



Politecnico di Milano  
**SCUOLA DI INGEGNERIA INDUSTRIALE E DELL'INFORMAZIONE**  
Corso di Laurea in Ingegneria Biomedica

---

TESI DI LAUREA TRIENNALE

**Analisi delle variabilità delle caratteristiche di  
Reti microvascolari 3D**

Relatore

**Prof. Costantino Maria Laura**

Correlatore

**Dr. Possenti Luca**

Docente corso progetto:

**Prof. Giordano Carmen**

Candidati

**Rota Alberto – matr. 889895**

**Senesi Martina – matr. 886607**

**Stucchi Adelaide – matr. 887574**

**Venturelli Irene – matr. 887593**

# SOMMARIO

Il recente sviluppo della tecnologia *Organ-on-Chip* e, in particolare, dei dispositivi microfluidici, è accompagnato dalla necessità di metodi di analisi morfologica e topologica che forniscano risultati accurati in tempi rapidi.

Obiettivo di questo lavoro è lo sviluppo di un metodo di analisi computazionale applicabile a reti microvascolari 3D di qualsiasi dimensione, risoluzione e morfologia, che calcoli dei parametri quantitativi salienti. Dal volume tridimensionale ricavato dalla microscopia confocale viene ottenuta la segmentazione e, da essa, lo scheletro della rete, che fornisce una buona rappresentazione topologica del network vascolare. A partire da queste basi si ottengono i parametri morfologici, tra cui il raggio, la lunghezza e la tortuosità di ogni ramo con le rispettive distribuzioni riferite alla rete nel complesso. Questo algoritmo permette, inoltre, di interfacciare il network analizzato con un software per lo studio della fluidodinamica della rete.

Il metodo computazionale sviluppato è applicabile universalmente ed è versatile sulla performance: il settaggio di opportuni parametri permette di effettuare un'analisi che predilige l'accuratezza dei risultati o il tempo richiesto al calcolatore.

# ABSTRACT

The recent development of the *Organ-on-Chip* technology and, in particular microfluidic devices, has revealed the need for methods providing accurate and quick results, for both morphological and topological analyses.

The aim of this work is to develop a computational analysis method applicable to 3D microvascular networks of any size, resolution and morphology, which also calculates the significant quantitative parameters. The three-dimensional volume obtained from confocal microscopy is used as a starting point for the segmentation and then for the skeletonization of the network, which provides a good topological representation of the vasculature. From these bases is possible to obtain morphological parameters, including the radius, length and tortuosity of each branch with their network-related distributions as a whole. This algorithm also allows to interface the analyzed vessel structure with a software for the fluid-dynamic study of the network.

The computational method developed is universally applicable and is versatile on performance: by setting appropriate parameters is possible to perform an analysis that favors the accuracy of the results or the time required for the computer.

# INDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUZIONE .....</b>	<b>6</b>
	1.1 <i>Scopo della tesi</i>	8
<b>2</b>	<b>STATO DELL'ARTE .....</b>	<b>10</b>
	2.1 <i>K3M Algorithm</i>	11
	2.2 <i>AngioQuant</i>	11
	2.3 <i>VESGEN 2D</i>	12
	2.4 <i>RAVE</i>	13
	2.5 <i>AngioTool</i>	14
	2.6 <i>REAYER</i>	14
	2.7 <i>AngioQuant, AngioTool, RAVE e REAYER: un confronto</i>	15
<b>3</b>	<b>MATERIALI E METODI .....</b>	<b>18</b>
	3.1 <i>Metodi di Flattening</i>	19
	3.2 <i>Segmentazione e Scheletrizzazione</i>	20
	3.3 <i>Analisi e Parametri</i>	24
	3.4 <i>Simulazione Fluidodinamica</i>	33
	3.5 <i>Il Deep Learning come approccio alternativo per la segmentazione</i>	38
<b>4</b>	<b>RISULTATI.....</b>	<b>42</b>
	4.1 <i>Confronto con l'analisi bidimensionale</i>	42
	4.2 <i>Effetto del campionamento sui risultati</i>	44
	4.3 <i>Dipendenza dalla qualità dell'immagine in input</i>	45
	4.4 <i>Applicazione dell'algoritmo: network trattati con urea</i>	47
	4.5 <i>Simulazione fluidodinamica</i>	48
	4.6 <i>Deep Learning</i>	50
<b>5</b>	<b>DISCUSSIONE.....</b>	<b>58</b>
	5.1 <i>Confronto con l'analisi bidimensionale</i>	58
	5.2 <i>Effetto del campionamento sui risultati</i>	59
	5.3 <i>Dipendenza dalla qualità dell'immagine in input</i>	60
	5.4 <i>Applicazione: network trattati con urea</i>	60

5.5	<i>Simulazione fluidodinamica</i>	63
5.6	<i>Deep Learning</i>	64
5.7	<i>Limiti</i>	68
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONE .....</b>	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>70</b>

# 1 INTRODUZIONE

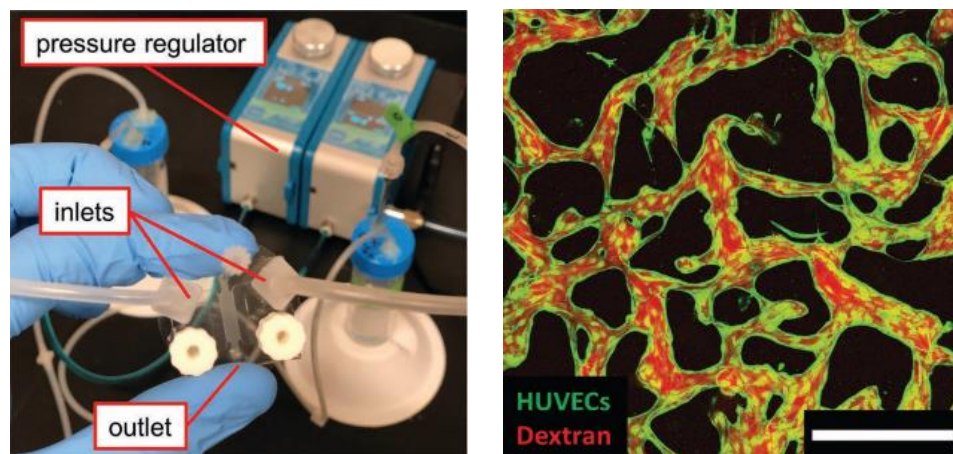
La microcircolazione fa riferimento ad una parte funzionale della circolazione del sangue estremamente importante, che si caratterizza per la ramificazione di piccoli vasi sanguigni. La funzione microcircolatoria principale è il trasporto di ossigeno e sostanze nutritive verso i tessuti e la rimozione di anidride carbonica e prodotti di scarto da essi, permettendo il normale funzionamento degli organi. Il sangue ricco di ossigeno viene trasportato a tutti i tessuti attraverso la rete delle arterie mentre quello carico di anidride carbonica e prodotti di scarto è riportato al cuore dalla rete venosa. La rete di vasi venosi e arteriosi costituisce un sistema chiuso in cui i capillari rappresentano il punto di collegamento tra i due circuiti, e, insieme ai vasi di dimensioni inferiori a 100  $\mu\text{m}$ , costituiscono quello che viene definito *microcircolo*. La struttura e la funzione del microcircolo sono altamente eterogenee nei diversi organi; in generale, la pressione motrice, il tono arteriolare, l'emoreologia e la pervietà sono i principali determinanti del flusso sanguigno capillare, il quale deve soddisfare il fabbisogno di ossigeno delle cellule dei tessuti. ([1])

I vasi in cui avviene lo scambio di sostanze sono i capillari, costituiti da un sottile strato di cellule endoteliali (circa 0,1-1  $\mu\text{m}$  di spessore) che poggia su una membrana basale, conformazione che rende la parete capillare ideale per lo scambio di sostanze con i tessuti. Il meccanismo che permette lo scambio di sostanze tra sangue e liquido interstiziale può essere passivo, nel caso in cui le molecole siano spinte dalla differenza di concentrazione presente tra i due compartimenti separati dalla membrana, o attivo, in cui lo scambio avviene contro gradiente. L'endotelio, presente nella parete capillare, regola il movimento dell'acqua e delle sostanze disciolte nel plasma interstiziale tra il sangue e i tessuti. Inoltre, è presente una particolare tipologia di cellule mesenchimali indifferenziate con funzione contrattile, definite pericitiche, le quali possono contrarsi e ridurre la dimensione dei vasi permettendo la regolazione del flusso sanguigno e della pressione.

Lo sviluppo tecnologico e le continue ricerche scientifiche hanno permesso la miniaturizzazione in vitro dei processi in vivo alla base della circolazione sanguigna appena descritti, attraverso l'analisi della microfluidica, campo di ricerca innovativo che si basa sullo studio del comportamento e sulla manipolazione di piccole quantità di fluidi (nano-picolitri) all'interno di canali cavi micrometrici. I dispositivi microfluidici ad oggi utilizzati sono definiti con il termine "lab-on-a-chip system" e prevedono il monitoraggio su un unico chip

di tutti i componenti necessari a svolgere le diverse tappe di un processo chimico. Questi chip, infatti, sono già utilizzati in molti laboratori per i notevoli vantaggi che presentano, principalmente associati ai ridotti volumi di fluido trattati.

Gli “Organ On Chip” sono particolari chip microfluidici tridimensionali destinati alle colture cellulari 3D, i quali offrono una potenziale alternativa ai test tradizionali sugli animali, permettendo di simulare le attività, la meccanica e la risposta fisiologica di interi organi o sistemi di organi, con l’obiettivo di ottenere un modello in vitro di organo artificiale. Il PDMS (PoliDiMetilSilossano) è il materiale più usato per la produzione di dispositivi microfluidici in virtù del semplice processo di fabbricazione e delle sue proprietà, come la permeabilità ai gas, la trasparenza ottica, la flessibilità, basso modulo elastico e la biocompatibilità; il tutto lo rende adatto nelle applicazioni biologiche. L’aspetto rilevante dei sistemi di coltura 3D risiede nella flessibilità delle colture in gel della matrice extracellulare (ECM) che consente alle cellule di cambiare forma e di creare connessioni cellulari difficilmente ottenibili su supporti rigidi di coltura.



**Figura 1.1** A sinistra, un dispositivo microfluidico. A destra la visualizzazione in microscopia confocale di un network microvascolare. La scala è di 200 $\mu$ m ([2]).

Una volta effettuata l’incubazione delle reti, possono essere svolti esperimenti di natura biologica, farmacologica e medica in modo tale da ricavare risultati che permettano di trarre conclusioni qualitative e quantitative di carattere biomedico: i networks vascolari in questione possono venire analizzati manualmente o in modo automatizzato. Nel primo caso

è possibile calcolare grandezze come il diametro dei rami, la loro lunghezza e il numero di branchpoints presenti, ma il tempo impiegato per ricavarli risulta maggiore rispetto a quello richiesto da un metodo automatizzato. Inoltre, uno degli aspetti più rilevanti che rende meno efficace un'analisi svolta manualmente è che essa, basandosi su una ricostruzione operatore-dipendente, è soggetta ad una più elevata probabilità di commettere errori.

Nel caso in cui si volessero effettuare delle simulazioni al calcolatore, è anche necessario sviluppare un metodo in grado di ricostruire geometricamente la rete.

## 1.1 Scopo della tesi

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è lo sviluppo di un metodo automatico per l'analisi di immagini tridimensionali di reti microvascolari che permetta di ricavare parametri quantitativi riferiti alla topologia e alla morfologia della rete, utili per trarre considerazioni riguardo alla qualità della vascolarizzazione, alla perfusione e alla performance fluidodinamica. I requisiti di progetto per l'algoritmo sono l'automatizzazione e l'applicabilità universale. L'algoritmo è automatizzato se non rende necessario l'intervento manuale dell'utilizzatore per la specifica di parametri di lavoro o per la modifica dell'immagine di partenza ottenuta dalla microscopia confocale; l'algoritmo è universale se applicabile ad immagini di dimensione, risoluzione e *aspect-ratio* qualsiasi, con la produzione di risultati comparabili anche tra reti differenti in questi aspetti.

Perché avvenga un'analisi completa e soddisfacente è necessario il raggiungimento di obiettivi secondari, riferiti a diversi step da raggiungersi prima dell'obiettivo principale.

**Attività di pre-processing dei dati:** La rete microvascolare può presentare una risoluzione differente nelle tre dimensioni che, se non correttamente riadattata, si ripercuote in imprecisioni e inconsistenze nelle misurazioni topologiche e morfologiche. In questa fase vengono effettuate operazioni di livellamento della rete e di proporzionamento della densità (espressa in  $\mu m/pixel$ ) sui tre assi.

**Analisi Topologica:** La caratterizzazione morfologica della rete e la simulazione fluidodinamica non possono lavorare con l'intero volume del vaso. È necessario quindi individuarne la *centerline* e le posizioni dei punti di biforcazione in modo da analizzare la



rete microvascolare dal punto di vista topologico, propedeutico alle misurazioni geometrico-morfologiche caratteristiche.

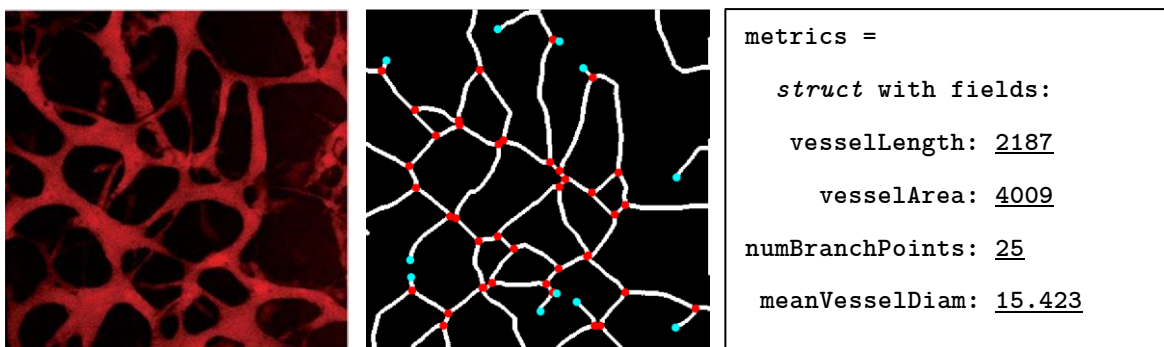
**Analisi Morfologica:** I parametri più significativi di una rete microvascolare sono quelli morfologici, indicativi degli aspetti geometrici dei vasi tra cui il raggio, la lunghezza, la tortuosità e l'area laterale. Da queste misurazioni è possibile ricavare anche considerazioni di carattere statistico utili per un confronto tra reti differenti.

**Simulazione fluidodinamica:** La caratterizzazione degli aspetti fluidodinamici di una rete microvascolare in tre dimensioni vengono ricavati attraverso un software già sviluppato in analisi precedenti per la risoluzione di un problema di Poiseuille monodimensionale sui vasi e, in contemporanea, di un problema di Darcy tridimensionale sul volume circostante, tramite un approccio agli elementi finiti. La topologia e la morfologia della rete devono essere quindi convertite su files interfacciabili con questo software.

## 2 STATO DELL'ARTE

Prima di procedere alla discussione dei metodi e delle procedure descritte all'interno di questo lavoro di tesi è stata effettuata un'analisi della letteratura disponibile sulle principali riviste scientifiche a carattere biomedico e ingegneristico. Tramite questa analisi è stato possibile apprendere, studiare e testare diversi metodi automatizzati precedentemente utilizzati per l'analisi computazionale di reti microvascolari.

In generale, un metodo automatizzato è la sequenza di istruzioni fornite al calcolatore deputata all'elaborazione di dati senza l'intervento dell'utente. Per quanto riguarda questo lavoro, la ricerca si è focalizzata su metodi applicabili a immagini di reti microvascolari provenienti da diverse tecniche di imaging, con l'obiettivo di estrapolare parametri quantificabili relativi alla morfologia, architettura e topologia della rete. La centerline dei vasi, il diametro, la tortuosità e i branchpoints sono i principali tra gli elementi ricavabili con questi algoritmi, nonché i più attinenti al nostro studio.



*Figura 2.1* A sinistra, l'immagine di una rete microvascolare da microscopia confocale. In centro, la riduzione allo scheletro e l'analisi topologica. A destra, i risultati numerici di un algoritmo computazionale 2D

Le immagini a disposizione provengono da microscopia confocale e sono state ottenute per mezzo del trattamento dei campioni con specifici marcatori cellulari; gli algoritmi presentati non sono sempre direttamente compatibili con questi dati, rendendo necessaria una fase di pre-processing. A differenza dei software commerciali utilizzati su larga scala e, spesso, integrati nei sistemi microscopici (Nikon's NIS- Elements, Mauna Kei Technologies' Cellvizio), gli algoritmi che verranno esposti in questo capitolo sono open-source, quindi facilmente adattabili agli specifici contesti di applicazione.

Come una qualsiasi valutazione automatizzata, i seguenti metodi permettono di ridurre la probabilità di errore umano e facilitano il calcolo dei parametri morfologici significativi della rete difficilmente ricavabili attraverso un'analisi manuale; in generale impiegano meno dell'1% del tempo richiesto per l'analisi manuale ( $3,089 \pm 1,355$  secondi a immagine).

## 2.1 K3M Algorithm

È stato analizzato anche un algoritmo di thinning con lo scopo di comprendere nel dettaglio l'implementazione matematica e computazionale della procedura alla base di tale metodologia. Con *algoritmo di thinning*, o di *scheletrizzazione*, ci si riferisce ad una successione di istruzioni governata da una logica sequenziale o iterativa (o, per quanto stiamo per presentare, mista) che, richiesta in input un'immagine come una matrice di pixels, ne genera un'altra di uguale dimensione contenente la riduzione dell'immagine stessa al suo scheletro.

In letteratura sono riportati svariati approcci allo sviluppo di questo algoritmo tra cui compaiono differenti definizioni di “scheletro dell'immagine”, ambiti di applicabilità e ottimizzazione dei risultati. Per questioni di inerenza con il nostro lavoro e di accessibilità a codice e documentazione, in questo elaborato è riportato un algoritmo a valenza universale utilizzabile per l'elaborazione di immagini binary o grayscale, il *K3M algorithm* [3]. Punto di forza di tale algoritmo è, appunto, l'ampia gamma di immagini provenienti da fonti diverse che possono venire processate: in [3] vengono presentati i risultati del thinning di calligrafie e caratteri tipografici, che risultano essere un espediente più che adatto all'approfondimento della comprensione riguardo all'operatività del metodo, nonché alla possibilità di estensione dello stesso a immagini biomedicali.

## 2.2 AngioQuant

*AngioQuant* [4] è uno strumento automatizzato di analisi delle immagini utilizzato per la quantificazione dell'angiogenesi, basato su linguaggio MATLAB® e progettato per l'analisi in vitro di colture di cellule endoteliali e fibroblasti. Come unità di base per la quantificazione

vengono considerati i complessi tubulari, ovvero reti di tubi collegati, dei quali vengono fornite misurazioni quantitative e riproducibili di:

- lunghezze misurate in pixel dallo scheletro dei tubuli
- dimensioni, misurate in pixel dal risultato della segmentazione
- numero di giunzioni

In particolare, è possibile misurare il valor medio e il valore totale di ogni grandezza.

*AngioQuant* è stato progettato per la rilevazione dei soli tubuli e non dei fibroblasti, che nella maggior parte dei casi risultano più pigmentati. Per aumentare la qualità dei risultati ottenuti, è necessario che vengano soddisfatti alcuni requisiti: innanzitutto è fondamentale che l'immagine in ingresso sia il meno sfocata possibile; secondariamente la fase di imaging deve essere eseguita immediatamente dopo l'esperimento di angiogenesi in laboratorio, in questo modo si assicura una intensità di colorazione sufficiente a fornire un adeguato contrasto tra i tubuli e il resto dell'immagine. Infine, l'immagine deve essere uniformemente illuminata in modo da distinguere i tubuli dal background dell'immagine stessa. Molto spesso infatti le immagini da processare presentano un'illuminazione disomogenea, pertanto diventa impossibile utilizzare la medesima soglia di eliminazione o di mantenimento dei pixel, in quanto gli angoli potrebbero essere più scuri rispetto al centro del vaso. Nel caso in cui l'immagine non sia ben illuminata, *AngioQuant* è comunque in grado di fornire una buona valutazione dello sfondo che è diversa per ogni porzione dell'immagine. Questo è il punto di forza di tale metodo, oltre all'applicabilità ad una vasta gamma di immagini differenti.

## 2.3 VESGEN 2D

*VESGEN 2D* è un software automatizzato e funzionante come plug-in su ImageJ, il quale mappa e quantifica gli effetti dei regolatori vascolari sulla morfologia dei vasi analizzando parametri significativi [5]. Tra questi: diametro del vaso, lunghezza, densità, punti di diramazione e dimensione frattale. Esistono infatti regolatori molecolari che determinano l'architettura del singolo vaso, come il fattore di crescita endoteliale VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), il quale determina la dilatazione del vaso e interessa solamente specifiche generazioni di ramificazioni vascolari.

Grazie all'utilizzo di questo software possono essere analizzate tre diverse strutture di tessuto vascolare: ramificazioni ad albero, reti e composizione di albero-reti. *VESGEN 2D* richiede in input esclusivamente un'immagine digitale binaria (in bianco e nero) nella quale l'architettura vascolare deve essere rappresentata in nero: tramite i concetti di *8-neighbor pixel-connectivity*, scheletrizzazione e mappa delle distanze l'algoritmo analizza le tre possibili strutture sopra citate. Il software mappa solitamente dalle 5 alle 12 generazioni di ramificazioni vascolari, a partire dal vaso principale [5].

*VESGEN 2D* è stato utilizzato per mappare e quantificare la progressione della retinopatia diabetica, una malattia vascolare che rappresenta la principale causa di cecità negli adulti in età lavorativa. Inoltre, può essere applicato per analizzare la regolamentazione dei farmaci in modelli in vivo.

## 2.4 RAVE

*Rapid Analysis of Vessel Elements*, in breve *RAVE* (2011), è fortemente ottimizzato per la quantificazione di parametri cruciali relativi alla distinzione tra immagini di microvascolatura tumorale o fisiologica. Sulla base della misurazione della frazione volumetrica del vaso (VVF, *Vessel Volume Fraction*), della densità di lunghezza (VLD, *Vessel Length Density*), della distribuzione del raggio del lume e della dimensione frattale è possibile distinguere immagini che, se analizzate manualmente, non sono immediatamente classificabili come patologiche o non-patologiche.

Gli sviluppatori di questo metodo hanno voluto creare un codice rapido e robusto, con un focus sulla ripetibilità di applicazione dell'algoritmo: *RAVE* [6] riduce infatti il tempo impiegato per l'analisi dell'immagine singola, mirando ad ottenere risultati corretti e consistenti in poco tempo anche da un batch di grande dimensione. Sebbene l'obiettivo principale dell'applicazione di questo metodo non sia l'elevata accuratezza delle misure, sono riportati in [6] i coefficienti di correlazione tra le misure computazionali e quelle manuali che risultano essere molto soddisfacenti, segnalando quindi che il trade-off tra tempo di analisi e accuratezza non risulta svantaggioso.

## 2.5 AngioTool

È un software codificato in Java che include il processo di segmentazione, scheletrizzazione e analisi del sistema vascolare, per questo risulta essere molto interessante al fine di compiere un'analisi completa dell'immagine. Rimane evidente il fatto che la coerenza dei valori ottenuti dall'analisi dipenda dall'attenta ottimizzazione dello scheletro nella fase iniziale dello studio.

*AngioTool* riceve in input un'immagine ottenuta tramite microscopio e al lancio vengono identificati i profili dei vasi in base ai parametri preimpostati del software. I vasi identificati sono delimitati da un contorno, il quale si aggiorna dinamicamente in risposta alle regolazioni effettuate usando i controlli inclusi nella scheda di analisi [7]. Una volta che la sovrapposizione del contorno corrisponde al vaso dell'immagine visualizzata, l'analisi può essere effettuata.

Al termine dell'indagine sulla rete vascolare, l'immagine risultante mostra l'intera area occupata dai vasi, alla quale viene sovrapposta la rappresentazione dello scheletro della rete e dei punti di diramazione all'interno dell'area stessa. L'immagine, dopo essere stata analizzata, viene salvata insieme ad un file Excel contenente i parametri di analisi e i risultati calcolati dal software.

Numerosi sono gli aspetti morfologici significativi che *AngioTool* ottiene, come la percentuale di area dell'immagine occupata dalla rete vascolare, il numero di vasi, la loro lunghezza e le loro giunzioni; inoltre permette di ottenere un indice di ramificazione, il quale risulta uguale al numero di branchpoints dei vasi normalizzato per unità di area. La normalizzazione di alcune metriche consente infatti il confronto di reti vascolari di dimensioni diverse.

## 2.6 REAVER

*REAVER* [8] è uno strumento open-source scritto in MATLAB® e pubblicato da alcuni ricercatori dell'Università della Virginia nel 2020.

Il suo compito è analizzare immagini riguardanti reti vascolari in 2D e può essere applicato a molteplici situazioni, nonché in esperimenti volti a valutare i possibili effetti causati da

perturbazioni esterne (ad esempio utilizzo di farmaci o particolari stati patologici) grazie alla sua capacità di processare immagini con architetture di partenza molto eterogenee tra loro. Al fine di accrescere questa caratteristica, infatti, i ricercatori hanno sviluppato l'algoritmo basandosi su un dataset di immagini di partenza diverso rispetto a quello utilizzato per il *fine-tuning*, ottenendo in questo modo anche una riduzione del rischio di errore sistematico da parte del programma.

Per mantenere la capacità molto elevata di distinzione delle strutture si va incontro ad un maggior rischio di riscontrare falsi positivi, i quali porterebbero ad un'alterazione nei risultati quantitativi. L'unico modo per rendere questo difetto meno frequente è puntare sull'accuratezza della segmentazione.

*REAYER* si basa su un codice semplice in grado di procedere tramite due fasi distinte: la segmentazione della rete su background locale e la scheletrizzazione con ulteriore rifinitura attuabile tramite l'utilizzo di diversi filtri [8]. La tecnica di processing sfrutta un valore di soglia di eliminazione o mantenimento capace di adattarsi a ciascuna diversa architettura della rete rendendolo molto accurato nella segmentazione pixel-by-pixel e il migliore nel distinguere i pixel in primo piano – *foreground* – tra quelli precedentemente analizzati. Al termine del processo viene creato un file in formato *.mat* da cui è possibile estrarre i parametri di output significativi per l'analisi quantitativa della rete. Il risultato appare molto accurato e preciso nel quantificare i dati significativi dei vasi tra cui la densità di lunghezza, la frazione d'area, il diametro medio o il numero di branchpoints. Laddove l'algoritmo non fosse eccessivamente accurato è possibile combinarlo con l'intervento manuale da parte dell'utente, riducendo così l'errore di misura per diversi parametri.

## **2.7 AngioQuant, AngioTool, RAVE e REAYER: un confronto**

Al fine di valutare la performance migliore – in termini di parametri della struttura vascolare – tra gli algoritmi sopra citati, è stata condotta un'analisi statistica andando a calcolare e confrontare la distribuzione di grandezze quali la precisione, l'accuratezza, la sensibilità, la specificità, l'errore assoluto medio e il tempo d'esecuzione. Dal confronto si evince che il software considerato più soddisfacente è quello che presenta un valore significativamente

maggiore – o minore, a seconda del parametro – rispetto agli altri codici; nel caso in cui la differenza tra i risultati ottenuti da ciascun metodo non fosse così evidente non viene tratta alcuna conclusione. Un altro paragone effettuato è quello rispetto al ground-truth, ovvero l'analisi manuale, per il quale qualsiasi discordanza viene identificata come errore da parte del software, in modo da rendere possibile la comparazione tra i programmi. In *figura 2.2* è riportato un esempio di analisi della medesima immagine con gli algoritmi di cui sopra, in confronto con l'analisi manuale.

In particolare, facendo riferimento ad una generica  $i$ -esima immagine appartenente al dataset di partenza e considerando il  $j$ -esimo programma si possono estrapolare le seguenti grandezze:

- L'errore assoluto  $A_{ij}$  è il valore assoluto dell'errore statistico  $E_{ij}$  calcolato come differenza tra la misurazione  $Y_{ij}$  di un parametro tramite l'algoritmo e quella  $G_{ij}$  derivante dall'analisi manuale:

$$E_{ij} = Y_{ij} - G_{ij} \quad A_{ij} = |E_{ij}|$$

- La precisione  $P_{ij}$  è la differenza tra l'errore  $E_{ij}$  e la mediana  $\tilde{E}_j$  dei valori di esso relativa alla totalità delle immagini di partenza:

$$P_{ij} = |E_{ij} - \tilde{E}_j|$$

- La durata del processo viene estrapolata per mezzo di un *tic/toc statement*. Il timer parte automaticamente quando, all'interno del codice, il programma riscontra la presenza di un *tic*, ovvero nell'istante in cui si attiva il processo di segmentazione automatica, e viene fermato appena essa termina, incontrando il *toc*.

Per valutare la specificità, l'accuratezza e la sensibilità è necessario introdurre quattro ulteriori quantità statistiche; i veri positivi (TP), che fanno riferimento al numero di pixel correttamente classificati come vasi, i falsi positivi (FP), i veri negativi (TN) e i falsi negativi (FN). Questi valori poi sono stati confrontati con quelli ottenuti dall'analisi manuale.

- L'accuratezza  $S^A$  è calcolata come il rapporto tra i pixel considerati *true* indipendentemente dalla loro appartenenza alla rete vascolare

$$S^A = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN}$$

- La specificità  $S^C$  è la frazione dei pixel realmente non appartenenti alla rete

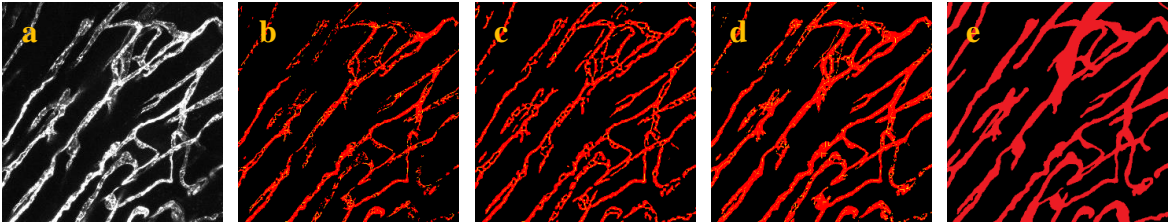


$$S^C = \frac{TN}{TN + FP}$$

- La sensibilità  $S^N$  è la frazione dei pixel realmente appartenenti alla rete

$$S^N = \frac{TP}{TP + FP}$$

L'analisi effettuata giunge alla conclusione che *REAYER* è l'algoritmo più adatto all'utilizzo in questo lavoro in quanto presenta l'accuratezza e la sensibilità maggiori rispetto agli altri programmi; esso presenta l'errore assoluto minore per quanto riguarda l'estrapolazione di parametri come la densità di lunghezza, la frazione d'area, il diametro e il numero di branchpoints. Per quanto riguarda la specificità si sono dimostrati essere molto validi *RAVE* e *AngioQuant*. *REAYER* inoltre è il software che impiega il minor tempo d'esecuzione, anche se questo aspetto è molto soddisfacente per qualsiasi metodo automatizzato se confrontato con l'analisi manuale.



**Figura 2.2** a) Immagine originale, b) Analisi con AngioQuant, c) Analisi con AngioTool, d) Analisi con RAVE e) Analisi con REAYER

### 3 MATERIALI E METODI

In questa sezione verranno presentati dettagliatamente tutti gli strumenti computazionali impiegati durante il corso di questo lavoro. Sono stati analizzati i risultati della maggior parte dei metodi presentati nello stato dell'arte, in modo da poterne selezionare uno che fornisca i risultati migliori. Nella *figura 2.2* è riportata la stessa rete microvascolare segmentata con *AngioQuant*, *AngioTool*, *RAVE* e *REAYER*: da un'analisi preliminare qualitativa è evidente come quest'ultimo fornisca risultati più chiari e più facilmente interfacciabili con un approccio computazionale. La stessa analisi preliminare è stata applicata anche per la valutazione della qualità della scheletrizzazione e dell'analisi topologica e morfologica, da cui sono state tratte considerazioni analoghe che confermano l'efficacia di *REAYER*. Quest'ultimo è stato quindi selezionato ed applicato alle immagini nel dataset: tutte le considerazioni riguardo all'analisi bidimensionale che verranno esposte successivamente nell'elaborato si riferiscono a questo algoritmo. I restanti metodi di analisi che non sono riportati nella *figura 2.2* non sono stati testati per questioni di reperibilità o compatibilità con i sistemi informatici a disposizione.

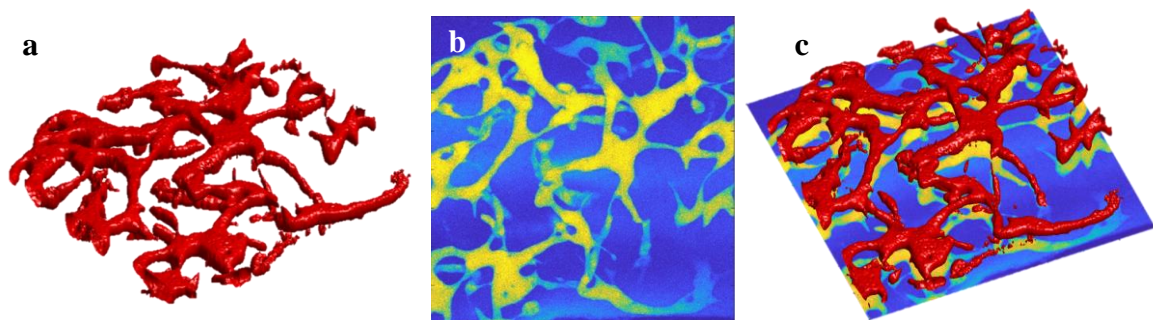
L'algoritmo che viene presentato in questo elaborato richiede in ingresso immagini provenienti da microscopia confocale in formato *.oib*. Un microscopio confocale rileva immagini del campione a diverse profondità, così da permettere la ricostruzione tridimensionale. Le dimensioni delle immagini a disposizione sono di 800x800 pixel, con un numero variabile di layers. Queste si riferiscono a porzioni di dimensione 1272x1272 $\mu\text{m}$ , da cui si ricava che la risoluzione sull'immagine bidimensionale è di  $1.59 \frac{\mu\text{m}}{\text{pixel}}$ , mentre due layers adiacenti sono tra loro distanti 5 $\mu\text{m}$ .

Dal momento che la densità di pixel è diversa lungo l'asse-z, il volume originale è stato sottoposto ad una procedura di proporzionamento, con l'obiettivo di ottenere un volume su cui lavorare che abbia un numero maggiore di layers, ma che siano tra loro distanti tanto quanto due pixel adiacenti sull'asse-x o sull'asse-y. Dal momento che il volume riproporzionato deve contenere informazioni che non erano presenti in quello originale, l'approccio da utilizzare è necessariamente un'interpolazione. Grazie alla funzione *slice* di MATLAB® è possibile ottenere approssimazioni del volume all'interno dell'intervallo di 5 $\mu\text{m}$  tra due layers adiacenti. Per questa procedura sono stati scelti tre tipi di interpolazione – costante a tratti, lineare e spline – e sono stati valutati preliminarmente gli effetti di ognuna

delle tre sui risultati dell'analisi topologica e morfologica che verranno presentati nei paragrafi successivi. È stato riscontrato che l'approccio spline permette di ottenere superfici più morbide e senza spigoli che, oltre ad essere meglio rappresentative della morfologia superficiale della rete microvascolare reale, producono meno imprecisioni quando il volume viene sottoposto all'analisi.

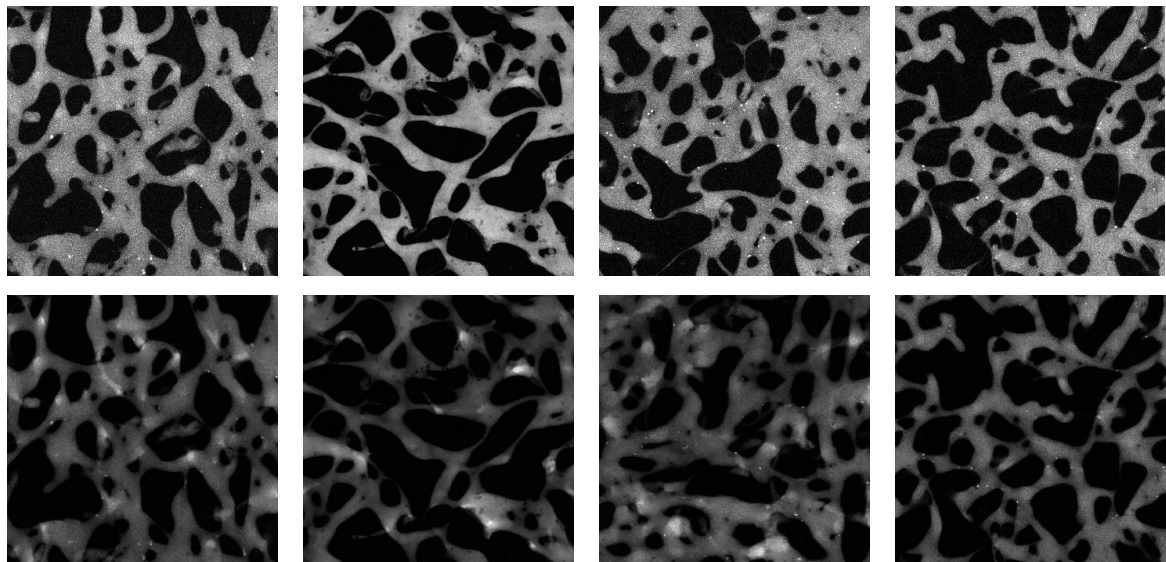
### 3.1 Metodi di Flattening

Le immagini in 3D a disposizione non sono dimensionalmente compatibili con *REAYER*, il quale lavora su immagini bidimensionali in scala di grigi, ciò rende necessario che i valori sull'asse- $z$  (identificativo della direzione di stacking dei layers) vengano proiettati in un'unica matrice bidimensionale. Necessariamente questa operazione causa una perdita di informazioni dipendente dalla natura matematica della proiezione. Dal momento che ciò che si vuole ottenere è un “appiattimento” del volume tridimensionale su una superficie in due dimensioni, è stata identificata questa fase del pre-processing come *flattening*. Un possibile approccio per l'implementazione del flattening si avvale dell'operazione di media aritmetica, dove il valore di ogni pixel dell'immagine bidimensionale – identificato dalle sue coordinate  $x$  e  $y$  relative a larghezza e altezza – è il valore medio tra quelli individuati dalle stesse coordinate sull'intera profondità (direzione  $z$ ) dei layers.



**Figura 3.1** a) Rendering tridimensionale di una rete microvascolare. b) La proiezione in due dimensioni con il metodo del massimo. c) Sovrapposizione della rete tridimensionale con l'immagine bidimensionale

Analogamente può essere considerata, in sostituzione all'operazione di media, quella di massimo, che porta con sé di conseguenza proiezioni differenti. Sottoponendo una pluralità di volumi al flattening con entrambi i metodi ed osservando e confrontando qualitativamente le immagini che vengono prodotte si conclude che il metodo del massimo è più consistente. La *figura 3.2* mostra il flattening della stessa immagine con i due metodi di cui sopra, in cui è evidente come le proiezioni ottenute con la media siano in generale più scure, meno nitide e con valori di illuminazione molto differenti. Tutti questi fattori si ripercuotono negativamente sulla qualità della segmentazione e della scheletrizzazione effettuate dall'algoritmo, il quale calcola le threshold più adatte quando i pixel del vaso e dello sfondo hanno valori tra loro molto distanti.



*Figura 3.2* La prima riga mostra il flattening di quattro immagini con il metodo del massimo, la seconda riga con il metodo della media.

## 3.2 Segmentazione e Scheletrizzazione

### 3.2.1 *REAYER* per la segmentazione e la scheletrizzazione in due dimensioni

Nel processo di segmentazione, *REAYER* compie operazioni morfologiche binarie e applica diverse tipologie di filtraggio ricorrendo spesso al confronto con valori soglia: il ruolo dei filtri è quello di diminuire la variazione di intensità tra un pixel e il successivo riducendo allo stesso tempo il rumore presente nelle immagini di partenza.

Inizialmente l'immagine viene sfocata per mezzo di un filtro che analizza ad uno ad uno i pixel e il loro vicinato, composto da ulteriori 8 pixel, in modo tale da generare una prima segmentazione approssimativa; contemporaneamente viene estratto un modello del background sfruttando un filtro di *smoothing* al fine di sottrarlo all'immagine precedente ottenendo in questo modo l'effettiva segmentazione iniziale: il risultato viene poi confrontato con un valore soglia scalare settabile dall'utente.

È necessario smussare ulteriormente i bordi del pattern poiché essi sono le zone in cui è più probabile riscontrare falsi positivi, di conseguenza vengono applicati un *11-square averaging filter* e un filtro di convoluzione che va ad eliminare i pixel considerati "estranei" ovvero quelli che, considerando un vicinato di 8 pixel, sono circondati da meno di 4 vicini.

Durante il processo di segmentazione e scheletrizzazione, *REAYER* deve tenere in considerazione diversi aspetti caratteristici della struttura vascolare. In particolare, il letto capillare è composto da vasi altamente interconnessi tra loro che rendono la struttura topologicamente complessa; per semplificare ulteriormente l'immagine, il software si premura di eliminare i capillari con un'area minore di un certo valore pre-impostabile.

Queste fasi non definitive della segmentazione però causano la presenza di "buchi" all'interno della struttura i quali devono essere riempiti impostando come *true* i condotti microvascolari composti da un numero ridotto di pixel.

Un altro possibile ostacolo a cui si va incontro durante il processing è la netta dilatazione dell'immagine causata dagli step iniziali della segmentazione, che se non opportunamente filtrata, può causare una distorsione del risultato; si rende quindi necessaria una procedura di *thinning*. Come ultimo step vengono rimosse le componenti vascolari che presentano una dimensione minore di un certo limite, arrivando in questo modo all'immagine segmentata finale.

Un ulteriore elemento da tenere in considerazione è la risoluzione dell'immagine poiché, talvolta, i parametri risultano dipendere da essa a differenza del dataset di immagini con cui è stato testato inizialmente l'algoritmo, il quale possedeva un intervallo di risoluzione contenuto in un range fissato di default. È importante, al fine di mantenere coerenti tra loro le strutture vascolari pre e post segmentazione, non uscire dal range di risoluzione consigliato (20x-60x, per non allontanarsi di molto dai valori di default); in caso contrario, valori esterni all'intervallo potrebbero causare un mancato riconoscimento dei vasi più piccoli

semplificando troppo il modello, oppure un loro eccessivo campionamento rendendo le stime sui parametri inaffidabili.

Ottenuta la segmentazione definitiva, *REAYER* sfrutta le funzioni binarie morfologiche già presenti in MATLAB® come *fill* e *bridge* per una rifinitura generale del bordo del pattern settando come *true* i vasi con area ridotta per riempire i piccoli buchi rimasti.

Un'altra funzione molto importante è *thin* che, applicata un numero indefinito di volte, ricava una centerline primitiva del vaso, la quale successivamente viene elaborata e pulita applicando ulteriori funzioni come *spur* e *clean*. I successivi filtraggi portano ad una chiara definizione della scheletrizzazione e contemporaneamente consentono l'identificazione dei branchpoints e degli endpoints.

### **3.2.2 ActiveContour e la segmentazione in 3D**

L'obiettivo del lavoro è l'analisi di reti microvascolari tridimensionali senza la necessità di ricorrere a dei metodi di flattening, ed è quindi necessario un software che permetta lo studio della rete in 3D. La ricerca bibliografica è stata fondamentale per conoscere algoritmi di segmentazione e scheletrizzazione che lavorano su immagini tridimensionali. Non è stato possibile però riscontrare la presenza di metodi computazionali che fossero in grado di analizzare e ricavare automaticamente parametri topologici e morfologici di una rete 3D, così come *REAYER* è in grado di fare per le immagini bidimensionali.

Per poter visualizzare la rete in 3D, è necessario convertire la matrice  $800 \times 800 \times l$  – dove  $l$  varia a seconda dell'immagine – in una superficie tridimensionale renderizzabile attraverso la funzione *isosurface*. Inoltre, per ottenere una visualizzazione più chiara ed intuitiva, si effettua una procedura di smoothing utile per rimuovere gli spigoli vivi che risultano essere irrealistici in una rete capillare. È opportuno sottoporre l'immagine ad una sola procedura di smoothing poiché se fosse applicata più volte, la perdita di informazioni sarebbe considerevole e ciò potrebbe incidere sulla simulazione fluidodinamica; l'utilizzatore può, tuttavia, specificare il numero preciso di smoothing da effettuare, secondo le necessità.

Una volta ricostruita la rete tridimensionale, è necessario effettuare la segmentazione della rete 3D poiché l'algoritmo di scheletrizzazione, che sarà presentato di seguito, richiede un volume binario in input. Per segmentare l'immagine viene utilizzata *ActiveContour*, funzione

di MATLAB® che implementa una tecnica ampiamente impiegata in ambito biomedico. La funzione riceve in ingresso una maschera e il volume non segmentato, da cui genera in output una matrice binaria 3D delle stesse dimensioni di partenza del volume, nella quale 0 identifica i voxel corrispondenti allo sfondo, mentre 1 quelli del vaso. È utile inoltre effettuare preliminarmente un downsampling poiché sono richiesti tempi relativamente lunghi per effettuare la segmentazione di una grande quantità di dati, permettendo in questo modo di ridurre il tempo computazionale impiegato dall'algoritmo. Per effettuare il downsampling, è opportuno scegliere un valore che, in questo lavoro, è stato denominato con “downfactor” il quale risulta essere una quantità scelta a discrezione dell'utente. Assegnando a downfactor un valore pari a  $n$ , l'algoritmo campiona un pixel dell'immagine ogni  $n$ , riducendo di un fattore  $n^3$  il tempo di calcolo.

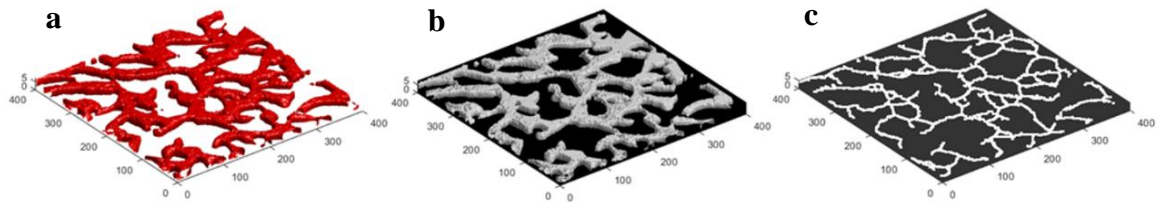
La maschera, che la funzione riceve in input, è una superficie topologicamente simile a quella di partenza ma dove i vasi hanno dimensioni maggiori rispetto a quelle reali (ad esempio la sezione del vaso nella maschera risulta essere più ampia). ActiveContour ha il compito di ridurre e far aderire la superficie in eccesso fino a quando la maschera non coincide con le dimensioni effettive del bordo del vaso, rappresentato nella rete microvascolare originale.

### 3.2.3 Scheletrizzazione in tre dimensioni: *Skeleton3D*

Il volume segmentato ottenuto viene sottoposto ad un algoritmo di scheletrizzazione per ricavare le centerline del vaso; questo è un passaggio necessario in quanto i parametri utili per la simulazione fluidodinamica non possono essere ricavati dalla rete segmentata, ma solo dal suo scheletro.

Per fare questo viene utilizzato Skeleton3D [9], un'implementazione in MATLAB®, che richiede in ingresso un'immagine già segmentata, ovvero una matrice tridimensionale di valori logici, e a partire da quest'ultima ricava lo scheletro in 3D utilizzando un algoritmo di thinning dell'asse mediale parallelo, o *centerline*. Quello che si ottiene è una matrice binaria delle stesse dimensioni di quella di partenza, dove i pixel corrispondenti allo scheletro assumono il valore 1, mentre quelli dello sfondo 0.

Nonostante sia un algoritmo sviluppato per la quantificazione della rete di processi cellulari nell'osso [10], si applica con successo anche ad immagini di altre strutture tubolari o filamentose come nelle reti microvascolari.



**Figura 3.3** a) Visualizzazione tridimensionale della rete 3D; b) Segmentazione con ActiveContour; c) Scheletrizzazione con Skeleton3D

## 3.3 Analisi e Parametri

### 3.3.1 Analisi topologica e morfologica in due dimensioni con *REAYER*

Oltre ad effettuare le operazioni di segmentazione e scheletrizzazione su immagini di reti microvascolari bidimensionali, *REAYER* calcola alcuni parametri morfologici e topologici della rete, in particolare:

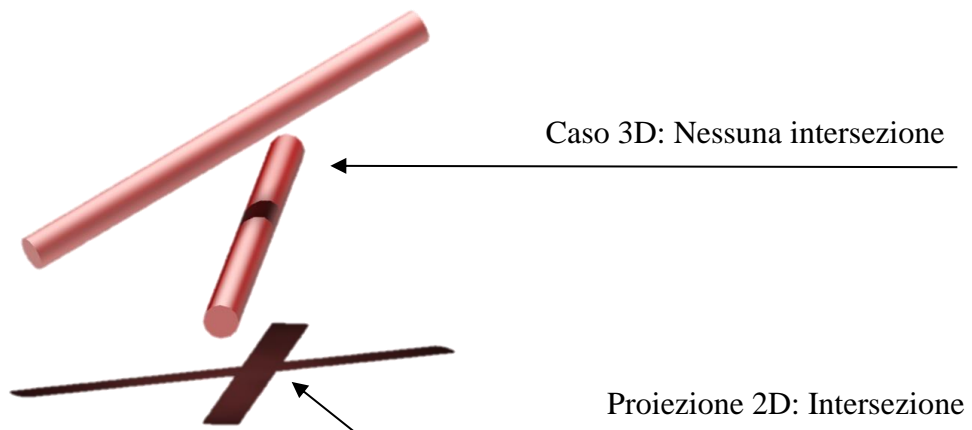
- La frazione d'area di un vaso viene calcolata come rapporto tra il numero di pixel considerati *true* all'interno dell'immagine segmentata e il numero di pixel totali.
- La densità di lunghezza totale è ottenuta come sommatoria dei valori di distanza calcolata tra ciascun pixel dello scheletro e il successivo; al fine di convertirla in unità millimetriche essa viene divisa per il valore dell'angolo solido riferito all'obiettivo della lente del microscopio (FoV, *Field Of View*).
- Il diametro medio è calcolato tramite la trasformata della distanza euclidea considerando che il valore di ogni pixel *true* deve essere uguale alla sua distanza minima da un pixel *false* o da un pixel non segmentato.
- Per ricavare invece il raggio dei segmenti vascolari, viene sfruttato lo scheletro dell'immagine come maschera per effettuare il sample delle distanze corrispondenti alla centerline del vaso. Il diametro specifico si ottiene moltiplicando il raggio per 2 e sottraendo 1 al valore trovato



- Per identificare i punti di diramazione degli scheletri e quindi calcolarne il numero, l'algoritmo applica all'immagine binaria l'operazione morfologica *bwmorph(nomeImmagine, 'branchpoints')* già presente in MATLAB®.

### 3.3.2 Analisi topologica e morfologica in tre dimensioni

Le geometrie e la topologia della rete vengono più accuratamente rappresentate quando l'analisi viene effettuata sull'intero volume piuttosto che su una sua rappresentazione bidimensionale; talvolta, può capitare che questioni di accuratezza dei risultati si tramutino in errori. Tra due vasi sghembi e quindi senza intersezione, ad esempio, potrebbero venire riconosciuti branchpoints che sono solamente artefatti prodotti dall'utilizzo di un algoritmo di flattening, come esposto nella *figura 3.4*.



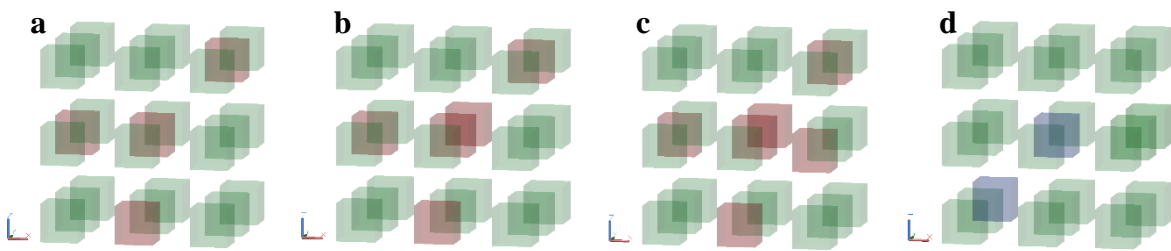
*Figura 3.4 Esempio di imprecisione nell'analisi topologica dovuta alla bidimensionalità dell'immagine*

Sotto ogni punto di vista, affidarsi ad un'analisi tridimensionale è la scelta migliore quando si hanno a disposizione immagini provenienti da microscopia confocale.

### 3.3.3 Estrapolazione di branchpoint ed endpoints

Assicurandosi che lo scheletro prodotto dagli algoritmi precedentemente presentati abbia larghezza unitaria (in termini di pixel), ricavare la posizione di branchpoints ed endpoints è un processo relativamente semplice. Considerando un campione 3x3x3 della matrice tridimensionale booleana rappresentativa di un punto dello scheletro, una porzione non

terminale né ramificata dello occuperebbe al massimo tre dei voxel del campione (*figura 3.5.a*). Traducendo questa considerazione in codice MATLAB®, per ogni campione viene valutata la somma totale dei suoi 27 elementi. È a questo punto di facile intuizione come, qualora la somma sia superiore a 3, il voxel centrale del campione è da considerarsi un branchpoint, mentre qualora la somma sia pari a 2 è da considerarsi un endpoint. Una dimostrazione grafica è qui esposta nella *figura 3.5*. Il campione viene analizzato scorrendo tutti i voxel del volume e considerando il *neighbourhood* di ognuno di essi.



**Figura 3.5** a), b) e c) sono possibili morfologie di branchpoint. d) è una possibile morfologia di endpoint. In rosso sono evidenziati i voxel dello scheletro nel caso di un branchpoint, in blu quelli in caso di un endpoint. In verde, i voxel che non appartengono allo scheletro.

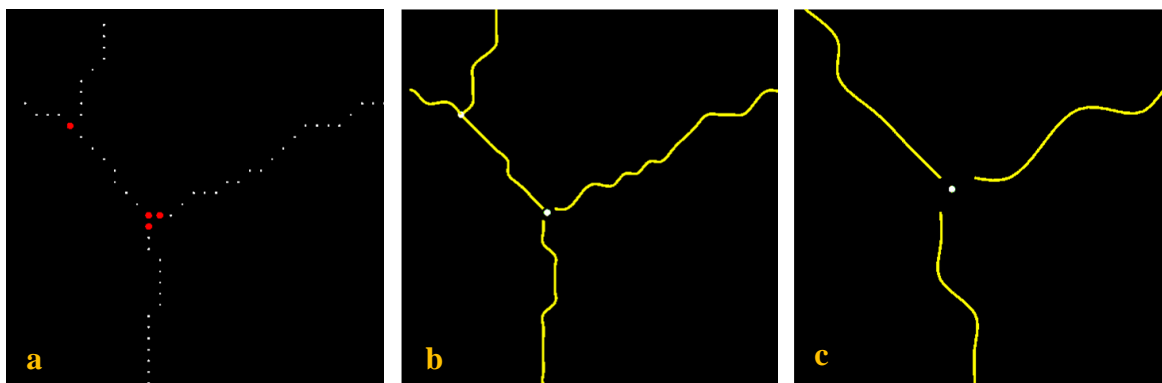
Se per quanto riguarda la classificazione di endpoints l'output del codice appena descritto è sempre inequivocabile, capita che per specifiche morfologie di diramazione vengano individuati più branchpoints adiacenti, come nel caso esposto in *figura 3.6.a*. Il fatto che l'algoritmo interpreti più branchpoints ad una sola diramazione non è tuttavia da interpretarsi come un errore, ma come un artefatto dovuto esclusivamente alla topologia della rete ed alla risoluzione dell'immagine. Dal momento che lo scheletro ricavato da *Skeleton3D* è discreto, non si hanno informazioni sullo spazio che separa due voxel adiacenti. Con una risoluzione diversa o con un downsampling più o meno fitto, questi artefatti potrebbero scomparire o verificarsi in nuove posizioni.

### 3.3.4 Interpolazione

Tenendo in considerazione che la non-continuità dello scheletro da cui viene ricavata la maggior parte dei risultati di questo lavoro è causa di diverse problematiche, è stata effettuata un'interpolazione dei dati così da ottenere uno scheletro continuo costituito da funzioni

spline. Ogni spline, nello specifico, interpola i voxel appartenenti ad un ramo (*branch*) dello scheletro, costituito da tutti i voxel adiacenti tra due branchpoints o endpoints diversi. L'interpolazione viene effettuata con funzioni base di MATLAB®, che forniscono l'output in una forma *piecewise-polynomial*. I valori estremi di ogni polinomio nello spazio vengono individuati da un'opportuna variabile, ugualmente fornita in output da queste funzioni. Avvalendosi dello scheletro interpolato, è possibile approssimare il vaso anche tra layers adiacenti, oltre che gruppi di branchpoints vicini con il loro centro di massa (*figura 3.6.b*). L'interpolazione non può essere effettuata su una rete intricata ed interconnessa come quella microvascolare, ma necessita di una successione di dati ridotta e, soprattutto, non ramificata: ciò rende necessario che lo scheletro ottenuto venga scomposto nei branches che lo compongono, i quali dovranno essere singolarmente sottoposti all'interpolazione. Per questa operazione è possibile appoggiarsi ad un pacchetto MATLAB® progettato per lavorare su network lacuno-canaliculari ossei, *Skel2Graph3D* [10]. Dal momento che le architetture capillari alla microscala sono molto simili a queste, è lecito utilizzare questo pacchetto per processare reti microvascolari. *Skel2Graph3D* converte il volume booleano dello scheletro in un grafo, fornendo la serie dei nodi e indicandone le connessioni, ognuna delle quali è associata al set di voxels che la compongono.

Da questa conversione è possibile analizzare lo scheletro non più come un insieme completo di voxel, ma come un gruppo di branches ognuno dei quali è caratterizzato dai propri specifici voxels. Trattare lo scheletro dal punto di vista della teoria dei grafi porta molti vantaggi all'analisi topologica, poiché è un metodo relativamente semplice e poco costoso dal punto di vista computazionale che permette di valutare matematicamente le biforcazioni nella rete e le connessioni fra esse.



**Figura 3.6** a) Lo scheletro discreto con il fenomeno dei branchpoint tripli nel caso b) L'interpolazione: si noti come il triplo branchpoint viene assimilato ad un unico nodo. c) È visibile come l'interpolazione comprenda solo i branchpoint e non la loro interpolazione

### 3.3.5 Calcolo di parametri morfologici

Lo scheletro e la segmentazione ottenute con gli algoritmi precedentemente presentati sono gli unici input richiesti per il calcolo dei parametri morfologici. È infatti possibile effettuare trasformazioni e operazioni topo-morfologiche sui singoli branches, per poi calcolare i parametri di interesse per ognuno di essi e stimare quelli della rete microvascolare attraverso considerazioni di carattere statistico.

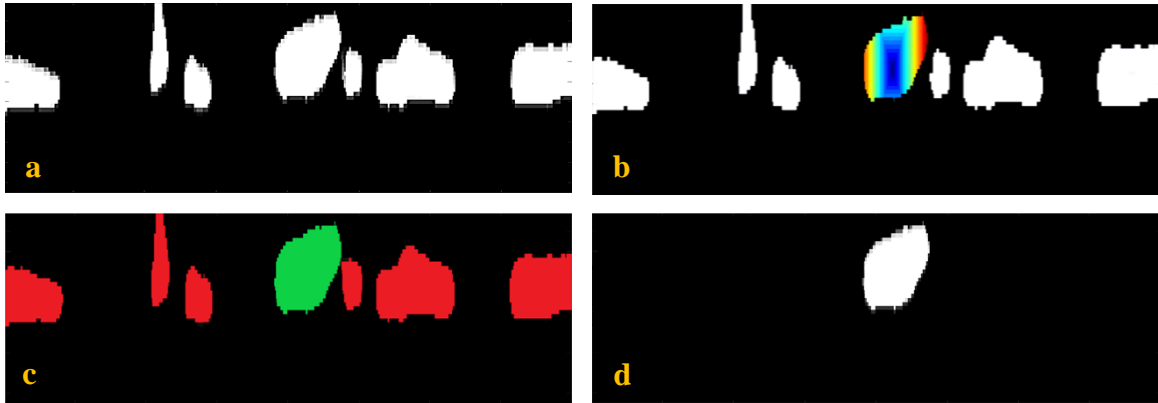
**Calcolo della lunghezza del vaso:** Avendo a disposizione la sequenza di coordinate  $x$ ,  $y$  e  $z$  dei voxel di un ramo di scheletro e tenendo in considerazione l'ordine in cui esse sono salvate nei rispettivi array, si calcola la lunghezza totale come la somma delle distanze tra pixel adiacenti. Questa misurazione è calcolata dallo scheletro discreto.

**Calcolo della tortuosità:** L'espressione matematica della tortuosità di un vaso non è immediata né tantomeno consolidata. Il metodo matematico più semplice per stimare la tortuosità si basa sul rapporto tra la lunghezza effettiva del ramo e la distanza tra i punti nodali estremi. Questa interpretazione associa a curve simili ad una circonferenza valori molto elevati, che non sempre sono indicativi dell'effettiva tortuosità del vaso; dal momento che, per le reti microvascolari, queste forme sono molto rare, l'approssimazione citata precedentemente è da considerarsi soddisfacente.

**Calcolo del raggio:** A differenza di lunghezza e tortuosità, il calcolo del raggio è meno intuitivo e richiede un maggior numero di step intermedi non banali e che si fondano su concetti geometrici non immediati.

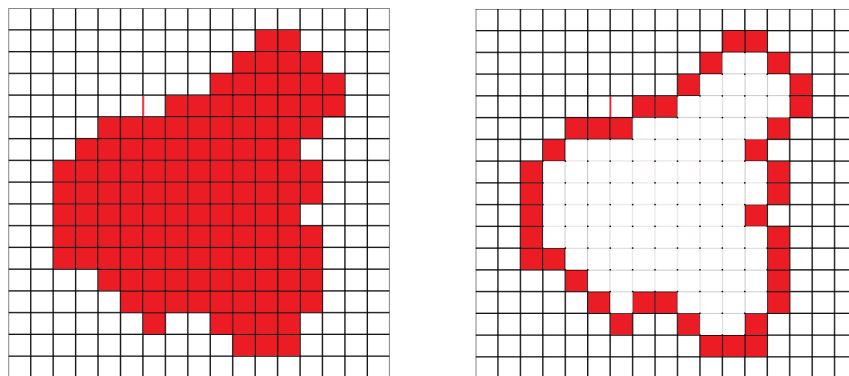
È stato innanzitutto preso in considerazione il fatto che, vista l'elevata complessità e variabilità delle biforcazioni e delle anastomosi nelle reti capillari, il raggio di un branch è una misura molto variabile anche all'interno del branch stesso, a prescindere dalla tecnica utilizzata per ottenerne una stima. È stato quindi deciso di ricercare la misura del raggio in corrispondenza di tre punti nel branch, situati rispettivamente a un quarto, metà e tre quarti dell'intervallo di ascissa curvilinea. Per ognuno di questi tre punti viene calcolato il vettore normale al ramo, che viene utilizzato per individuare la direzione in cui si sviluppa il ramo nel volume segmentato (ottenuto al *paragrafo 3.3.2*). Grazie alla funzione *obliqueslice* si ottengono tre matrici bidimensionali contenenti i valori del volume sul piano di taglio che ha come normale la direzione appena calcolata: essendo direttamente ricavate da un volume binario, anch'esse sono matrici binarie. In ognuna delle tre *slices*, tuttavia, non è presente solamente la sezione del vaso di cui si sta calcolando il raggio, ma anche quelle di altri vasi che corrono più o meno parallelamente ad esso e che quindi non sono da prendere in considerazione nel calcolo (*figura 3.7.a*). Per effettuare questa ulteriore segmentazione ci si può basare sul concetto di *geodetica*. Una trasformazione geodetica per un'immagine binaria associa ad ogni pixel la distanza da un altro pixel scelto come origine secondo il percorso più breve, quindi senza la facoltà di attraversare pixel catalogati con 0. La trasformata geodetica acquisisce valori numerici in corrispondenza dei pixel che appartengono alla sezione del vaso che contiene l'origine, la quale è scelta come il pixel del branch su cui viene basata la sezione. In corrispondenza delle sezioni di tutti gli altri vasi, poiché nessun percorso "collega" i loro pixel con l'origine, il valore della geodetica è  $+\infty$  (*figura 3.7.b*). A questo punto la sezione del vaso di interesse è separabile dal resto dell'immagine, e può essere rigorosamente calcolata la sua area. Il raggio che si considera, per concludere, è il raggio di un cerchio con area corrispondente a quella appena calcolata, ovvero la metà del *diametro equivalente*. La misurazione finale del raggio di un branch è la media di ognuna delle sezioni ricavate. Lo script è facilmente riadattabile in modo da consentire all'utilizzatore di modificare la quantità di punti in cui viene calcolato il raggio, in modo da ottenere una migliore approssimazione della misura reale. È necessario tenere in considerazione, tuttavia, che questo step di analisi topologica è quello più dispendioso dal punto di vista di potenza e tempo di calcolo –

*obliqueslice* richiede un'interpolazione del volume in alcuni punti e secondo alcune direzioni di taglio – e di conseguenza aumentando la densità di slices per ogni ramo si prolunga il tempo richiesto al calcolatore per l'analisi della rete.



**Figura 3.7** *a) Una slice di volume binario ottenuta con obliqueslice. b) L'applicazione della trasformazione geodetica alla slice. c) In verde, la sezione del singolo vaso di cui calcolare il raggio  $e$ , in rosso, le sezioni di tutti gli altri vasi nella slice. d) La slice con la sola sezione del ramo di interesse da cui calcolare il raggio*

**Calcolo dell'area Laterale:** La misurazione dell'area laterale dell'intera rete può essere effettuata in modo preciso sul volume segmentato, ma la stessa considerazione non può essere fatta per il singolo branch. A partire dalla matrice tridimensionale binaria in output dell'algoritmo di segmentazione, vengono eliminati tutti i voxel che sono *6-connessi* o più, ovvero che sono circondati nel loro *neighbourhood* in tre dimensioni da almeno altri 6 voxel *true* non in diagonale.



**Figura 3.8** *Metodo di calcolo dell'area laterale. Data la complessità della rappresentazione tridimensionale, è riportato un esempio in due dimensioni. Le considerazioni sono analoghe, ma in questo caso i voxel eliminati devono essere 4-connessi. A sinistra, la sezione di un vaso. A destra, i soli pixel appartenenti all'area laterale*

Quando un voxel è 5-*connesso* o meno, allora esso è appartenente al bordo del vaso e occupa una porzione di area laterale totale pari a

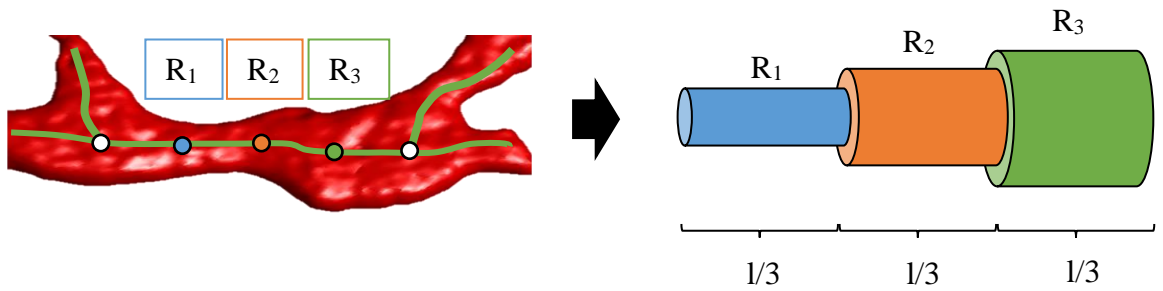
$$A_{i,j,k} = 6 - d$$

dove  $d$  è il grado di connettività del voxel in posizione  $(i, j, k)$  e  $A_{i,j,k}$  la sua area laterale. Si deduce che l'area laterale totale risulta

$$A_{tot} = \sum_x \sum_y \sum_z A_{i,j,k}$$

Questo metodo non può essere però utilizzato per il calcolo dell'area laterale dei singoli branches, poiché la complessa e diversificata morfologia delle biforcazioni alla microscala non permette di suddividere il volume segmentato nei vari rami. Ne segue che un metodo accurato come quello appena presentato non può essere applicato ai singoli rami a meno che non venga effettuata, preventivamente, una suddivisione manuale del volume sulla base della topologia dello scheletro.

L'area laterale di ogni branch è stata quindi calcolata attraverso formule geometriche elementari approssimando la morfologia del vaso a quella di un cilindro, di cui è nota l'area laterale a partire da lunghezza e raggio: dal momento che, come descritto nel precedente paragrafo, sono a disposizione tre diverse misure del raggio per tre porzioni successive del branch, l'area laterale è stata approssimata a quella totale di tre cilindri della stessa lunghezza – ognuna pari ad un terzo della lunghezza totale del ramo – e da raggio differente.



**Figura 3.9** Visualizzazione del metodo di calcolo dell'area laterale approssimata per un vaso.

La formula che permette di ricavare la superficie laterale di un singolo branch con un'approssimazione a tre cilindri è quindi

$$A_{branch,3} = 2\pi R_1 \cdot \frac{l}{3} + 2\pi R_2 \cdot \frac{l}{3} + 2\pi R_3 \cdot \frac{l}{3}$$

Per un numero maggiore di slices e quindi di valori di raggio a disposizione (si veda il paragrafo precedente), la formula è generalizzabile in




$$A_{branch,num.slices} = \frac{2\pi l}{num.slices} \cdot \sum_{i=1}^{num.slices} R_i$$

**Calcolo dell'Eccentricità:** Per ogni vaso nel network microvascolare, viene calcolato anche un valore di eccentricità, indicativo di quanto il profilo del ramo si avvicini ad una forma cilindrica. Per fare questo, viene individuato il contorno di ognuna delle sezioni sul singolo ramo (che vengono utilizzate per il calcolo del raggio) con lo stesso metodo utilizzato per individuare l'area laterale, questa volta in due dimensioni come in *figura 3.8*. Una volta ottenuta questa linea chiusa, viene utilizzata una funzione di MATLAB® che approssima ad essa un'ellisse; l'eccentricità del vaso viene calcolata come l'eccentricità dell'ellisse di approssimazione, che si ottiene dalla formula

$$e = \sqrt{1 - \left(\frac{b}{a}\right)^2}$$

dove  $a$  è la lunghezza del semiasse maggiore e  $b$  la lunghezza del semiasse minore. Di seguito sono riportati alcuni esempi di sezioni di vaso.

**Tabella 3.1** Alcune sezioni di rami in una rete microvascolare tridimensionale

		
Asse Minore = 15.27 px Asse Maggiore = 34.80 px <b>Eccentricità = 0.90</b>	Asse Minore = 18.29 px Asse Maggiore = 19.28 px <b>Eccentricità = 0.32</b>	Asse Minore = 21.24 px Asse Maggiore = 75.96 px <b>Eccentricità = 0.96</b>

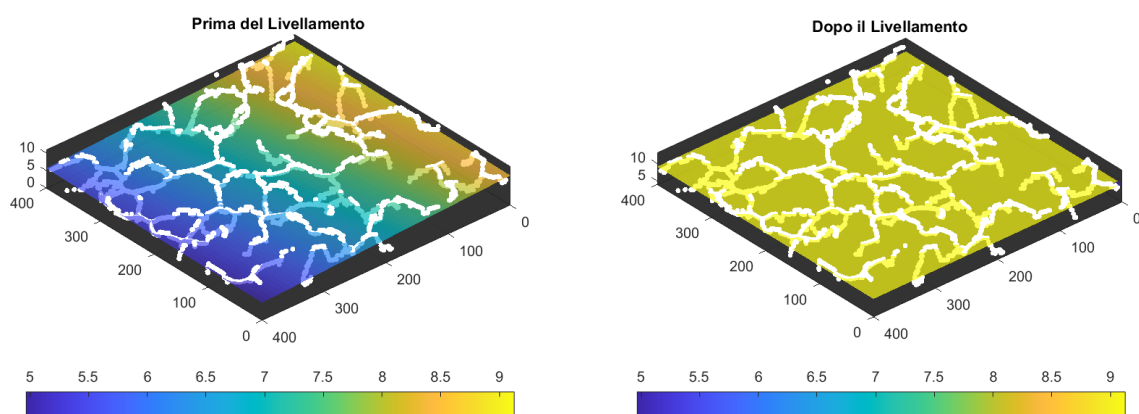
I valori dell'eccentricità sono compresi tra 0 e 1, con 0 pari all'eccentricità di una sezione perfettamente circolare e 1 l'eccentricità di un segmento rettilineo.



### 3.4 Simulazione Fluidodinamica

Al fine di effettuare uno studio completo e approfondito di un network microvascolare è bene prendere in considerazione anche la caratterizzazione fluidodinamica, ottenibile a livello computazionale con un software di simulazione. Dal momento che il software impiegato è stato utilizzato per altri lavori ([11]), è necessario interfacciare correttamente la topologia qui ricavata con quella richiesta dalla rete, così da ottenere risultati attendibili, coerenti ed effettivamente riscontrabili con la fluidodinamica in vitro. Il software sviluppato in questo lavoro effettua quindi modifiche e rifiniture allo scheletro, preventivamente alla simulazione, così da risolvere tutte le problematiche che porterebbero alla non-esecuzione della simulazione o alla produzione di risultati non riscontrabili in vitro e vivo.

L'analisi alla microscopia confocale della rete sull'*Organ-on-Chip* potrebbe, innanzitutto, essere effettuata con un posizionamento dell'obiettivo non perpendicolare al piano di giacenza della rete, con una conseguente "inclinazione" dell'immagine ricavata. Per riallineare lo scheletro al piano orizzontale, il programma ricava un piano di approssimazione di tutti i voxel nel volume della rete segmentata con un metodo di minimizzazione dello scarto quadratico medio. Il piano di interpolazione viene poi utilizzato per riallineare la rete, traslando verso l'alto o verso il basso porzioni di volume specifiche a seconda del valore del piano in quel punto (figura 3.10).



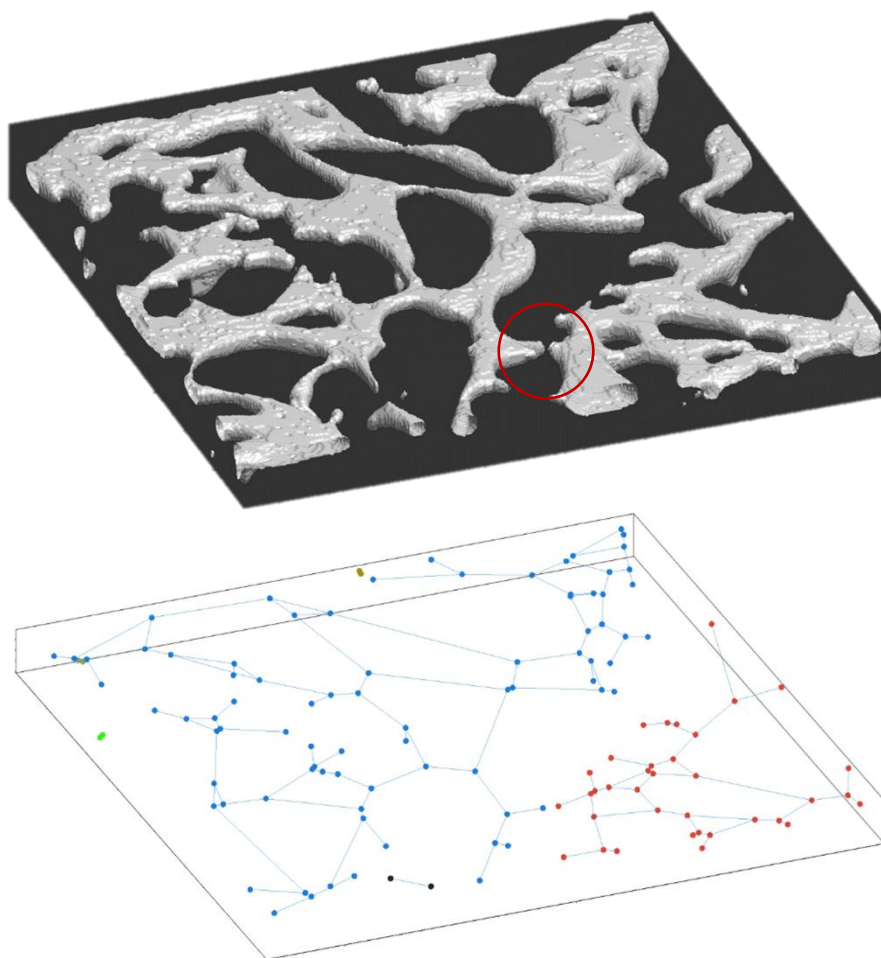
**Figura 3.10** A sinistra, lo scheletro prima del livellamento, con il relativo piano interpolante. A destra, lo stesso scheletro dopo il livellamento. Si noti il cambiamento dell'inclinazione del piano, riscontrabile anche nel colore uniforme del piano interpolante dopo il livellamento.

Da questa procedura di livellamento si ricava quindi una rete che è approssimata con un piano quasi perfettamente orizzontale, quindi più vicina al campione in vitro dove lo sviluppo della rete microvascolare giace perfettamente sul piano  $x-y$ .

Il successivo accorgimento che viene messo in atto è la rimozione di tutti i vasi con lunghezza inferiore ad una certa soglia, modificabile dall'utente e impostata di default pari al 1.25% della dimensione massima dell'immagine. Vasi con lunghezza inferiore a questo riferimento sono spesso artefatti della scheletrizzazione, comunque necessari per garantire la connettività del network e la sua corretta rappresentazione. In questa situazione, poi, la misurazione del raggio è meno precisa rispetto a quella effettuata per vasi più lunghi, poiché è più facile che sezionando il vaso venga presa in considerazione anche la morfologia delle biforcazioni, influenzando negativamente sull'accuratezza della misura.

Per ultimo, è necessario soffermarsi sulle quelle porzioni di reti topologicamente disconnesse dal resto dell'immagine. È infatti possibile che, durante l'analisi microscopica confocale, porzioni di rete (costituite anche da un singolo vaso), escano dal frame di osservazione dello strumento. Alcune zone della rete vengono quindi raggiunte dal mezzo di contrasto utilizzato per la microscopia – il destrano in questo caso – ma non sono collegate al resto dei vasi. Quando si prende in considerazione l'immagine prodotta dal microscopio, quindi, è possibile che siano presenti delle sottoreti, o *subnetworks*, topologicamente disconnesse dal resto dello scheletro (*figura 3.11*). Se i subnetworks in questione sono vicini al bordo del volume non sono causa di criticità, poiché in almeno un punto del loro scheletro verrà applicata una condizione al contorno che ne definisce il valore di pressione; nel caso in cui, invece, essi siano in posizioni più interne nel volume, il problema fluidodinamico non è fisicamente significativo. Queste porzioni di scheletro sono, di conseguenza, eliminate.

Per fare ciò, lo scheletro viene convertito, grazie alla funzione *Skel2Graph3D* sopra citata, in un grafo, al fine di poter individuare e distinguere le sottoreti.



**Figura 3.11** In alto, la segmentazione della rete. È visibile, nel cerchio rosso, una porzione di vaso mancante che disconnette la rete in due grandi subnetworks. In basso, la conversione dello scheletro in un grafo.

Per questo motivo è stata sviluppata una funzione ricorsiva che cataloga un nodo del grafo e tutti i suoi vicini (ovvero i nodi nello stesso grafo con cui esso condivide un *link*) con lo stesso valore. La ricorsione prosegue fino a quando non sono stati catalogati tutti i nodi di tutti i subnetworks. Le sottoreti a cui non è applicabile almeno una condizione al contorno che ne definisce i valori di pressione vengono eliminate.

Una volta messi a punto tutti gli accorgimenti di cui sopra ed effettuate le opportune correzioni alla rete, è necessario convertire i dati in un formato interfacciabile con il software di simulazione. L'obiettivo è quello di stampare su file i dati relativi alle coordinate dei branches, aggiungendo le opportune condizioni al contorno; inoltre è necessario classificare

i punti di end e di start come branchpoints o endpoints, e la posizione che occupano all'interno della rete microvascolare.

L'output atteso è ad esempio il seguente:

```

BEGIN_LIST
BEGIN_ARC
BC DIR 1
BC INT
1      0.966292    0.018727    0.097378    start
1      0.843945    0.039950    0.101124    end
1      0.884206    0.071170    0.101123    point
1      0.905748    0.060534    0.108787    point
1      0.927399    0.046026    0.112766    point
END_ARC
BEGIN_ARC
BC INT
BC INT
2      0.774032    0.107366    0.073658    start
2      0.782772    0.078652    0.083645    end
2      0.779014    0.096797    0.075183    point
2      0.778784    0.091666    0.074545    point
2      0.781495    0.087561    0.077494    point
END_ARC
END_LIST

```

La struttura del file vede nella prima colonna il numero del vaso, nelle prime due righe sono riportati i punti di start e di end, seguite da i restanti punti che fanno parte del branch. Per ogni start ed end del vaso è necessario determinare se i rispettivi punti sono degli endpoints o dei branchpoints attraverso il confronto delle coordinate dei punti di inizio e fine del vaso

con quelle dei punti di branchpoints e di endpoints precedentemente calcolate. A questo punto, è fondamentale capire quali endpoints occupano posizioni al bordo, considerando come periferico un punto del vaso con coordinate  $x$ ,  $y$  e  $z$  quando almeno una di esse è ad una distanza del 5% dalla periferia dell'immagine. Dopo aver ottenuto queste informazioni, è possibile determinare le condizioni al contorno per i punti di start e per i punti di end, stampando su file "BC MIX" nel caso di endpoints interni all'immagine, "BC DIR" per endpoints vicini al bordo, infine "BC INT" per indicare i restanti branchpoints.

Per il corretto funzionamento della simulazione, solo il punto di start riferito al primo ramo deve avere come condizione "BC DIR" e di conseguenza tutti gli altri start con la medesima condizione saranno riportati come dei punti di end con condizione "BC DIR". Come è possibile notare dall'esempio sopra riportato, sono state introdotte delle scritture per indicare l'inizio e la fine dell'intera lista contenente tutti i rami dell'immagine analizzata, "BEGIN\_LIST" e "END\_LIST". Allo stesso modo, sono presenti "BEGIN\_ARC" e "END\_ARC", per indicare rispettivamente l'inizio e la fine di tutti i punti appartenenti al ramo indicato nella prima colonna dell'esempio riportato.

La fluidodinamica della rete microvascolare è simulata computazionalmente con un software apposito già sviluppato ed utilizzato in [11] e [12], che risolve attraverso il metodo agli elementi finiti un problema matematico che si basa su due domini: uno costituito dai capillari e l'altro dall'interstizio. Per quanto riguarda i capillari, il problema è monodimensionale e riferito alla portata governata dalle equazioni di Poiseuille, mentre l'interstizio è descritto attraverso un problema di Darcy in tre dimensioni.

Le equazioni alla base di questo problema sono:

$$\left\{ \begin{array}{ll} \frac{\mu_t}{k} \mathbf{u}_t + \nabla p_t = 0 & su \Omega \\ \nabla \cdot \mathbf{u}_t - \varphi_{vessels} \delta_\Lambda = 0 & su \Omega \\ 8 \frac{\mu_v}{R^2} u_v + \frac{\partial p_v}{\partial s} = 0 & su \Lambda \\ \frac{\partial u_v}{\partial s} + \frac{\varphi_{vessels}}{\pi R^2} = 0 & su \Lambda \end{array} \right.$$

dove  $\Omega$  è il dominio tridimensionale dell'interstizio,  $\Lambda$  il dominio monodimensionale del vaso,  $u$  la velocità di fluido,  $p$  la pressione idraulica (i pedici  $t$  e  $v$  si riferiscono all'interstizio e al vaso rispettivamente),  $\delta_\Lambda$  la pressione oncotica nel vaso,  $\varphi_{vessels}$  descrive lo scambio di

fluido tra vaso e interstizio,  $\mu_v$  la viscosità del sangue,  $\mu_t$  la viscosità interstiziale,  $k$  la conduttività idraulica del tessuto,  $R$  il raggio del vaso,  $s$  la direzione assiale del vaso.

### 3.5 Il Deep Learning come approccio alternativo per la segmentazione

Tra tutti gli step di analisi computazionale di reti microvascolari 3D finora presentati, quello che richiede più tempo di calcolo è la segmentazione. In media, ActiveContour occupa il 63% del tempo impiegato per l'analisi completa. Tuttavia, tenendo in considerazione l'elevata variabilità e complessità delle immagini che possono essere sottoposte a questi algoritmi, l'impiego di altri metodi "classici" di segmentazione come il *thresholding* o il *clustering* è sconsigliabile. È stato quindi tentato un approccio innovativo e, al momento, ancora poco utilizzato in ambito microvascolare: il Deep Learning. Questo termine si riferisce ad un particolare modo di organizzare una *rete neurale*, ovvero una serie di operazioni matematiche e algebriche che permettono di convertire input in output solo attraverso l'algebra matriciale e alcune operazioni di filtraggio di segnali. Questo approccio è molto utilizzato per la segmentazione di immagini 2D di reti vascolari (in ambito oftalmico [13] e [14], neurovascolare [15] e dermatologico [16]), mentre il materiale in letteratura riguardo all'utilizzo del Deep Learning per dati in tre dimensioni è in numero inferiore ([17] e [18]).

A differenza degli approcci computazionali tradizionali che prevedono la ricerca e lo sviluppo ottimale di un algoritmo che sappia distinguere ciò che è vaso da ciò che non lo è, una rete neurale lavora su una grande quantità di immagini e le loro corrispondenti segmentazioni. Dopo aver organizzato l'ordine e la natura delle operazioni di cui sopra – per la maggior parte prodotti matriciali e filtri di convoluzione – la rete neurale "impara" i coefficienti delle matrici di moltiplicazione e nei filtri di convoluzione in modo da ottenere, dalle immagini fornite, le segmentazioni desiderate che sono anch'esse date in input alla rete neurale. Se inizialmente gli operandi in queste operazioni matematiche sono scelti pseudo-casualmente, attraverso il *training* essi vengono ottimizzati in modo da segmentare con la migliore accuratezza il maggior numero di immagini fornite: al termine di questo processo, è possibile sottoporre alla rete neurale una nuova immagine, diversa da quelle fornite con il

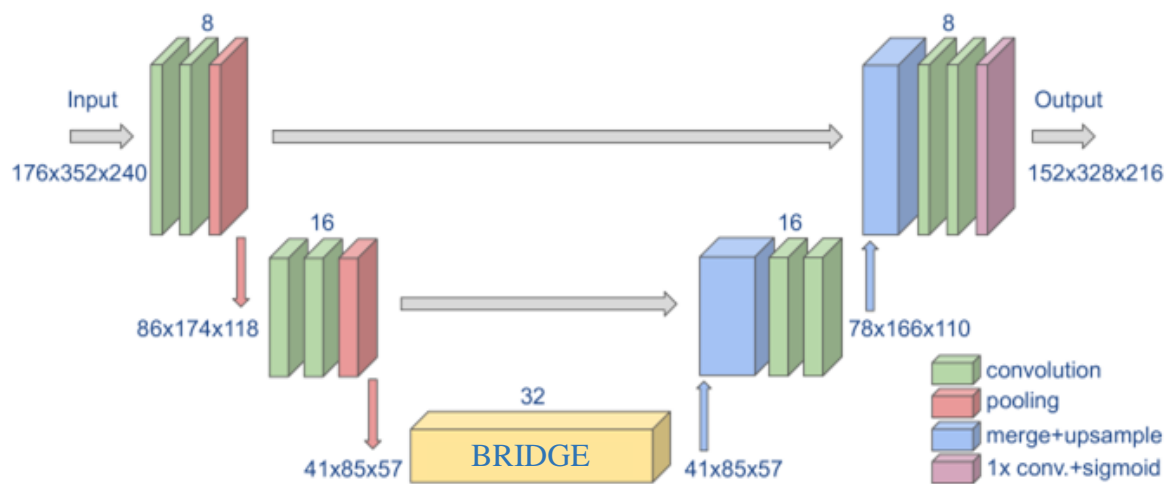
training, ed essa verrà segmentata nello stesso tempo in cui il calcolatore esegue un prodotto matriciale o un'operazione di convoluzione. Generalizzando, è necessario somministrare alla rete neurale una serie di problemi già risolti (ovvero le immagini e le loro corrispondenti segmentazioni) ed essa provvederà tramite metodi di minimizzazione dell'errore – metodo della discesa del gradiente o *gradient descent* – a ricavare la relazione matematica che lega il dato alla soluzione; una volta ottenuta, essa può essere applicata nel processing altre immagini.

Per questo approccio è necessario avere a disposizione:

- Un ampio dataset di immagini e le rispettive segmentazioni già effettuate con metodi manuali o con altri metodi. Questo gruppo di immagini è definito *dataset di training* poiché è attraverso questi dati che la rete neurale ottiene i parametri ottimali per la segmentazione. Per questo lavoro, è a disposizione un database di 40 files *.oib* di reti microvascolari.
- Un'architettura di operazioni che può essere costruita *ad hoc* oppure riadattata da altre già utilizzate per scopi simili. Per questo lavoro è stato intrapreso il secondo approccio e si è fatto uso di un'architettura di rete neurale già utilizzata per la segmentazione di immagini biomediche, *U-Net*.
- Alcune immagini già segmentate da utilizzare al termine del *training* per valutare l'accuratezza della rete neurale, ovvero il processo di *testing*. Si noti che per il testing è necessario utilizzare immagini diverse da quelle fornite per il training, così da valutare la rete su dati che risultano “sconosciuti”. Sono state utilizzate cinque immagini con la stessa provenienza di quelle nel dataset di training.

Il vantaggio dell'utilizzo di una rete neurale è il tempo impiegato per la segmentazione della singola immagine: il tempo di training richiede ore o, in alcuni casi, giorni (in funzione della quantità di immagini utilizzate e della potenza di calcolo disponibile), ma una volta terminato questo processo la segmentazione impiega al massimo pochi secondi, dipendentemente dalle dimensioni dell'immagine. L'accuratezza della rete neurale è proporzionale alla quantità di immagini utilizzate per il training e, per ottenere delle segmentazioni soddisfacenti, un pool di 40 immagini non è sufficiente. Tuttavia, attraverso rotazioni, traslazioni, mirroring e zoom si possono generare nuove immagini che derivano da quelle del dataset originale di training, aumentandone la quantità senza compromettere negativamente l'accuratezza e la performance della rete ottenuta.

Progettare ad hoc l'architettura di una rete neurale è una procedura tediosa e complessa, che risulta addirittura inutile quando è possibile allenare una rete già utilizzata e consolidata in ambiti analoghi a quello di interesse. Per questo motivo è stato effettuato il training su *U-Net3D*, una rete neurale di segmentazione in 3D per immagini biomediche [18]. Questa architettura è caratterizzata da una simmetria che si manifesta in una prima fase di downsampling attraverso filtri di convoluzione, necessari per ricavare le caratteristiche essenziali dall'immagine in ingresso, seguita da una seconda fase di up-sampling classifica i pixel come vaso o come sfondo.



**Figura 3.12** Rappresentazione grafica dell'architettura U-Net, con una prima fase dedicata al down-sampling e una seconda fase dedicata all'up-sampling ([19]).

Tutto il lavoro riguardante il Deep Learning è stato effettuato con il *Deep Learning Toolbox* di MATLAB®, che mette a disposizione la strumentazione necessaria allo sviluppo di reti neurali e al loro utilizzo. A seconda della potenza di calcolo a disposizione e della quantità di immagini utilizzabile nell'allenamento della rete, il training può venire effettuato con diverse tecniche, che sono state tutte testate sulla base degli stessi dati di training e testing.

### 3.5.1 Estrazione di patches

La prima di queste tecniche consiste nella suddivisione casuale del volume di partenza in sotto-volumi, *patches*, di dimensione fissa, in questo caso di 128x128x8: la rete allenata non



può però lavorare sull'intero volume  $800 \times 800 \times l$ , che deve essere scomposto in patches ognuna delle quali viene sottoposta alla segmentazione, per poi essere ri-assemblate nel volume finale. La dimensione  $128 \times 128 \times 8$  non è scelta casualmente, ma dipende dalla dimensione dei filtri di convoluzione utilizzata da U-Net. Con questo metodo è possibile allenare la rete neurale con un numero maggiore di immagini, ottenendo una migliore accuratezza in *trade-off* con un aumento del tempo richiesto dalla segmentazione della singola immagine (l'analisi di 8 patches  $2 \times 2 \times 2$ , ad esempio, richiede più tempo dell'analisi di un singolo volume  $4 \times 4 \times 4$ ).

È stato scelto di ridimensionare l'immagine da segmentare – che può essere di dimensione qualsiasi – ad una dimensione fissa pari a  $384 \times 384 \times 16$  voxels, così da estrarre 18 patches dalla figura che vengono segmentate singolarmente. Il volume completo viene quindi ricomposto da queste patches, e quindi riscalato alla sua dimensione originale. Il modo in cui vengono definite le patches da estrarre influisce sulla qualità della segmentazione finale globale: lavorare con molte patches di piccole dimensioni può migliorare l'accuratezza della rete, accompagnata però da un maggiore tempo richiesto dalla segmentazione della singola immagine. Al contrario, utilizzare poche patches di dimensioni elevate può richiedere meno tempo di calcolo, riducendo però l'accuratezza dell'operazione.

### 3.5.2 Augmentation

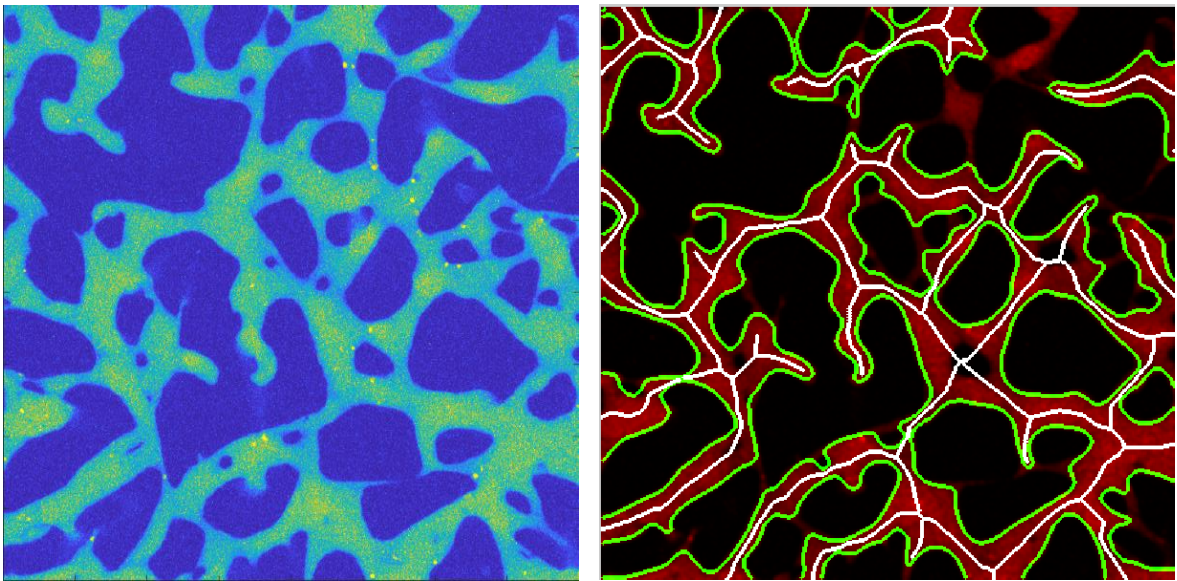
Quando la disponibilità di volumi per il training è ridotta, è possibile ottenerne di nuovi effettuando operazioni di rotazione, mirroring, riscaldamento e traslazione sui dati a disposizione, in modo da incrementare effettivamente la quantità di dati su cui la rete neurale può allenarsi anche senza aumentare il numero effettivo di immagini a disposizione. Per questo approccio non è stata effettuata l'estrazione di patches e la rete è stata allenata con i volumi nella loro interezza.

## 4 RISULTATI

In questo capitolo verranno presentati i risultati del lavoro, ricavati al fine di verificare l'efficacia dell'algoritmo, la sua correttezza ed il soddisfacimento dei requisiti di universalità e automatizzazione presentati nel *capitolo 1.1*. Per queste verifiche, l'analisi dell'algoritmo sviluppato è stata confrontata con quella effettuata da *REAYER* ([8]), al fine di trarre considerazioni che siano basate su un mezzo di paragone solido ed efficace. Dal momento che *REAYER* lavora su immagini bidimensionali, il solo confronto non è sufficiente per effettuare considerazioni complete ed esaustive riguardo al metodo computazionale sviluppato. Per questo motivo è stata anche condotta un'indagine comparativa sui risultati dell'analisi morfologica tridimensionale su immagini di reti microvascolari di diversa "qualità": nello specifico, le immagini a disposizione sono state qualitativamente categorizzate in due gruppi, su ognuno dei quali è stato fatto lavorare l'algoritmo così da individuare, in prima approssimazione, la capacità dello stesso di ricavarne parametri differenti e logicamente riconducibili alla categorizzazione. Sono stati inoltre ricavati i risultati dell'analisi topologica e morfologica su un *pool* di immagini ottenute dalla microscopia confocale su reti microvascolari trattate con urea, poi paragonati con un gruppo di immagini non trattate utilizzate come controllo.

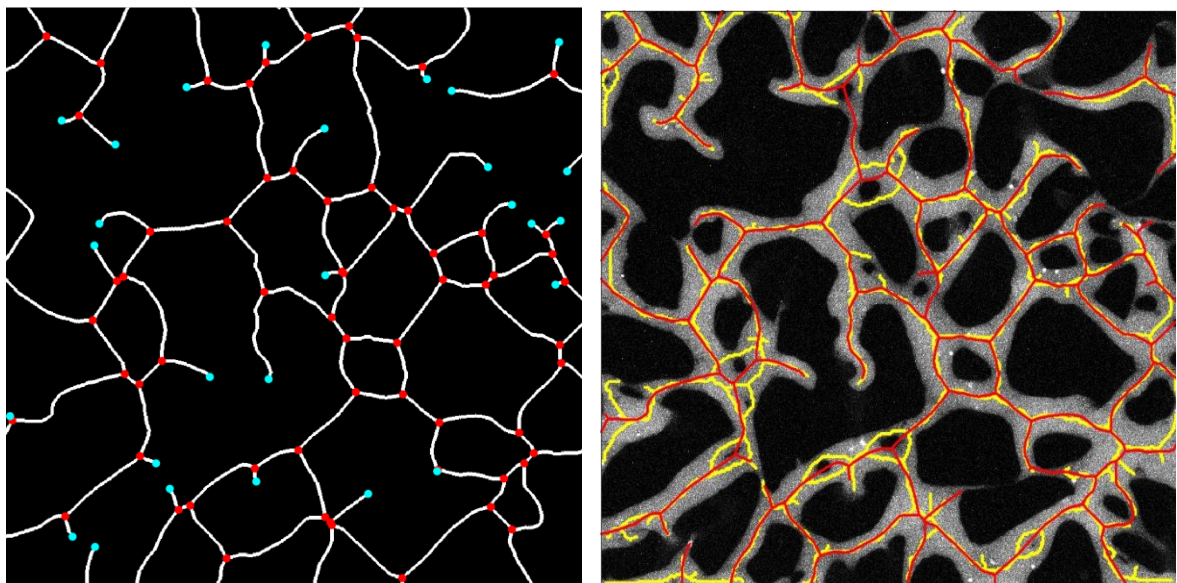
### 4.1 Confronto con l'analisi bidimensionale

Una prima analisi di verifica dell'efficacia dell'algoritmo riguarda il confronto tra il suddetto e *REAYER*, un metodo emerso dalla ricerca in letteratura e precedentemente esposto in questo elaborato (*capitolo 2.6*): di seguito, in *figura 4.1*, viene presentato il risultato della segmentazione e della scheletrizzazione eseguita da *REAYER*.



**Figura 4.1** A sinistra, la proiezione bidimensionale della rete sottoposta a REAVER. A destra, il risultato della segmentazione e della scheletrizzazione di REAVER, dove in verde è evidenziato il bordo del vaso, in rosso il lume e in bianco lo scheletro.

Per effettuare un'analisi comparativa, viene esposta successivamente la sovrapposizione dello scheletro ottenuto da *REAVER* e quello ricavato dal metodo sviluppato; poiché quest'ultimo è il risultato di un'analisi in tre dimensioni, è necessario sottoporlo all'algoritmo di flattening – presentato nel capitolo 3.1 – prima di poter effettuare la sovrapposizione.



**Figura 4.2** A sinistra, lo scheletro ottenuto da REAVER con, in azzurro, i branchpoints e, in rosso, gli endpoints. A destra, la sovrapposizione dei due scheletri e dell'immagine flat di partenza; in rosso, lo scheletro di REAVER e in giallo quello ottenuto dal metodo tridimensionale.

Dalla sovrapposizione si evince che la scheletrizzazione bidimensionale che si ottiene da *REAYER* non riconosce diversi loops (gruppi di rami della rete che formano un percorso chiuso), che vengono invece classificati come semplici biforcazioni; la scheletrizzazione tridimensionale, invece, li riconosce come tali. Inoltre, alcuni vasi di piccola dimensione non vengono scheletrizzati. In generale, la morfologia dei due scheletri confrontati è qualitativamente comparabile, tranne in alcuni vasi ai bordi dell'immagine analizzata.

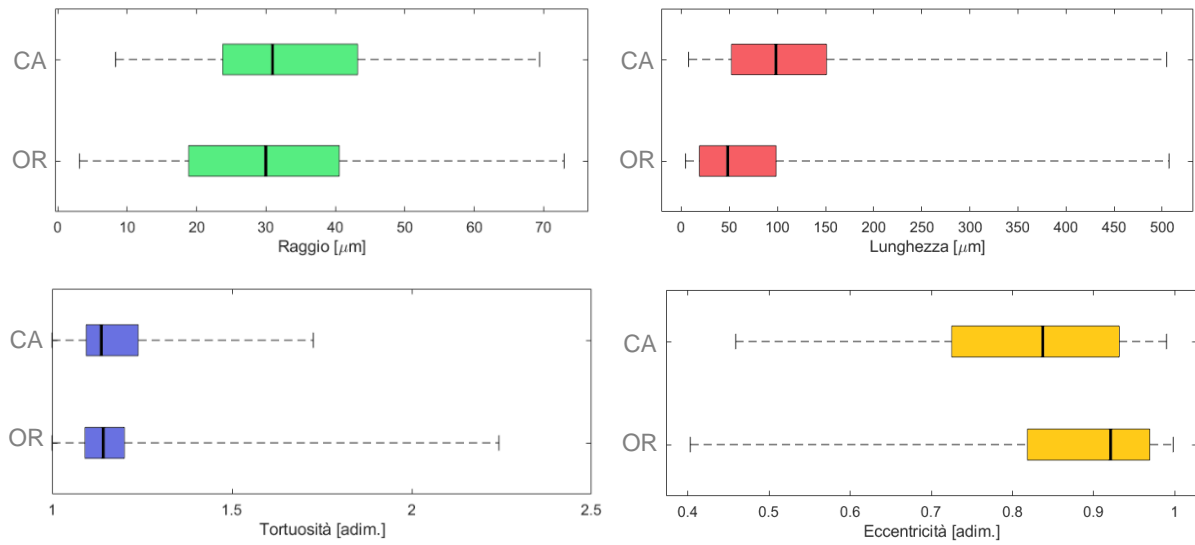
Il confronto tra *REAYER* e l'algoritmo tridimensionale è stato svolto anche dal punto di vista quantitativo, esclusivamente per i risultati numerici ricavati da entrambi gli algoritmi, i quali sono riportati in *tabella 4.1*.

**Tabella 4.1** Parametri quantitativi di una rete microvascolare. Tra gli indici non presentati precedentemente: la frazione volumetrica è il rapporto tra il volume dei vasi e il volume totale, il rapporto S/V è la superficie laterale normalizzata sul volume totale. I campi della colonna relativa a *REAYER* dove è presente un “-” indicano valori non calcolati da questo algoritmo.

	<b><i>REAYER</i></b>	<b>Algoritmo 3D</b>
Frazione Volumetrica	39.11%	8.25%
Raggio Medio	17.23 $\mu\text{m}$	14.42 $\mu\text{m}$
Lunghezza Totale	4366.20 $\mu\text{m}$	6461.75 $\mu\text{m}$
Tortuosità Media	-	1.19 [adim.]
Eccentricità Media	-	0.8742 [adim.]
Area Laterale	-	1.46 $\text{mm}^2$
Numero di biforcazioni	30	57
Rapporto S/V	-	$7.3 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^{-1}$

## 4.2 Effetto del campionamento sui risultati

Nel *paragrafo 3.2.2* è stato introdotto il downsampling come tecnica per ridurre il tempo computazionale impiegato per la segmentazione con *ActiveContour*: è tuttavia necessario controllare che l'utilizzo del downsampling non sia eccessivamente influente sui risultati. La verifica è effettuata tramite una comparazione della distribuzione delle metriche più significative di un volume campionato (con fattore di downsampling pari a 2) e di uno non campionato. I boxplot riportati di seguito mostrano il confronto tra le distribuzioni di raggio, lunghezza, tortuosità ed eccentricità per la stessa rete microvascolare.

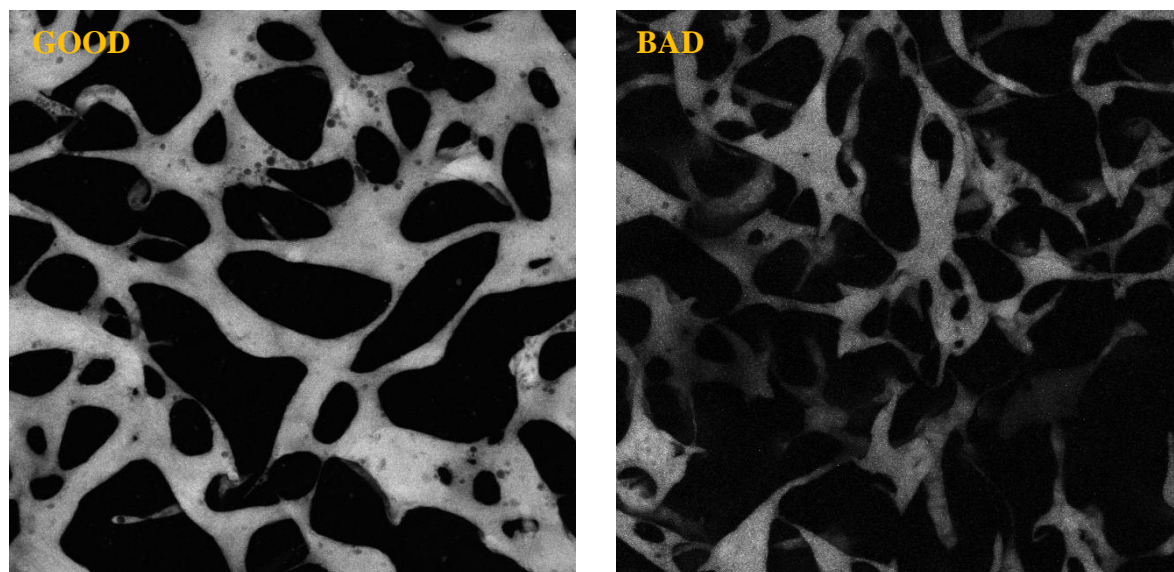


**Figura 4.3** Boxplot delle misurazioni di raggio, lunghezza, tortuosità ed eccentricità per i vasi di un volume campionato e dello stesso volume nelle dimensioni originali. I boxplot denominati con la sigla CA si riferiscono al volume campionato, quelli denominati con la sigla OR si riferiscono al volume originale.

Dai grafici emerge una distribuzione comparabile per quanto riguarda il raggio, la tortuosità e l'eccentricità dei vasi, sia per quanto riguarda la mediana che per l'ampiezza del IQR (Range InterQuartile), mentre per la misura della lunghezza la mediana del volume originale risulta all'incirca dimezzata rispetto a quella del volume campionato.

## 4.3 Dipendenza dalla qualità dell'immagine in input

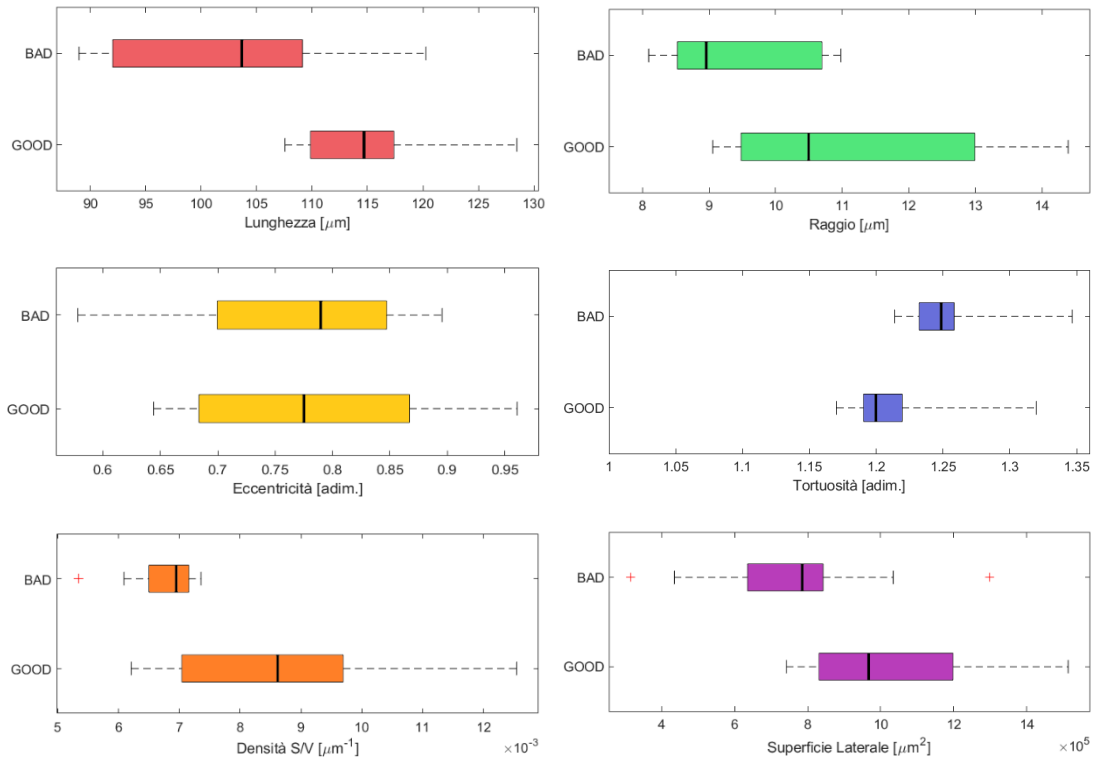
Per testare l'algoritmo sviluppato e, contemporaneamente, valutare se la qualità dell'immagine da analizzare influisce sui risultati prodotti sono state classificate 10 immagini di buona qualità – GOOD – e 10 di cattiva qualità – BAD – nel dataset a disposizione. La classificazione ha seguito un criterio qualitativo basato sul contrasto dell'immagine, sul rumore e sulla connettività della rete.



***Figura 4.4** A sinistra, un esempio di rete classificata GOOD. A destra, un esempio di rete classificata BAD. Le immagini riportate si riferiscono alla proiezione bidimensionale delle rispettive reti in tre dimensioni*

In *figura 4.4* si nota come nell'immagine riferita alla rete GOOD i valori dei pixel nel vaso siano molto distanti dai valori dei pixel nello sfondo, aspetto indicativo di un contrasto elevato; inoltre, l'immagine GOOD è caratterizzata da una colorazione più uniforme sia per quanto riguarda i pixel del vaso che per quelli nel background. Infine, l'immagine BAD presenta diverse sottoreti disconnesse caratterizzate anche da rami con diametro molto ridotto, mentre la rete GOOD risulta ben connessa.

È stata effettuata l'analisi morfologica e topologica sui due gruppi di immagini ricavate da questa classificazione, di cui sono state poi confrontate le distribuzioni delle misure ricavate. Di seguito, sono riportati i boxplot ottenuti da questa analisi.

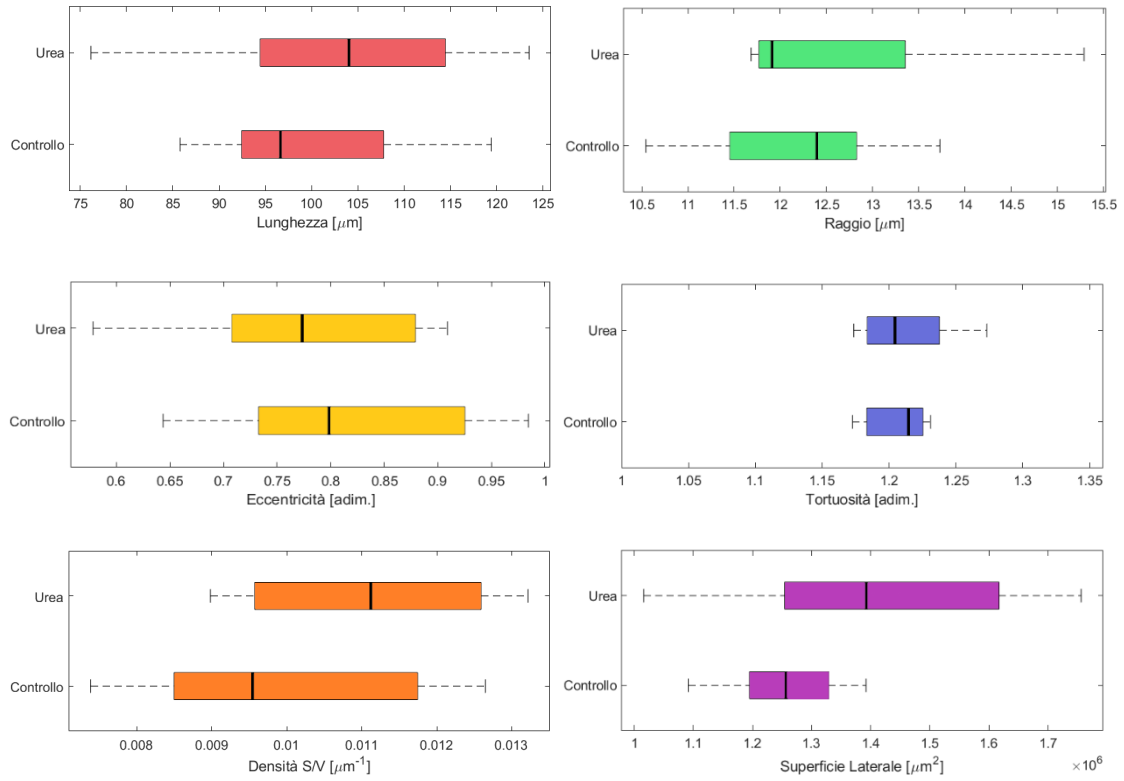


**Figura 4.5** Boxplot delle misurazioni di lunghezza, raggio, eccentricità, tortuosità, densità S/V e superficie laterale da reti GOOD e BAD.

## 4.4 Applicazione dell'algoritmo: network trattati con urea

L'algoritmo sviluppato è stato utilizzato per ricavare i parametri morfologici da un set di reti microvascolari trattate con urea e da un set di reti di controllo, permettendo quindi di effettuare un confronto. I risultati ottenuti sono significativi perché consentono di valutare se l'accumulo di urea nella microcircolazione abbia effetti apprezzabili sulla morfologia della rete. La valutazione viene effettuata per simulare le conseguenze e gli effetti dell'accumulo di questa sostanza in pazienti uremici.



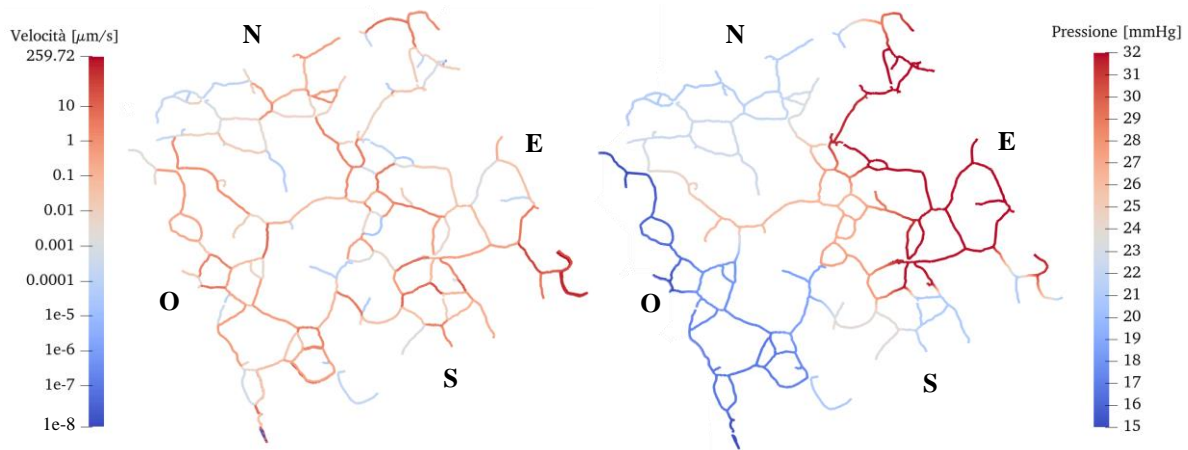


**Figura 4.6** Boxplot delle misurazioni di lunghezza, raggio, eccentricità, tortuosità, densità S/V e superficie laterale da reti trattate con urea e reti non trattate di controllo.

## 4.5 Simulazione fluidodinamica

La parte conclusiva del lavoro riguarda l'utilizzo di un software di simulazione fluidodinamica, che associa ad ogni punto dello scheletro un valore di pressione e uno di velocità. Di seguito è riportata una visualizzazione della distribuzione delle pressioni e delle velocità sulla centerline di una rete microvascolare.





**Figura 4.7** Output della simulazione fluidodinamica visualizzato tramite ParaView. In alto, la distribuzione delle pressioni sulle centerline dei vasi; sono anche indicate le direzioni cardinali, utili per la determinazione delle condizioni al contorno. In basso, la distribuzione delle pressioni e delle velocità a confronto; le velocità sono rappresentate con una scala colore logaritmica

Per la simulazione è necessario definire le condizioni al contorno del problema fluidodinamico da risolvere, in particolare occorre assegnare valori di pressione fissi a specifici punti dello scheletro sottoposto al software. È stato scelto di applicare una condizione al contorno di 32 mmHg al bordo EST della rete e 15 mmHg al bordo OVEST, mentre ai bordi NORD e SUD è stato scelto di fissare il valore intermedio di 23.5 mmHg: dopo aver assegnato gli input, la simulazione calcola i valori di pressione in tutti i punti interni dello scheletro.

Per valutare, in prima approssimazione, la correttezza del risultato fluidodinamico è necessario prendere in considerazione i seguenti aspetti: nella rete non devono essere presenti punti a cui è associato un valore esterno al range definito dalle condizioni al contorno (non devono essere presenti valori minori del limite inferiore, 15 mmHg in questo caso, o maggiori del limite superiore, 32 mmHg in questo caso); le pressioni devono essere distribuite in maniera continua e graduale, senza che si verifichino salti di elevata entità nell'intorno di ogni punto.

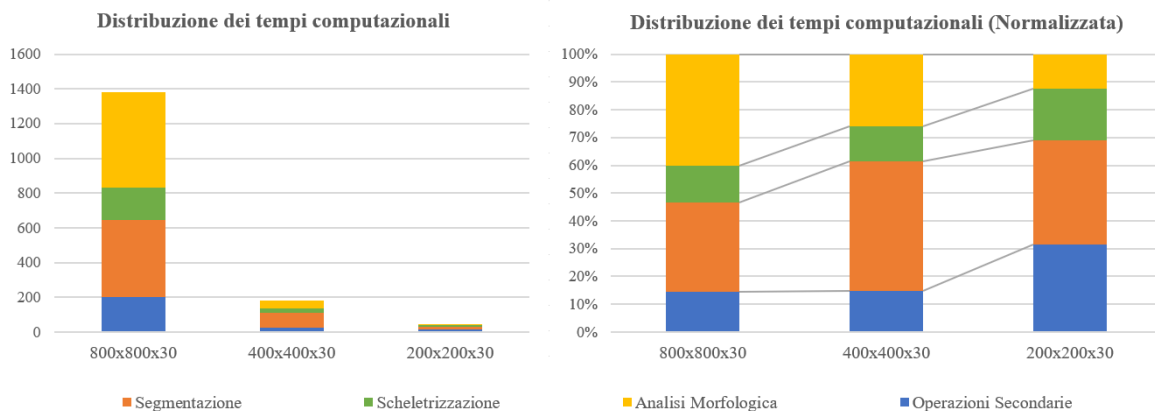
## 4.6 Deep Learning

L'efficacia dell'utilizzo di una rete neurale di Deep Learning per la segmentazione in sostituzione ad ActiveContour è stata valutata dal punto di vista del tempo impiegato per l'operazione, della qualità della segmentazione e dell'effetto sulla topologia e morfologia dello scheletro ottenuto nei successivi step dell'algoritmo. Di seguito, in *tabella 4.2*, sono riportati i tempi computazionali richiesti per l'analisi completa di tre porzioni di diversa dimensione (800x800x30, 400x400x30 e 200x200x30) della stessa rete microvascolare

**Tabella 4.2** Tempi richiesti per l'analisi computazionale di networks microvascolari di tre dimensioni diverse. Dove non specificato, i tempi sono da intendersi in secondi

Step Computazionale	Tempo richiesto					
	800x800x30		400x400x30		200x200x30	
Lettura file e inizializzazione	0,9	0,1%	1,1	0,6%	1,1	2,5%
Flattening 2D	2,0	0,1%	1,5	0,8%	0,7	1,6%
Downsampling e riproporzionamento	132,4	9,6%	10,1	5,6%	3,5	7,9%
Creazione della mask per ActiveContour	8,8	0,6%	1,0	0,6%	0,6	1,2%
<b>Segmentazione con ActiveContour</b>	<b>436,1</b>	<b>31,5%</b>	<b>83,6</b>	<b>45,9%</b>	<b>16,1</b>	<b>36,1%</b>
Livellamento della rete	61,5	4,4%	12,3	6,8%	5,2	11,6%
Scheletrizzazione con Skeleton3D	177,2	12,8%	20,0	11,0%	7,1	16,0%
Calcolo Endpoints e Branchpoints	1,0	0,1%	0,2	0,1%	0,2	0,6%
Interpolazione	6,3	0,5%	2,9	1,6%	0,9	1,9%
Calcolo delle metriche in 3D	553,5	40,0%	47,0	25,9%	5,6	12,6%
Conversione in .pts	3,0	0,2%	2,1	1,1%	3,5	7,9%
<b>TOTALE in secondi</b>	<b>1382,9 sec</b>		<b>181,9 sec</b>		<b>44,5 sec</b>	
<b>TOTALE in minuti</b>	<b>23,0 min</b>		<b>3,0 min</b>		<b>0,7 min</b>	

Gli stessi dati sono riportati anche in due istogrammi, utili per valutare come i tempi computazionali richiesti dai diversi step dell'algoritmo contribuiscano al tempo totale e se vi sia un'effettiva dipendenza dalla dimensione dell'immagine.

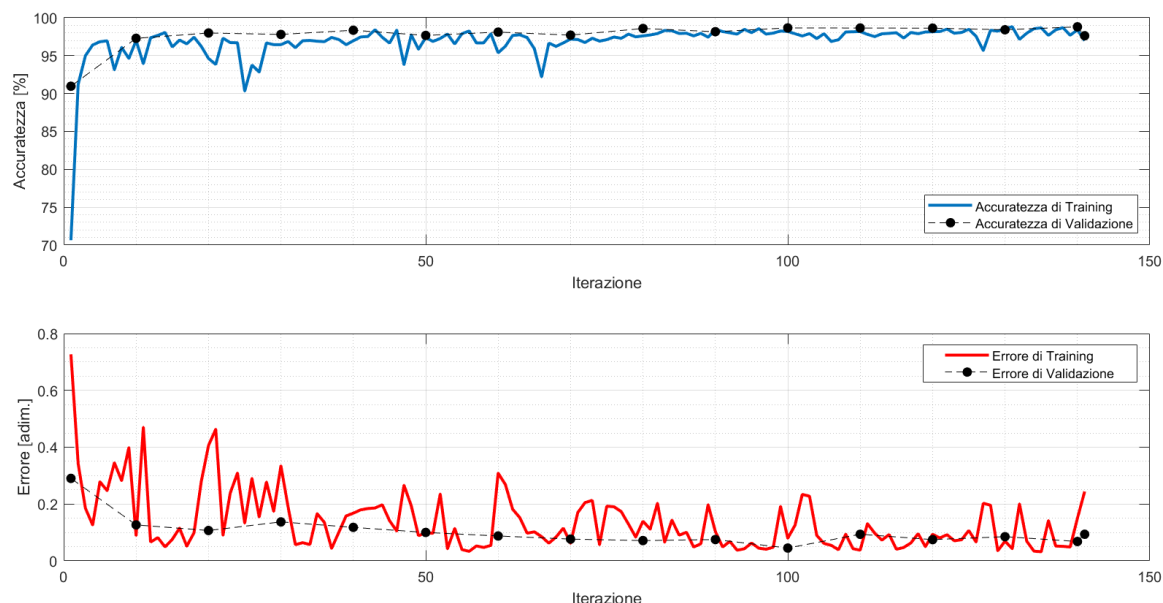


**Figura 4.8** Istogrammi per le distribuzioni dei tempi computazionali in immagini di diversa dimensione. A sinistra, viene utilizzata una scala assoluta dove la componente dei singoli step nella barra verticale è riferita al tempo totale. A sinistra viene, invece, utilizzata una scala relativa, dove è indicata la percentuale di tempo impiegata da ogni step sul tempo totale. Per questioni di chiarezza, gli step meno significativi sono raggruppati.

La qualità della segmentazione è misurata come l'accuratezza dei risultati ottenuti quando confrontati con i risultati ricavati applicando ActiveContour sulla stessa immagine tridimensionale. L'effetto sulla morfologia dello scheletro viene, invece, valutato con un'analisi qualitativa.

#### 4.6.1 Analisi del processo di training

Di seguito sono riportati i dati relativi al processo di training, utili per verificare preliminarmente le performance della rete neurale, valutarla e, se necessario, ottimizzare alcuni parametri.



**Figura 4.9** In blu l'andamento dell'accuratezza della rete neurale in funzione del numero di iterazioni effettuate; in rosso, l'andamento dell'errore. La linea nera tratteggiata si riferisce sempre a questi due valori, ma è relativa alle immagini di validazione.

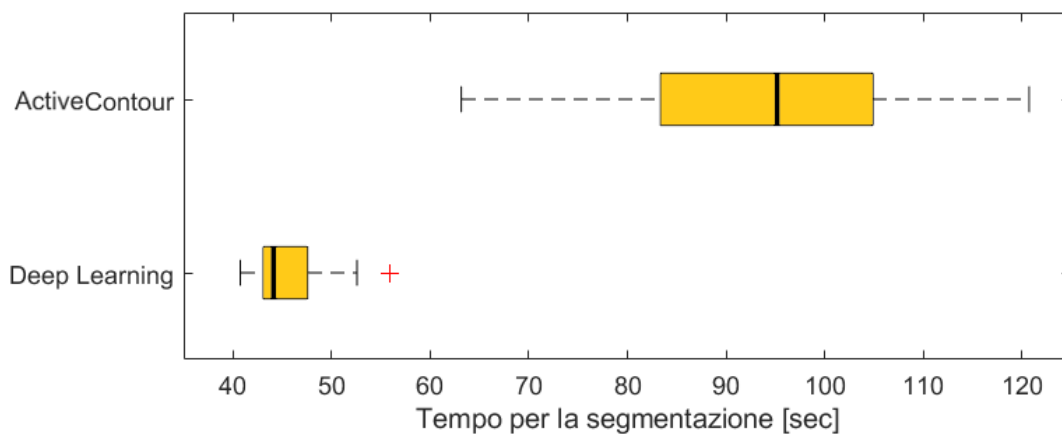
L'accuratezza di training indica la percentuale di voxel correttamente segmentati all' *i-esima* iterazione: dal momento che ad ogni iterazione di training vengono utilizzate solo un gruppo – un *batch* – sempre diverso delle immagini a disposizione, questa misura non è effettivamente indicativa dell'accuratezza della rete, ma è piuttosto riferita alla performance della rete neurale dipendente dalle specifiche immagini nel batch. Al contrario, la linea tratteggiata è riferita all'accuratezza della rete ricavata dalle immagini di validazione: questo set di immagini, 5 per questo lavoro, viene segmentato ogni 10 iterazioni per valutare più correttamente l'accuratezza della rete, senza la dipendenza dalle immagini utilizzate. L'andamento di entrambi questi valori di accuratezza converge asintoticamente ad un valore compreso tra il 95% e il 100%: il valore fornito da MATLAB® al termine del training è pari a 96.07%.

L'errore di training, meglio noto come *loss*, è invece la misura dello scarto quadratico medio tra i valori dei pixel ottenuti dalla segmentazione e i valori dei pixel nel *ground-truth*: è necessario specificare che l'output della segmentazione con rete neurale non è l'immagine binaria con voxel *true* o *false*, ma un'immagine dove ad ogni voxel è assegnato un valore di confidenza compreso tra 0 e 1. Tanto più questo valore è vicino a 1 e tanto più la rete neurale

è “fiduciosa” che quel voxel corrisponda ad un vaso; questi sono i valori utilizzati per il calcolo del *loss*, che in questo caso si stabilizza su valori leggermente inferiori allo 0.1. Idealmente, l’andamento del *loss* dovrebbe tendere asintoticamente a zero il più rapidamente possibile e senza oscillazioni: quando si ha a disposizione un dataset di poche immagini, tuttavia, è possibile che l’andamento presenti uno o più picchi che devono però essere di entità progressivamente inferiore.

#### 4.6.2 Tempo computazionale per la segmentazione

L’implementazione di un metodo alternativo come il Deep Learning per la segmentazione è scaturita dall’osservazione del tempo computazionale impiegato per questa operazione, in media pari al 63% del tempo richiesto per effettuare l’analisi completa. In *figura 4.10* viene mostrata la distribuzione delle tempistiche di segmentazione con Deep Learning e ActiveContour su un pool di 50 immagini, identiche per i due casi.



**Figura 4.10** Boxplot della distribuzione delle tempistiche di segmentazione effettuata con ActiveContour (alto) e attraverso la rete neurale di Deep Learning (basso). Entrambi questi boxplot si riferiscono ad immagini campionate con fattore di downsampling pari a 2.

Il boxplot di ActiveContour mostra un range di tempi molto ampio, che spazia da circa 60 secondi a 120 secondi, accompagnato da un’ampia dispersione se confrontato con il boxplot riferito al Deep Learning. La mediana di queste due distribuzioni è molto differente, in

particolare quella riferita (44 secondi) è inferiore alla metà di quella riferita ad ActiveContour.

### 4.6.3 Qualità della segmentazione

La riduzione del tempo computazionale richiesto che si mira ad ottenere con una rete neurale di Deep Learning non deve essere influente sulla qualità dell'immagine segmentata ottenuta, in particolare l'immagine binaria in output deve essere il più simile possibile a quella del *ground truth* o, quantomeno, presentare incongruenze prevedibili e che possano venire corrette sistematicamente in un momento successivo, o di cui si possa prevedibilmente tenere in considerazione durante l'analisi morfologica. Per valutare la qualità della segmentazione l'accuratezza è un parametro fondamentale, accompagnata dalla specificità e dalla sensibilità. Per il calcolo di questi parametri sono state prese in considerazione le seguenti formule:

$$Sensitività = \frac{TP}{TP + FN}$$

$$Specificità = \frac{TN}{TN + FP}$$

$$Accuratezza = \frac{TN + TP}{TN + TP + FN + FP}$$

I voxel sono stati classificati come

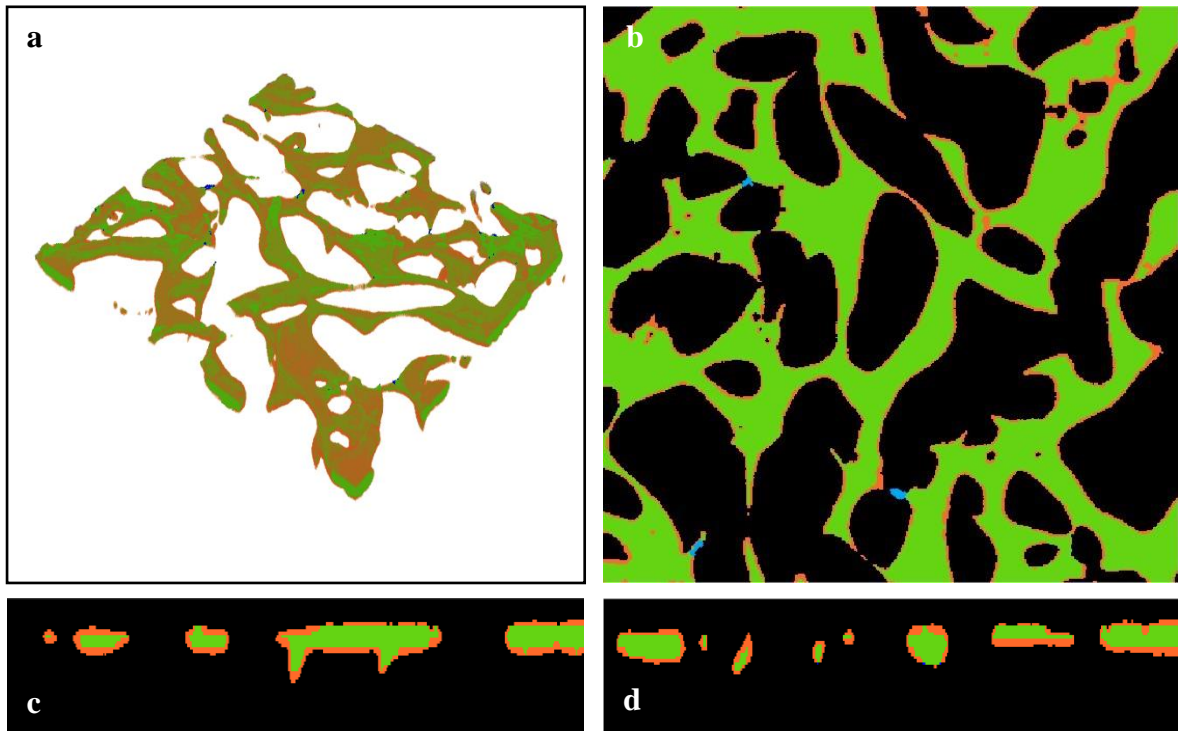
*TP*: Riconosciuti come vaso sia dalla rete neurale sia da ActiveContour

*TN*: Riconosciuti come background sia dalla rete neurale sia da ActiveContour

*FP*: Riconosciuti come vaso dalla rete neurale e come background da ActiveContour

*FN*: Riconosciuti come background dalla rete neurale e come vaso da ActiveContour

Di seguito, è riportata l'immagine di una rete tridimensionale e di tre proiezioni ortogonali, con un codice colore utile per valutare anche qualitativamente gli indici di cui sopra.



**Figura 4.11** In verde i veri positivi TP, in arancione i falsi negativi FN, in blu i falsi positivi FP, in nero (solo per le immagini **a**, **b** e **c**) i veri negativi TN. Nell'immagine **a**, per questioni di chiarezza di visualizzazione, i veri negativi non sono mostrati. **a)** Visualizzazione della rete tridimensionale; **b)** Slicing con vista superiore; **c-d)** Slicing con viste laterali.

La *tabella 4.3* riportata gli indici di accuratezza, specificità e sensibilità riferiti alla rete nella *figura 4.11*.

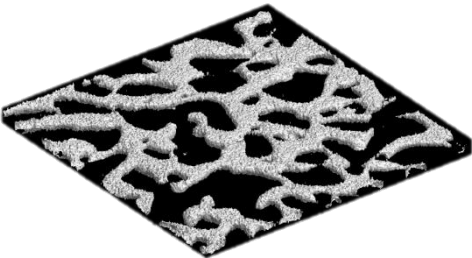
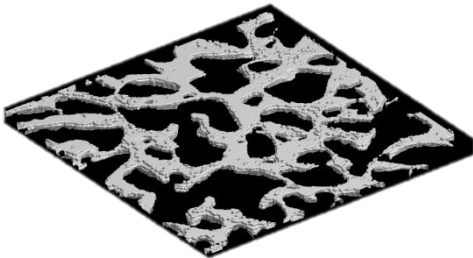
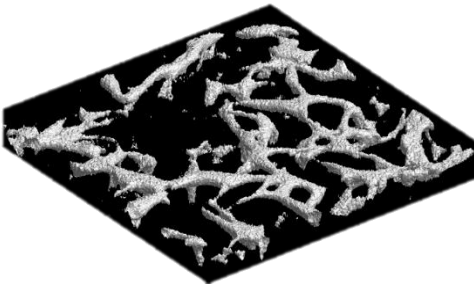
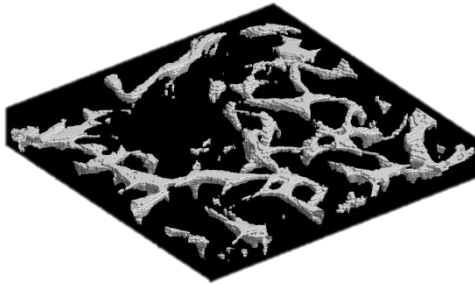
**Tabella 4.3** Valori per il calcolo di sensibilità, specificità ed accuratezza per un'immagine segmentata con rete neurale di Deep Learning

TP	TN	FP	FN	Sensibilità	Specificità	Accuratezza
336223	6611919	402	251456	57,21%	99,99%	96,50%

Si nota dalla *figura 4.11* che la rete neurale non segmenta correttamente i voxels più esterni nel vaso, fenomeno che si manifesta anche come un valore di specificità medio-basso. Di contro, alcune situazioni in cui vasi sottili non venivano segmentati da ActiveContour sono invece considerati nella segmentazione con Deep Learning.

Nelle immagini di seguito viene riportato un rendering tridimensionale della segmentazione con Deep Learning e con ActiveContour. Queste visualizzazioni sono utili per verificare preventivamente che l'output della rete neurale e quello dell'algoritmo tradizionale siano i più simili possibile. Per completezza, questo confronto viene effettuato sia su una rete GOOD che su una rete BAD.

**Tabella 4.4** Segmentazione con ActiveContour e Deep Learning di una rete GOOD e di una rete BAD

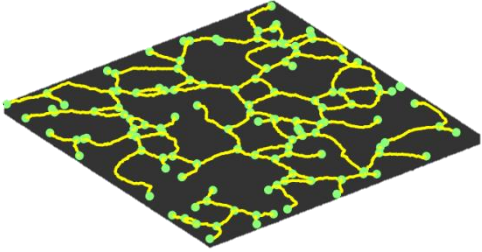
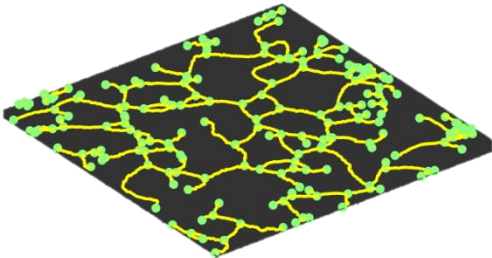
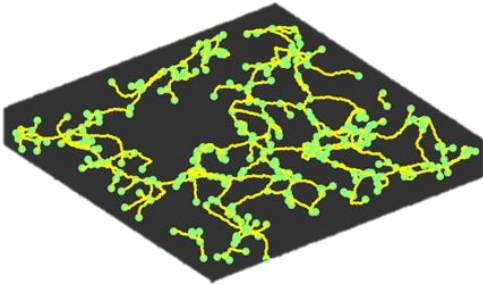
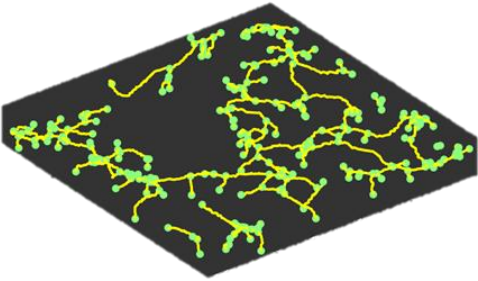
	ActiveContour	Deep Learning
<b>GOOD</b>		
<b>BAD</b>		

Le differenze tra i risultati con le due tecniche di segmentazione sono limitate, soprattutto per la rete GOOD; per quanto riguarda la rete BAD si nota, tuttavia, che alcuni rami della rete caratterizzati da raggio e lunghezza molto ridotti non vengono correttamente segmentati dalla rete neurale, oppure vengono disconnessi dal resto della rete.

Per identificare eventuali problematiche nei successivi step dell'algoritmo (principalmente la scheletrizzazione) sono stati comparati qualitativamente anche gli scheletri delle due reti precedentemente presentate in *tabella 4.4*.



**Tabella 4.5** Scheletrizzazione con ActiveContour e Deep Learning di una rete GOOD e di una rete BAD. L'algoritmo di scheletrizzazione impiegato è lo stesso per entrambe le immagini

	ActiveContour	Deep Learning
<b>GOOD</b>		
<b>BAD</b>		

Dalla *tabella 4.5* emerge che alcuni particolari dello scheletro non sono presenti nel network ottenuto dal volume binario derivante dal Deep Learning. Questi particolari sono, nella maggior parte dei casi, vasi di piccole dimensioni.

## 5 DISCUSSIONE

### 5.1 Confronto con l'analisi bidimensionale

I parametri morfologici presentati in *tabella 4.1*, ricavati da entrambi gli algoritmi, non sono simili, ma le differenze sono sempre riconducibili al loro funzionamento.

La frazione volumetrica è molto superiore se calcolata da *REAYER*: su un volume tridimensionale, infatti, un vaso difficilmente occupa tutta la profondità a disposizione, mentre per un'immagine bidimensionale la profondità di un vaso è sempre pari a 1 pixel, che rappresenta anche la profondità di tutto il volume.

Per quanto riguarda il raggio medio, il valore ottenuto dall'algoritmo sviluppato è inferiore del 16% rispetto a quello ottenuto da *REAYER*, in quanto quest'ultimo considera la misurazione su un vaso perfettamente cilindrico, mentre il metodo sviluppato tiene in considerazione la reale morfologia della sezione di ogni ramo, la quale nella maggior parte dei casi risulta essere non circolare.

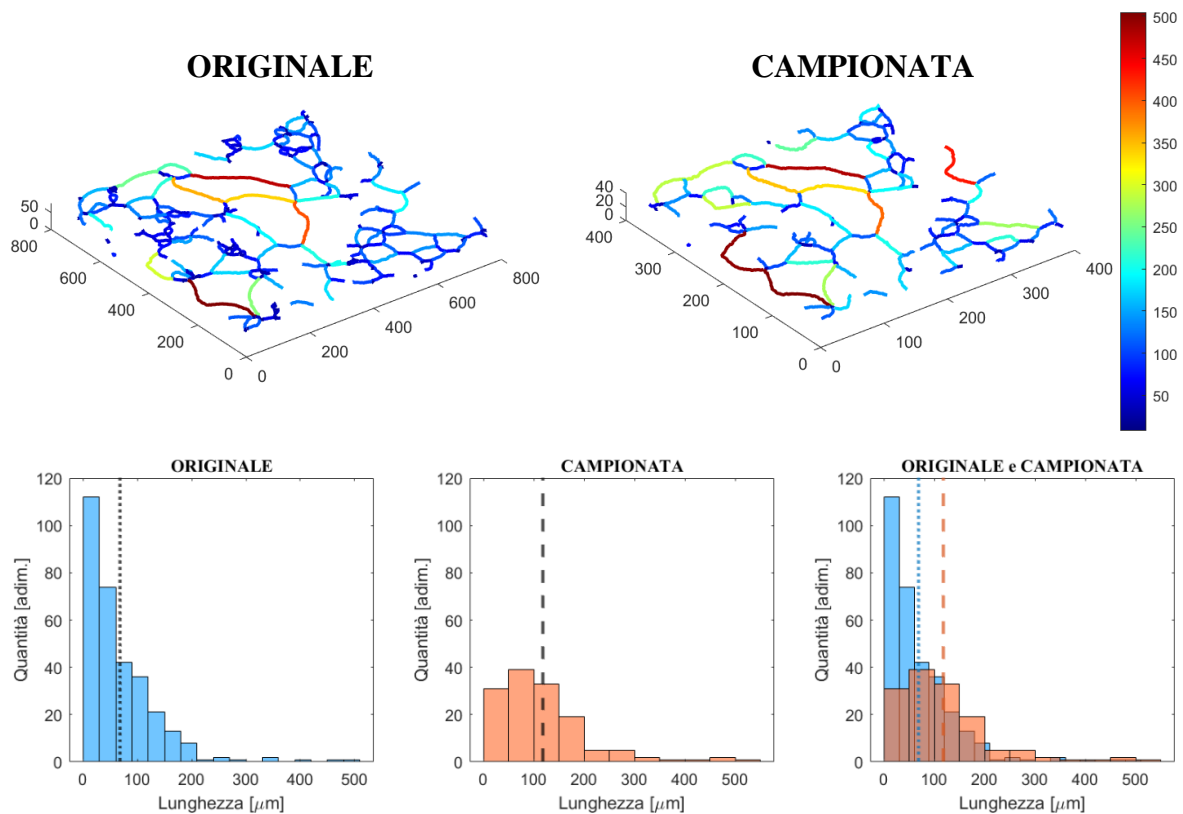
La lunghezza totale, invece, risente della bidimensionalità dell'immagine quando analizzata con *REAYER*, che sottostima questa misurazione. Con la proiezione in 2D si perdono infatti tutte le informazioni riguardo allo sviluppo dei rami nella profondità, che risultano conseguentemente di lunghezza ridotta rispetto ad un'analisi tridimensionale.

Anche il numero di biforcazioni del network viene sottostimato da *REAYER*: in corrispondenza dei loops, che sono caratterizzati da almeno due biforcazioni, l'analisi bidimensionale individua solamente un branchpoint (*figura 4.2*). Inoltre, i vasi di lunghezza ridotta non vengono considerati, contribuendo alla riduzione del numero di biforcazioni calcolate.

Da queste considerazioni possiamo concludere che gli algoritmi confrontati producono risultati comparabili, con discrepanze sempre attribuibili alla dimensionalità dell'immagine e ad alcuni sotto-processi intermedi, come segmentazione e scheletrizzazione, caratteristici dei due algoritmi considerati.

## 5.2 Effetto del campionamento sui risultati

Utilizzando un boxplot come base per un confronto tra un'immagine campionata (fattore di downsampling pari a 2) ed un'immagine in risoluzione originale, non si riconoscono differenze sostanziali per quanto riguarda le distribuzioni di raggio, tortuosità ed eccentricità, sia per la mediana che per l'IQR. La distribuzione delle lunghezze dei vasi, invece, risente della perdita di informazioni causata dal campionamento, che si manifesta con un aumento di circa il 50% della mediana dell'immagine originale, accompagnata da una traslazione del range interquartile verso valori più alti. L'innalzamento della mediana è dovuto al fatto che effettuando il campionamento vengono persi i vasi più corti della rete. Nell'immagine originale, invece, la presenza di un elevato numero di questi rami è responsabile dell'abbassamento del valore mediano (*figura 5.1*).



**Figura 5.1** In alto a sinistra, lo scheletro di una rete non campionata colorato in base alla lunghezza del vaso; In alto a destra, lo scheletro della stessa rete campionata, visualizzata con lo stesso codice colore. In basso, gli istogrammi delle lunghezze dei vasi con linee orizzontali in corrispondenza dei valori medi.

## 5.3 Dipendenza dalla qualità dell'immagine in input

Dal confronto effettuato tra le 10 immagini GOOD e le immagini BAD si evince una sostanziale dipendenza dei risultati dalla qualità dell'immagine di partenza.

Le discrepanze tra i valori sono dovute al diverso contrasto, rumore e connettività tra i due gruppi di immagini, aspetti che comportano una maggiore perdita di informazioni nelle immagini BAD.

In particolare, la mediana calcolata per lunghezza, raggio, densità S/V e superficie laterale nelle immagini BAD risulta essere inferiore, in quanto la scarsa qualità di partenza non permette la corretta identificazione di tutte le caratteristiche morfologiche della rete.

Invece per quanto riguarda l'ottenimento di eccentricità e tortuosità i valori ottenuti sono simili, in quanto sono parametri non strettamente correlati alla quantità di informazioni perse.

I risultati ottenuti sono coerenti con la distinzione effettuata, quindi l'algoritmo è in grado di ricavare parametri morfologici riscontrabili nella classificazione *ad hoc* eseguita sulle immagini scelte per questo test.

## 5.4 Applicazione: network trattati con urea

L'effetto dell'urea sulla microcircolazione è oggetto di ricerca, ed è possibile valutare, tramite l'algoritmo sviluppato, se questa molecola apporti modifiche apprezzabili alla morfologia del network. Tuttavia, il tempo ridotto in cui queste reti sono state esposte ad urea (5 giorni), potrebbe non essere sufficiente per provocare una differenza a livello morfologico. È stato effettuato un test statistico per determinare se le differenze tra le distribuzioni delle metriche ricavate dall'algoritmo di analisi siano significative. È stato svolto un test per ogni distribuzione, in modo da verificare la significatività delle differenze per ogni metrica calcolata.

Il test svolto è il *Wilcoxon–Mann–Whitney test*, noto anche come *U-Test di Mann-Whitney*. Dal momento che le reti trattate con urea sono differenti da quelle utilizzate come controllo, il test è a variabili disaccoppiate; infine, il test è a due code poiché si valuta la differenza

nelle distribuzioni a prescindere da quale di esse sia caratterizzata da valori maggiori o minori.

L'ipotesi nulla  $H_0$  per il test svolto è:

*$H_0$ : Non esiste una differenza significativa tra la distribuzione della misurazione per il network trattato con urea ed il network di controllo.*

L'ipotesi alternativa  $H_1$  è invece la seguente:

*$H_1$ : La differenza tra la distribuzione della misurazione per il network trattato con urea ed il network di controllo è significativa e non può essere attribuita al caso.*

Entrambe le ipotesi nulla e alternativa sono identiche per tutti e sei i test effettuati sulle differenti metriche.

Le misurazioni di entrambe le popolazioni vengono raggruppate e classificate con indice 1 se appartenenti al pool di controllo, mentre vengono classificate con indice 2 se appartenenti al pool trattato con urea (*tabella 5.1*). Successivamente, ad ogni misurazione viene assegnato un rango (o *rank*) numerico che identifica la posizione della suddetta misurazione quando la popolazione viene disposta in ordine crescente. Infine, si calcola la statistica-test  $U$ , che segue la formula:

$$U = \min\{U_1, U_2\}$$

dove

$$U_1 = N_1 N_2 + \frac{N_1(N_1 + 1)}{2} - R_1 \qquad U_2 = N_1 N_2 + \frac{N_2(N_2 + 1)}{2} - R_2$$

$N_1 = N_2 = 8$  il numero di campioni nei rispettivi gruppi e  $R_1$  e  $R_2$  la somma dei ranks di tutti i campioni nelle rispettive categorie.

Di seguito, in *tabella 5.1* sono riportati tutti i valori ricavati per il test sulle distribuzioni del raggio, mentre in *tabella 5.2* sono esposti i test effettuati su tutte e sei le differenti metriche.

**Tabella 5.1** U-Test di Mann-Whitney utilizzato per la valutazione della differenza delle distribuzioni del raggio calcolato su una rete di controllo (indicizzata con 1) e una rete trattata con urea (indicizzata con 2).

Raggio [μm]			Gruppo	Valore	Rank			
CONTROLLO	1	38,97	1	18,35	1	R <sub>1</sub>	56	
	1	40,67	1	33,89	2	U <sub>1</sub>	44	
	1	35,72	2	35,71	3			
	1	41,31	1	35,72	4	R <sub>2</sub>	80	
	1	36,02	1	36,02	5	U <sub>2</sub>	20	
	1	18,35	2	36,66	6			
	1	38,00	1	38,00	7	U <sub>1</sub> +U <sub>2</sub>	N <sub>1</sub> *N <sub>2</sub>	Check
	1	33,89	2	38,51	8	64	64	OK
UREA	2	35,71	2	38,84	9			
	2	40,29	1	38,97	10	U <sub>stat</sub>	20	
	2	38,84	2	39,11	11	U <sub>crit</sub>	13	
	2	36,66	2	40,29	12			
	2	39,11	1	40,67	13			
	2	50,06	1	41,31	14			
	2	43,39	2	43,39	15			
	2	38,51	2	50,06	16			
						U <sub>stat</sub> > U <sub>crit</sub>		
						Si accetta H <sub>0</sub>		

**Tabella 5.2** Valori essenziali per lo U-Test di Mann-Whitney su tutte e sei le distribuzioni di metriche ricavate dai sample trattati con urea ed il set di controllo

Raggio [μm]						Eccentricità [adim.]									
CONTROLLO	1	38,97	UREA	2	35,71	R <sub>1</sub>	56	CONTROLLO	1	0,830	UREA	2	0,851	R <sub>1</sub>	67
	1	40,67		2	40,29	U <sub>1</sub>	44		1	0,822		2	0,878	U <sub>1</sub>	33
	1	35,72		2	38,84	R <sub>2</sub>	80		1	0,836		2	0,862	R <sub>2</sub>	69
	1	41,31		2	36,66	U <sub>2</sub>	20		1	0,841		2	0,834	U <sub>2</sub>	31
	1	36,02		2	39,11	U <sub>stat</sub>	20		1	0,847		2	0,785	U <sub>stat</sub>	31
	1	18,35		2	50,06	U <sub>crit</sub>	13		1	0,957		2	0,850	U <sub>crit</sub>	13
	1	38,00		2	43,39	U <sub>stat</sub> > U <sub>crit</sub>			1	0,836		2	0,815	U <sub>stat</sub> > U <sub>crit</sub>	
	1	33,89		2	38,51	Si accetta H <sub>0</sub>			1	0,797		2	0,813	Si accetta H <sub>0</sub>	

Lunghezza [μm]						Densità S/V [μm <sup>-1</sup> ]									
CONTROLLO	1	113,12	UREA	2	76,15	R <sub>1</sub>	59	CONTROLLO	1	8,16E-03	UREA	2	8,98E-03	R <sub>1</sub>	52
	1	102,44		2	90,03	U <sub>1</sub>	41		1	9,18E-03		2	1,26E-02	U <sub>1</sub>	48
	1	111,60		2	102,89	R <sub>2</sub>	77		1	8,56E-03		2	1,32E-02	R <sub>2</sub>	84
	1	100,19		2	98,85	U <sub>2</sub>	23		1	9,90E-03		2	1,26E-02	U <sub>2</sub>	16
	1	85,78		2	123,49	U <sub>stat</sub>	23		1	1,26E-02		2	9,71E-03	U <sub>stat</sub>	16
	1	58,55		2	105,17	U <sub>crit</sub>	13		1	6,57E-03		2	1,11E-02	U <sub>crit</sub>	13
	1	93,07		2	106,35	U <sub>stat</sub> > U <sub>crit</sub>			1	1,14E-02		2	1,11E-02	U <sub>stat</sub> > U <sub>crit</sub>	
	1	92,70		2	122,54	Si accetta H <sub>0</sub>			1	7,38E-03		2	9,43E-03	Si accetta H <sub>0</sub>	

Tortuosità [adim.]						Area Laterale [μm <sup>2</sup> ]									
CONTROLLO	1	1,23	UREA	2	1,21	R <sub>1</sub>	74	CONTROLLO	1	3,27E+06	UREA	2	3,10E+06	R <sub>1</sub>	64
	1	1,22		2	1,24	U <sub>1</sub>	26		1	3,26E+06		2	3,30E+06	U <sub>1</sub>	36
	1	1,25		2	1,17	R <sub>2</sub>	62		1	3,22E+06		2	3,33E+06	R <sub>2</sub>	72
	1	1,19		2	1,19	U <sub>2</sub>	38		1	3,41E+06		2	3,69E+06	U <sub>2</sub>	28
	1	1,23		2	1,20	U <sub>stat</sub>	26		1	3,12E+06		2	3,40E+06	U <sub>stat</sub>	28
	1	1,25		2	1,27	U <sub>crit</sub>	13		1	4,46E+06		2	3,95E+06	U <sub>crit</sub>	13
	1	1,18		2	1,23	U <sub>stat</sub> > U <sub>crit</sub>			1	3,40E+06		2	4,11E+06	U <sub>stat</sub> > U <sub>crit</sub>	
	1	1,21		2	1,18	Si accetta H <sub>0</sub>			1	3,30E+06		2	2,86E+06	Si accetta H <sub>0</sub>	

L'ipotesi nulla  $H_0$  viene accettata per tutte e sei le misurazioni morfologiche disponibili, e da ciò è possibile concludere che l'urea non produce una variazione significativa nella distribuzione dei parametri morfologici caratteristici del network microvascolare. Tale conclusione è accreditata dal fatto che il risultato del test è identico per tutti e sei i parametri presi in considerazione. L'urea con cui vengono trattate le reti microvascolari in questione, quindi, non produce variazioni morfologiche su di esse oppure l'entità dell'effetto è molto ridotta rispetto al range dei valori misurati in condizioni fisiologiche.

## 5.5 Simulazione fluidodinamica

La simulazione ha permesso di calcolare parametri fluidodinamici necessari ad ottenere la portata e le proprietà del flusso all'interno della rete.

Dalla distribuzione di pressione ottenuta dalla simulazione e dai parametri significativi della rete calcolati precedentemente è possibile calcolare la portata attraverso l'applicazione della legge di Poiseuille.

La legge di Poiseuille stabilisce che la portata è direttamente proporzionale alla differenza di pressione applicata agli estremi di un condotto e alla quarta potenza del raggio  $R$ ; è invece inversamente proporzionale alla viscosità del fluido e alla lunghezza del vaso. Questa legge, insieme al principio di conservazione di massa, rende impossibile la presenza di valori di pressione esterni al range imposto con le condizioni al contorno. In *figura 4.7* si nota come la simulazione fluidodinamica rispetti questa condizione sullo scheletro ricavato dall'analisi topologica. Inoltre, i valori di pressione devono in generale essere distribuiti in modo continuo, senza che si verifichino variazioni repentine nell'intorno di un voxel: anche in questo caso, i risultati ottenuti sono coerenti con questa condizione.

La velocità calcolata sulla centerline dei vasi rappresenta, inoltre, un'ulteriore conferma della correttezza del risultato. I branches caratterizzati da una velocità molto elevata sono infatti delimitati da nodi – branchpoints o endpoints – con valori di pressione molto distanti tra loro. Infine la velocità sui vasi “a fondo chiuso”, che dovrebbe essere teoricamente nulla per la legge di Poiseuille, risulta avere valori molto bassi nell'ordine dei  $10^{-4} \mu\text{m/s}$ : questo valore è calcolato diverso da zero per compensare l'efflusso di fluido verso l'interstizio attraverso la

parete del vaso ed ha quindi valori molto ridotti in confronto al resto dei branches dove la portata, e quindi la velocità, è governata dalle differenze di pressione capillare.

## 5.6 Deep Learning

### 5.6.1 Analisi del processo di training

La valutazione della performance della rete neurale sulla base dei grafici di accuratezza e *loss* in funzione del numero di iterazioni consente di trarre considerazioni preliminari sull'efficacia della segmentazione; in situazioni in cui il dataset di training è di dimensioni molto ridotte – è il caso di questo lavoro – questa analisi preliminare è ulteriormente riduttiva. Tuttavia, dalla *figura 4.9* emerge un andamento dell'accuratezza che si stabilizza molto velocemente su valori molto alti: questo fattore è molto positivo poiché è indice della buona qualità dei parametri di training, che permettono di produrre una rete accurata già nelle prime iterazioni del processo. Questi parametri sono il *learn-rate* iniziale, il *learn-rate-reduction-factor* e la sua frequenza di riduzione, la dimensione del *batch* impiegato in ogni iterazione del training e il parametro di regolarizzazione L2. La ridotta quantità di immagini a disposizione si riflette, tuttavia, sull'andamento del *loss*: questo valore dovrebbe stabilizzarsi il più rapidamente possibile su valori bassi, tendendo asintoticamente a 0. Si nota invece, sempre in *figura 4.9*, che i valori di questa variabile oscillano, seppur mantenendosi attorno a valori accettabili. Con un dataset più ampio le oscillazioni del *loss*, che già sono leggermente in diminuzione con l'aumentare delle iterazioni, si stabilizzerebbero a zero. La ridotta dimensione delle immagini di training è il principale limite della rete neurale, ma l'*augmentation* (*capitolo 3.5*) impiegata per “compensare” questo problema permette di ottenere comunque valori di accuratezza sufficientemente elevati.

### 5.6.2 Tempo computazionale per la segmentazione

Gli istogrammi in scala normalizzata in *figura 4.8* permettono di individuare come il tempo richiesto per un'analisi completa sia ripartito nei vari step computazionali che la



compongono, anche in funzione delle dimensioni dell'immagine. Dagli istogrammi si nota come la segmentazione sia caratterizzata da una percentuale che, in funzione della dimensione, si mantiene sempre all'incirca costante: ActiveContour infatti richiede tanto più tempo quanto più è grande (e pesante dal punto di vista della memoria) l'immagine. L'analisi morfologica – che in *figura 4.8* è riferita al calcolo di tutte le metriche esposte nel *capitolo 3.3* – richiede invece relativamente meno tempo per volumi di dimensione ridotta: il calcolo di queste metriche si basa infatti su funzioni che richiedono lo stesso numero di operazioni indipendentemente dalla quantità dei dati con cui devono lavorare, o dove comunque si verificano variazioni non apprezzabili. La motivazione di una evidente variabilità sulla porzione di tempo richiesta risiede nel fatto che immagini campionate o di dimensione ridotta sono generalmente caratterizzate da scheletri con un numero di rami inferiore. Poiché vengono calcolati i parametri geometrici significativi di ogni ramo, l'analisi morfologica richiede tanto più tempo quanti più rami sono presenti nello scheletro.

In generale, due networks vascolari scheletrizzati in  $n$  branches e  $x \cdot n$  branches richiederanno, rispettivamente,  $t$  e  $x \cdot t$  secondi per l'analisi morfologica.

Il boxplot in *figura 4.10* rappresentativo delle tempistiche richieste per la segmentazione rivelano un'ottima applicabilità del Deep Learning, che si manifesta con una riduzione media dei tempi del 54.56%. Dal momento che la riduzione del tempo computazionale richiesto per questo step dell'analisi è il motivo principale per cui è stato studiato un approccio basato sulle reti neurali, si ritiene quindi di aver conseguito con successo un miglioramento sotto questo aspetto. Inoltre, la riduzione della dispersione dei tempi di segmentazione rispetto ad ActiveContour rappresenta un altro aspetto positivo: il tempo computazionale richiesto da questo algoritmo è infatti dipendente dal volume tridimensionale in input e, di conseguenza, dalla complessità topologica e morfologica della rete microvascolare da segmentare e dalla qualità dell'immagine fornita dalla microscopia confocale, in particolare dal rumore bidimensionale ad alte frequenze. ActiveContour impiega, dunque, più tempo per la segmentazione di networks intricati e caratterizzati da immagini molto rumorose. La motivazione di questa dipendenza è intrinseca nel funzionamento dell'algoritmo: se la rete è molto intricata, ActiveContour deve prendere in considerazione molti bordi di vaso e posizzionarli correttamente a cavallo tra la rete ed il background, con un conseguente aumento del tempo richiesto. Con il Deep Learning, invece, vengono applicate sempre le stesse operazioni di algebra e logica sui voxel della rete, completando quindi l'operazione senza

variazioni di tempo dipendenti dall'immagine fornita in input. Questo aspetto è ulteriormente rilevante quando il volume da sottoporre all'analisi non viene campionato; se con un fattore di downsampling pari a 2 le tempistiche di segmentazione variano, per ActiveContour, dai 60 ai 120 secondi, ci si aspetta che senza downsampling i tempi richiesti, che vengono moltiplicati per un fattore pari a 8 in questo caso, siano compresi in un range molto più ampio, tra gli 8 e i 16 minuti. La segmentazione con *U-Net*, di conseguenza, non solo riduce il tempo computazionale al calcolatore, ma fornisce un ulteriore grado di prevedibilità sulla richiesta in tempo dell'algoritmo complessivo.

### 5.6.3 Qualità della segmentazione

Il capitolo 3.5.2 concludeva esponendo come il volume da segmentare venga ridimensionato a 384x384x16 voxel, sottoposto alla rete neurale e infine riportato alla sua dimensione originale. Ciò potrebbe ragionevolmente portare a pensare che effettuare una segmentazione su un volume di dimensione ridotta, e quindi meno dettagliato di informazioni, produca un risultato impreciso quando riportato alla sua dimensione originale. La riduzione di un'immagine di dimensione, ad esempio, 1000x1000x40 a 384x384x16 è associata ad una perdita di informazioni e di dettaglio, che potrebbero fare la differenza nel risultato della segmentazione o in step successivi dell'analisi topo-morfologica. Questa strategia, tuttavia, non influisce sulla qualità della segmentazione, ed il valore di accuratezza ricavato dalle immagini di validazione e di testing molto elevato (96,50%) lo conferma. L'architettura di *U-Net* (figura 3.12) e della maggior parte delle reti neurali convoluzionali presenti in letteratura prevede, infatti, che il volume da segmentare venga ridotto ad una dimensione fissata, su cui vengono poi effettuate le operazioni per il riconoscimento dei voxels. Ciò permette di risparmiare sul tempo computazionale, rendendo anche più semplice il processo di progettazione dell'architettura della rete. Il BRIDGE nella figura 3.12 si riferisce infatti a tutte le operazioni svolte sull'immagine dopo che essa viene dimensionalmente ridotta, ed è infatti rappresentato da un parallelepipedo molto più stretto dell'immagine di input. Le dimensioni di riduzione, poi, sono solitamente molto inferiori rispetto ai 384x384x16 voxel a cui viene ridimensionato il volume di interesse, di conseguenza l'effetto di questa

operazione non influisce negativamente sulla qualità della segmentazione dopo l'espansione dell'immagine alla sua dimensione originale.

Dalla *figura 4.11* emerge il principale limite della segmentazione con Deep Learning dal punto di vista della qualità della segmentazione, ovvero il mancato riconoscimento del layer di voxel più esterno per ogni vaso, che sono quindi classificabili come falsi negativi. I voxel sulla superficie esterna dei vasi hanno infatti valori solitamente più bassi rispetto ai voxel nel lume, e non vengono quindi segmentati correttamente. L'errore è sistematico e, di conseguenza, prevedibile e compensabile attraverso metodi di post-processing applicabili all'immagine tridimensionale. È possibile infatti, per esempio, effettuare il *thickening* del volume ottenuto dalla segmentazione, aggiungendo quindi degli strati di voxel sulla superficie esterna dei vasi; questo metodo tuttavia, sarebbe causa di altre problematiche riguardo alla morfologia della rete in output. Innanzitutto, l'entità del *thickening* – il numero di layers di pixel da aggiungere alla superficie esterna – deve essere valutata qualitativamente osservando multiple sezioni della rete a diverse angolazioni, come in *figura 4.11*; inoltre questo algoritmo ha come conseguenza lo smussamento dei bordi e degli spigoli, correlato ad una modifica della morfologia delle sezioni e, di conseguenza, variazioni nei valori di raggio, eccentricità e superficie laterale calcolati. Dal momento che, da una valutazione qualitativa su alcune immagini simili a quella in *figura 4.11*, il layer di falsi negativi ha uno spessore al massimo pari a 3 voxel, è stato deciso di non applicare il *thickening* in post-processing alla segmentazione con Deep Learning. L'accuratezza e la specificità ottenute hanno comunque valori molto elevati che, in combinazione con un'analisi qualitativa sui volumi dello scheletro e sui risultati delle segmentazioni, permettono di affermare la validità della sostituzione di ActiveContour con una rete neurale di Deep Learning. È stata quindi ottenuta una tecnica che ha permesso di ridurre consistentemente il tempo computazionale richiesto, seppur mantenendo una qualità elevata del risultato, con un buona accuratezza e la generazione di un errore sistematico e prevedibile.

## 5.7 Limiti

La maggior parte dei metodi di analisi topo-morfologica di reti vascolari in letteratura lavora su immagini angiografiche, principalmente in ambito oftalmologico riguardo alla vascolarizzazione della retina. Le angiografie producono, tuttavia, immagini bidimensionali e, di conseguenza, la maggior parte degli algoritmi in letteratura (presentati anche nel *capitolo 2*) lavora su dati in 2D. Non è quindi presente un mezzo di paragone robusto ed affidabile per la comparazione dei risultati ottenuti dall'analisi tridimensionale con questo algoritmo, ma possono essere condotti confronti tra le metriche ottenute dall'algoritmo di questo lavoro e i metodi di analisi in due dimensioni, tenendo obbligatoriamente in considerazione i fattori che causerebbero incongruenze tra le due misurazioni.

Sono presenti anche alcuni limiti riguardo al funzionamento dell'algoritmo:

- la scheletrizzazione produce, in alcuni casi, vasi di piccole dimensioni che non sono effettivamente presenti, causati da particolari morfologie di vaso
- alcuni vasi molto sottili possono non venire segmentati, perdendo il collegamento anche di più rami nello scheletro
- sebbene l'area laterale totale sia calcolata in modo preciso, l'area laterale dei singoli rami è un'approssimazione geometrica
- la segmentazione con la rete neurale di Deep Learning perde lo strato più esterno di voxel sui vasi, che si riflette in una sottostima nella misurazione del raggio.

## 6 CONCLUSIONE

In questo lavoro di tesi è stato realizzato un metodo computazionale universale per l'analisi 3D delle variabilità delle caratteristiche di reti microvascolari, applicabile a volumi tridimensionali ottenuti dalla microscopia confocale di network microvascolari di qualsiasi dimensione e risoluzione. L'algoritmo prodotto permette di ricavare le caratteristiche topologiche della rete, quindi la centerline dei vasi, le biforcazioni, gli endpoints e le connessioni tra essi. Inoltre, vengono calcolate le metriche morfologiche più significative ovvero il raggio, la lunghezza, la tortuosità, l'eccentricità e l'area laterale di ogni ramo della rete sottoposta all'analisi; di conseguenza è possibile valutarne le distribuzioni e i valori medi per poi effettuare confronti con altri networks. L'algoritmo prodotto fornisce in output i files necessari allo studio della fluidodinamica della rete, effettuato computazionalmente con un software di simulazione già utilizzato in altri lavori. I parametri dell'analisi sono personalizzabili a seconda che l'utilizzatore prediliga l'accuratezza dei risultati o il tempo computazionale impiegato: questo algoritmo è anche adatto, parametrizzando opportunamente i suddetti valori, ad effettuare l'analisi completa di molte immagini in tempi relativamente brevi (50 reti microvascolari in poco più di 1 ora su una CPU a 1.60GHz).

## 7 BIBLIOGRAFIA

- [1] C. Ince, “The microcirculation is the motor of sepsis,” *Crit. Care*, vol. 9 Suppl 4, no. Suppl 4, pp. S13–S19, 2005, doi: 10.1186/cc3753.
- [2] G. S. Offeddu *et al.*, “Application of Transmural Flow Across In Vitro Microvasculature Enables Direct Sampling of Interstitial Therapeutic Molecule Distribution,” *Small*, vol. 15, no. 46, pp. 1–10, 2019, doi: 10.1002/sml.201902393.
- [3] K. Saeed, M. Tabędzki, M. Rybnik, and M. Adamski, “K3M: A universal algorithm for image skeletonization and a review of thinning techniques,” *Int. J. Appl. Math. Comput. Sci.*, vol. 20, no. 2, pp. 317–335, 2010, doi: 10.2478/v10006-010-0024-4.
- [4] A. Niemistö, V. Dunmire, O. Yli-Harja, W. Zhang, and I. Shmulevich, “Robust quantification of in vitro angiogenesis through image analysis,” *IEEE Trans. Med. Imaging*, vol. 24, no. 4, pp. 549–553, 2005, doi: 10.1109/TMI.2004.837339.
- [5] M. B. Vickerman *et al.*, “VESGEN 2D: Automated, user-interactive software for quantification and mapping of angiogenic and lymphangiogenic trees and networks,” *Anat. Rec.*, vol. 292, no. 3, pp. 320–332, 2009, doi: 10.1002/ar.20862.
- [6] M. E. Seaman, S. M. Peirce, and K. Kelly, “Rapid analysis of vessel elements (RAVE): A tool for studying Physiologic, Pathologic and Tumor Angiogenesis,” *PLoS One*, vol. 6, no. 6, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0020807.
- [7] E. Zudaire, L. Gambardella, C. Kurcz, and S. Vermeren, “A computational tool for quantitative analysis of vascular networks,” *PLoS One*, vol. 6, no. 11, Nov. 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0027385.
- [8] B. A. Corliss, R. W. Doty, C. Mathews, P. A. Yates, T. Zhang, and S. M. Peirce, “REAYER: A Program for Improved Analysis of High-resolution Vascular Network Images,” *Microcirculation*. 2020, doi: 10.1111/micc.12618.
- [9] T.-C. Lee, R. L. Kashyap, and C.-N. Chu, “Building Skeleton Models via 3-D Medial Surface/Axis Thinning Algorithms,” *CVGIP Graph. Model. Image Process.*, vol. 56, no. 6, pp. 462–478, 1994, doi: 10.1006/cgip.1994.1042.
- [10] P. Kollmannsberger, M. Kerschnitzki, F. Repp, W. Wagermaier, R. Weinkamer, and P. Fratzl, “The small world of osteocytes: Connectomics of the lacuno-canalicular network in bone,” *New J. Phys.*, vol. 19, no. 7, 2017, doi: 10.1088/1367-2630/aa764b.
- [11] L. Possenti *et al.*, “A computational model for microcirculation including Fahraeus-

- Lindqvist effect, plasma skimming and fluid exchange with the tissue interstitium,” *Int. j. numer. method. biomed. eng.*, vol. 35, no. 3, pp. 3–8, 2019, doi: 10.1002/cnm.3165.
- [12] L. Possenti, G. Casagrande, S. Di Gregorio, P. Zunino, and M. L. Costantino, “Numerical simulations of the microvascular fluid balance with a non-linear model of the lymphatic system,” *Microvasc. Res.*, vol. 122, no. February 2018, pp. 101–110, 2019, doi: 10.1016/j.mvr.2018.11.003.
- [13] T. Pissas *et al.*, “Deep iterative vessel segmentation in OCT angiography,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 11, no. 5, p. 2490, 2020, doi: 10.1364/boe.384919.
- [14] C. Leahy, H. Radhakrishnan, G. Weiner, J. L. Goldberg, and V. J. Srinivasan, “Mapping the 3D connectivity of the rat inner retinal vascular network using OCT angiography,” *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 56, no. 10, pp. 5785–5793, 2015, doi: 10.1167/iovs.15-17210.
- [15] M. Livne *et al.*, “A U-Net Deep Learning Framework for High Performance Vessel Segmentation in Patients With Cerebrovascular Disease,” *Front. Neurosci.*, vol. 13, p. 97, 2019, doi: 10.3389/fnins.2019.00097.
- [16] J. Jaworek-Korjakowska, “A Deep Learning Approach to Vascular Structure Segmentation in Dermoscopy Colour Images,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2018, p. 5049390, 2018, doi: 10.1155/2018/5049390.
- [17] M. Haft-Javaherian, L. Fang, V. Muse, C. B. Schaffer, N. Nishimura, and M. R. Sabuncu, “Deep convolutional neural networks for segmenting 3D in vivo multiphoton images of vasculature in Alzheimer disease mouse models,” *PLoS One*, vol. 14, no. 3, pp. 1–21, 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0213539.
- [18] P. Teikari, M. Santos, C. Poon, and K. Hynynen, “Deep Learning Convolutional Networks for Multiphoton Microscopy Vasculature Segmentation,” pp. 1–23, 2016, [Online]. Available: <http://arxiv.org/abs/1606.02382>.
- [19] O. Ronneberger, P. Fischer, and T. Brox, “U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation BT - Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention – MICCAI 2015,” 2015, pp. 234–241.

