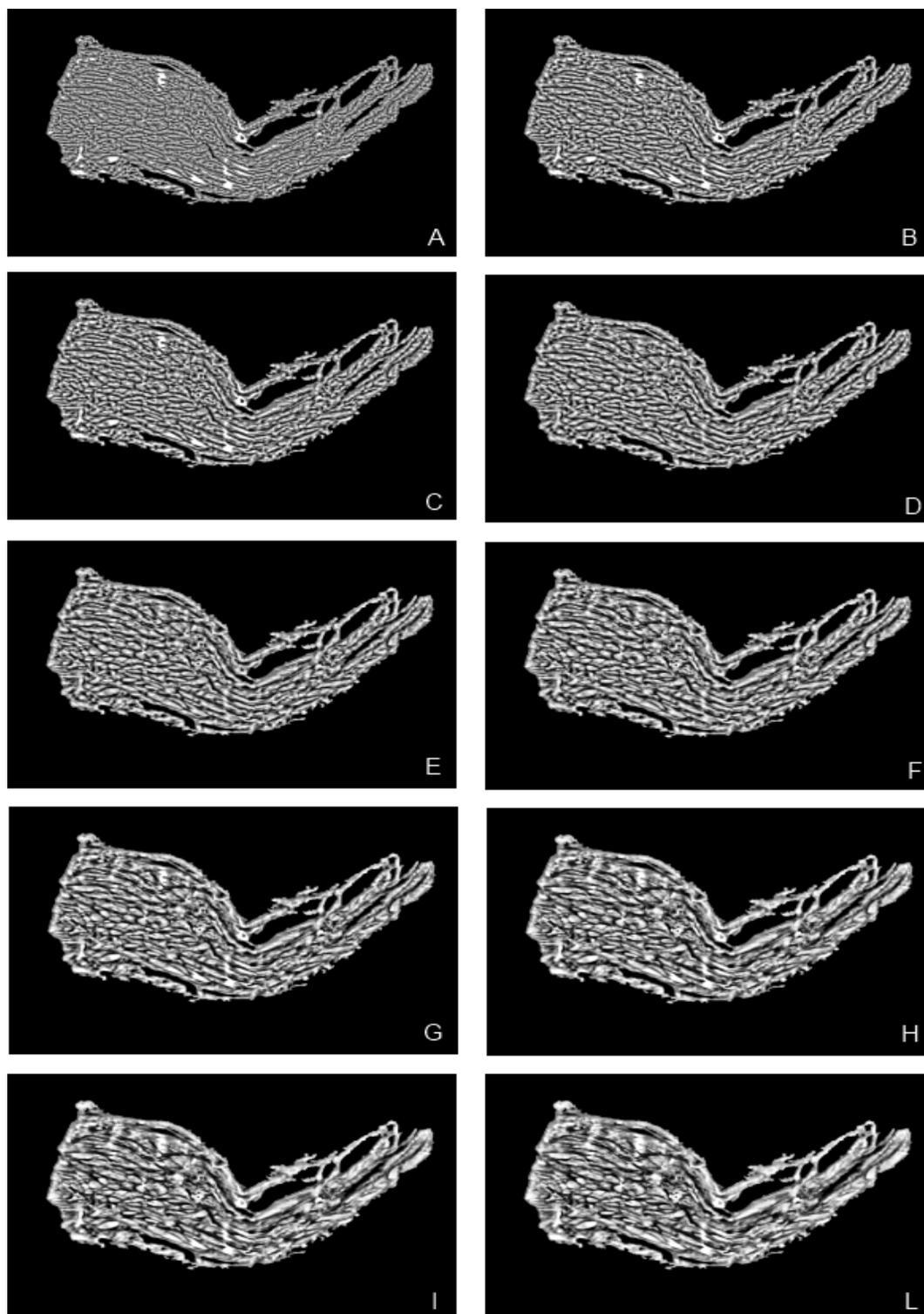


Figura 2.11: Equalizzazione locale: A con intorno di dimensioni 7x7 pixel, B intorno 13x13 pixel, C intorno 17x17 pixel, D intorno 23x23 pixel, E intorno 27x27 pixel, F intorno 31x31 pixel, G intorno 35x35 pixel, H intorno 41x41 pixel, I intorno 51x51 pixel, L intorno 61x61 pixel.

**Sogliatura** Consiste nel segmentare una immagine selezionando gli oggetti sulla base della somiglianza tra livelli di grigio. Si basa sull'ipotesi che oggetti simili hanno livelli di grigio simili. Esistono diverse tecniche di sogliatura le più famose delle quali sono quella di *Otsu* [22] già utilizzata nella selezione della ROI o quella del *k-mean* [18].

La funzione predefinita in Matlab per la sogliatura (*graythresh*) è basata sull'algoritmo di Otsu ed è questa che ho utilizzato per fare le prove di segmentazione tramite sogliatura globale.

Tuttavia, come discusso nella sezione riguardante l'equalizzazione, il principio della sogliatura globale non è adattabile alle immagini che ho studiato, dato che molto dipende dalle proprietà locali dell'immagine. Ho deciso, quindi, di esplorare il campo delle sogliature locali, in modo da selezionare le fibre non solo in base ai loro livelli di grigio, ma anche in base alla posizione sull'immagine stessa.

Ho creato dunque una funzione (*localthreshold*) che calcola la sogliatura locale su un intorno di ogni pixel analogamente a quanto fatto per l'equalizzazione locale. Per ogni intorno viene quindi definita una soglia che viene applicata al pixel centrale, che viene così mantenuto o cancellato. Le sogliature locali che ho preso in considerazione sono 3:

- *niblack*: la soglia è definita sulla base della varianza della distribuzione dei pixel nell'intorno [24]
- *mean*: la soglia è definita usando l'intensità media dei pixel nell'intorno [18]
- *balanced*: determina la soglia guardando al baricentro della distribuzione dei pixel nell'intorno.

L'effettivo miglioramento dell'uso della sogliatura locale rispetto a quella globale è ben mostrato nella figura 2.12.

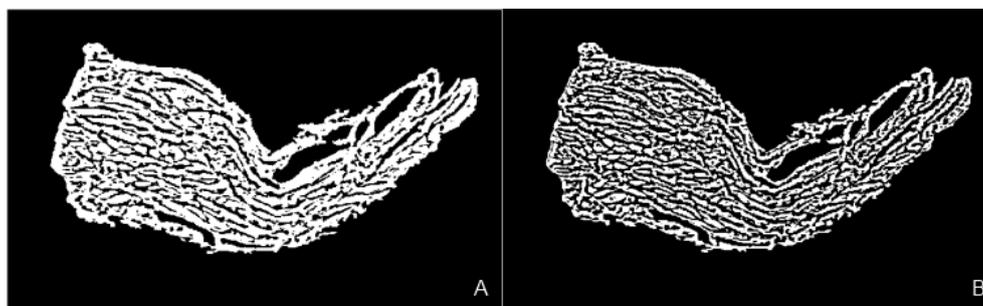


Figura 2.12: A: Sogliatura globale (Otsu), B: Sogliatura locale (Niblack).

**Watershed** L'altro metodo di segmentazione che ho considerato è quello del *watershed*. Questa tecnica ipotizza che una immagine sia analoga ad un terreno dove l'altitudine dei rilievi sia data dall'intensità dei livelli di grigio. Supponendo che su questo terreno inizi a cadere della pioggia, l'acqua si andrà ad accumulare all'interno di bacini di raccolta costituiti dalle regioni in cui sono presenti dei minimi locali dei livelli di grigio. La modalità di salita dell'acqua all'interno delle pozze è stabilita dalle connessioni che sono definite tra i pixel, come spiegato sopra. Mano a mano che il livello dell'acqua sale, le diverse pozze iniziano ad entrare in contatto. Per evitare la fusione delle pozze si immagina di costruire uno spartiacque (*watershed* in inglese) che mantenga separate le acque. Contando il numero di pozze è possibile assegnare un'etichetta (*label*) ad ognuna di esse, così da riconoscere ogni elemento dell'immagine e poterlo maneggiare.

Il problema principale di questa tecnica è che per ogni minimo viene generato un oggetto, causando una eccessiva segmentazione (*over segmentation*)

(fig. 2.13).

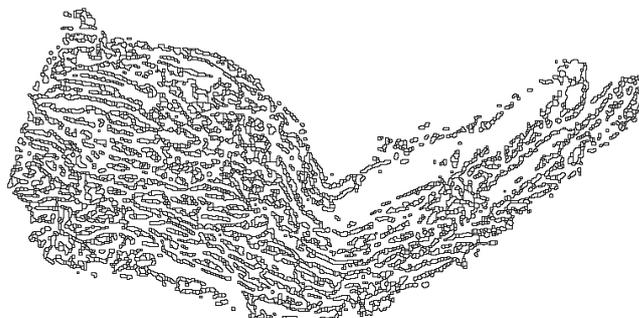


Figura 2.13: Esempio di immagine over-segmentata.

Per evitare ciò si utilizzano diverse tecniche che “semplificano” l’immagine e diminuiscono le pozze dalle quali si formano gli spartiacque. Alcune di queste tecniche prevedono la modifica dell’immagine sulla base dell’aumento del contrasto dei contorni degli oggetti. Per questo motivo ho studiato due tecniche che producono un aumento del contrasto ai bordi degli oggetti: la distanza morfologica e il gradiente.

#### *Distanza morfologica*

La distanza morfologica si applica a immagini binarie e definisce la distanza di ogni pixel bianco (1) dal più vicino pixel nero (0), come mostrato nell’esempio (fig. 2.14). Il risultato dell’applicazione della distanza morfologica dopo aver applicato una equalizzazione locale e una sogliatura per binarizzare l’immagine della sezione di legamento è mostrata nella figura 2.15.

Applicando il watershed a questa immagine si ottiene come risultato una decisa diminuzione dell’over segmentation, come mostrato in figura 2.16.

Tuttavia molte fibre restano ancora escluse da una corretta segmentazione e altre risultano inopportunamente spezzate.

0	0	1	1	1
0	0	1	1	1
1	1	1	1	1
1	1	1	1	1
1	0	0	0	1

A

1	1	0	0	0
1	1	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	1	1	1	0

B

0.00	0.00	1.00	2.00	3.00
0.00	0.00	1.00	1.00	1.00
1.00	1.00	1.41	2.00	2.24
1.41	1.00	1.00	1.00	1.41
1.00	0.00	0.00	0.00	1.00

C

Figura 2.14: A: Matrice di un'immagine binaria. B: Complementare della matrice originale. C: Distanza morfologica.

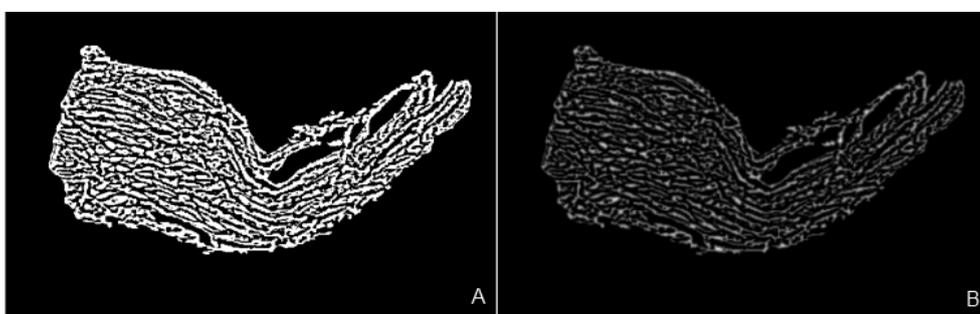


Figura 2.15: A: Sogliazione locale (Niblack) con finestra 27x27. B: Distanza morfologica.

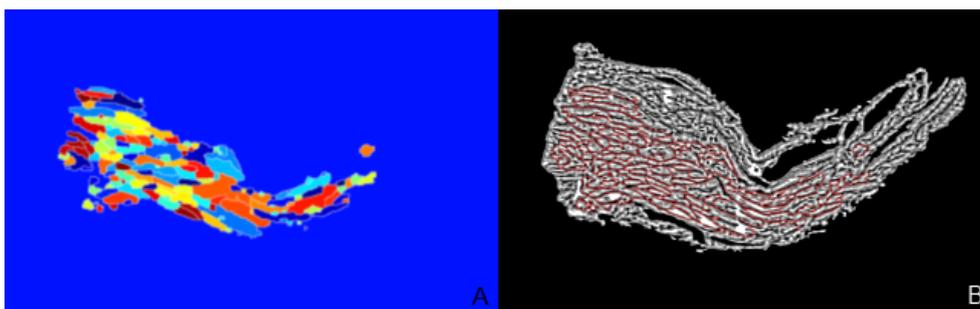


Figura 2.16: A: Watershed, ogni label è contraddistinta da un colore diverso. B: Risultato della segmentazione.

*Gradiente*

L'altra tecnica di miglioramento dei bordi delle varie fibre che ho analizzato è quella del calcolo del modulo del gradiente dell'immagine. Il gradiente è un operatore che considera l'immagine come una funzione tra i punti del piano e i livelli di grigio. In questo modo è possibile definire il gradiente di questa funzione e quindi dell'immagine. Dato che il gradiente è sensibile al contrasto tra gli oggetti nell'immagine, risulta possibile evidenziare in maniera molto evidente i bordi degli oggetti presenti, fornendo un modo per selezionare e ottimizzare la scelta dei bacini di riempimento nell'uso del watershed.

Calcolare il gradiente di una immagine equivale a fare un'operazione di filtraggio. Per filtraggio s'intende un'operazione sui pixel volta a modificarne il valore secondo determinate regole. Per filtrare un'immagine si utilizza la seguente funzione Matlab:

$$g = \text{imfilter}(f,w,'conv'). \quad (2.5)$$

L'immagine di partenza ( $f$ ) viene elaborata attraverso delle tabelle di trasformazione chiamate maschere ( $w$ ). La maschera è una matrice di pixel i cui valori d'intensità sono utilizzati per la determinazione della relazione che si vuole. Solitamente sono matrici di ordine dispari, in cui il pixel centrale rappresenta quello da elaborare.

"Conv" indica l'operazione che lega l'immagine e la maschera, si tratta di una convoluzione tra le due matrici.

Matematicamente il gradiente è così definito:

$$\nabla f = \begin{pmatrix} G_x \\ G_y \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \frac{\partial f}{\partial x} \\ \frac{\partial f}{\partial y} \end{pmatrix} \quad (2.6)$$

e il modulo del gradiente:

$$g(x, y) = [G_x^2 + G_y^2]^{\frac{1}{2}}. \quad (2.7)$$

Come visto, le componenti verticale e orizzontale del gradiente possono essere trattate distintamente. Per questo motivo ho utilizzato l'operatore *Sobel* come operatore di filtraggio. Le maschere che rappresentano quest'operatore sono infatti due, una per la direzione verticale e una per quella orizzontale (fig. 2.17):

-1	0	1
-2	0	2
-1	0	1

A

-1	-2	-1
0	0	0
1	2	1

B

Figura 2.17: A: Maschera di Sobel per i contorni verticali. B: Maschera di Sobel per i contorni orizzontali.

Per crearla occorre richiamare la funzione *fspecial*:

$$w = \text{fspecial}(\text{"sobel"}). \quad (2.8)$$

Per applicare questo metodo occorre, dunque, prima filtrare l'immagine con una maschera *sobel* e successivamente calcolare il watershed sul gradiente dell'immagine appena ottenuto.

Come si osserva (fig. 2.7), il gradiente non dà alcun risultato utile. Esso dovrebbe fornire i punti di minimo da utilizzare come marker per la funzione watershed, ma dall'immagine (fig. 2.18) si nota che essi sono indistinguibili. Ciò è dovuto al fatto che sto apportando delle elaborazioni solo sulla ROI.



Figura 2.18: Gradiente dell'immagine equalizzata localmente.

Selezionandola subito all'inizio ho però perso delle informazioni utili e ciò risulta evidente quando vado a calcolare il gradiente. Il bordo della ROI da me selezionata crea un dislivello eccessivo rispetto allo sfondo e i risultati ottenuti sono falsati. Ciò è dovuto al fatto che l'operatore gradiente si basa proprio sulla variazione di intensità, e questa, se eccessiva, rende fuorviante il risultato.

Occorre dunque, riuscire a ridurre per quanto possibile il rumore dell'immagine, appiattendolo le asperità della superficie. Nell'ambito della trasformazione morfologica, si può utilizzare, in questo senso, la tecnica della *ricostruzione*.

**Ricostruzione** La *ricostruzione* morfologica è una tecnica che ha molteplici utilizzi nell'analisi digitale delle immagini. A differenza delle altre tecniche morfologiche fino qui analizzate essa si basa sul "confronto" di due immagini (chiamate *marker* e *mask*) e un elemento strutturale, di solito 8-connesso. Può essere pensata come la ripetizione di una dilatazione dell'immagine *mar-*

*ker* fino a che non si adatti all'immagine *mask*. Uno dei risultati principali di questa operazione è che l'immagine *marker* trasformata è equivalente all'immagine *mask*, ma con picchi e valli dei grigi appiattiti, come si può vedere in figura 2.19.

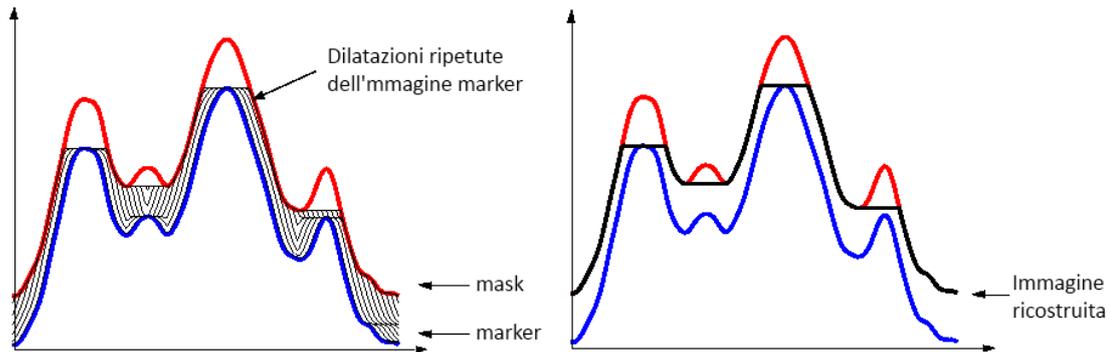


Figura 2.19: Esempio di ricostruzione morfologica di due sezioni di immagini.

In questo lavoro la ricostruzione morfologica è stata utilizzata principalmente come tecnica per eliminare, o diminuire, il rumore presente nelle sezioni di legamento in modo da evitare la *over segmentation* e separare in maniera più accurata le fibre.

Per creare le immagini *marker* e *mask*, sono partita dall'immagine originale della sezione che è stata usata come *mask*, mentre la *marker* è stata ottenuta sottraendo un valore costante ( $G$ ) ai livelli di grigio della *mask*:

$$marker = mask - G \quad (2.9)$$

In Matlab la funzione che esegue la ricostruzione morfologica è:

$$out = imreconstruct(marker, mask). \quad (2.10)$$



# Capitolo 3

## Elaborazione e Risultati

### 3.1 Introduzione

Nel precedente capitolo sono state presentate ed approfondite le tecniche di elaborazione cui ho fatto riferimento nel progetto. In questo capitolo si costruirà il programma che elabora le immagini. A partire dalle tre sezioni a disposizione, si proverà poi a creare un modello tridimensionale di una piccola porzione di legamento.

### 3.2 Descrizione dell'algoritmo

I risultati a cui sono pervenuta con la segmentazione finale, nel capitolo precedente, non sono i migliori. Ciò è dovuto, come già anticipato, alla scelta iniziale di identificare la ROI e apportare tutte le successive elaborazioni solo su di essa.

Selezionando la ROI come prima operazione si crea un elevato dislivello tra i bordi del legamento e lo sfondo. Le tecniche di elaborazione morfologica,

come visto nel capitolo precedente, considerano le immagini come superfici topologiche, caratterizzate da altezze e profondità. Il dislivello esistente tra sfondo e contorni del legamento non può dunque esser ignorato, al contrario assume con queste tecniche un peso ancora maggiore e falsifica i risultati ottenuti.

Si è ritenuta una soluzione valida a questo problema, l'elaborazione di tutta l'immagine che mantiene quindi le proprietà originali e la possibilità di selezionare la ROI solamente in un secondo momento.

Ho deciso dunque di procedere all'elaborazione dell'immagine originale, acquisita da scanner, applicando direttamente le tecniche di trasformazione di intensità, in particolare l'equalizzazione locale.

Si è pensato di realizzare tale operazione con tre finestre di dimensioni sufficientemente diverse 13x13, 27x27, 61x61 (fig. 3.1), che permettessero di individuare la finestrazione più efficace allo scopo. Per poter scegliere infine quale sia la finestrazione migliore si porterà avanti questo confronto per tutte le tecniche successive.

Il problema di avere dislivelli troppo elevati tra i bordi dell'immagine porta a sogliature non efficaci. Per ottenere questa condizione si è pensato di seguire la strada della ricostruzione della ROI, e in particolare di ricostruire l'immagine sulla base della deviazione standard. Facendo riferimento all'equazione (2.10), nel mio caso l'immagine *mask* è l'immagine localmente equalizzata, la *marker* è un'immagine creata sulla base della deviazione standard (fig. 3.2), più precisamente sottraendo al valore dei pixel originali la differenza tra valore medio e deviazione standard. Ho deciso di operare questo tipo di ricostruzione poichè la deviazione standard è un indice che misura la dispersione dei pixel rispetto al valore medio. In questo caso il valore medio si può pensare come l'altezza media dei picchi e la deviazione standard come una

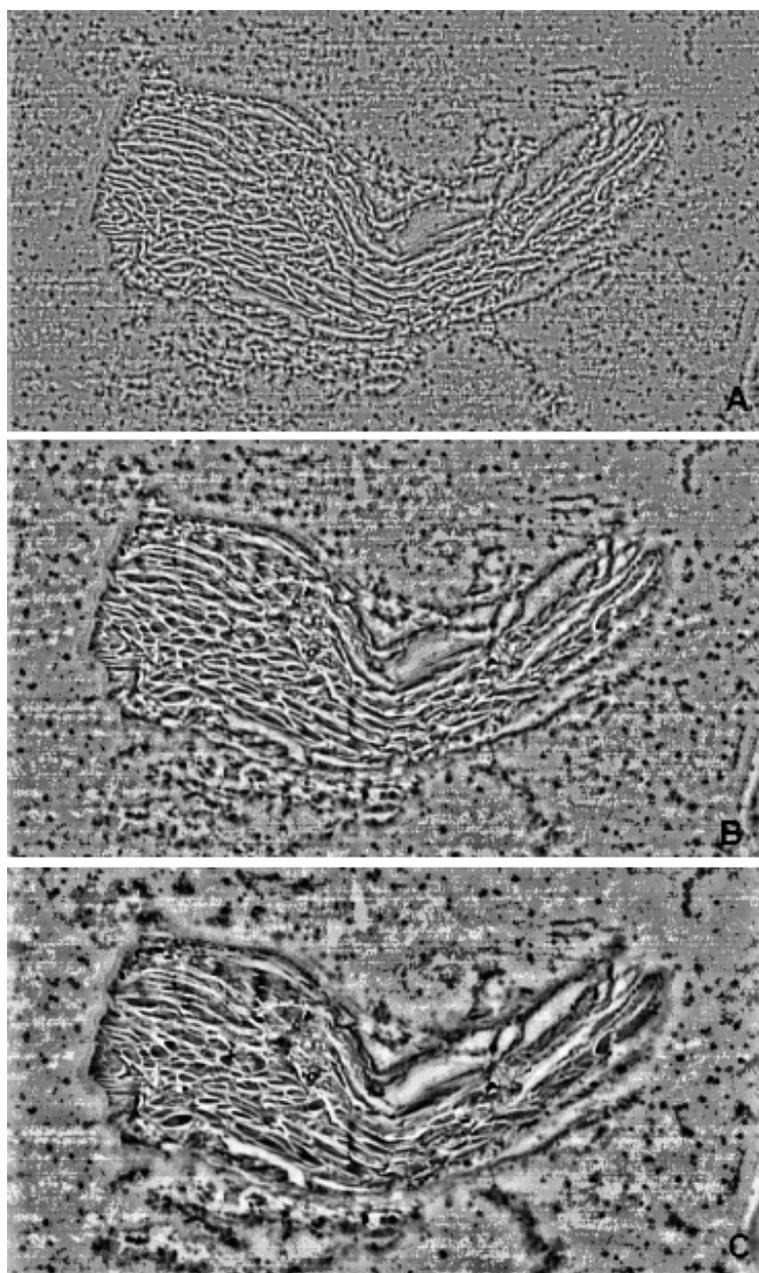


Figura 3.1: Equalizzazione locale con finestre: A. 13x13, B. 27x27, C. 61x61.

misura dell'altezza media delle montagne rispetto alla media. Con questo dato si può tenere sotto controllo l'altezza dei picchi che voglio considerare e

‘troncare’ quelli che non interessano. Dato che la deviazione standard è una caratteristica propria delle immagini, questo metodo è adattabile a tutte le immagini.

Per realizzare la *marker* ho creato una funzione (*imgStDev*) che calcola il valore della deviazione standard dell’immagine.

Detti  $x_i$  i valori osservati, ossia i valori dei pixel,  $\bar{x}$  la media aritmetica di tali valori e  $N$  il numero di valori, matematicamente la deviazione standard si calcola mediante la seguente formula:

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N}}. \quad (3.1)$$

Dato che considero la deviazione standard come la dispersione dei pixel rispetto al valore medio dell’immagine ho creato anche una funzione (*imgAverage*) che misura il valore medio della mia immagine così definito:

$$\bar{x} = \left(\frac{1}{N}\right) \sum_{i=1}^N x_i. \quad (3.2)$$

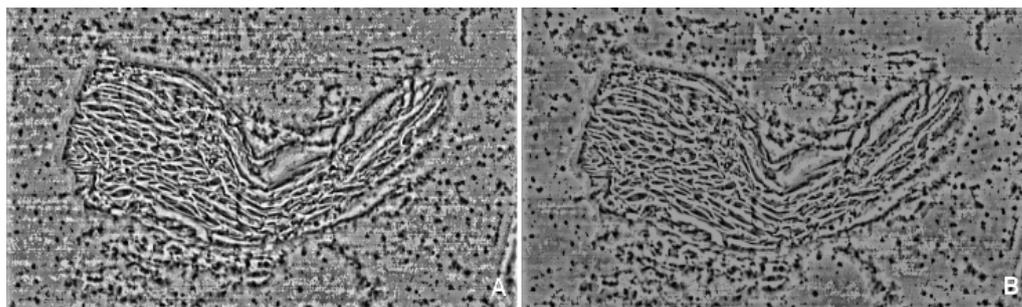


Figura 3.2: A: Immagine localmente equalizzata con finestra 27x27, B: Immagine ricostruita sulla base della deviazione standard.

L’immagine così ottenuta risulta meno rumorosa e soprattutto appiattita, requisito indispensabile per ottenere un risultato utile tramite gradiente.

Come si osserva in figura 3.3 l'elaborazione dell'immagine tramite gradiente appare, fino a questo punto, migliore rispetto a quella ottenuta ope-

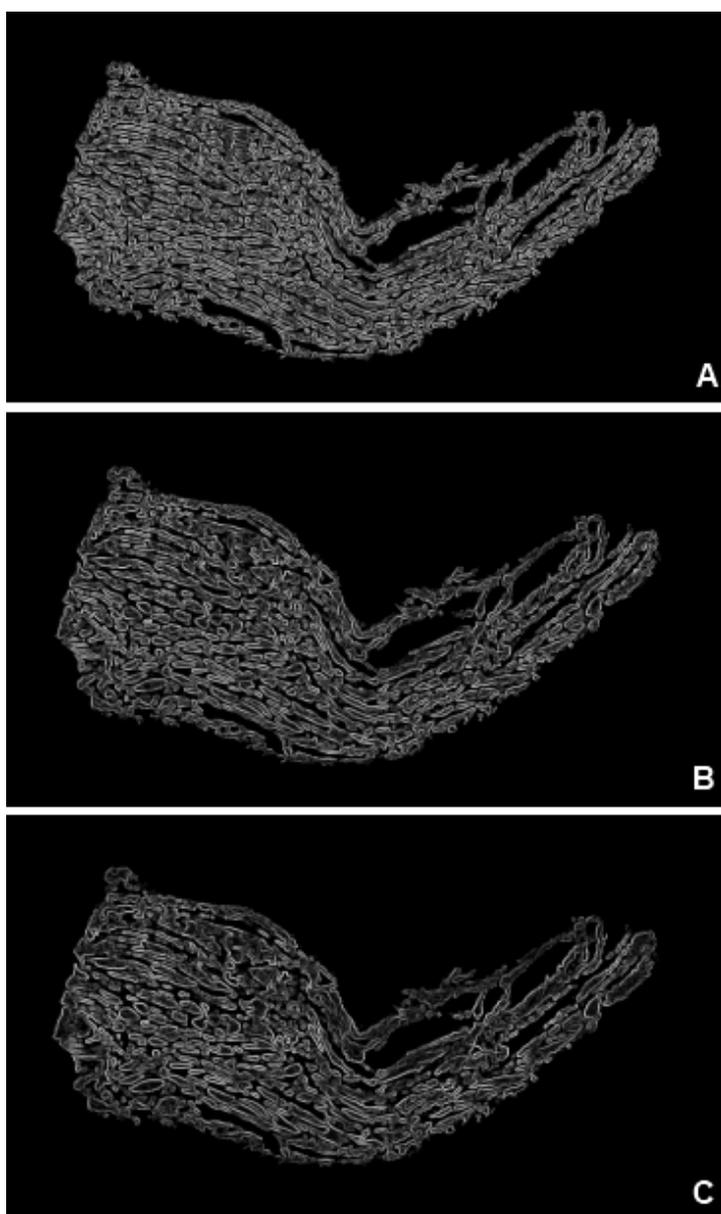


Figura 3.3: Gradiente immagine equalizzata: A. con finestra 13x13, B. con finestra 27x27, C. con finestra 61x61.

rando unicamente sulla ROI (fig. 2.18). I bordi del gradiente sono molto chiari, ben distinti e identificano quasi alla perfezione tutte le fibre. Per segmentare tutte le fibre con la tecnica watershed occorre mettere in evidenza i massimi del gradiente. I massimi rappresentano i marker, identificano le aree corrispondenti alle fibre, limitando la over-segmentazione. Per mettere in evidenza i massimi del gradiente ho dunque operato una nuova ricostruzione della ROI, ripulita dal rumore sullo sfondo. Quest'operazione si può compiere semplicemente scegliendo come *marker* l'immagine del gradiente e come *mask* l'immagine del gradiente a cui viene sottratto un coefficiente  $\alpha$  tale che  $0 \leq \alpha \leq 1$ .

Osservando attentamente quest'immagine (fig. 3.4) si nota che le fibre sono colorate di vari toni di grigio, ciò significa, in termini morfologici, che hanno diverse profondità. Per separarle accuratamente sfrutto proprio tale caratteristica e seziono l'immagine in tutti i suoi livelli (64). Per ogni sezione calcolo le label, ossia il numero di fibre che corrisponde a quel livello di grigio (ricorrendo al procedimento enunciato al cap. 2) e faccio un filtraggio passa-alto delle aree per eliminare singoli pixel isolati che rappresentano rumore rispetto agli oggetti che sto ricercando (fig. 3.5B). Per realizzare questo filtraggio ho creato una funzione *imgHighPassArea*: non prende in considerazione aree inferiori ad un valore da me prestabilito. Stabilito questo valore mediante delle prove, ho settato a 50 il numero minimo di pixels che deve possedere una label al fine di esser riconosciuta tale. In ingresso alla funzione devo passare: l'immagine da filtrare e il parametro limite del filtraggio. Qui di seguito si mostra ciò che si ottiene osservando una singola sezione random dell'immagine (fig. 3.5A).

Per migliorare la visualizzazione ho richiamato la funzione *imfill* di Matlab

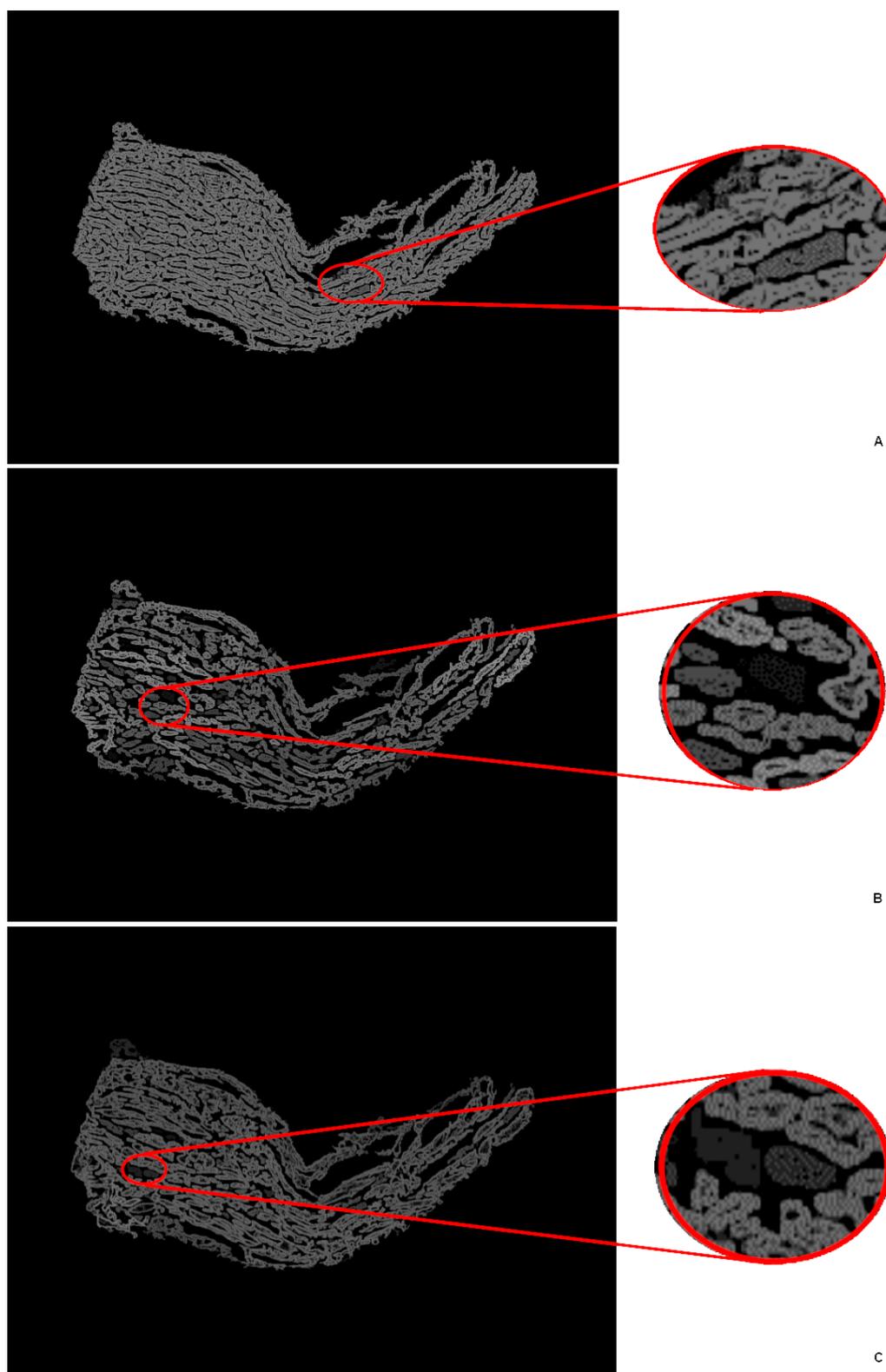


Figura 3.4: Immagine del gradiente ricostruita dell'immagine elaborata: A. con finestra 13x13, B. con finestra 27x27, C. con finestra 61x61.

che riempie i buchi all'interno delle label: in questo modo anche l'identificazione dei bordi risulta più precisa (fig. 3.5C).

Trasformando l'immagine in binaria, le fibre da segmentare sono oggetti bianchi dalla forma relativamente semplice su sfondo scuro. Per identificare il bordo di ognuno di essi è sufficiente richiamare una seconda funzione preimpostata in Matlab:

$$g = bwperim(f). \quad (3.3)$$

Questa funzione richiede come parametro d'ingresso l'immagine da elaborare e restituisce in uscita il perimetro degli oggetti (fig. 3.5D).

Per esser sicura di riuscire a distinguere tutti gli oggetti, anche quelli adiacenti, ho deciso di richiamare la funzione *watershed*, essa infatti considera gli oggetti come label differenti.

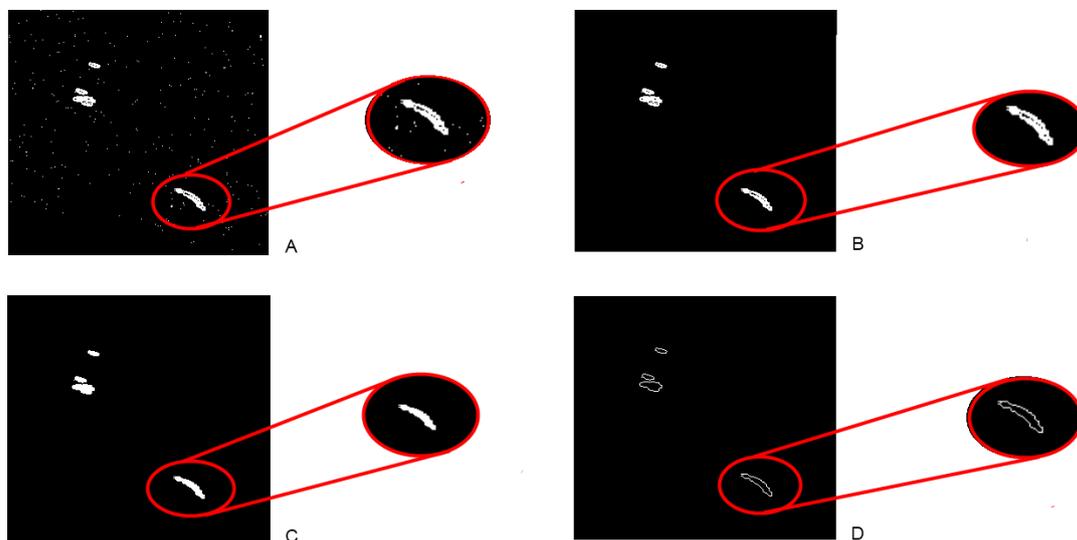


Figura 3.5: A: Immagine della sezione n. 33, B: Immagine dopo il filtro passa-alto, C: Immagine dopo imfill, D: Perimetri degli oggetti .

Per visualizzare il risultato ottenuto ho creato la funzione *imgOverlay* che mostra l'immagine data dalla sovrapposizione tra le linee rosse di watershed e l'immagine ricostruita. In questo modo si può osservare la precisione con cui sono riuscite ad identificare i bordi delle fibre nelle tre immagini equalizzate con finestre di dimensioni diverse (fig. 3.6).

Si possono dunque confrontare le segmentazioni ottenute, scegliendo le dimensioni di finestra più adatte.

Con l'equalizzazione locale mediante finestra 13x13 si ottengono aree troppo piccole che non vengono riconosciute come fibre dal programma e non vengono dunque segmentate correttamente. Anche impostando un parametro inferiore per la funzione *imgHighPassArea* il numero di fibre riconosciute non varia in maniera rilevante. Con ciò si può dedurre che utilizzare finestre di equalizzazione locale troppo piccole non porta a risultati soddisfacenti.

La figura 3.6C mostra l'elaborazione che si ottiene a partire da un'equalizzazione locale con finestra 61x61. Anche questa segmentazione è da scartare in quanto le label sono troppo estese, non vengono isolate le fibre più piccole. Anche le finestre troppo grandi non sono le migliori.

Dalle considerazioni fatte si vede che l'immagine equalizzata con finestra 27x27 è la più adatta alla segmentazione.

A questo punto l'elaborazione finale della prima sezione di legamento a cui sono giunta equalizzando l'immagine con finestra 27x27 è molto buona (fig. 3.7), posso quindi schematizzare l'algoritmo da me creato nei seguenti passi successivi:

1. Fare l'equalizzazione locale dell'immagine con finestra 27x27.
2. Ricostruire l'immagine sulla base della deviazione standard.

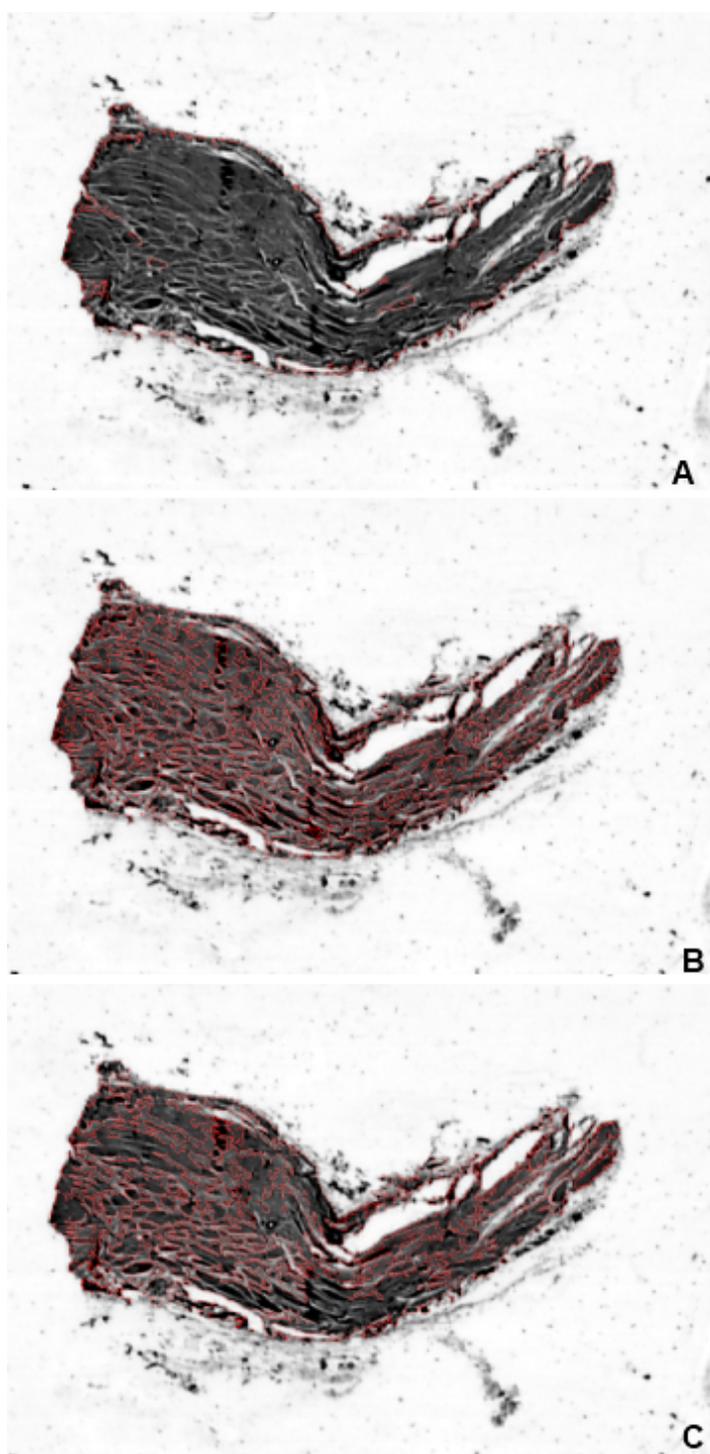


Figura 3.6: Segmentazione di A: Immagine localmente equalizzata con finestra 13x13, B: Immagine localmente equalizzata con finestra 27x27, C: Immagine localmente equalizzata con finestra 61x61.

3. Calcolare il gradiente.
4. Fare una ricostruzione dell'immagine del gradiente e sezionarla sulla base dei livelli di grigio.  
Per ogni sezione:
5. Selezionare le label.
6. Migliorare l'immagine ottenuta riempiendo i buchi e filtrando le aree.
7. Calcolare il gradiente.
8. Evidenziare il perimetro delle regioni.
9. Calcolare il watershed.
10. Visualizzare la segmentazione così ottenuta, sovrapponendola all'immagine originale.

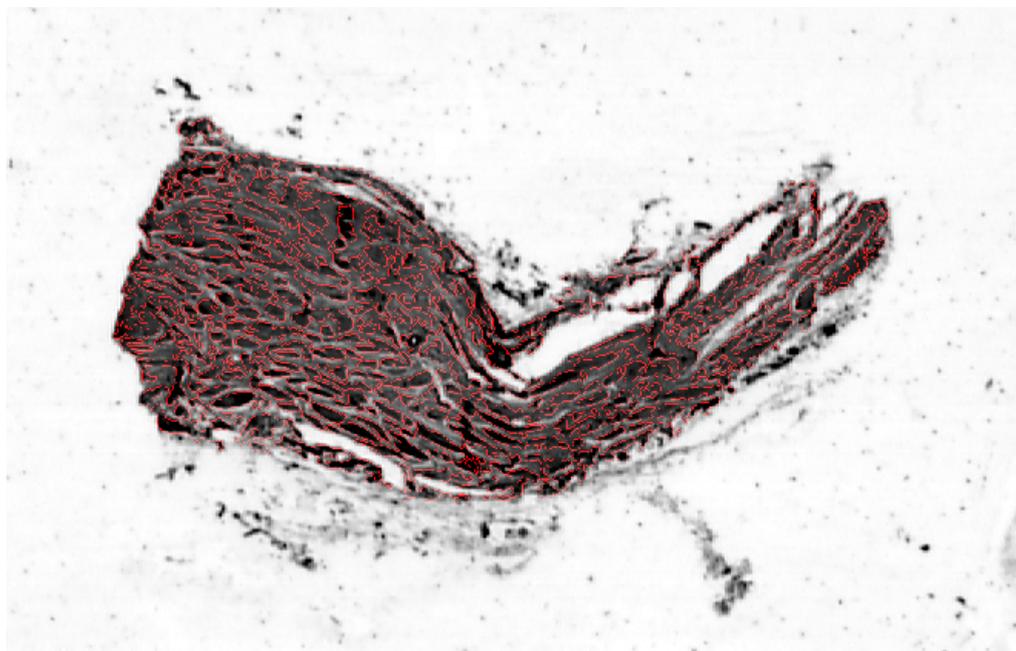


Figura 3.7: Identificazione delle fibre della prima sezione di LCM, utilizzando la finestra  $27 \times 27$  per l'equalizzazione locale.

### 3.3 Applicazione dell'algoritmo alle immagini delle sezioni di legamento

L'algoritmo descritto nel paragrafo precedente è stato studiato sulla base di una sezione del LCM, lo si applica ora anche alle altre due sezioni a disposizione, per valutarne l'efficienza.

Le segmentazioni che si ottengono sono rappresentate in figura 3.8.

Osservando le immagini si nota che alcune fibre vengono segmentate correttamente in tutte e tre le sezioni, ma non sempre è così.

Si analizzano ora alcune fibre, per comprendere i limiti dell'algoritmo.

In figura 3.9 ho messo in evidenza tre fibre verdi che l'algoritmo ha correttamente segmentato in tutte e tre le immagini, due fibre rosse che, invece,

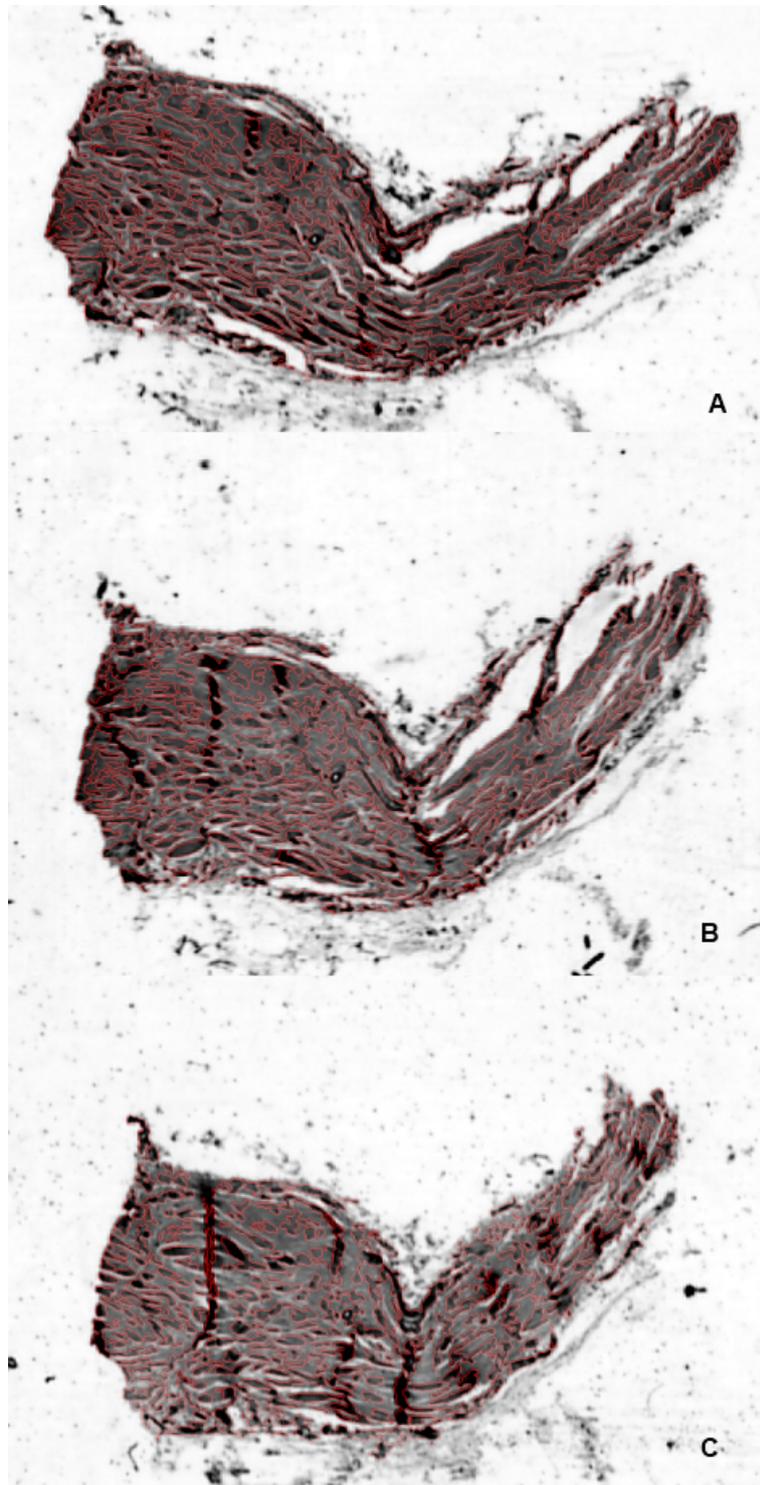


Figura 3.8: Identificazione delle fibre A: della prima sezione di LCM, B: della seconda sezione di LCM, C: della terza sezione di LCM.

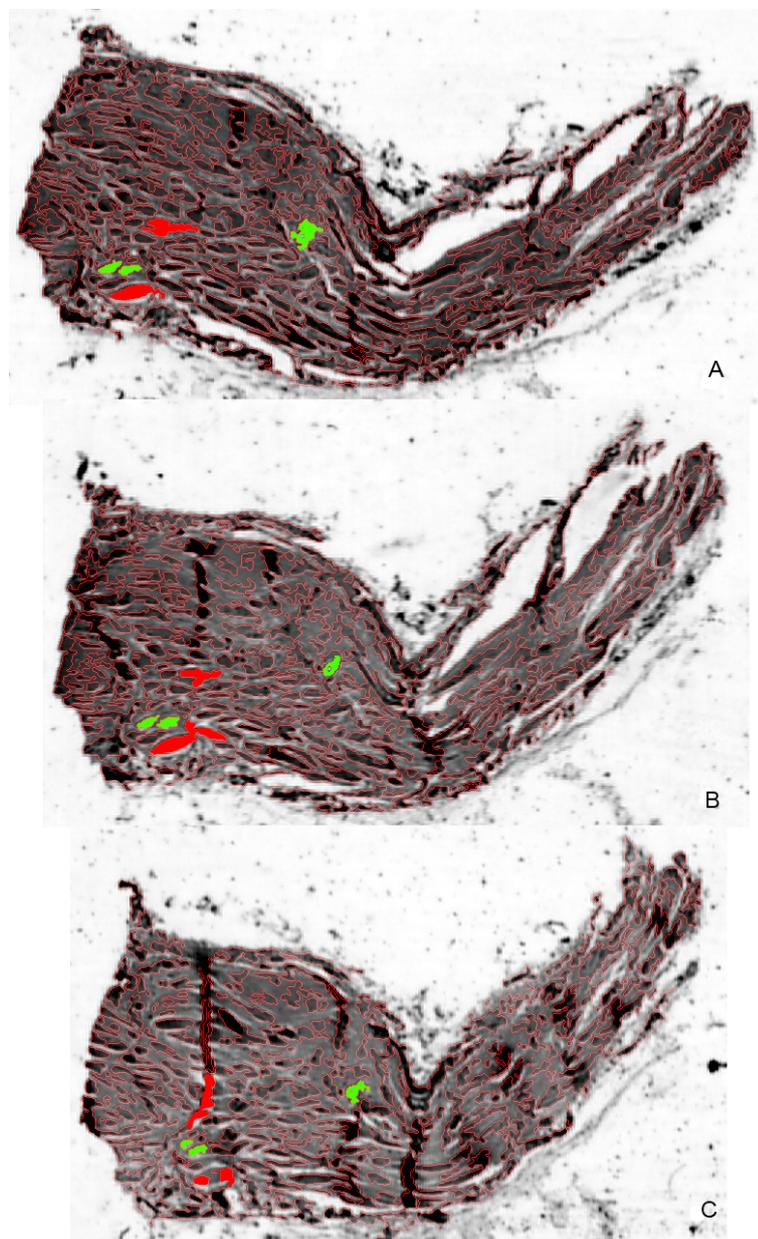


Figura 3.9: Fibre segmentate correttamente (verdi) e non correttamente (rosse) in A: Prima sezione di LCM, B: Seconda sezione di LCM, C: Terza sezione di LCM.

non sono state correttamente segmentate.

Prima di analizzare le varie fibre individuate nelle tre sezioni occorre premettere che la loro forma non sarà necessariamente uguale. Ciò è dovuto alla geometria delle fibre di legamento: esse variano diametro e forma durante la loro estensione. Trattandosi di immagini di sezioni adiacenti di legamento, la forma della fibra nelle varie sezioni si discosterà dunque più o meno dalla forma individuata nella sezione precedente e successiva, sarà simile ma non uguale.

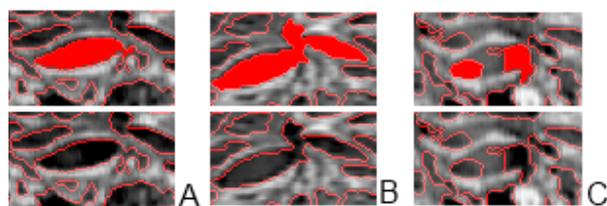


Figura 3.10: Fibra segmentata non correttamente in A: Prima sezione di LCM, B: Seconda sezione di LCM, C: Terza sezione di LCM.

Dal confronto della fibra selezionata nelle tre sezioni (fig. 3.10) si nota innanzitutto che nella terza sezione essa viene segmentata in due parti. La suddivisione della fibra in due parti è un errore di segmentazione. Se si osserva l'immagine originale, si nota che nella terza sezione la fibra è attraversata da un fascio di pixel più chiari. Quest'intensità assume un valore rilevante con la ricostruzione dell'immagine. Con quest'operazione ho appiattito molto i livelli e ciò corrisponde a una diminuzione del contrasto. Di conseguenza il fascio chiaro si allarga e tende a far separare le due aree più scure (fig. 3.11). L'effetto di quest'elaborazione risulta molto più evidente quando calcolo il gradiente.



Figura 3.11: A: Prima sezione di LCM, B: Risultato ricostruzione, C: Risultato sobel.

Un'altra fibra non correttamente segmentata dall'algoritmo è quella in figura 3.12, selezionata nella parte superiore delle sezioni. Questa fibra viene

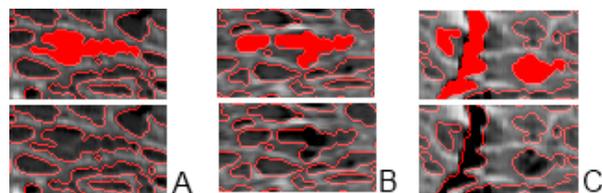


Figura 3.12: Fibra non correttamente segmentata in A: Prima sezione di LCM, B: Seconda sezione di LCM, C: Terza sezione di LCM.

spezzata già nella seconda figura e diventa quasi irriconoscibile nella terza. Osservando le sezioni originali acquisite da scanner (fig. 2.4, 2.5, 2.6), si nota che la seconda e la terza immagine risultano molto rumorose nella fascia superiore. Nella seconda compaiono infatti delle striature abbastanza evidenti e molto scure, che si espandono maggiormente nella terza immagine, diventando anche più definite. Questo rumore potrebbe esser una conseguenza della sezionatura del legamento. I pixel rumorosi hanno una tonalità di grigio molto scura, simile a quella delle fibre. L'algoritmo da me studiato sfrutta tecniche che basate sull'intensità dei pixel potrebbero confondere in questo senso i pixel delle fibre e quelli rumorosi. Come conseguenza si ha che le fibre non vengono correttamente segmentate ma, in questo caso, spezzate

fino ad assumere una forma irriconoscibile.

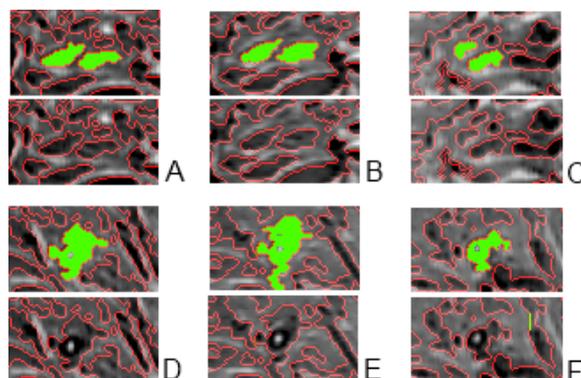


Figura 3.13: Fibre correttamente segmentate in A-D: Prima sezione di LCM. B-E: Seconda sezione di LCM. C-F: Terza sezione di LCM.

La figura 3.13 invece mostra alcune fibre che l'algoritmo ha identificato e segmentato correttamente. Osservando la figura si riconoscono abbastanza semplicemente i bordi delle fibre corrispondenti nelle tre immagini consecutive. La geometria dei contorni non è uguale, ma simile, poiché come già anticipato, è una caratteristica delle fibre stesse. L'algoritmo è riuscito a riconoscere più precisamente le fibre e i loro contorni poiché le fibre qui segmentate appartengono alla zona centrale delle sezioni di legamento, ove il rumore è limitato.

### 3.4 Rappresentazione tridimensionale

L'ultimo obiettivo del progetto è riuscire a fare una rappresentazione tridimensionale di come si dispongono le fibre del LCM.

Al fine di riconoscere le rispettive fibre nelle tre sezioni, prima di procedere ho numerato tutte le fibre identificate in ogni sezione del legamento, in modo da

distinguerle tutte. Ciò è stato fatto semplicemente richiamando la funzione *bwlabel* sull'immagine complementare a quella che si ottiene al termine della segmentazione. Questa enumerazione sarà utile per riconoscere in maniera univoca le rispettive fibre delle tre sezioni.

Successivamente ho proceduto con l'allineamento delle tre sezioni: ho creato una funzione che fosse in grado di allinearle basandosi sui relativi centri di massa. Per centro di massa si intende il pixel corrispondente alla media pesata delle intensità. Detti  $i$  e  $j$  rispettivamente l'ascissa e l'ordinata del pixel  $p_{i,j}$  e  $f_{i,j}$  il livello di grigio corrispondente, le coordinate del pixel rappresentante la media pesata dell'immagine si calcolano mediante le seguenti formule:

$$dx = \frac{\sum_{j=1}^n (p_j f_j)}{\sum_{j=1}^n (f_j)} \quad (3.4)$$

$$dy = \frac{\sum_{i=1}^n (p_i f_i)}{\sum_{i=1}^n (f_i)} \quad (3.5)$$

Ho creato dunque la funzione *MatrixCoM* che passata in ingresso un'immagine binaria, fornisce come output le coordinate del centro di massa.

Ho calcolato le posizioni dei centri di massa di tutte e tre le immagini, li ho poi allineati rispetto alla prima. Per far ciò ho creato la funzione *traslation* che, ricevendo in ingresso un'immagine e le distanze dei centri di massa di questa rispetto alla prima, trasla le coordinate del centro di massa della sezione in questione e le fa coincidere con quelle della prima, trasladando dunque l'intera immagine e centrandola rispetto alla prima che considero di riferimento:

$$g = \text{traslation}(f, dx, dy) \quad (3.6)$$

$f$  è l'immagine da allineare,  $dx$  e  $dy$  sono rispettivamente le distanze dei centri di massa rispetto alle righe e alle colonne.

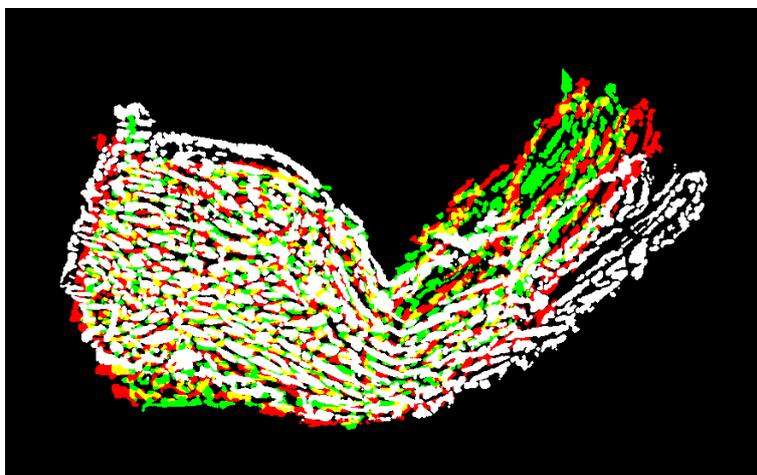


Figura 3.14: Sovrapposizione di tutte e tre le sezioni allineate.

In questo modo ho allineato le sezioni rispetto alla traslazione. Non avendo informazioni sull'orientamento originale delle fibre, non si è ritenuto opportuno determinare un aggiustamento rispetto alla rotazione, sarebbe stata una scelta arbitraria e soggettiva.

Vista la dimensione  $\mu$ -metrica delle fibre e del loro spessore, per riuscire a visualizzarne tridimensionalmente la struttura, occorre selezionare una regione ristretta a qualche fibra. Ho selezionato dunque una ROI 101x101 pixel per ogni fibra e ho effettuato un allineamento rispetto al loro centro di massa. Avendo allineato le fibre solamente rispetto alla traslazione, esse sono leggermente ruotate le une sulle altre. Risultava estremamente complicato visualizzare discretamente le fibre in 3D. Ho dovuto quindi procedere selezionando manualmente le ROI di mio interesse.

Per fare la visualizzazione tridimensionale, per prima cosa ho allineato verticalmente le tre immagini, servendomi della funzione Matlab *cat* e successivamente mi sono servita del programma MRICRO.

E' necessario che le dimensioni delle ROI da impilare siano uguali. Poichè

le immagini a disposizione sono un numero davvero ridotto e di dimensioni molto piccole, per riuscire a visualizzare la struttura tridimensionale ho dovuto ingrandire molto l'immagine, motivo per cui appare rumorosa, sgranata e i confini delle fibre non sono ben delineati (fig. 3.15).

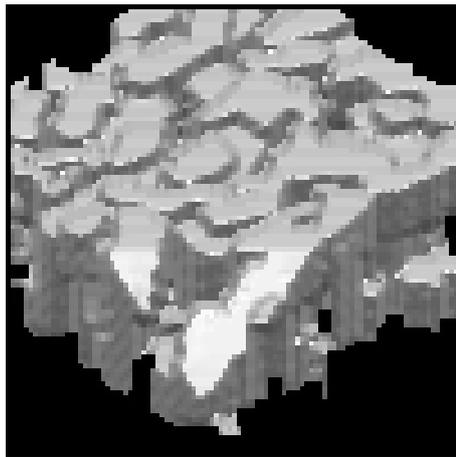


Figura 3.15: Visione tridimensionale della Roi.

# Conclusioni

Questo lavoro di tesi rappresenta un punto d'inizio per un maggiore approfondimento della conoscenza anatomica dei legamenti. L'obiettivo del progetto è la realizzazione di un programma di elaborazione di immagini in grado di segmentare correttamente fibre di legamenti, al fine di individuarne la struttura interna e di comprendere la relazione che lega struttura e proprietà.

Tale programma è in grado di segmentare immagini di sezioni di legamenti acquisite da scanner. Segmentare fibre di legamenti equivale ad estrapolare i dettagli di interesse dall'immagine e ciò è stato fatto intraprendendo la strada dell'elaborazione morfologica.

Per ottenere risultati utili a questo tipo di elaborazione sono state utilizzate tecniche che si basano sulle variazioni di intensità e sulla ricostruzione di un'immagine. Tuttavia la segmentazione è ben riuscita solamente nell'identificazione delle fibre appartenenti all'area centrale della sezione, in quanto è quella meno rumorosa. Le fibre superiori, infatti, sono state rovinare in seguito a rumore causato dal taglio nel sezionare il legamento e quelle in prossimità del bordo del legamento erano attraversate da fasci chiari che non hanno permesso una segmentazione corretta.

L'algoritmo redatto e descritto in questa tesi è alla base della realizzazione del programma definitivo.

In particolare, si ritiene che le tecniche di elaborazione intraprese siano state le più adatte, occorre però migliorare ancora la precisione e le prestazioni dell'algoritmo.

A tale scopo sono state programmate delle micro-tomografie del legamento in modo da ottenere immagini tridimensionali, queste dovrebbero essere meno rumorose e la struttura legamentosa dovrebbe risultare in esse ben visibile. Non avendo però ancora a disposizione queste immagini, ho cercato di ricostruire la struttura tridimensionale del legamento impilando le sezioni a disposizione e mettendo in rilievo alcune fibre correttamente segmentate. La risoluzione con cui si ottiene la struttura tridimensionale in questo modo non è certamente delle migliori, occorre avere quantomeno un numero superiore di sezioni a disposizione, ma tale metodica ha permesso di avere dei risultati preliminari di segmentazione tridimensionale.

Le funzioni implementate sono disponibili presso il Laboratorio di Biomeccanica dell'Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna.

# Appendice A

## Istituto Ortopedico Rizzoli

### A.1 Descrizione Struttura

L'Istituto Ortopedico Rizzoli è situato a Bologna sulle colline, nella zona Sud della città, a circa un chilometro di distanza dai viali che circondano il centro storico fiancheggiando il tracciato delle mura medievali (fig. A.1 ).



Figura A.1: Istituto Ortopedico Rizzoli

Tale Istituto è suddiviso in due sedi, Ospedale ed Istituto di Ricerca Codivilla-Putti. L'ospedale è sito in via G.Pupilli 1, mentre l'Istituto di Ricerca si trova in via di Barbiano 1/10. L' Istituto Ortopedico Rizzoli è una struttura ospedaliera e di ricerca altamente specializzata nel campo dell'ortopedia e traumatologia. Dal 1981 è stato dichiarato dal Ministero della Sanità italiano "Istituto di Ricovero e Cura a Carattere scientifico" (IRCCS) (fig. A.2).



Figura A.2: Logo dell'Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna

L'attività dell'istituto si articola in ricerca, cura ed assistenza ed è finalizzata a:

- fornire prestazioni ortopedico-traumatologico-riabilitative urgenti e programmate con utenza nazionale;
- produzione e sviluppo di ricerca biomedica e sanitaria, correlata alla pratica clinica e gestionale;
- contribuire alla formazione e specializzazione delle professioni sanitarie, in stretta relazione con svariati Atenei Universitari Italiani.

I servizi clinici ed assistenziali offerti riguardano l'intero ambito ortopedico-traumatologico (patologie traumatiche e/o degenerative) e delle funzioni riabilitative ad esso correlate. In relazione a tali ambiti sono state sviluppate specifiche aree, tra cui le più importanti risultano essere:

- chirurgia protesica ( con particolare interesse in protesi d'anca, ginocchio e spalla);
- chirurgia ortopedica ad indirizzo oncologico e traumatologia vertebrale in elezione;
- ortopedia pediatrica;
- chemioterapia dei tumori muscolo-scheletrici.

Le attività cliniche e di ricovero sono organizzate in 30 unità operative raggruppate in tre dipartimenti ( Dipartimento A.Codivilla, Dipartimento I.F.Goidanich, Dipartimento V.Putti).

L'attività chirurgia ortopedica-traumatologica di base non è la sola svolta in questo Istituto, in quanto vengono eseguiti interventi di altissima specializzazione nel trattamento dei tumori dell'apparato muscolo-scheletrico, nelle patologie ortopedico-pediatriche, vertebrali, del piede e arti superiori, nella patologia dello sportivo, degenerativa articolare dell'anca e del ginocchio ed infine anche in riguardo alla diagnosi e trattamento delle malattie genetiche scheletriche. Presso tale struttura è inoltre una Banca del Tessuto Muscolo-Scheletrico, che si occupa della raccolta, conservazione e distribuzione di tali tipologie di tessuto, ed una società 'Telemedicina Rizzoli S.p.A.' che si occupa di servizi in telemedicina.

### **A.1.1 Divisioni, servizi e dipartimenti.**

#### **Dipartimento Alessandro Codivilla**

##### **Unità di degenza**

VIII Divisione di Chirurgia ortopedico-traumatologica pediatrica

Divisione di Chirurgia ortopedica-traumatologica vertebrale

Sezione A di Chirurgia ortopedico-traumatologica

Sezione B di Chirurgia ortopedico-traumatologica

##### **Servizi sanitari di supporto**

Servizio di Immunoematologia e Medicina trasfusionale

Modulo dipartimentale di Medicina generale

Modulo dipartimentale di Patologia clinica

Modulo organizzativo di Reumatologia

Banca del tessuto muscolo-scheletrico

##### **Laboratori di ricerca**

Laboratorio di Immunologia e genetica

Laboratorio di Biologia cellulare e microscopia elettronica

Servizio di Chirurgia sperimentale

#### **Dipartimento Italo Federico Goidanich**

##### **Unità di degenza**

V Divisione di Chirurgia ortopedico-traumatologica ad indirizzo oncologico

Sezione di Chemioterapia dei tumori muscolo-scheletrici

Sezione di Chirurgia generale dell'apparato muscolo-scheletrico

**Servizi sanitari di supporto**

Servizio di Anatomia ed istologia patologica

Servizio di Farmacia

Servizio di Radiologia e diagnostica per immagini

Modulo dipartimentale Imaging con ultrasuoni e Radiologia interventistica angiografica

Modulo organizzativo di Rigenerazione Tissutale Ossea

**Laboratori di ricerca**

Laboratorio di Ricerca oncologica

**Dipartimento Vittorio Putti**

**Unità di degenza**

I, VI, VII, IX Divisione di Chirurgia ortopedico-traumatologica

Sezione C di Chirurgia ortopedico-traumatologica

Servizio di recupero e rieducazione funzionale

**Servizi sanitari di supporto**

Servizio di Anestesia-Rianimazione e Terapia intensiva

Modulo dipartimentale di Pronto soccorso

**Laboratori di ricerca**

Laboratorio di Analisi del movimento

Laboratorio di Biomeccanica e Innovazione Tecnologica

Laboratorio di Fisiopatologia degli impianti ortopedici

Laboratorio di Tecnologia Medica

## A.2 Laboratorio di Biomeccanica

Il Laboratorio di Biomeccanica e Innovazione tecnologica, diretto dal Prof. Maurilio Marcacci, è un ambiente di lavoro multidisciplinare, che si avvale della collaborazione fra chirurghi ortopedici, ingegneri, fisici, informatici e dottori in scienze motorie, creando un supporto teorico e pratico all'attività di ricerca clinica e chirurgica.



Figura A.3: Interfaccia principale del software study-joint per analisi anatomico-funzionali di articolazioni

Il Laboratorio, in collaborazione con la Clinica Ortopedica e Traumatologica III, ha acquistato rilevanza internazionale nell'ambito della chirurgia assistita al computer, nelle biotecnologie tissutali, nella validazione di impianti protesici e nell'analisi biomeccanica delle articolazioni (fig. A.3). Le attività del Laboratorio sono suddivise in cinque aree:

- biomeccanica-cinematica;
- Roentgen Stereophotogrammetric Analysis (RSA);
- navigazione robotica;
- biotecnologie;
- biomeccanica dello sport.

In stretta collaborazione con il Laboratorio di Biomeccanica e Innovazione tecnologica, opera, nell'ambito di svariati e molteplici progetti, anche il Laboratorio NaBi.

### A.3 Laboratorio NaBi

Il Laboratorio NaBi si occupa della progettazione e dello sviluppo di moderni approcci nano-biotecnologici in ambito di Medicina Rigenerativa e di Chirurgia Protesica e Traumatologica. Uno degli ambiti di ricerca del Laboratorio è la realizzazione e caratterizzazione di ricoprimenti nano-strutturati e anti-usura per protesi articolari e altri dispositivi impiantabili in Ortopedia e Traumatologia, per la cui deposizione viene utilizzata una tecnologia di ultima generazione, la *Pulsed Plasma Deposition* (PPD), che consente di depositare materiali organici su substrati inorganici e viceversa, realizzando nano-strutture polifunzionali caratterizzate da altissima adesione all'interfaccia. Un ulteriore ramo di ricerca, è lo studio di *scaffold magnetici* per la rigenerazione ossea ed osteocondrale con nano-particelle magnetiche opportunamente funzionalizzate con fattori di crescita e/o cellule (fig. A.4).

Tale attività è svolta nell'ambito del Progetto Magister, collaborazione europea tra il Consiglio Nazionale delle Ricerche, Università di Bologna e



Figura A.4: Processo di rigenerazione ossea con l'utilizzo di scaffold magnetici.

Zagabria, e partner esperti in magnetismo (ISMN), biologia (BSMU), fisica delle particelle (USC) e tecnologia relativa agli scaffold (ISTEC). Questo studio è supportato da una parte di sviluppo in ambiente virtuale basata su simulazioni matematiche utilizzando un software ad elementi finiti di ultima generazione, *Comsol 3.5 Multiphysics*. Parallelamente, il controllo spaziale e temporale della rigenerazione tissutale sullo scaffold viene testato in vitro con cellule staminali mesenchimali in situazione di coltura statica e dinamica in un bioreattore magnetico. Vengono validate inoltre nuove metodologie di fissazione dei dispositivi ortopedici, grazie allo sviluppo di un simulatore magneto-meccanico.

# Bibliografia

- [1] M. Christopher, J. Wright, M. Wright, “Anatomy of the Knee”.
- [2] Keith L. Moore, Arthur F. Dalley, “Anatomia Umana”, 2001, Capitolo 5: ‘Arto inferiore ’, pp. 616-623.
- [3] I., A. Kapandji, “Physiologie articulaire”, 1974, vol. 2, pp. 108-114.
- [4] Ker, R. F., “Mechanics of tendon, from an engineering perspective”, 2007, Vol. 12, pp. 1001-1009.
- [5] Hazel R.C. Screen, “Hierarchical approaches to understanding tendon mechanics”, 2009, Vol. 4.
- [6] J. Kastelic, A. Galeski, E. Baer, “The multicomposite structure of tendon”, 1978, Vol. 6, pp. 11-23
- [7] Robert T. Burks, “Knee Ligaments: Structure, Function, Injury, and Repair”, 1990, Capitolo 4: “Gross Anatomy”, edited by D. Daniel et al..
- [8] Nimni, “Semin Arthritis Rheum”, 1983, Capitolo: “Collagen: structure, function and metabolism in normal and fibrotic tissue”.

- [9] Nimni, “Dynamics of connective tissue macromolecules”, 1975, Capitolo: “Molecular structure and function of collagen in normal and diseased tissue”, edited by Burleigh PMC e Pool AR.
- [10] Graham, H.K., Holmes, D.F., Watson, R.B., Kadler, K.E. “Identification of collagen fibril fusion during vertebrate tendon morphogenesis. The process relies on unipolar fibrils and is regulated by collagen – proteoglycan interaction”, 2000, *J. Mol. Biol.* pp. 295, 891–902.
- [11] Birk, D.E., Zycband, E.I., Woodruff, S., Winkelmann, D.A., Trelstad, R.L., “Collagen fibrillogenesis in situ: fibril segments become long fibrils as the developing tendon matures”, 1997, *Dev. Dyn.*, pp. 208, 291–298.
- [12] Cribb, A.M., Scott, J.E., “Tendon response to tensile stress: an ultra-structural investigation of collagen: proteoglycan interactions in stressed tendon”, 1995, *J. Anat.*, pp. 187, 423–428.
- [13] Dahners, L.E., Lester, G.E., Caprise, P., “The pentapeptide NKISK affects collagen fibril interactions in a vertebrate tissue”, 2000, *J. Orthop. Res.*, pp. 18, 532–536.
- [14] Trotter, J.A., Wofsy, C., “The length of collagen fibrils in tendons”, 1989, *Trans. Orthop. Res. Soc.*, pp. 14, 180.
- [15] Parry, D.A., Craig, A.S., “Growth and development of collagen fibrils in connective tissue”, 1984, In: Ruggeri, A., Motta, A. (Eds.), “Ultrastructure of the Connective Tissue Matrix”, The Hague, Martinus Nijhoff, pp. 34–62.
- [16] Craig, A.S., Birtles, M.J., Conway, J.F., Parry, D.A., “An estimate of the mean length of collagen fibrils in rat tail-tendon as a function of age”, 1989, *Connect. Tissue Res.*, pp. 19, 51–62.

- 
- [17] Paolo P. Provenzano, Ray Vanderby Jr., "Collagen fibril morphology and organization: Implications for force transmission in ligament and tendon", 2005, pp.71-84.
- [18] Rafael C. Gonzalez, Richard E. Woods, Steven L. Eddins, "Digital Image Processing using Matlab", 2004, edited by Pearson Education.
- [19] Savio L-Y. Woo, Richard E. Debski, John D. Withrow, Marsie A. Jannaushek, "American Journal of Sports Medicine", 1999, Vol. 27, pp. 533.
- [20] Savio L-Y. Woo, Edmond P. Young, Michael K. Kwan, "Knee Ligaments: Structure, Function, Injury, and Repair", 1990, Capitolo 7: "Fundamental Studies in Knee Ligament Mechanics", edited by D. Daniel et al..
- [21] F. H. Netter, "Atlante di Anatomia Fisiopatologia e Clinica", 1992, Collezione CIBA-GEIGY Edizione.
- [22] N. Otsu, "A threshold selection method from grey level histogram", 1979, IEEE Trans. Syst. Man Cybern., Vol. 9 n. 1, pp. 62-66.
- [23] Luc Vincent, "Morphological grayscale reconstruction in images analysis: Applications and efficient algorithms", 1993, IEEE Transaction on image processing.
- [24] W. Niblack, "An Introduction to Digital Image Processing", 1986, Ed. Prentice Hall, pp. 115-116.



## *Ringraziamenti*

*Prima di tutto vorrei ringraziare il Dr. Marco Bontempi per aver accettato di seguirmi in quest'esperienza altamente formativa, per aver avuto fiducia nei miei confronti e per esser stato sempre paziente nello spiegarmi ciò che non sapevo e nel seguirmi durante la stesura della tesi. Un ringraziamento comunque sentito va a tutti i ragazzi del Laboratorio di Biomeccanica dell'Istituto Ortopedico Rizzoli che mi hanno accolta come una di loro e hanno condiviso con me la loro quotidianità, facendomi interfacciare con il mondo della ricerca.*

*Vorrei dire ancora grazie alla Prof.ssa Maria Pia Saccomani per aver accettato di farmi da Relatrice.*

*Vorrei ringraziare tutti i miei compagni di corso e le mie amiche per aver condiviso gioie e dolori dell'università e lo stress e l'ansia dell'ultimo periodo.*

*Un sentito grazie va a mio fratello Maurizio che ha sempre creduto tanto in me e quest'ammirazione è per me uno sprono a fare sempre del mio meglio, nello studio e nella vita. Ai miei genitori che mi hanno permesso di studiare e di raggiungere questo e altri obiettivi e che ripetono continuamente di esser orgogliosi di me.*

*Un ringraziamento unico va ai miei nonni, per esser ancora qui a condividere con me questo momento, non immaginate quanto lo desideravo.*

*Un grazie tutto speciale ad Ale che con il suo affetto mi è sempre stato vicino, pazientemente ha ascoltato le mie continue lamentele, ha sempre creduto in me ed è fiero delle mie capacità. Grazie per rendere entusiasmante qualsiasi esperienza regalandomi sempre nuova energia per affrontare qualsiasi sfida. Grazie!*