# Università degli Studi di Padova

Facoltà di Ingegneria

Corso di Laurea Triennale in Ingegneria Biomedica


Tesi di laurea

# Identificazione automatica del Beading nei nervi della cornea


**Relatore** : Prof. Grisan Enrico

**Laureando** : Frison Marco



27 Settembre 2010

*Alla mia Famiglia,*

*che mi ha sostenuto in*

*tutto questo splendido percorso*

# Indice

**1 Introduzione** **1**

1.1 Scopi e Obiettivi . . . . . 1

**2 La Cornea** **3**

2.1 Morfologia della cornea . . . . . 3

2.2 Innervazione della cornea . . . . . 4

2.3 Beading o *'forma a rosario'* . . . . . 6

**3 Formulazione dell'algoritmo** **9**

3.1 Immagini . . . . . 9

3.2 Individuazione dei nervi corneali . . . . . 10

3.2.1 Estrazione dei seed points . . . . . 11

3.3 Calcolo della tortuosità . . . . . 14

3.4 Individuazione Beading . . . . . 17

**4 Risultati** **21**

4.1 Densità dei nervi corneali . . . . . 21

4.2 Osservazioni e conclusioni . . . . . 25

# Sommario

Questa tesi tratta dell'analisi automatica di immagini confocali della cornea, e della stima di parametri clinici con particolare attenzione al fenomeno del *Beading*.

Esistono malattie e distrofie della cornea che possono pregiudicare la vista, alcune causano gravi disabilità, altre vengono scoperte solo grazie a visite dell'occhio. Le fibre nervose, le cellule endoteliali, i cheratociti sono molto sensibili alle patologie della cornea provocando cambiamenti nella sua morfologia. Questi cambiamenti delle strutture corneali sono correlati all'età, all'uso di lenti a contatto, ad interventi chirurgici all'occhio, al trapianto oppure a malattie sistemiche come il diabete.Un modo rapido e non invasivo, che ci permette di acquisire in vivo immagini della cornea e delle sue strutture interne, è la microscopia confocale. Al giorno d'oggi, la maggior parte delle analisi delle strutture corneali viene svolta attraverso sistemi manuali o semi-automatici, i parametri clinici che ne derivano quindi sono soggetti ad errore e mancano ripetibilità. Elaborare le immagini derivanti dalla microscopia confocale è risultato utile al fine di ricavare informazioni sullo stato di salute della cornea.

Per questi motivi si suggerisce di utilizzare un affidabile strumento automatico per la valutazione delle patologie della cornea. Individuare le strutture anatomiche della cornea, misurare quantitativamente le strutture individuate, e infine stimare i parametri di interesse clinico, sono le fasi che ogni strumento automatico di elaborazione della cornea deve seguire.

In questa tesi, verrà descritto un algoritmo che estrarrà le fibre nervose, calcolandone dei parametri clinici come tortuosità e lunghezza di ogni nervo. Successivamente l'algoritmo individuerà nelle strutture nervose il fenomeno del *Beading*. Gli algoritmi presentati consentiranno di ricavare una descrizione clinica dettagliata della cornea per quanto riguarda le fibre nervose. Si potrà quindi sviluppare uno strumento diagnostico di aiuto alla pratica clinica.

# Capitolo 1

# Introduzione

## 1.1 Scopi e Obiettivi

Lo scopo del lavoro presentato in questa tesi è quello di sviluppare una serie di strumenti in grado di analizzare automaticamente immagini confocali della cornea, ricavandone importanti dati clinici.

La cornea è quella membrana avascolare pluristratificata con peculiari caratteristiche ottico-fisiche di trasparenza e rifrazione della luce. Essa rappresenta la componente più importante del diottro oculare, ed è spessa circa 500 µm al centro mentre 700-800 µm in periferia. Dal punto di vista istologico la cornea è formata da tre strati principali e tra di essi si trovano due membrane. L'epitelio, è separato dallo stroma attraverso la membrana di Bowman, mentre lo stroma è separato dall'endotelio attraverso la membrana di Descemet. La cornea è l'unica parte del corpo umano che non ha afflusso di sangue, essa riceve l'ossigeno direttamente dall'aria. Grazie alla microscopia confocale, si può acquisire in vivo ed in maniera non invasiva immagini dai vari strati della cornea.

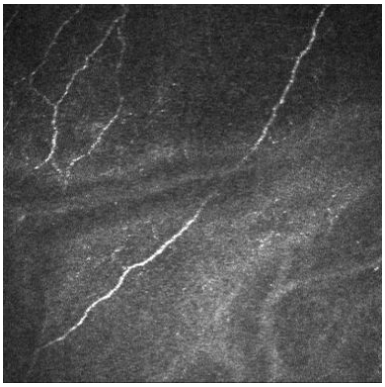


Figura 1.1: Immagine dello strato subbasale della cornea ottenuta con microscopio confocale.

Analizzare queste immagini è molto importante per ricavare e sviluppare informazioni cliniche per quanto riguarda lo stato di salute della cornea. In particolare, le immagini prese ad una specifica profondità permettono la visualizzazione delle strutture nervose presenti. La cornea infatti, è molto ricca di fibre sensitive, è dotata anche di innervazione simpatica che coopera con le strutture precedenti. I nervi corneali sono strutture strette e allungate che si estendono in uno strato di circa 10 µm, e forniscono importanti informazioni a livello clinico. Possono subire danni legati all'età, all'uso di lenti a contatto, trapianti, operazioni chirurgiche. Un importante collegamento è dato dalla correlazione della tortuosità del nervo con la neuropatia diabetica, una delle complicanza pù gravi e più diffuse provocate dal diabete.

# Capitolo 2

# La Cornea

## 2.1 Morfologia della cornea

L'occhio è l'organo deputato alla vista, è composto da più parti che devono lavorare tutte assieme per garantire una buona visione; ha una superficie sferica, il diametro verticale è pari a 24 mm mentre il diametro orizzontale è poco più largo. La luce attraversa la cornea che ne permette il passaggio verso le strutture interne dell'occhio, facendo convergere i raggi luminosi verso la fovea. La cornea è quella parte trasparente dell'occhio che ricopre l'iride, la pupilla e la camera anteriore. A causa della sua trasparenza, è importante notare come la cornea sia priva di irrorazione sanguigna; essa riceve i nutrienti dall'esterno attraverso i fluidi lacrimali, dall'interno attraverso l'umor acqueo e anche dalle proteine che possiedono i nervi corneali. Nel corpo umano la cornea ha un diamtro di circa 11.5 mm, uno spessore di 0.5-0.6 mm al centro e di 0.6-0.8 mm nelle zone più esterne. La cornea è formata da tre strati principali e da due membrane che separano gli strati stessi. Andando dall'esterno verso l'interno dell'occhio troviamo: l'epitelio, la membrana di Bowman, lo stroma, la membrana di Descemet e infine l'endotelio.

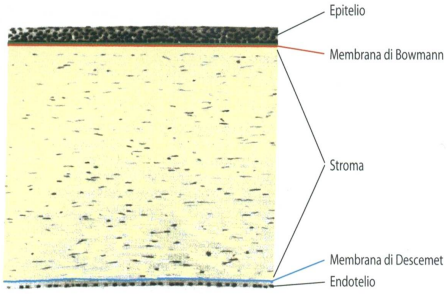



Figura 2.1: Ricostruzione degli strati corneali.

## 2.2 Innervazione della cornea

La cornea è uno dei tessuti più sensitivi del nostro corpo poichè è ricca di fibre nervose sensoriali. I nervi corneali derivano dai lunghi nervi ciliari, i quali a loro volta derivano dal ramo oftalmico del trigemino. A livello del limbus sclerocorneale, le fibre nervose provenienti dai nervi ciliari lunghi sono disposti in un plesso circolare dal quale originano altre fibre. Queste fibre scorrono radialmente con diversi anastomosi all'interno dello stroma posteriore, formando il plesso profondo della cornea. Le sottili fibre nervose originate da questo plesso, formano il plesso nervoso subbasale che si estendono superficialmente consentendo l'innervazione allo strato di cellule basali epiteliali; terminando all'interno dello strato superficiale epiteliale. La maggior parte delle fibre nervose corneali di origine sensoriale, sono derivate dal ramo oftalmico del nervo trigemino. Tuttavia, in alcuni casi la cornea inferiore riceve alcune delle la sua innervazione dal ramo mascellare del trigemino. Tutte le cornee dei mammiferi ricevono anche innervazione simpatica dal ganglio cervicale superiore. La maggior parte delle fibre nervose degli esseri umani, si trovano nel terzo anteriore della stroma, si spostano dalla periferia verso il centro al di sotto il terzo anteriore dello stroma a causa dell'organizzazione delle lamelle di collagene.

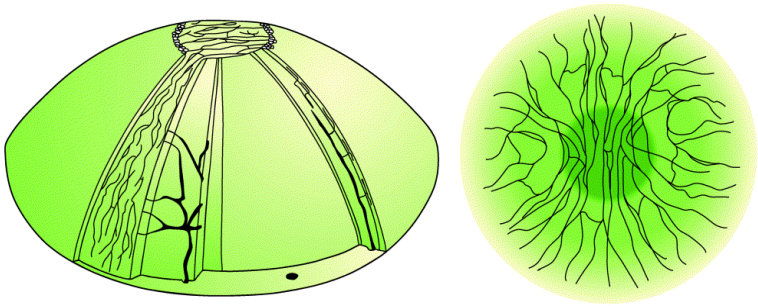


Figura 2.2: Sinistra: Schematica distribuzione dei nervi nello stroma e nel plesso subbasale. Destra: Schema dell'organizzazione del plesso subbasale. Nel vertice i fasci nervosi mostrano un orientamento preferenziale in direzione superiore-inferiore e nella zona circostante tendono ad essere orientati nella direzione nasale-temporale.

A livello dello stroma si possono trovare anche lamelle immerse in una sostanza fondamentale e cheratociti. La sostanza fondamentale è formata da mucopolisaccaridi, mentre i cheratociti sono cellule appiatite simili a fibroblasti. I Cheratociti sono spesso localizzati in prossimità delle fibre nervose e a volte avvolgono le fibre nervose adiacenti in con estensioni citoplasmatiche. Contatti fisici tra i nervi e i cheratociti si osservano più frequentemente in cornee di pazienti affetti da cheratocono. Nella cornea umana, i nervi penetrano nello strato di Bowman attraversando la cornea periferica e centrale. Dopo aver penetrato lo strato di Bowman, i grandi fasci nervosi si dividono in fasci più piccoli. Ogni piccolo fascio quindi si estende parallelamente alla superficie corneale, tra strato di Bowman e le cellule basali dello strato epiteliale.

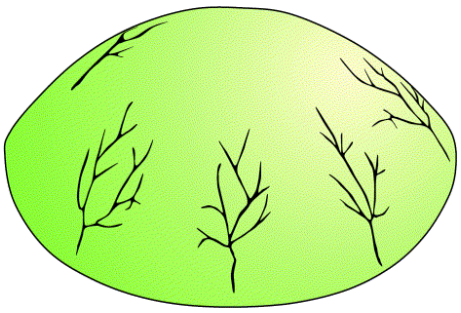


Figura 2.3: Distribuzione radiale delle fibre nervose dello stroma nella corne umana.

## 2.3 Beading o *' forma a rosario '*

Uno degli scopi di questa tesi è l'individuazione del fenomeno del *Beading*, detto anche ' forma a rosario '. La cornea umana è densamente innervata e le informazioni sulla distribuzione delle fibre nervose e delle ultrastrutture sono scarse. Le sezioni frontali mostrano che i nervi corneali consistono in fibre nervose con un diametro relativamente piccolo (0.1 µm a 1.0 µm) contenenti vescicole chiare e dense. Le fibre nervose mostrano anche delle 'perline' disposte ad una distanza regolare una dall'altra. Queste 'perline' prendono il nome di *bead* ( in italiano rosario), in quanto caratterizzano le fibre nervose per tutto il loro corso. A livello dei *bead*, le fibre presentano mitocondri e vescicole più chiare. Le fibre nervose, sono caratterizzate dalla presenza di molte vescicole e molti mitocondri di differenti tipi e dimensioni, distribuite uniformemente lungo tutto il percorso del nervo. Le vescicole chiare e dense disposte lungo il nervo, differiscono tra di loro in grandezza.

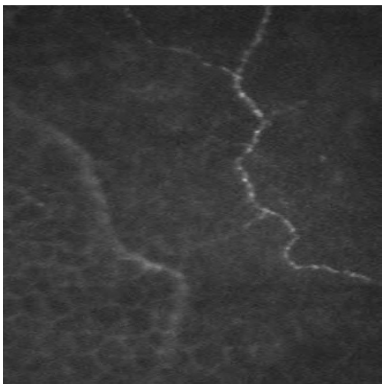


Figura 2.4: Nervi nel plesso subbasale, il fenomeno del *Beading* è visibile ad occhio nudo nella fibra nervosa che si estende a destra.

In generale, le vescicole più dense sono larghe il doppio delle vescicole più chiare, ma qualche volta avviene anche il contrario. Spesso le fibre nervose di dimensioni più grandi contengono molti più mitocondri e vescicole rispetto alle fibre nervose di minor diametro e lunghezza, non tutte le fibre presentano però a livello dei *bead* mitocondri e vescicole, alcune presentano entrambi altri solo mitocondri. La differenza in questi *bead* può essere dovuta dalle sezioni casuali, poichè l'assenza delle vescicole in una sezione non implica la loro presenza al'interno del *bead*. La funzione di questi *bead* è ancora poco chiara, ma la loro apparenza ci suggerisce che potrebbero essere adibiti all'assunzione o al rilascio di sostanze extracellulari dalle cellule epiteliali adiacenti. Grazie al microscopio confocale, si può notare come gran parte delle fibre nervose siano affette da questa carattteristica forma a rosario, in alcune fibre il fenomeno è visibile anche ad occhio nudo, ma si consiglia sempre di svolgere un' accurata analisi automatica.

# Capitolo 3

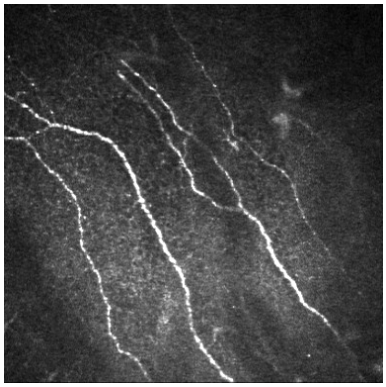
# Formulazione dell'algoritmo

## 3.1 Immagini

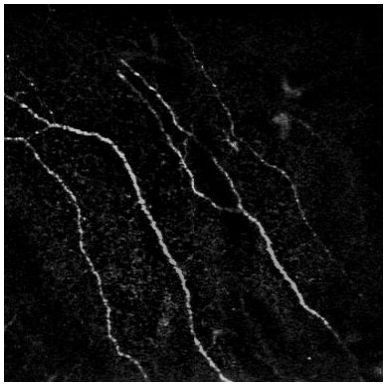
Le immagini del tessuto subbasale epiteliale sono state acquisite in persone sane e in persone affette da diabete con il microscopio confocale Heidelberg SLO. Le immagini acquisite sono state salvate come immagini digitali in bianco e nero di area 384x384 pixel corrispondenti ad un'area di 400x400 microns . I nervi in queste immagini, appiono come strutture lineari di colore più chiaro rispetto allo sfondo. Le immagini non hanno una luminosità e un contrasto uniforme infatti esibiscono zone più scure nelle regioni esterne, per questo hanno bisogno di una pre-elaborazione. Le regioni più scure sono dovute a diversi fattori ad esempio dalla non uniforme riflessione della luce nelle diverse aree corneali causata dalla forma sferica degli strati della cornea. Per compensare il problema delle zone più scure è stato applicato un filtro gaussiano passa alto a partire da un filtro gaussiano in frequenza. Una gaussiana posta al centro dell'immagine risulta essere un filtro passa-basso con banda passante dipendente dalla sua varianza. A partire da questo filtro, si può ottenere il corrispondente filtro passa-alto tramite la relazione Gpa = 1-Gpb.

$$g(x,y) = \frac{1}{2\pi|\sum|^{1/2}} e^{-0.5[(x,y)-\mu]^{\intercal} \sum^{-1} [(x,y)-\mu]}$$

La relazione precedente rappresenta una funzione gaussiana bidimensionale, dove µ è il vettore delle medie e $\sum$ è la matrice di covarianza. Grazie al filtro gaussiano, ad ogni pixel dell'immagine originale viene applicata la matrice di convoluzione ottenendo una sfocatura controllata, utile ad esempio per elaborazioni successive. Grazie alla pre-elaborazione, le strutture nervose sono molto più visibili anche nelle zone periferiche dell'immagine.



(a) Immagine originale, presa con microscopio confocale.



(b) Immagine pre-elaborata con filtro gaussiano.

Figura 3.1: Confronto visivo tra immagine originale presa con microscopio confocale (a) e immagine pre-elaborata con filtro gaussiano bidimensionale (b). Nell'immagine pre-elaborata vengono messe in risalto le alte frequenze (zone chiare), a discapito delle basse frequenze (zone scure e sfondo).

## 3.2 Individuazione dei nervi corneali

Le immagini prese ad una specifica profondità, permettono la visualizzazione delle strutture nervose all'interno dello strato subbasale della cornea. Queste fibre nervose sono strutture allungate che si distendono lungo uno strato molto sottile di circa 10 µm.

Queste strutture sono molto importanti, in quanto consentono di ricavare utili informazioni cliniche correlate al cambiamento dell'età, all'uso prolungato di lenti a contatto oppure interventi alla cornea che potrebbero aver provocato lesioni. Un importante collegamento è la correlazione esistente tra la tortuosità del nervo e l'insorgere della neuropatia diabetica, malattia che causa danni al sistema nervoso periferico.

### 3.2.1 Estrazione dei seed points

L'algoritmo comincia individuando una serie di seed points, che saranno usati come punti iniziali per la procedura di tracciamento dei nervi. A tal fine viene disegnata una griglia di righe e colonne distanziate una dall'altra di 10 pixel. Tutti i pixel all'interno delle celle vengono quindi analizzati, se il loro livello di grigio supera una soglia di rilevazione posta empiricamente a 0.8 volte la media del livello di grigio dell'intera immagine, il pixel è considerato appartenente al nervo. Una sequenza di seed points consecutivi vengono considerati appartenenti al profilo del nervo. I nervi con un diametro molto largo oppure molto piccolo non vengono presi in considerazione in modo da diminuire il numero dei seed points rilevati.

Il tracciamento è basato in un'analisi passo dopo passo di linee consecutive di scansione lineare SL. La posizione della linea di scansione determina quali pixel sono sotto analisi. La linea di scansione $\mathrm{SL}_i$, al passo $i$, classifica e determina quali pixel possono essere considerati come appartenenti a nervi $\mathrm{VP}_i$. In generale, lungo la linea di scansione $\mathrm{SL}_i$ potrebbero essere identificati $n_i$ differenti profili di nervo. L'intensità dei valori dei pixel $p_k$, di una generica linea di scansione SL, vengono esaminati e classificati in due classi: " nervo" $(v)$ e "non nervo" $(\sim v)$ . La classificazione porta a definire un nuovo termine $P_k^v(SL)$ , vettore contenente la probabilità di ogni pixel $p_k$ in SL di essere " nervo ". La linea di scansione viene analizzata per determinare

tutte le sequenze di pixel consecutivi classificati come " nervo", che porta ad una prima serie di candidati di profili di nervo $\mathrm{VP}_i$. I candidati vengono esaminati nel seguente modo:

- tutti i profili $vp_{ij} \epsilon$ $\mathrm{VP}_i$ che sono più piccoli di $\delta_0$ vengono cancellati da $\mathrm{VP}_i$;
- tutti i profili $(vp_{ij},\ vp_{ik}) \epsilon$ $\mathrm{VP}_i$ che sono più vicini di $\delta_1$sono fusi in un unico profilo;
- tutti i profili che hanno un contrasto $\kappa$ inferiore ad una soglia $\delta_2$vengono cancellati da $\mathrm{VP}_i$;

dove $\delta_0$, $\delta_1$, $\delta_2$ sono valori di soglia scelti; $vp_{ij}$ sono tutti i profili individuati lungo la linea di scansione $i$ con (j = 1, ..., $\mathrm{n}_i$ ), mentre il contarsto $\kappa$ di un generico profilo vp in SL è definito come:

$$\kappa(vp, I) = \frac{|\beta^v(vp, I) - \beta^{\sim v}(vp, I)\ |}{max[\beta^v(vp, I) - \beta^{-v}(vp, I)]}$$

dove

$$\beta^v(vp, I) = \frac{\sum_{k=1}^{m} P_k^v(SL) I(p_k)}{\sum_{k=1}^{m} P_k^v(SL)}$$

$I(p_k)$ è l'intesità del pixel $p_k$ ed $m$ è il numero di pixel che contiene la generica linea di scansione SL. Per ogni profilo $vp$ viene calcolato il diametro e la parte centrale del nervo. Il diametro è definito come :

$$d(vp, I) = max_{i,j} \parallel p_i - p_j \parallel$$

mentre la parte centrale del nervo è definita dalla relazione :

$$c(vp, I) = \frac{\sum_{k=1}^{m} P_k^v p_k}{\sum_{k=1}^{m} P_k^v}$$

Grazie alle definizioni di diametro e di parte centrale trovate nelle linee di scansione $SL_{i-1}$ e $SL_i$, si può determinare la posizione della nuova linea di scansione $SL_{i+1}$. Il profilo corretto, uno per ogni linea di scansione, è dato dalla funzione $P$ definita come:

$$vp_i = P(VP_i) = argmin_{vp_{ij} \epsilon VP_i} \; s(vp_{ij})$$

dove $s$ è una funzione puntuale valutata per ogni punto del profilo del nervo $vp_{ij}(j = 1....n_i)$ identificato nella linea di scansione $SL_i$. La funzione s è definita invece dalla relazione:

$$s(vp_{ij}) = \frac{\theta(vp_{ij}) - \theta_{i-1}^*}{w_\theta} + \frac{d(vp_{ij}) - d_{i-1}^*}{w_d}$$

$$\theta_{i-1}^* = \frac{1}{2}[\theta_{i-2}^* + \theta_{i-1}]$$

$$d_{i-1} = \frac{1}{2}[d_{i-2}^* + d_{i-1}]$$

dove $\theta(vp_{ij})$ è la direzione definita dalla connessione del centro del profilo corrente $vp_{ij}$, e quello selezionato nella precedente linea di scansione; la direzione di riferimento è definita invece dal termine $\theta^*$; $\theta_{i-1}$ è la direzione definita dai centri dei nervi selezionati nella linea di scansione $(i-2)^{esima}$ e $(i-1)^{esima}$. Il diametro del profilo corrente è definito da $d(vp_{ij})$ mentre $d_i^*$ è il diametro di riferimento; $d_{i-1}$ è il diametro del profilo selezionato nella $(i-1)^{esima}$ linea di

scansione. I valori di riferimento sono stati introdotti al fine di imporre una certa regolarità nella scelta del diametro e della giusta direzione, per prevenire brusche variazioni nelle fasi successive di individuazione.

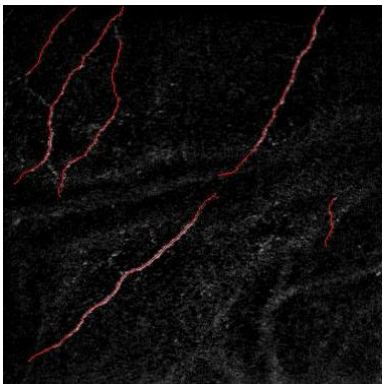


Figura 3.2: Risultato rappresentativo della tecnica del tracciamento dei nervi.

## 3.3 Calcolo della tortuosità

La tortuosità è tra le prime alterazioni che colpiscono le fibre nervose nella cornea. Uno dei primi cambiamenti nella morfologia della cornea dovuti al diabete è l'aumento della tortuosità. La tortuosità può essere intuitivamente definita come un andamento meno regolare o rettilineo del corso del nervo.

Prima di valutare il significato clinico dei cambiamenti nel tempo della tortuosità, bisogna capire i principali fattori che influenzano la classificazione di un nervo da tortuoso a non tortuoso. Date due curve continue ed adiacenti $s_1$ e $s_2$, la combinazione delle due è data dalla relazione:

$$s_3 = s_1 \oplus s_2.$$

e la tortuosità $\tau$ delle due curve può essere espressa da:

$$\tau(s_1) \leq \tau(s_2) \Longrightarrow \tau(s_1) \leq \tau(s_1 \oplus s_2) \leq \tau(s_2)$$

Questo significa che con la composizione di due curve, la tortuosità risultante è compresa tra le tortuosità delle due curve prese singolarmente. Poichè si suppone che le due curve appartengano allo stesso nervo, si può supporre che anche $s_3$ è continua senza perdite di generalità. La proprietà di composizione spiega come una curva $s$, composta da vari segmenti di curva $s_i$, avrà una tortuosità risultante che non potrà essere inferiore a qualunque delle sue componenti. La relazione è la seguente:

$$\tau(s_i) \leq \tau(s_1 \oplus s_2 \oplus ..... \oplus s_n)$$

$$\forall i = 1....n \text{ ed } s_i \subseteq s.$$

Altre proprietà correlate alla tortuosità sono la modulazione ad ampiezza costante, e ampiezza di modulazione a frequenza costante. Si può assumere che più un nervo è tortuoso, più grande sarà il numero dei cambiamenti nel segno della curvatura *(twist)*. L'ampiezza è definita come la distanza massima delle curva dalla corda sottostante; più grande sarà l'ampiezza del segmento di una curva, maggiore sarà la tortuosità correlata al segmento stesso. Un segmento di curva compreso tra due cambiamenti di segno consecutivi può essere definito come una 'turn curve'. Dati due nervi che hanno le stesse turn curve e la stessa ampiezza, la differenza in tortuosità deriva dal numero di turn curve $\varphi$.

$$\varphi(s_1) \leq \varphi(s_2) \Longrightarrow \tau(s_1) \leq \tau(s_2)$$

e al contrario, per due nervi con lo stesso numero di turn curve, con la stessa frequenza la differenza di tortuosità dipende dall'ampiezza $\alpha$ delle turn curve.

$$\alpha(s_1) \leq \alpha(s_2) \Longrightarrow \tau(s_1) \leq \tau(s_2)$$

In modo più approfondito un nervo corneale può essere definito come una curva

$$s(l) = [x(l),\, y(l)] : D \subset \mathbb{R} \rightarrow \mathbb{R}^2$$

con $s \epsilon C^1(\mathbb{R})$ e con $l$ le coordinate curvilinee definite in un intervallo $D$ di $\mathbb{R}$.

Molto utili al fine del calcolo della tortuosità sono la *lunghezza della corda* $L_\chi$, la *lunghezza della curva* $L_c$ e la *curvatura* $\kappa(l)$ stessa della curva $s(l)$ definite nel modo seguente:

$$L_\chi = \| \, s(max(D)) - s(min(D)) \, \|$$

$$L_c = \int_{min(D)}^{max(D)} \| \, \frac{\partial s}{\partial l} \, \| \, dl$$

$$\kappa(l) = \frac{\frac{dx}{dl}\frac{d^2y}{dl^2} - \frac{d^2x}{dl^2}\frac{dy}{dl}}{((\frac{dx}{dl})^2 + (\frac{dy}{dl})^2)^{\frac{3}{2}}}$$

In questa tesi, la valutazione della tortuosità avviene decomponendo ogni nervo in un insieme di segmenti consecutivi con segno di curvatura costante. Un segmento $s_i$ di un nervo appartenente alla curva $s$ viene definito come turn curve se:

$$[\kappa(l) \geq 0,\, \forall l \epsilon D_i] \vee [\kappa(l) \leq 0,\, \forall l \epsilon D_i]$$

dove $D_i$ rappresenta una sottoclasse di $D$. Una volta che che la curva $s(l)$ viene divisa in $n$ turn curve possiamo quantificare la tortuosità del nervo come:

$$\tau(s) = \frac{n-1}{n}\frac{1}{L_c}\sum_{i=1}^{n}[\frac{L_{cs_i}}{L_{\chi s_i}} - 1]$$

La formula precedente per il calcolo della tortuosità di un nervo permette di ricavare alcune considerazioni. Quando n è uguale ad 1, la tortuosità vale ragionevolmente 0; siamo nel caso in cui una curva non cambia mai convessità, la curva quindi ha convessità costante. Quando n è diverso da 1, la tortuosità non sarà mai uguale a 0. La tortuosità ricavata ha la dimensione di 1/lunghezza può quindi essere interpretata come *densità di tortuosità*.

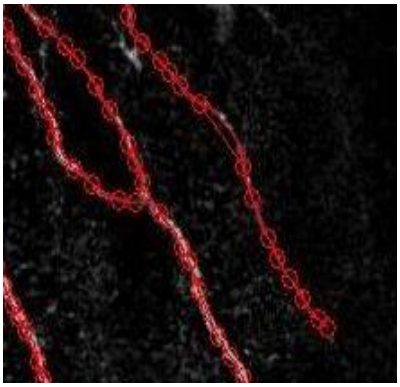


Figura 3.3: Risultato rappresentativo del calcolo della tortuosità, i pallini rossi presenti lungo il corso del nervo corrispondono al cambiamento di concavità del nervo stesso *(twist)*.

## 3.4 Individuazione Beading

Prima di iniziare con l'individuazione del fenomeno del *Beading* si è deciso di migliorare il contrasto dell'immagine da elaborare; migliorando il contrasto i valori di intensità dell'immagine originale ($I$) vengono mappati in una nuova immagine($J$) in modo tale che l'1% dei dati è saturo a bassa e ad alta intensità di $I$. Poichè il fenomeno del *beading* presenta nel corso del nervo zone più chiare dovute alla presenza di vescicole e mitocondri, per l'individuazione si è deciso di effettuare un'operazione di sogliatura. Procedendo con l'algoritmo, si aumenta il contrasto dell'immagine in uscita ($J$). Successivamente all'immagine di uscita viene applicata un'operazione morfologica di chiusura, usando come elemento strutturante una matrice 3x3 formata da 0 e 1.

Per eliminare i disturbi in eccesso, viene usato un filtro media che, per determinare il valore del pixel di destinazione sfrutta non solo il valore del pixel stesso nell'immagine originale, ma anche il valore di alcuni pixel ad esso vicini. La dimensione di tale vicinanza è stata impostata grazie all'uso di una finestra, su cui l'operatore deve lavorare.

$$\frac{1}{9}\begin{matrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \end{matrix}$$

Svolgendo una sottrazione, che avviene nei pixel corrispondenti tra l'immagine elaborata con la chiusura e l'immagine elaborata con il filtro media abbiamo come risultato la seguente immagine digitale:

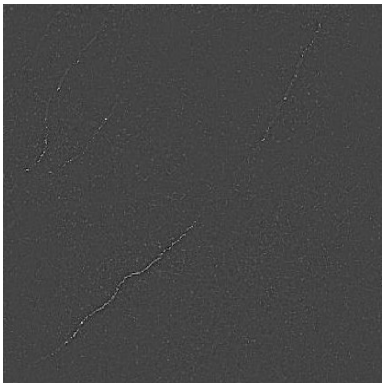
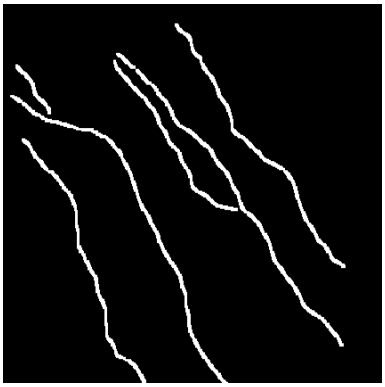


Figura 3.4: L'immagine viene elaborata con un filtro media per eliminare i disturbi in eccesso.

Si può notare come lungo il percorso del nervo siano presenti pixel molto più chiari rispetto a pixel dello sfondo. Per evidenziare i pixel più chiari all'interno del nervo si è scelto di applicare una soglia, che viene scelta dall'operatore. La soglia in questo caso viene scelta empiricamente, ed

è settata a 0.4 volte rispetto al massimo del livello di grigio dei pixel della fibra nervosa. L'utilizzo della soglia oltre a sottolineare i pixel di intensità superiore all'interno del nervo, evidenzia anche alcune zone presenti nello sfondo, zone che non devono essere prese in considerazione al fine della rilevazione del fenomeno del *Beading*. Per questo l'immagine ha bisogno di altre elaborazioni. Per l'eliminazione dei falsi positivi, vengono create due immagini digitali, derivanti sempre dall'immagine originale pre-elaborata ($J$). Viene creata una maschera contenente i nervi identificati e attraverso un'operazione morfologica di apertura, tutti i nervi vengono dilatati. Questa operazione viene svolta in modo che nelle operazioni successive vengano presi in considerazione anche i pixel vicini al profilo del singolo nervo individuato. La seconda immagine contiene invece il fenomeno del *Beading* che ci interessa rilevare, più altri pixel in eccesso rilevati nello sfondo.



(a) I nervi vengono portati a valore logico alto mentre lo sfondo valore logico basso

(b) Vescicole e mitocondri sono portati a livello logico alto, l'immagine contiene anche qualche falso positivo.

Figura 3.5: Attraverso l'operazione logica *AND* gli indici dei pixel vengono confrontati, questo per eliminare i falsi positivi rilevati.

Nel corso dell'algoritmo è stata creata anche una funzione, consistente in una maschera, che elimina le strutture individuate formate da più di 5 pixel, questo poichè i *bead* sono caratterizzati da microstrutture con numero di pixel inferiore, permettendo così di eliminare dei falsi positivi. Gli indici del fenomeno del *Beading* vengono quindi mappati sull'immagine originale pre-elaborata ($J$) per avere un riscontro visivo delle operazioni svolte.

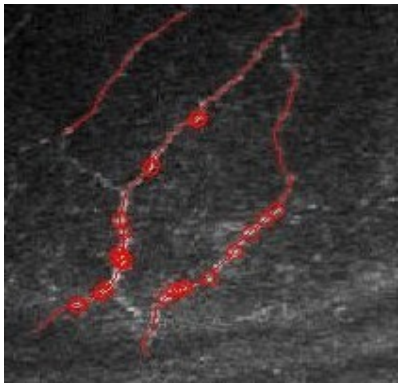


Figura 3.6: Risultato rappresentativo del fenomeno del Beading, i pallini rossi lungo il percorso del nervo indicano la presenza di vescicole o mitocondri invaginati dalle fibre nervose.

# Capitolo 4

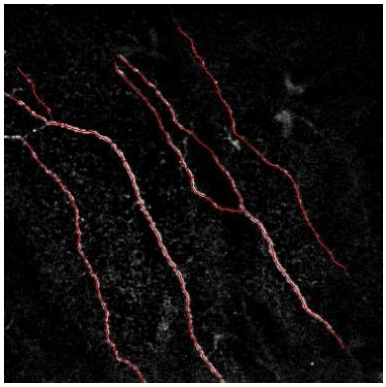
# Risultati

In questa tesi sono state elaborate 21 immagini digitali dell'epitelio subbasale della cornea. Le immagini sono state prese da pazienti sani (N=12), e da pazienti malati (N=9). Le immagini sono state acquisite con un microscopio confocale, coprono una superficie di 400x400 microns e sono state salvate come immagini JPEG monocromatiche di 384x384 pixel. Le stesse immagini sono state elaborate con l'algoritmo proposto, per fornire la valutazione di dati clinici come la tortuosità e lunghezza delle singole fibre nervose e l'individuazione del fenomeno del *Beading*. A causa della curvatura degli strati corneali e del possibile non perfetto allineamento del microscopio confocale con l'occhio, molte delle immagini presentano zone che non fanno parte dello strato subbasale come ad esempio stroma ed epitelio.

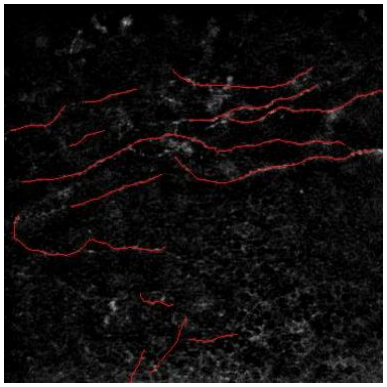
## 4.1 Densità dei nervi corneali

Una distribuzione omogenea di fibre nervose attraverso la cornea, garantisce un rilevamento efficace di stimoli esterni nocivi e lesioni a singole cellule epiteliali, che possono essere sufficienti a far scattare la percezione del dolore. Lo studio dei soggetti, sia sani che malati mostra una media di 7-8 fasci nervosi per immagine nei pazienti sani, media che si alza tra i 10-11 fasci nei pazienti malati di diabete. Data l'ipotesi che l'immagine è circa 0,15 $mm^2$ in termini di

dimensioni, e che la superficie totale del cornea umana è di circa 90 $mm^2$, è possibile calcolare che nel plesso subbasale umano, sono presenti circa 5400-7200 fasci nervosi. Poiché ogni nervo subbasale dà origine a rami laterali, ognuno contenente 3-7 assoni, il numero totale di assoni nel plesso subbasale può essere stimato a circa 19 000-44 000. La media più alta nei soggetti diabetici, è dovuta al fatto che le fibre nervose non riescono più a stare coese tra di loro. Si può ipotizzare che l'incremento del numero delle fibre nervose sia dovuto al fatto che i soggetti malati possiedono meno macromolecole adesive e scarsa abilità epiteliale di aderenza. Come si può notare dall'immagine, i nervi principali nei soggetti malati non possiedono più molte biforcazioni e questo porta ad avere un numero maggiore di singole fibre. Queste singole fibre sono caratterizzate da minor lunghezza rispetto alle fibre dei pazienti sani, ma da maggior tortuosità.



(a) Plesso subbasale di soggetto sano



(b) Plesso subbasale di soggetto affetto da diabete.

Figura 4.1: Le fibre nervose nel soggetto sano risultano coese e continue (a). Nel soggetto affetto da diabete le fibre nervose non riescono più a stare coese tra di loro risultando discontinue e più tortuose.

Confrontando le immagini dei pazienti sani e dei soggetti affetti da diabete, non sono state riscontrate sostanziali differenze per quanto rigurda l'aspetto morfologico dell'epitelio basale, dello stroma, e dell'endotelio.

| | Densità nervi corneali ($\mu m/mm^2$) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Media | Std dev | Min | Max |
| Tutti i soggetti (N=21) | $7.41 \times 10^{-4}$ | $2.50 \times 10^{-4}$ | $3.43 \times 10^{-4}$ | $12 \times 10^{-3}$ |
| Soggetti sani (N=12) | $7.32 \times 10^{-4}$ | $2.56 \times 10^{-4}$ | $3.45 \times 10^{-4}$ | $12 \times 10^{-3}$ |
| Soggetti malati (N=9) | $7.50 \times 10^{-4}$ | $2.56 \times 10^{-4}$ | $3.43 \times 10^{-4}$ | $1 \times 10^{-3}$ |

Tabella 4.1: Dati densità dei nervi corneali

Circa la lunghezza dei nervi corneali, si rilevano sostanziali differenze tra soggetti sani e soggetti malati. I dati ricavati nei pazienti sani risultano molto superiori rispetto a quelli malati.

| | Lunghezza ($\mu m$) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Media | Std dev | Min | Max |
| Tutti i soggetti (N=21) | 14.450 | 9.942 | 3.812 | 47.916 |
| Soggetti sani (N=12) | 17.313 | 11.990 | 3.958 | 47.916 |
| Soggetti malati (N=9) | 11.588 | 7.894 | 3.812 | 35.223 |

Tabella 4.2: Dati riguardanti la lunghezza dei nervi corneali

Mentre per quanto riguarda la tortuosità dei nervi corneali abbiamo che:

| Tortuosità ($1/\mu m$) | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Soggetti Sani | Media | Std dev | Min | Max |
| Bernazzolil(124) | 1.623 | 0.789 | 0.389 | 2.586 |
| Bernazzolil(126) | 1.877 | 0.749 | 0.771 | 2.832 |
| Bernazzolil(160) | 1.274 | 1.027 | 0.117 | 3.467 |
| Bernazzolil(164) | 1.095 | 0.964 | 0.058 | 3.874 |
| Bernazzolil(160) | 0.958 | 0.812 | 0.117 | 3.024 |
| Costag(64) | 1.129 | 0.745 | 0.176 | 2.368 |
| Costag(67) | 1.684 | 1.256 | 0.048 | 3.382 |
| Costag(68) | 2.436 | 2.713 | 0.328 | 9.542 |
| Costag(70) | 1.298 | 1.223 | 0.197 | 3.315 |
| Costag(73) | 1.626 | 1.804 | 0.192 | 5.642 |
| Costag(77) | 0.931 | 0.676 | 0.195 | 2.003 |
| Costag(79) | 0.693 | 0.609 | 0.093 | 2.078 |

Tabella 4.3: Dati tortuosità relativi a soggetti sani

| Tortuosità ($1/\mu m$) | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Soggetti Malati | Media | Std dev | Min | Max |
| Estifanosea(116) | 1.874 | 1.692 | 0.334 | 5.738 |
| Estifanosea(117) | 1.352 | 1.698 | 0.234 | 5.776 |
| Estifanosea(118) | 1.161 | 1.443 | 0.203 | 5.260 |
| Estifanosea(333) | 0.754 | 0.876 | 0.068 | 2.818 |
| Estifanosea(357) | 1.469 | 0.954 | 0.153 | 3.553 |
| Estifanosea(358) | 1.355 | 1.222 | 0.108 | 3.907 |
| Estifanosea(370) | 1.427 | 1.560 | 0.151 | 5.921 |
| Estifanosea(373) | 2.170 | 2.097 | 0.253 | 6.189 |
| Estifanosea(376) | 1.584 | 1.540 | 0.056 | 5.921 |

Tabella 4.4: Dati tortuosità relativi a soggetti malati

Confrontando i valori medi e i valori minimi delle due classi di immagini, non si riscontrano sostanziali differenze per quanto riguarda la tortuosità. Considerando invece i valori massimi si notano sostanziali differenze. I soggetti malati presentano valori nettamente superiori rispetto ai soggetti sani.

| | Densità fenomeno Beading ($n^o pixel/\mu m$) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Media | Std dev | Min | Max |
| Tutti i soggetti (N=21) | 0.749 | 0.32 | 0.081 | 1.336 |
| Soggetti sani (N=12) | 0.806 | 0.371 | 0.081 | 1.336 |
| Soggetti malati (N=9) | 0.702 | 0.248 | 0.234 | 0.944 |

Tabella 4.5: Dati relativi al fenomeno del Beading

Osservando i dati ricavati della Tabella 4.5, si può notare come il fenomeno del *Beading* sia inferiore in media nei soggetti diabetici di circa un 10% . Questi dati vengono confermati dal fatto che i soggetti affetti da diabete possiedono fibre nervose con una minore capacità di invaginare mitocondri e vescicole rispetto alle fibre nervose corneali di soggetti sani. Il minor numero di vescicole e mitocondri invaginati suggerisce che ci potrebbe essere minor rilascio di

sostanze extracellulari a livello corneale andando ad intaccare i compiti biologici adibiti alla cornea. La presenza di vescicole, mitocondri, e glicogeno nelle fibre nervose dello stroma e dell'epitelio indicano che i trasmettitori, probabilmente di origine sensoriale, innervano la cornea umana. Grazie a questi dati si può concludere che tutti i tipi di cellule come cellule epiteliali e mitocondri essendo entrambi invaginati dalle fibre nervose sono direttamente innervate. Questi risultati implicano che la densità delle fibre nervose, la diminuzione in lunghezza e l'aumento dei valori massimi della tortuosità di ogni nervo corneale, sono correlate con la malattia del diabete, ed eventualmente, possono spiegare le manifestazioni cliniche di complicanze corneali in forma grave della retinopatia diabetica. Da sottolineare il fatto che il diabete causa anche una diminuzione di sensibilità nella cornea. Tuttavia, non è ancora chiaro se questa diminuzione di sensibilità sia dovuta all'alterazione delle fibre nervose corneali. E' dimostrato anche come cambiamenti nella cornea che si manifesterebbero con l'avanzare dell'età, sono accelerati dal diabete.

Per sostenere le ipotesi avanzate in questo elaborato devono essere realizzati ulteriori studi. Sicuramente, le osservazioni presentate fungono da ulteriore sostegno rispetto alla tesi che il diabete ha un impatto significativo sulla integrità dei nervi corneali. Il metabolismo epiteliale corneale, l'adesione cellulare e la guarigione delle ferite dipendono da una adeguata innervazione corneale. In virtù del mio studio, non si può dimostrare direttamente che i cambiamenti epiteliali corneali sono attribuibili principalmente alla modifica del nervo. Tuttavia, questa tesi fornisce la prova che i cambiamenti dell'innervazione corneale sono possibili predittori dell'insorgere della retinopatia diabetica.

## 4.2 Osservazioni e conclusioni

L'algoritmo proposto per l'individuazione e per il calcolo di parametri clinici riguardanti le fibre nervose della cornea è totalmente automatico e non richiede l'intervento di nessun utente. Con questa applicazione, in 0.61 secondi con linguaggio MATLAB vengono calcolati importanti parametri clinici come lunghezza, tortuosità, densità dei nervi e infine il fenomeno del *Beading*. Le performance dell'algoritmo in generale sono condizionate dalla qualità dell'immagine. Luminosità, contrasto tra fibre nervose e sfondo e infine rumore, possono condizionare la rilevazione

automatica. Da sottolineare anche la presenza di altre strutture cellulari all'interno dell'immagine digitale, cellule epiteliali e cheratociti, potrebbero essere erroneamente riconosciuti come piccoli segmenti di nervo oppure potrebbero essere riconosciuti come fenomeno di *Beading*. Un attento settaggio del microscopio confocale, e un accurato allinemento dell'occhio non possono far altro che migliorare le performance. In vista di una futura applicazione clinica, sarebbe utile dare la possibilità all'utente di scegliere alcuni parametri, come ad esempio la scelta della soglia per l'individuazione del fenomeno del *Beading*.

# Bibliografia


[1] Linda J. Muller, Liesbeth Pels, and Gijs F. J. M. Vrensen. *Ultrastructural Organization of Human Corneal Nerves.* Investigative Ophtalmologist & Visual Science. 1996.

[2] Stefano De Cillà, Stefano Ranno, Elisa Carini, Paolo Fogagnolo, Gaia Ceresara, Nicola Orzalesi, and Luca M. Rossetti. *Corneal Subbasal Changes in Patients with Diabetic Retinopathy: An In Vivo Confocal Study.* Investigative Ophtalmologist & Visual Science. 2009.

[3] Enrico Grisan, Marco Foracchia, and Alfredo Ruggeri. *A Novel Method for the Automatic Grading of Retinal Vessel Tortuosity.* IEEE Trans. Med. Imaging. 2006.

[4] Alfredo Ruggeri, Fabio Scarpa, Enrico Grisan. *Analysis of corneal images for the recognition of nerve structures.* IEEE Trans. Med. Imaging. 2006.

[5] M. A. Dabbah, J. Graham, Mitra Tavakoli, Ioannis Petropoulos, and Rayaz A. Malik. *Nerve Fibre Extraction in Confocal Corneal Microscopy Images for Human Diabetic Neuropathy Detection using Gabor Filter.* ISBE, University of Manchester & Division of Cardiovascular Medicine. 2008

[6] Pei-Yao Chang, Hyman Carrel, Jen-Shang Huang, I-Jong Wang, Yu-Chih Hou, Wei-Li Chen, Jiun-Yi Wang, and Fung-Rong Hu. *Decresed Density of Corneal Basal Epithelium and Subbasal Corneal Nerve Bundle Changes in Patients with Diabetic Retinopathy.* Elsevier Inc. 2006.

[7] Nobuo Ishida, Gullapalli N. Rao, Manuel del Cerro, James V. Aquavella. *Corneal Nerve Alterations in Diabetes Mellitus.* Arch Ophtalmologist. 1984.

[8] Jiucheng He, Nicolas G. Bazan, Haydee E. P. Bazan. Mapping the entire human corneal nerve architecture. Neuroscience Center of Excellence and Department of Ophtalmology, Louisiana State University Health Sciences Center, School of Medicine, New Orleans, USA. 2010.

[9] Linda J. Muller, Carl F. Marfurt, Friedrich Kruse, Timo M.T. Tervo. Corneal nerves: structure, contents and function. Experimental Eye Research. 2003.