



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
FACOLTÀ DI INGEGNERIA

---

Corso di Laurea Triennale in Ingegneria Biomedica

**ANALISI DELLA MOBILITÀ  
DI COLTURE CELLULARI  
SOTTO ELETTROSTIMOLAZIONE  
TRAMITE TECNICHE  
DI ANALISI DI IMMAGINE**

*Analysis of cell cultures mobility under electrostimulation  
using image analysis techniques*

Relatore:

**Prof.ssa Milena Martarelli**

Tesi di Laurea di:

**Tommaso Bianchi**

Correlatore:

**Dr. Alessandro Annessi**

A.A. 2023/2024

# Indice

<b>Introduzione</b>	<b>8</b>
<b><i>1- Materiali e metodi</i></b>	<b>9</b>
1.1 I miotubi	9
1.2 Banco di prova	12
1.3 L'elettrostimolazione	14
1.4 Acquisizione dei video	15
<b><i>2- Elaborazione e analisi dei video</i></b>	<b>19</b>
2.1 Stato dell'arte sull'analisi Block Matching	20
2.2 Metodologia del Block Matching applicata al caso dei miotubi	22
<b><i>3- Analisi dei risultati</i></b>	<b>32</b>
3.1 Analisi dei miotubi trattati con statina con concentrazione di 0.6 nM	34
3.2 Analisi dei miotubi trattati con statina con concentrazione di 2.5 nM	40
3.3 Analisi dei miotubi trattati con statina con concentrazione di 2.5 nM e coenzima Q	47
3.4 Analisi dei miotubi trattati con coenzima Q	52
3.5 Analisi dei miotubi di controllo	57
3.6 Analisi complessiva dei risultati e confronto tra i diversi trattamenti dei miotubi	63
<b>Conclusioni</b>	<b>67</b>

**Bibliografia e sitografia**

**69**

**Appendice**

**70**

## *Elenco delle Figure*

<b>Figura 1:</b> Miotubi visti al microscopio con ingrandimento 40x .....	9
<b>Figura 2:</b> Piastra multiwell da sei pozzetti usata per le semine dei miotubi .....	11
<b>Figura 3:</b> Componenti del banco di prova.....	12
<b>Figura 4:</b> Interfaccia utente Labview .....	13
<b>Figura 5:</b> Microscopio BioTek Lionheart FX.....	13
<b>Figura 6:</b> Onda quadra adoperata per l'elettrostimolazione dei miotubi .....	14
<b>Figura 7:</b> Interfaccia utente del microscopio BioTek Lionheart FX.....	15
<b>Figura 8:</b> Pannello di navigazione del microscopio .....	16
<b>Figura 9:</b> Joystick per muoversi all'interno dei pozzetti manualmente.....	16
<b>Figura 10:</b> Menù per la regolazione della messa a fuoco e dell'esposizione .....	17
<b>Figura 11:</b> Comandi per l'acquisizione di immagini e video .....	17
<b>Figura 12:</b> Fermo immagine di un video acquisito a 40x .....	19
<b>Figura 13:</b> Immagine al frame k.....	20
<b>Figura 14:</b> Immagine al frame k suddivisa in blocchi .....	20
<b>Figura 15:</b> Immagine al frame k+1.....	21
<b>Figura 16:</b> Vettore spostamento tra i due frame .....	21
<b>Figura 17:</b> Fermo immagine del primo video in esempio per la condizione STAT 0.6 con in primo piano ben in evidenza il miotubo in esame .....	22
<b>Figura 18:</b> Frame del miotubo a riposo utilizzato come riferimento per il calcolo dei vettori spostamento dei frame successivi.....	23
<b>Figura 19:</b> Dall'alto verso il basso rappresentazione dei vettori spostamento nei frame 6,8 e 10 .....	25
<b>Figura 20:</b> Dall'alto verso il basso: frame contenente in blu i vettori spostamento del miotubo; scatter contenente il valore massimo dei vettori spostamento frame dopo frame; scatter contenente il valore medio dei vettori spostamento frame per frame .....	26
<b>Figura 21:</b> Grafico realizzato in Matlab che rappresenta tutti i picchi di contrazione raggiunti nel caso del miotubo in esame nel primo video, in rosso è anche tratteggiata la media generale dei massimi vettori spostamento.....	27
<b>Figura 22:</b> Grafico realizzato in Matlab che rappresenta tutti i picchi di contrazione raggiunti nel caso del miotubo in esame nel quarto video, in rosso è anche tratteggiata la media generale dei massimi vettori spostamento .....	27
<b>Figura 23:</b> Grafico realizzato in Matlab che rappresenta lo spettro del vettore <i>max_motion</i> del primo video del miotubo in esempio, ovvero il vettore dei massimi vettori spostamento per frame registrati .....	28
<b>Figura 24:</b> Andamento della contrazione del miotubo in esame (STAT 0.6) nel tempo, i punti rossi corrispondono al valore della media dei vettori spostamento massimi per i cinque video.....	29
<b>Figura 25:</b> Grafico realizzato in Matlab che rappresenta lo spettro del vettore <i>max_motion</i> del quarto video del miotubo in esempio, ovvero il vettore dei massimi vettori spostamento per frame registrati .....	30
<b>Figura 26:</b> Grafici finali del vettore spostamento massimo (in blu) e della media di tutti i vettori spostamento (in rosso) frame per frame di ognuno dei cinque video analizzati del miotubo trattato con STAT 0.6 .....	35

<b>Figura 27:</b> Grafici della contrazione frame per frame dei cinque video del miotubo trattato con STAT 0.6 .....	36
<b>Figura 28:</b> Spettri del vettore <i>max_motion</i> calcolato per ogni video del miotubo in esame (STAT 0.6) con relativo picco corrispondente alla frequenza di contrazione registrata .....	38
<b>Figura 29:</b> Grafici finali del vettore spostamento massimo (in blu) e della media di tutti i vettori spostamento (in rosso) frame per frame di ognuno dei tre video analizzati del miotubo trattato con STAT 2.5.....	41
<b>Figura 30:</b> Grafici della contrazione frame per frame dei tre video del miotubo trattato con STAT 2.5 .....	42
<b>Figura 31:</b> Spettri del vettore <i>max_motion</i> calcolato per ogni video del miotubo in esame (STAT 2.5) con relativo picco corrispondente alla frequenza di contrazione registrata .....	44
<b>Figura 32:</b> Andamento della contrazione del miotubo in esame (STAT 2.5) nel tempo, i punti rossi corrispondono al valore della media dei vettori spostamento massimi per i tre video.....	45
<b>Figura 33:</b> Grafici finali del vettore spostamento massimo (in blu) e della media di tutti i vettori spostamento (in rosso) frame per frame di ognuno dei quattro video analizzati del miotubo trattato con STAT 2.5 + Q .....	47
<b>Figura 34:</b> Grafici della contrazione frame per frame dei tre video del miotubo trattato con STAT 2.5 + Q .....	48
<b>Figura 35:</b> Spettri del vettore <i>max_motion</i> calcolato per ogni video del miotubo in esame (STAT 2.5 + Q) con relativo picco corrispondente alla frequenza di contrazione registrata .....	49
<b>Figura 36:</b> Andamento della contrazione del miotubo in esame (STAT 2.5 + Q) nel tempo, i punti rossi corrispondono al valore della media dei vettori spostamento massimi per i quattro video.....	50
<b>Figura 37:</b> Grafici finali del vettore spostamento massimo (in blu) e della media dei vettori spostamento (in rosso) frame per frame di ognuno dei quattro video analizzati del miotubo trattato con coenzima Q .....	52
<b>Figura 38:</b> Grafici della contrazione frame per frame dei quattro video del miotubo trattato con coenzima Q .....	53
<b>Figura 39:</b> Spettri del vettore <i>max_motion</i> calcolato per ogni video del miotubo in esame (Q) con relativo picco corrispondente alla frequenza di contrazione registrata.....	54
<b>Figura 40:</b> Andamento della contrazione del miotubo in esame (Q) nel tempo, i punti rossi corrispondono al valore della media dei vettori spostamento massimi per i quattro video .....	55
<b>Figura 41:</b> Grafici finali del vettore spostamento massimo (in blu) e della media di tutti i vettori spostamento (in rosso) frame per frame di ognuno dei sei video analizzati del miotubo di controllo.....	58
<b>Figura 42:</b> Grafici della contrazione frame per frame dei sei video del miotubo di controllo .....	59
<b>Figura 43:</b> Spettri del vettore <i>max_motion</i> calcolato per ogni video del miotubo in esame (CTR) con relativo picco corrispondente alla frequenza di contrazione registrata.....	60
<b>Figura 44:</b> Andamento della contrazione del miotubo in esame (CTR) nel tempo, i punti rossi corrispondono al valore della media dei vettori spostamento massimi per i primi tre video .....	62
<b>Figura 45:</b> Andamento della contrazione (media dei vettori spostamento massimi per video) dei miotubi rispettivamente nelle condizioni STAT 0.6, STAT 2.5, Q e CTR .....	65

## ***Elenco delle Tabelle***

<b>Tabella 1:</b> Tabella contenente i cinque trattamenti dei miotubi analizzati in questa tesi .....	10
<b>Tabella 2:</b> Parametri della funzione d'onda generata per il protocollo di elettrostimolazione .....	14
<b>Tabella 3:</b> Parametri utilizzati per la registrazione dei video .....	18
<b>Tabella 4:</b> Fattori di conversione $\mu\text{m}/\text{px}$ per gli ingrandimenti 20x e 40x .....	19
<b>Tabella 5:</b> Valori della media dei vettori spostamento massimi e della frequenza delle contrazioni per ogni video del miotubo preso in esame, trattato con STAT 0.6.....	29
<b>Tabella 6:</b> Valori della media dei vettori spostamento massimi e della frequenza delle contrazioni per ogni video del miotubo preso in esame, trattato con STAT 2.5.....	44
<b>Tabella 7:</b> Valori della media dei vettori spostamento massimi e della frequenza delle contrazioni per ogni video del miotubo preso in esame, trattato con STAT 2.5 e coenzima Q .....	50
<b>Tabella 8:</b> Valori della media dei vettori spostamento massimi e della frequenza delle contrazioni per ogni video del miotubo preso in esame, trattato con coenzima Q.....	55
<b>Tabella 9:</b> Valori della media dei vettori spostamento massimi e della frequenza delle contrazioni per ogni video del miotubo preso in esame di controllo, cioè senza nessun ulteriore trattamento.....	61
<b>Tabella 10:</b> Decadimento percentuale della media dei vettori spostamento massimi video dopo video per ognuna delle quattro condizioni di trattamento analizzate .....	66



## *Introduzione*

Questa tesi si pone come obiettivi quello di descrivere il processo di acquisizione di video della contrazione di miotubi murini, trattati in modi differenti e stimolati attraverso un campo elettrico, e quello di analizzare con la tecnica del Block Matching il campo di spostamento degli stessi miotubi, evidenziando eventuali differenze nei risultati in base ai trattamenti eseguiti su di essi.

Inizialmente verranno descritte le caratteristiche dei miotubi murini e i trattamenti a cui sono stati sottoposti, presentando poi il banco di prova, il processo di elettrostimolazione utilizzato e le accortezze avute durante l'acquisizione dei video.

Successivamente sarà illustrata la tecnica di elaborazione e di analisi dei video adottata, quella del Block Matching, e con essa la serie dei risultati ottenuti.

Infine verrà esposta l'analisi dei risultati e le conseguenti conclusioni sull'intero lavoro svolto, in particolare in merito alla correlazione tra il trattamento subito dai miotubi murini, il tempo trascorso dalla prima elettrostimolazione e la variazione del proprio campo di spostamento.



# Capitolo Primo

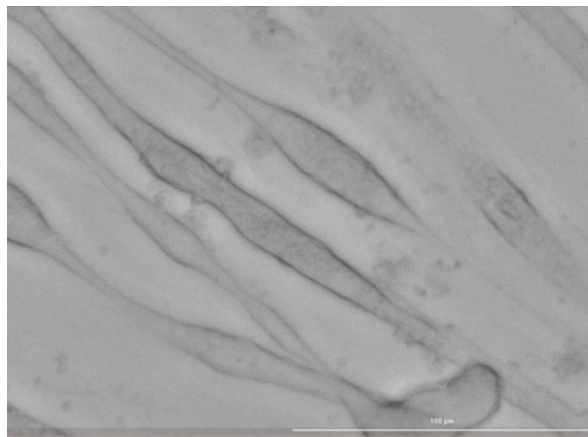
## MATERIALI E METODI

### *1.1 I miotubi*

Le cellule selezionate per gli esperimenti svolti sono delle cellule C2C12, specifiche cellule muscolo-scheletriche murine denominate mioblasti.

Dopo aver seminato una grande quantità di tali cellule in una fiaschetta, si aspetta un periodo di tempo variabile, in base alla densità della semina, prima di rimuoverle. Una volta rimosse esse vengono contate e seminate nuovamente in una piastra, insieme ad un mezzo di coltura ricco di sostanze nutritive ideali a creare un ambiente confortevole per la crescita delle cellule. Questo mezzo di coltura è costituito principalmente da vitamine, zuccheri e siero bovino.

Dopo alcune ore, questi mioblasti iniziano ad allinearsi ed unirsi tra loro in quello che viene definito processo di differenziamento, che porta alla formazione dei veri e propri **miotubi**. Tali miotubi sono l'oggetto dei video registrati ed analizzati in questo progetto, osservabili in Figura 1.



*Figura 1: miotubi visti al microscopio con ingrandimento 40x*

Uno degli obiettivi degli esperimenti svolti era quello di individuare un'eventuale correlazione tra il trattamento eseguito sui miotubi e le tempistiche e i valori di contrazione dei miotubi stessi. Sono stati testati cinque possibili trattamenti diversi dei miotubi:

- Miotubi trattati con **statina** con concentrazione di 0.6 nM (STAT 0,6);
- Miotubi trattati con **statina** con concentrazione di 2.5 nM (STAT 2,5);
- Miotubi trattati con **statina** con concentrazione di 2.5 nM e **coenzima Q** (STAT 2,5 + Q);
- Miotubi trattati con **coenzima Q** (Q);
- Miotubi **di controllo**, cioè privi di ulteriori trattamenti (CTR).

Per i trattamenti dei miotubi sono stati usati il **coenzima Q** e la **statina**, vediamo brevemente il perché di questa scelta:

- ❖ Le **statine** sono un gruppo di molecole appartenenti alla categoria dei cosiddetti ipolipemizzanti. Proprietà caratteristica delle statine è la capacità di abbassare i livelli del colesterolo nel sangue, oltre che aiutare a ridurre i livelli di trigliceridi e a far aumentare quelli del colesterolo HDL. Nel nostro caso sono state selezionate in quanto il loro effetto teorico è quello di far durare meno la contrazione dei miotubi trattati con esse rispetto a quelli di controllo; in pratica i miotubi trattati con statina dovrebbero “stancarsi” prima di contrarsi [1].
- ❖ Il **coenzima Q** svolge un ruolo antiossidante e contribuisce a trasferire l'energia dalle cellule. La sua importanza è tale da essere molto presente nelle cellule di organi importanti dell'organismo umano, come il cuore, il fegato, il pancreas e i reni. Esso assicura anche elasticità alla pelle e fornisce forza all'organismo contrastando la stanchezza. Nel caso in questione è stato scelto perché il suo effetto teorico è quello di far durare di più la contrazione dei miotubi trattati con esso rispetto a quelli di controllo [2].

*Tabella 1: tabella contenente i cinque trattamenti dei miotubi analizzati in questa tesi*

Trattamento 1	Trattamento 2	Trattamento 3	Trattamento 4	Trattamento 5
STAT 0,6	STAT 2,5	STAT 2,5 + Q	Q	CTR

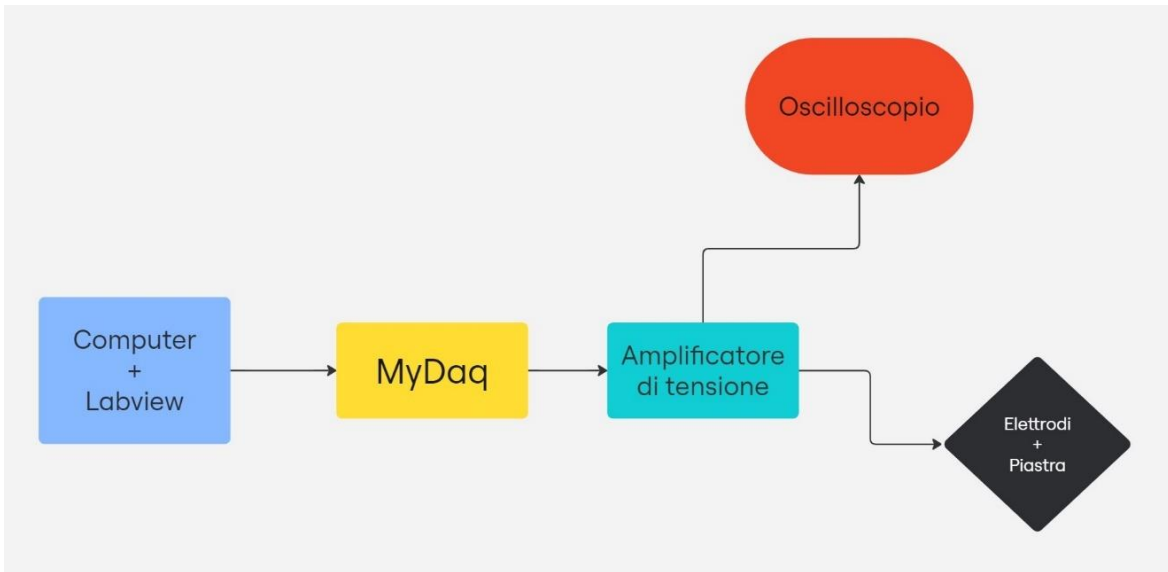
Per seminare le cellule sono state utilizzate delle piastre multiwell da sei pozzetti, di cui un esempio è posto in Figura 2:



*Figura 2: piastra multiwell da sei pozzetti usata per le semine dei miotubi*

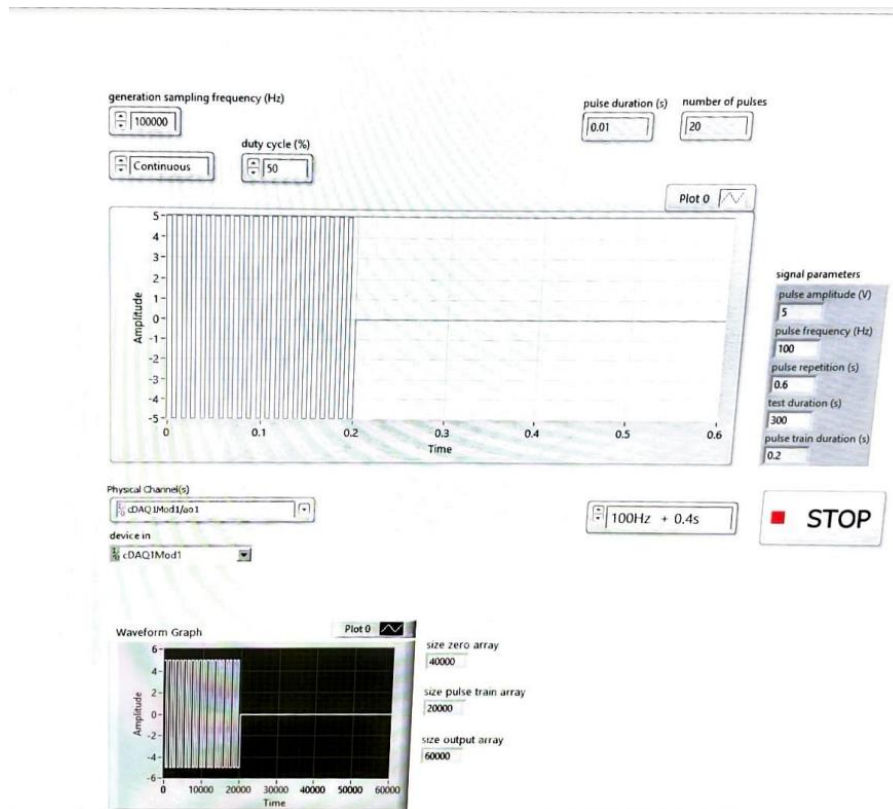
## 1.2 Banco di prova

Nel momento in cui i mioblasti si sono differenziati in miotubi, quest'ultimi sono pronti per poter essere stimolati. L'elettrostimolazione che lo permette è generata da un complesso banco di prova costituito da diverse componenti schematizzate in Figura 3 e descritte brevemente successivamente:



*Figura 3: componenti del banco di prova*

- I. **Labview**: software utile per diversi scopi, come acquisire e analizzare dati, controllare sistemi di misura o processi. In questo caso consente la creazione dell'onda necessaria per l'elettrostimolazione attraverso il collegamento di blocchi specializzati, oltre che garantire un'interfaccia utente di facile utilizzo, rappresentata in Figura 4.
- II. **myDaq**: scheda di acquisizione dati che svolge la funzione di generatore grazie al proprio collegamento con l'amplificatore di tensione.
- III. **amplificatore di tensione**: il suo compito è quello di amplificare il segnale in ingresso prodotto dalla myDaq secondo un guadagno prestabilito.
- IV. **oscilloscopio**: permette di visualizzare su uno schermo l'onda di tensione erogata dall'amplificatore nel dominio del tempo.
- V. **elettrodi**: di forma cilindrica e di grafite, poi collegati ai cavi elettrici per permettere l'elettrostimolazione della coltura di miotubi.



*Figura 4: interfaccia utente Labview*

Il microscopio utilizzato per l'ingrandimento dei miotubi (BioTek Lionheart FX), riportato in Figura 5, in realtà ha avuto anche un'ulteriore funzione, ovvero quella di fungere da incubatore per i miotubi stessi. In particolare, esso ha permesso di regolare la temperatura a valori prestabiliti, azione fondamentale per una corretta elettrostimolazione delle cellule.



*Figura 5: microscopio BioTek Lionheart FX [3]*

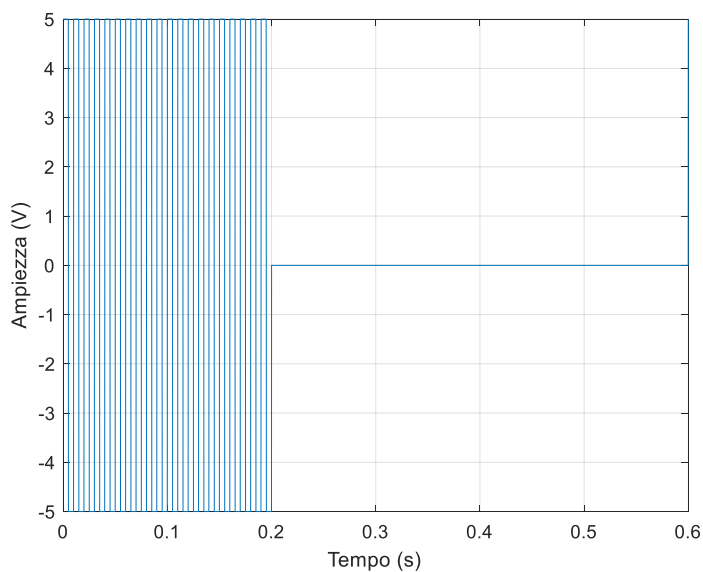
### 1.3 L'elettrostimolazione

Per la stimolazione è stato usato sempre lo stesso tipo di impulso ad alta frequenza, ritenuto il migliore in seguito a vari esperimenti fatti con protocolli di stimolazione con diversi valori dei parametri fondamentali.

Il segnale è un'onda quadra bipolare, con i parametri riportati in Tabella 2. L'onda relativa al protocollo utilizzato è rappresentata in Figura 6.

*Tabella 2: parametri della funzione d'onda generata per il protocollo di elettrostimolazione*

Pulse amplitude (V)	Pulse duration (s)	Pulse frequency (Hz)	Pulse repetition (s)	Duty cycle (%)	Pulse train duration (s)
5	0,01	100	0,6	50	0,2



*Figura 6: onda quadra adoperata per l'elettrostimolazione dei miotubi*

## ***1.4 Acquisizione dei video***

Oltre a fungere da incubatore e permettere vari livelli di ingrandimento, il microscopio utilizzato durante la stimolazione consente di acquisire video e immagini potendo selezionare diversi parametri, come la tipologia di navigazione, la messa a fuoco e la modalità di acquisizione.

L'interfaccia si presenta come in Figura 7.



*Figura 7: interfaccia utente del microscopio incubatore BioTek LIONHEART FX*

### ***1.4.1 Pannello per la navigazione***

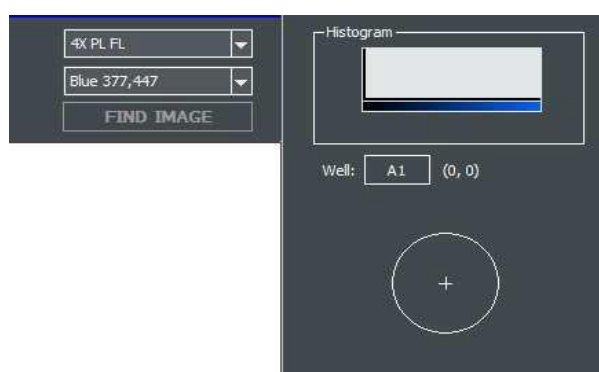
Nel pannello di navigazione in Figura 8 è possibile osservare tutti i parametri che il microscopio permette di selezionare. Nel primo menù a tendina in alto si può scegliere l'ingrandimento desiderato opzionando l'obiettivo corrispondente. Le scelte disponibili sono 4x, 10x, 20x, 40x e 60x (con lampada ad olio).

Nello specifico è stato utilizzato l'ingrandimento 40x per l'acquisizione dei video in quanto riesce ad ottimizzare qualità e dimensioni, mentre l'ingrandimento 20x è stato utilizzato semplicemente per spostarsi all'interno dei pozzetti ed effettuare controlli rapidi sulla situazione generale dei miotubi.

Il secondo menù a tendina specifica la tipologia di illuminazione. Per la totalità dei video registrati è stata utilizzata la tipologia denominata Brightfield, in quanto considerata la più

efficiente per lo scopo degli esperimenti. Un'altra tipologia di illuminazione testata molto brevemente è stata quella del contrasto di fase, non ritenuta tuttavia adatta in questo caso.

In basso a destra è inoltre presente una circonferenza rappresentante la piastra, con indicata la porzione visualizzata in quell'istante attraverso una piccola croce. Cliccando con il mouse in un qualsiasi punto all'interno della circonferenza, il microscopio si sposterà automaticamente lì. Sopra di esse è possibile, inoltre, selezionare uno dei sei pozzetti a disposizione in cui volersi muovere (nominati A1, A2, A3, B1, B2, B3) e sono presenti le coordinate (x,y) del punto in cui ci si trova, in questo caso (0,0), cioè esattamente al centro del pozzetto.



*Figura 8: pannello di navigazione del microscopio*

È possibile anche utilizzare un joystick (in Figura 9) per muoversi liberamente all'interno del pozzetto selezionato; tale dispositivo permette anche la regolazione manuale della messa a fuoco semplicemente girando accuratamente la sua manopola superiore.



*Figura 9: joystick per muoversi all'interno dei pozzetti manualmente*



### 1.4.2 Messa a fuoco ed esposizione alla luce

Un altro modo per regolare manualmente il fuoco (insieme al joystick), ma anche l'esposizione alla luce è farlo attraverso le frecce in Figura 10. È anche possibile regolarli in modo automatico e sulla carta ottimale attraverso i comandi *Autofocus* e *Auto Expose*.

Talvolta nel corso delle acquisizioni dei video si è ricorsi tuttavia alla regolazione manuale, in particolare in quelle situazioni in cui l'Autofocus non riusciva a ottimizzare la visione dei miotubi.

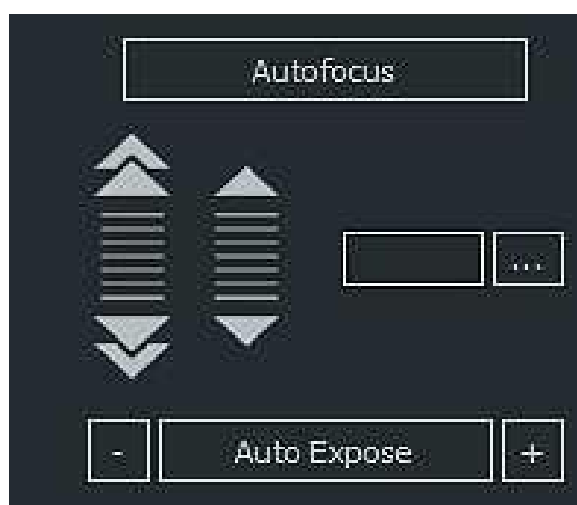


Figura 10: menù per la regolazione della messa a fuoco e dell'esposizione

### 1.4.3 Acquisizione e caratteristiche dei video

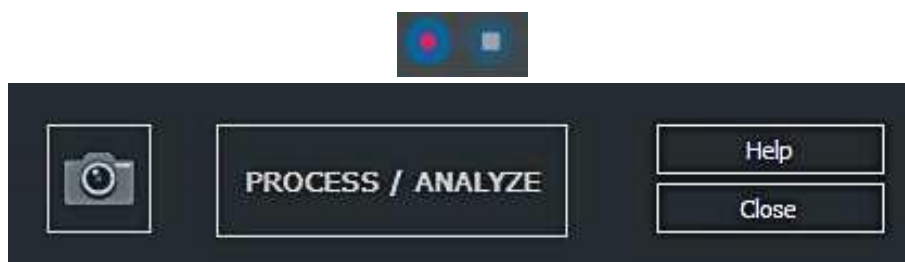


Figura 11: comandi per l'acquisizione di immagini e video

In Figura 11 troviamo rappresentati tutti i pulsanti che permettono l'acquisizione di video, ma anche di immagini qualora lo si voglia. È possibile anche regolare la durata temporale dei singoli video.

Per ognuna delle condizioni di trattamento e per diversi pozzetti sono stati registrati video di 10 secondi a distanza di 10 minuti l'uno dall'altro e con un ingrandimento di 40x, salvandoli e raggruppandoli in apposite cartelle nel computer in base al trattamento fatto in precedenza sui miotubi.

In ogni video si è cercato di inquadrare al meglio un singolo miotubo di dimensione e stato di contrazione ben visibili, così poi da riuscire ad ottenerne un'analisi migliore tramite Block Matching. Tra un video e l'altro è stato possibile osservare l'evolversi dello stato di contrazione dei miotubi in risposta all'elettrostimolazione. Se, infatti, nella prima fase si è notato un crescendo generale nel movimento dei miotubi fino a un picco massimo (a volte raggiunto già nel primo video, a volte nel secondo), nella fase successiva essi hanno iniziato a rallentare fino a fermarsi completamente.

Questa tendenza si è notata in quasi tutte le condizioni, con tempistiche e valori decisamente variabili, che in seguito verranno analizzati.

Le più grandi difficoltà sono state riscontrate nel trovare miotubi adeguati ai video all'interno del pozzetto, in quanto la maggior parte di essi non erano di dimensioni adatte o non si contraevano in modo abbastanza rilevante per poter poi essere analizzati mediante tecniche di analisi dei video.

Tutti i video registrati sono stati poi la base per la fase di elaborazione e analisi, contenute nel capitolo 2, che ha permesso di verificare la coerenza dei risultati con quanto atteso e di trarre le conclusioni sul lavoro svolto.

Qui sotto viene riportata la Tabella 3, che riporta i singoli parametri utilizzati per la registrazione dei video.

*Tabella 3: parametri utilizzati per la registrazione dei video*

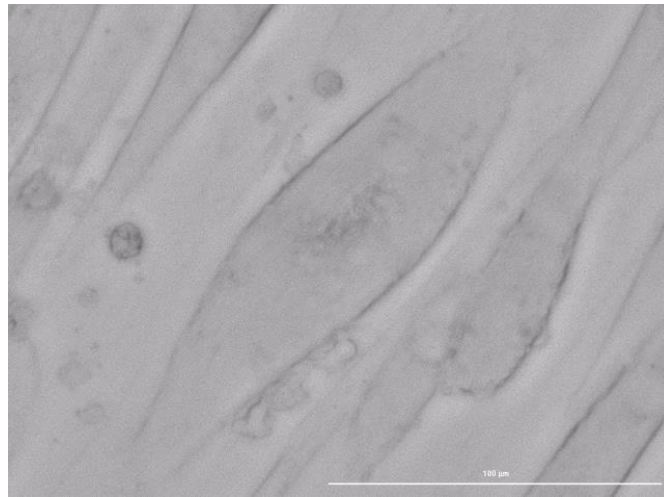
<b>Ingrandimento</b>	<b>Durata video</b>	<b>Intervallo tra ogni video</b>	<b>Focus</b>	<b>Esposizione alla luce</b>
40x	10 secondi	10 minuti	<i>Autofocus</i> (salvo rari casi)	<i>Auto Expose</i> (salvo rari casi)

## Capitolo Secondo

### ELABORAZIONE E ANALISI DEI VIDEO

Come precedentemente spiegato, durante la stimolazione sono stati acquisiti video, selezionando le aree di interesse in cui erano presenti miotubi in contrazione.

I video sono stati effettuati con ingrandimento 40x (esempio in Figura 12), mentre l'ingrandimento 20x è stato utilizzato per spostarsi all'interno dei pozzetti e avere un quadro generale della situazione di contrazione dei miotubi durante gli esperimenti.



*Figura 12: fermo immagine di un video acquisito a 40x*

In ogni immagine costituente il video è sovrapposta la scala grafica di lunghezza 100  $\mu\text{m}$ . Questa ci dà un'idea della dimensione effettiva dei miotubi. Grazie ad esse è anche possibile effettuare la conversione pixel-micrometri mediante un fattore di conversione, qualora lo si desideri. Esso permette nella fattispecie di convertire le variabili da  $\text{px}/\text{frame}$  a  $\mu\text{m}/\text{s}$ .

*Tabella 4: fattori di conversione  $\mu\text{m}/\text{px}$  per gli ingrandimenti 20x e 40x*

<b>INGRANDIMENTO</b>	<b>Lunghezza scala grafica (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Lunghezza scala grafica (px)</b>	<b>Dimensione pixel = <math>\mu\text{m}/\text{px}</math></b>
20x	100	306	0.327
40x	100	612	0.162

## 2.1 Stato dell'arte sull'analisi Block Matching

Il Block Matching è un metodo di stima degli spostamenti valutati tra due immagini o tra due frame di un video ed è la tecnica utilizzata in questa tesi per effettuare l'elaborazione e l'analisi dei video registrati [4]. Di seguito sono presentate le fasi in una generica applicazione della tecnica. Si consideri ad esempio un'immagine ad un generico frame  $k$  (Figura 13). L'immagine viene dunque suddivisa in blocchi di pixel, di dimensioni prestabilite (Figura 14).

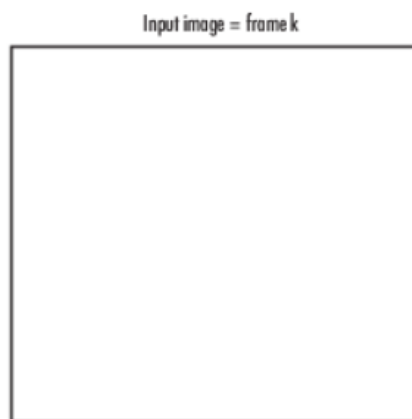


Figura 13: Immagine al frame  $k$

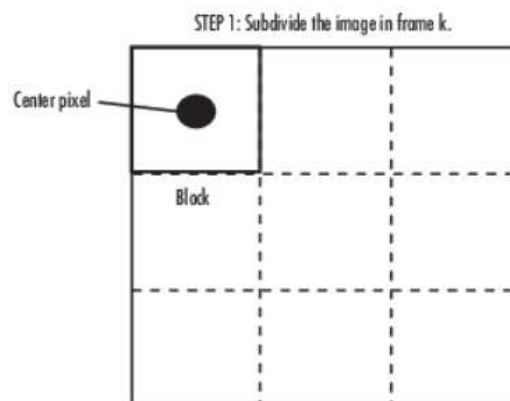
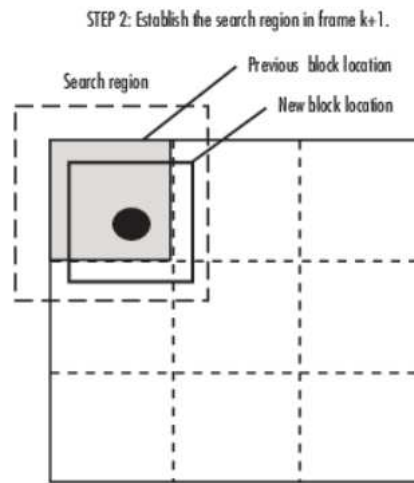


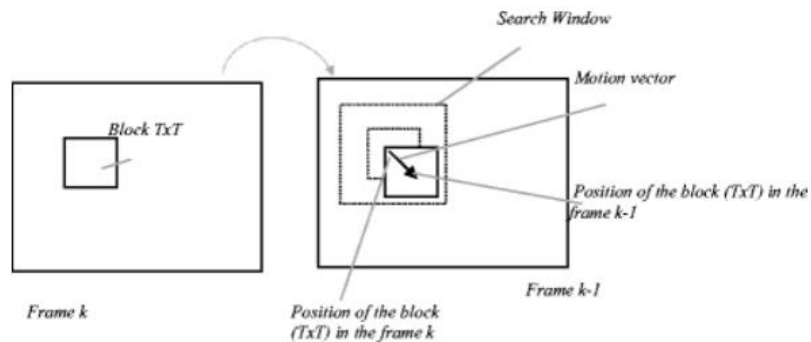
Figura 14: Immagine al frame  $k$  suddivisa in blocchi

A questo punto un'area di ricerca individuerà la nuova posizione del blocco, che sarà al frame  $k+1$  (Figura 15).



**Figura 15:** Immagine al frame  $k+1$

Il vettore dello spostamento sarà dato dal vettore congiungente i centri del blocco al frame  $k$  e del blocco al frame  $k+1$  (Figura 16).



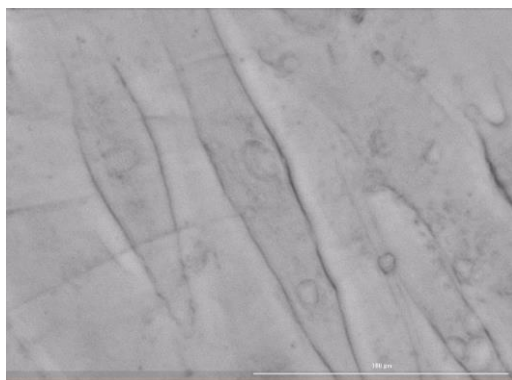
**Figura 16:** vettore spostamento tra i due frame

## ***2.2 Metodologia del Block Matching applicata al caso dei miotubi***

Per poter valutare l'entità della contrazione dei miotubi in relazione al loro trattamento, si sono analizzati diversi video per un miotubo per ogni tipologia di condizione (STAT 0.6, STAT 2.5, STAT 2.5 + Q, Q e CTR) con la tecnica del Block Matching, descritta precedentemente.

Qui di seguito viene riportata l'analisi dei video di un miotubo trattato con STAT 0.6, come esempio dell'applicazione del metodo che è stato poi utilizzato per tutti i video in questione. Per l'analisi verranno considerate delle sotto aree dell'immagine, denominate *roi*<sup>1</sup>, che presentano il campo di velocità con ampiezza massima. Verrà quindi applicata la tecnica del Block Matching per ricavare i vettori spostamento relativi a ogni blocco di pixel nel tempo.

Come termine di paragone tra i vari video di un singolo miotubo verrà utilizzata la media dei massimi vettori spostamento per frame, registrati durante la contrazione del miotubo sotto esame. Invece come termine di confronto tra video di miotubi diversi verrà preso l'andamento dei massimi dei vettori spostamento nel tempo.



**Figura 17:** fermo immagine del primo video in esempio registrato per la condizione STAT 0.6, con in primo piano ben in evidenza il miotubo in esame

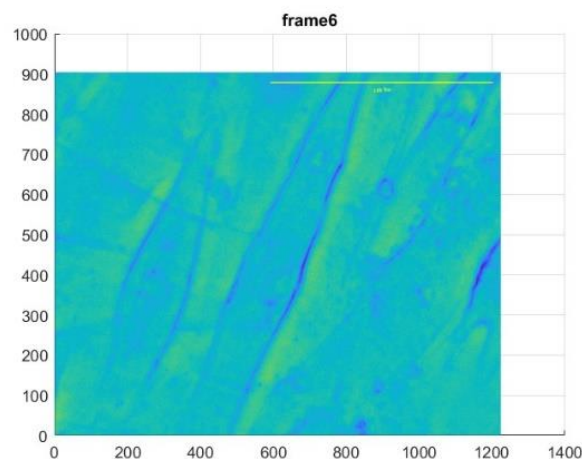
Si ricorda che il miotubo in analisi è stato stimolato con il protocollo descritto nel capitolo primo.

---

<sup>1</sup> *roi* = region on interest

L'applicazione del metodo per il caso in esempio e la sua implementazione in Matlab segue i passaggi successivamente descritti:

- È stato importato il primo video in Matlab mediante la funzione *importdata* e se ne sono verificate le dimensioni.
- Attraverso un ciclo for sono stati caricati tutti i frames del video e per ogni frame sono state eseguite le seguenti operazioni:
  1. L'immagine RGB è stata convertita in scala di grigi
  2. L'immagine è stata convertita in matrice numerica double.
- È stato realizzato un primo plot del video diviso per frame così da individuare un frame, da cui partire per le analisi successive, in cui il miotubo fosse a riposo (nel video di esempio corrispondente al sesto frame in Figura 18). Questo passaggio è stato fondamentale per permettere poi di calcolare il vettore spostamento per ogni frame rispetto al frame in cui il miotubo si considerava fermo.

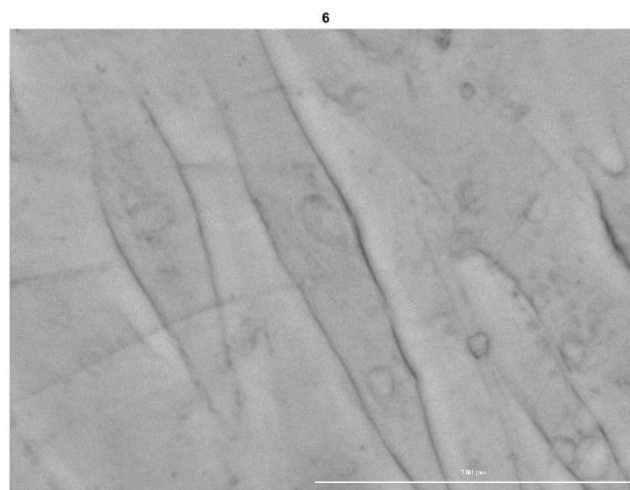


**Figura 18:** frame del miotubo a riposo utilizzato come riferimento per il calcolo dei vettori spostamento dei frame successivi

- Una volta definito il frame iniziale del miotubo a riposo si è passati alla definizione dei parametri della funzione *Vision.BlockMatcher* [4]. In particolare si sono scelte le dimensioni dei blocchi di pixel in cui dividere l'immagine nella fase di elaborazione (*BlockSize*), in questo caso si sono scelti blocchi di 35x35 pixel. Si sono selezionati inoltre il frame di riferimento (*ReferenceFrameSource*, *Input port*) individuato precedentemente, il massimo spostamento registrabile per ogni blocco di pixel (*MaximumDisplacement*), anch'esso 35x35 pixel, infine la modalità con cui vedere i

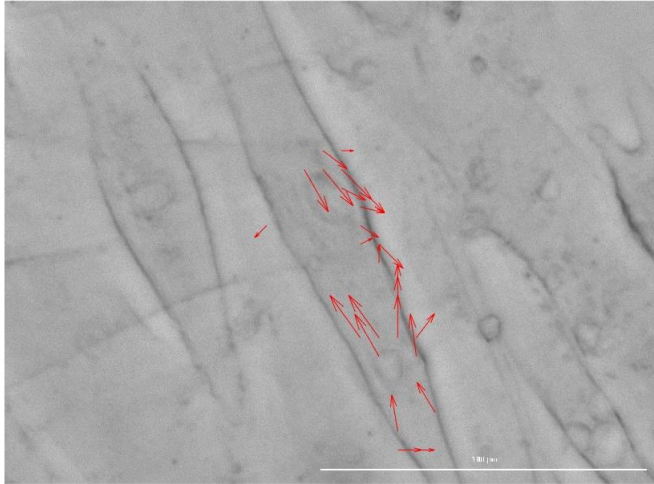
valori in uscita (*OutputValue*), nel nostro caso componenti orizzontali e verticali in forma complessa. Gli altri parametri sono stati lasciati di default.

- È stato realizzato un altro ciclo for nel quale, partendo dal frame di riferimento già definito, è stata applicata la funzione *Vision.BlockMatcher*, scorrendo tutti gli altri frame successivi e ottenendo una matrice *motion* contenente i valori dei vettori spostamento registrati tra ogni frame. In questo modo si sono individuati i vettori spostamento per ogni blocco di pixel e per ogni frame successivo a quello di riferimento. È stato poi creato un vettore *max\_motion* contenente tutti i valori massimi dei vettori spostamento frame per frame e un vettore *avg\_motion* contenente la media di tutti i vettori spostamento registrati ad ogni frame. Questi ultimi due vettori sono stati utilizzati per la realizzazione dei grafici che verranno successivamente presentati.
- È stato quindi realizzato un grafico contenente tre plot [Figura 20]: nel primo in alto in blu sono stati rappresentati i vettori spostamento frame per frame per osservare l'evolversi della contrazione del miotubo in esame (in Figura 19 si possono notare tre frame diversi e lo sviluppo dei vettori spostamento qui rappresentati in rosso). Per farlo è stata utilizzata la funzione *quiver* [5]. Nel secondo plot è stato rappresentato uno scatter (cioè un grafico a punti) contenente il valore massimo dei vettori spostamento del video frame dopo frame (*max\_motion*). Nel terzo plot, infine, è stato realizzato un altro scatter, ma stavolta rappresentante il valore medio di tutti i vettori spostamento per ogni frame (*avg\_motion*).

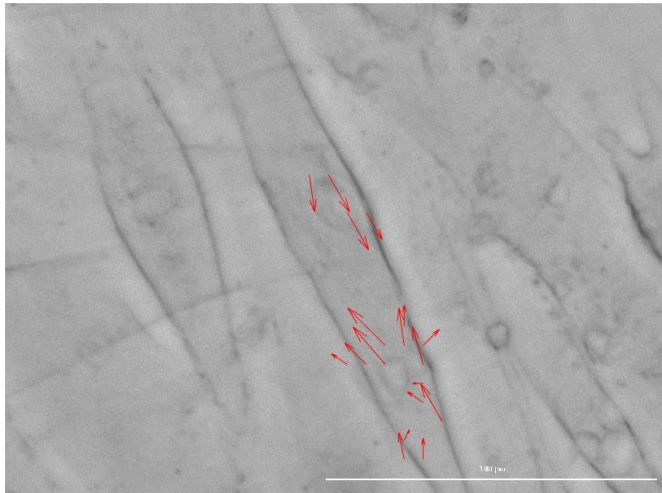




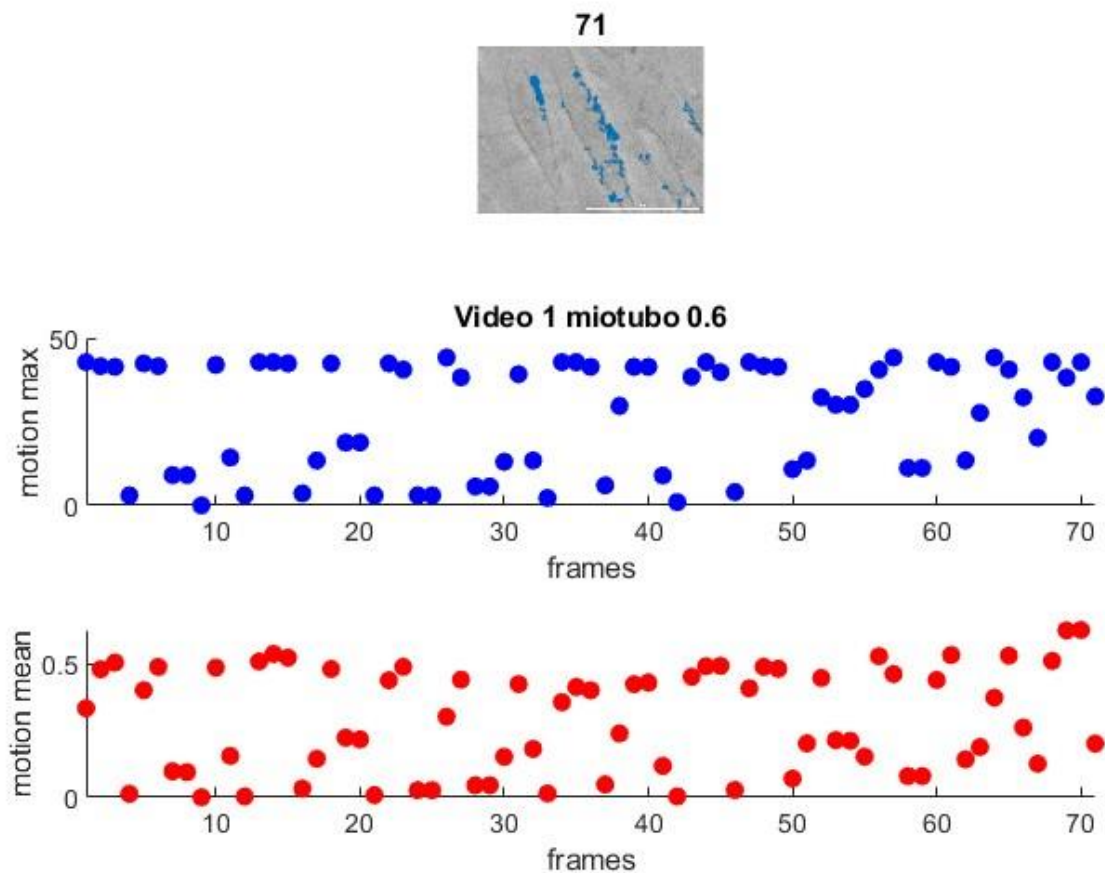
8



10

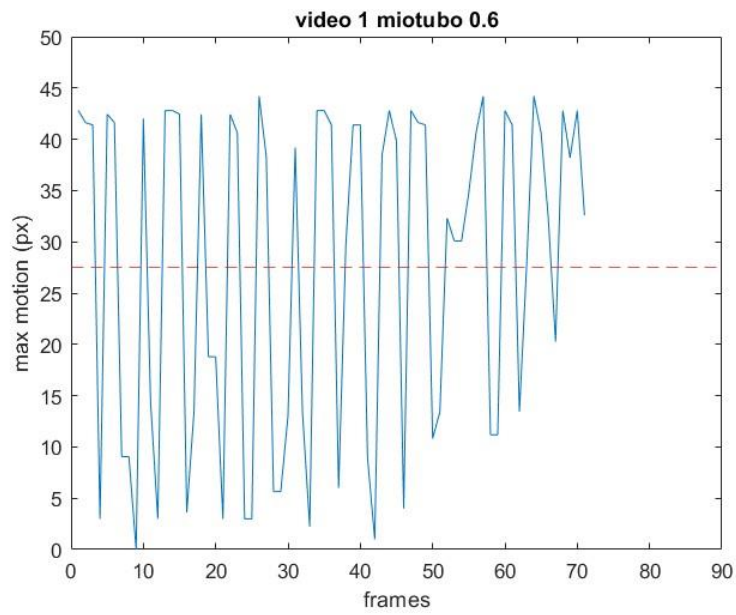


**Figura 19:** dall'alto verso il basso rappresentazione dei vettori spostamento nei frame 6, 8 e 10

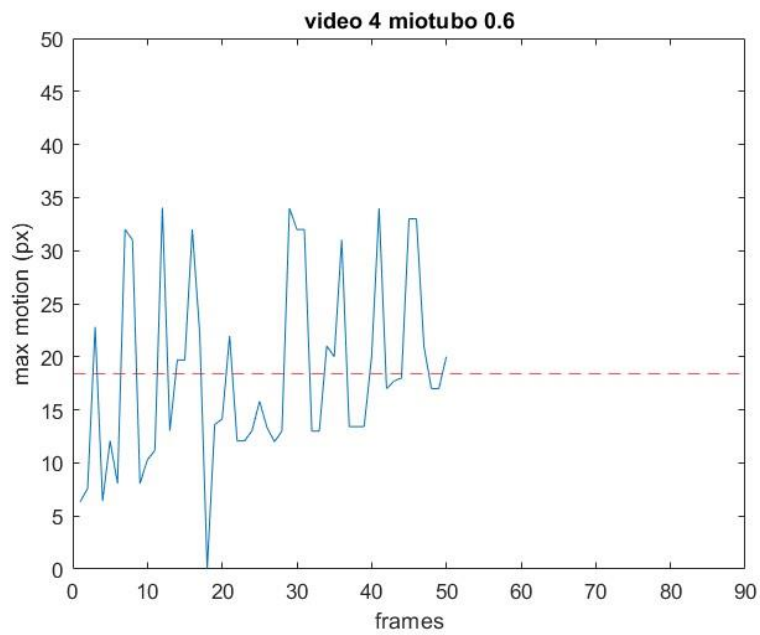


**Figura 20:** dall'alto verso il basso: frame contenente in blu i vettori spostamento del miotubo; scatter contenente il valore massimo dei vettori spostamento frame dopo frame; scatter contenente il valore medio dei vettori spostamento frame per frame

- A questo punto è stato realizzato un ulteriore grafico per ogni video rappresentante l'evolversi della contrazione frame dopo frame e che facilmente evidenzia la presenza di picchi, come quelli in Figura 21 e in Figura 22, corrispondenti ai massimi valori di contrazione. Esso non è altro che la rappresentazione del secondo grafico in Figura 20, ma mediante una linea continua anziché dei punti e impostando assi cartesiani uguali per tutti i video registrati del miotubo corrispondente, così da poter determinare anche visivamente un eventuale cambiamento nella frequenza di contrazione e nelle ampiezze massime raggiunte. Nello specifico il grafico in Figura 21 è relativo al primo video, mentre il grafico in Figura 22 è relativo al quarto. Si può facilmente notare come a distanza di circa mezz'ora i picchi raggiunti mostrano un andamento differente e raggiungono un massimo valore minore, sintomo del fatto che il miotubo tende a "stancarsi" e rallentare la propria contrazione al trascorrere del tempo.

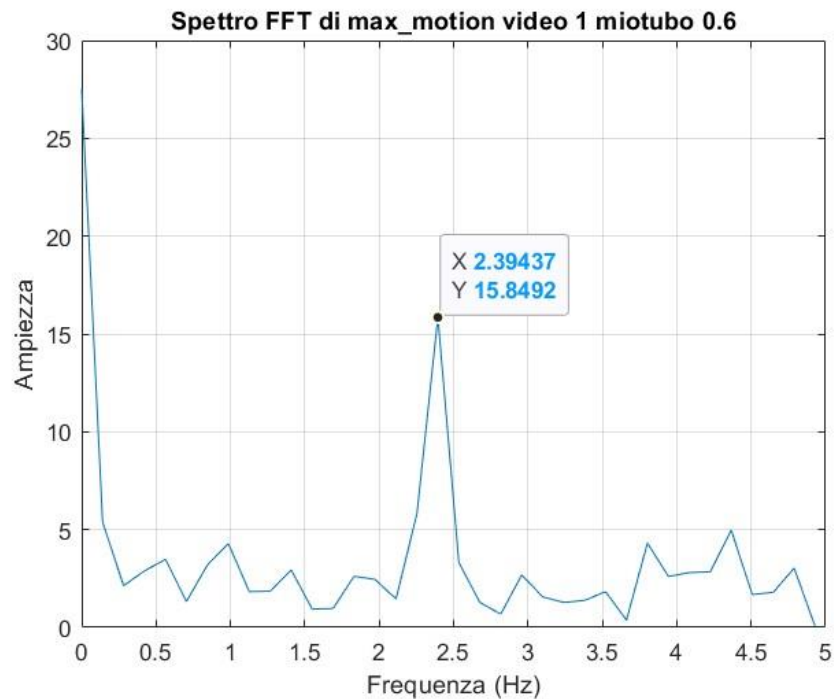


**Figura 21:** grafico realizzato in Matlab che rappresenta tutti i picchi di contrazione raggiunti nel caso del miotubo in esame nel primo video, in rosso è anche tratteggiata la media generale dei massimi vettori spostamento



**Figura 22:** grafico realizzato in Matlab che rappresenta tutti i picchi di contrazione raggiunti nel caso del miotubo in esame nel quarto video, in rosso è anche tratteggiata la media generale dei massimi vettori spostamento

- È stata allora fatta la *fft* (Fast Fourier Transform) [6] del vettore *max\_motion* per ogni video, ottenendo un grafico del suo spettro che mette in evidenza un picco di frequenza. Per il primo video del miotubo in esempio questo grafico è riportato in Figura 23.



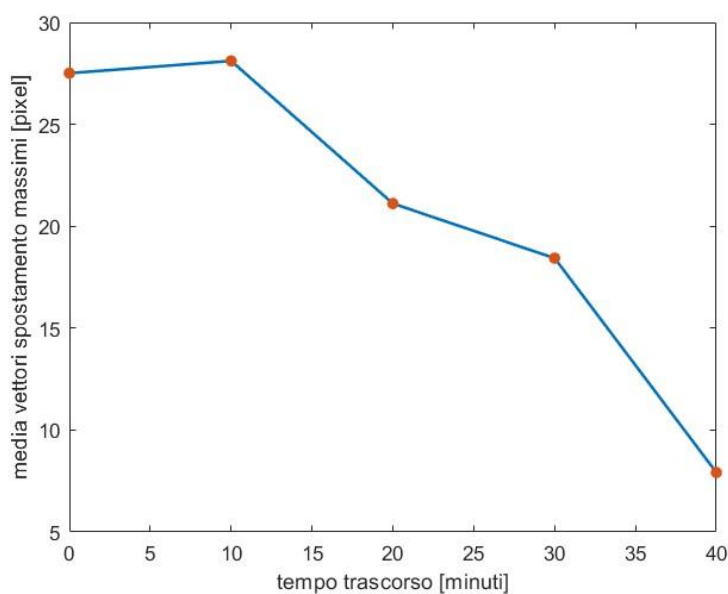
**Figura 23:** grafico realizzato in Matlab che rappresenta lo spettro del vettore *max\_motion* del primo video del miotubo in esempio, ovvero il vettore dei massimi vettori spostamento per frame registrati

- Per ogni video è stata poi calcolata la media dei massimi vettori spostamento registrati per ogni frame ed è stata creata la Tabella 5, che riporta proprio il valore delle medie per ogni video del miotubo in esame, con tanto di orario di registrazione corrispondente. In questa tabella si è anche inserita un'ulteriore colonna, che comprende il valore della frequenza delle contrazioni registrata per ogni video, così da riuscire a valutare anche un'eventuale variazione da questo punto di vista. Nel grafico in Figura 23 si può vedere corrispondere a 2.39437 Hz, ad esempio.

**Tabella 5:** valori della media dei vettori spostamento massimi e della frequenza delle contrazioni per ogni video del miotubo preso in esame, trattato con STAT 0.6

	<b>Orario</b>	<b>Media dei vettori spostamento massimi (px)</b>	<b>Frequenza delle contrazioni (Hz)</b>
<b>Video 1</b>	15.29	27.5098	2.39437
<b>Video 2</b>	15.39	28.1123	2.07317
<b>Video 3</b>	15.49	21.1941	1
<b>Video 4</b>	15.59	18.4326	2.4
<b>Video 5</b>	16.09	7.9185	1.30435

- Per il miotubo in esame è stato realizzato in Matlab un grafico che mostra l'andamento delle medie dei vettori spostamento massimi per i cinque video registrati [Figura 24]. Grazie ad esso è possibile avere un'idea ancora più chiara dell'andamento decrescente della contrazione dei miotubi al passare del tempo.

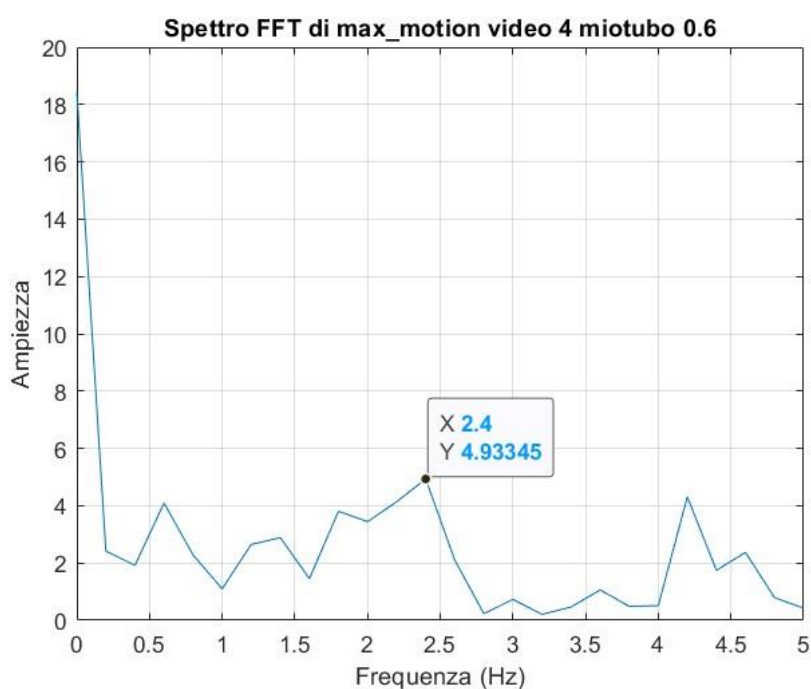


**Figura 24:** andamento della contrazione del miotubo in esame (STAT 0.6) nel tempo, i punti rossi corrispondono al valore della media dei vettori spostamento massimi per i cinque video

Come pronosticabile il miotubo sembra avere una contrazione in crescita nella prima fase fino ad arrivare a un picco massimo, in questo caso raggiunto dopo circa 10 minuti. A questo punto la contrazione inizia a diminuire nei propri valori fino a fermarsi completamente. Nei cinque video presi il miotubo non ha raggiunto lo stato di immobilità, ma l'andamento dei valori della media dei vettori spostamento massimi, per ogni video, evidenzia chiaramente questa tendenza.

Se si fossero registrati ulteriori video, dunque, si sarebbe presumibilmente registrato un ulteriore calo del valore della media fino a raggiungere idealmente il valore di 0.

Dal punto di vista della frequenza di contrazione, invece, non si è registrato per il caso in esame una variazione significativa al trascorrere del tempo, per quanto il picco massimo nello spettro è molto evidente nel primo video, mentre ad esempio nel quarto vi sono più picchi e di minore ampiezza, come visibile in Figura 25. Inoltre i valori delle frequenze corrispondenti evolvono in maniera incoerente, dunque andrebbero fatte ulteriori analisi per comprendere dove sia il problema in questa fase dell'elaborazione.



**Figura 25:** grafico realizzato in Matlab che rappresenta lo spettro del vettore *max\_motion* del quarto video del miotubo in esempio, ovvero il vettore dei massimi vettori spostamento per frame registrati

Il procedimento appena descritto è stato iterato per almeno tre video di un miotubo per ogni condizione di trattamento effettuato.

All'interno dei video di ogni miotubo è stata usata la media dei massimi vettori spostamento per frame come termine di paragone per valutare l'evolversi dello stato di contrazione dello stesso miotubo, all'allontanarsi temporalmente dalla elettrostimolazione iniziale.

Tra video di miotubi diversi sarebbe stato difficile fare un confronto puramente numerico, in quanto poco significativo. Dunque si è scelto di fare tutti i confronti basandosi sull'andamento nel tempo dello stato di contrazione in base al trattamento effettuato, utilizzando principalmente i due grafici inferiori della Figura 20 e quello realizzato successivamente, rappresentato ad esempio in Figura 21.

Il codice Matlab completo utilizzato in fase di elaborazione è riportato in *appendice*.

## Capitolo Terzo

### ANALISI DEI RISULTATI

In questo capitolo si procederà con l'analisi di tutti i risultati ottenuti.

Inizialmente verranno presentati tutti i grafici conseguiti dalle elaborazioni fatte tramite la tecnica del Block Matching sui video registrati e, in aggiunta, le tabelle contenenti i valori delle medie dei vettori spostamento massimi registrati per ogni frame di ogni video e la frequenza di contrazione corrispondente. Grafici e tabelle verranno riportati suddivisi in base alla condizione di trattamento dei miotubi corrispondenti, cioè rispettivamente statina 0.6 (STAT 0.6), statina 2.5 nM (STAT 2.5), statina 2.5 nM e coenzima Q (STAT 2.5 + Q), coenzima Q (Q) e condizione di controllo (CTR). L'ordine con cui verranno presentati i grafici e le tabelle elaborate sarà il medesimo per ogni condizione e rispetterà lo stesso ordine con cui sono stati ottenuti.

Dunque si inizierà presentando i tripli grafici contenenti l'ultimo frame di ogni video con i vettori spostamento relativi in blu, lo scatter dei massimi vettori spostamento frame per frame sempre in blu e lo scatter delle medie di tutti i vettori spostamento in rosso. Successivamente si passerà ai grafici del vettore spostamento massimo frame per frame per ogni video realizzato mediante una linea continua. Poi verranno riportati gli spettri realizzati mediante *fft* del vettore *max\_motion* di ogni video e la tabella contenente i video di ogni miotubo con corrispondente orario, media dei massimi vettori spostamento e frequenza di contrazione.

Infine, si concluderà ogni sezione con il plot delle medie dei vettori spostamento massimi per video trovati in precedenza, al fine di valutare l'andamento complessivo della contrazione del miotubo in esame.

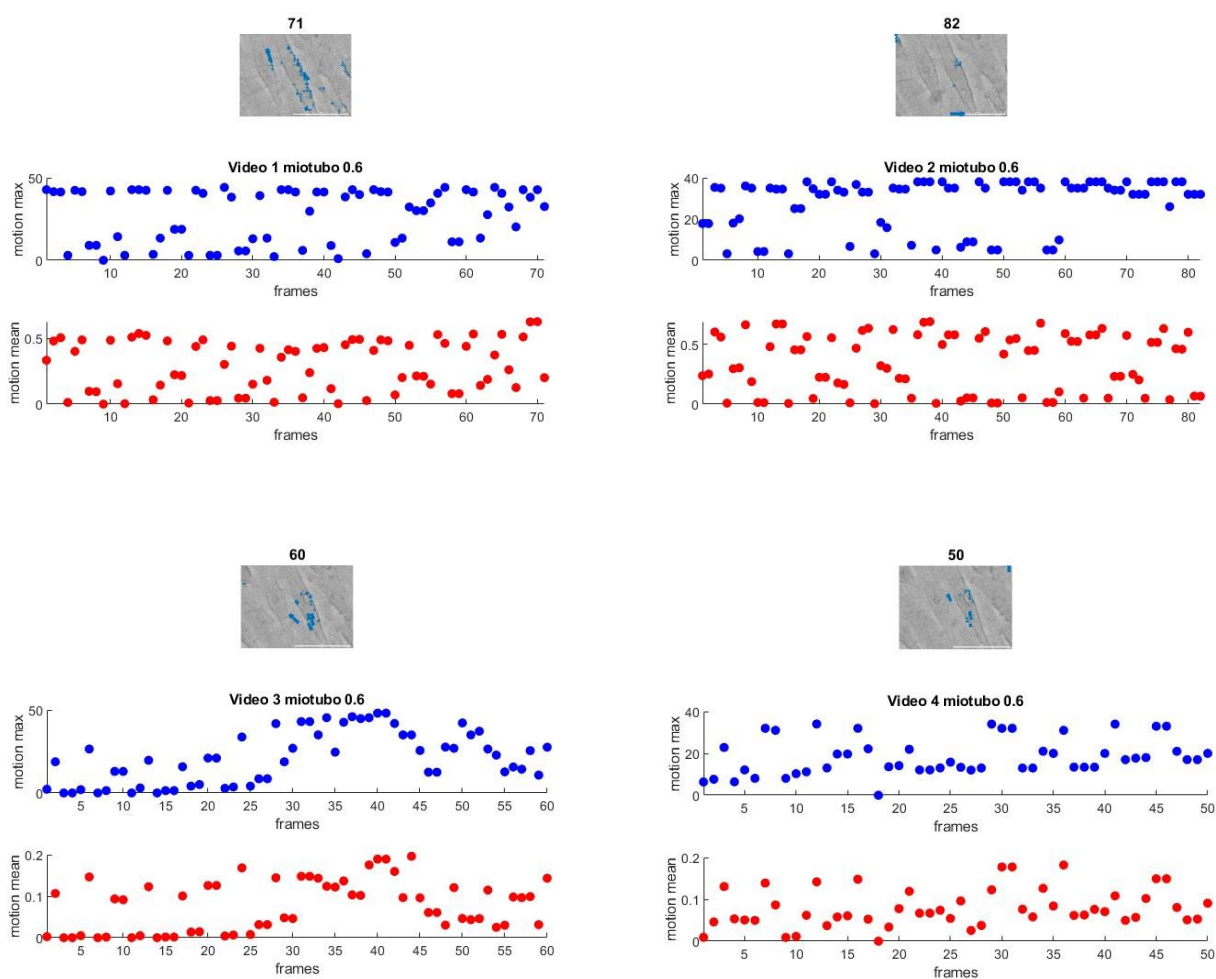


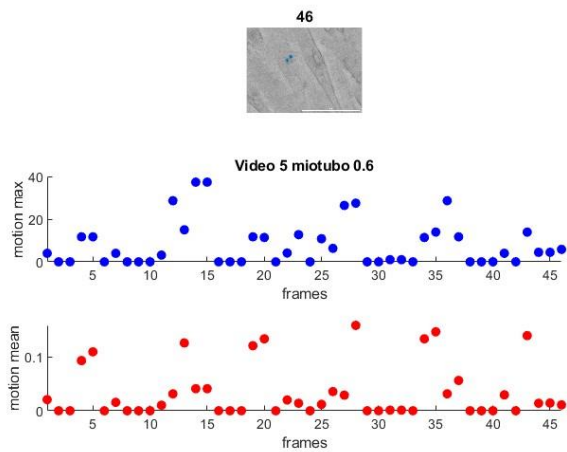
Successivamente ci si dedicherà all'analisi dei dati raccolti, cercando di mettere in evidenza le differenze riscontrate sullo stato di contrazione dei miotubi in relazione al trattamento a cui essi erano stati sottoposti in precedenza e in relazione al tempo trascorso dalla prima elettrostimolazione.

Lo scopo dell'analisi è sempre quella di comprendere l'andamento della contrazione dei miotubi nel tempo senza soffermarsi sul valore numerico dei vettori, che dipende da vari fattori.

### 3.1 Analisi dei miotubi trattati con statina con concentrazione di 0.6 nM

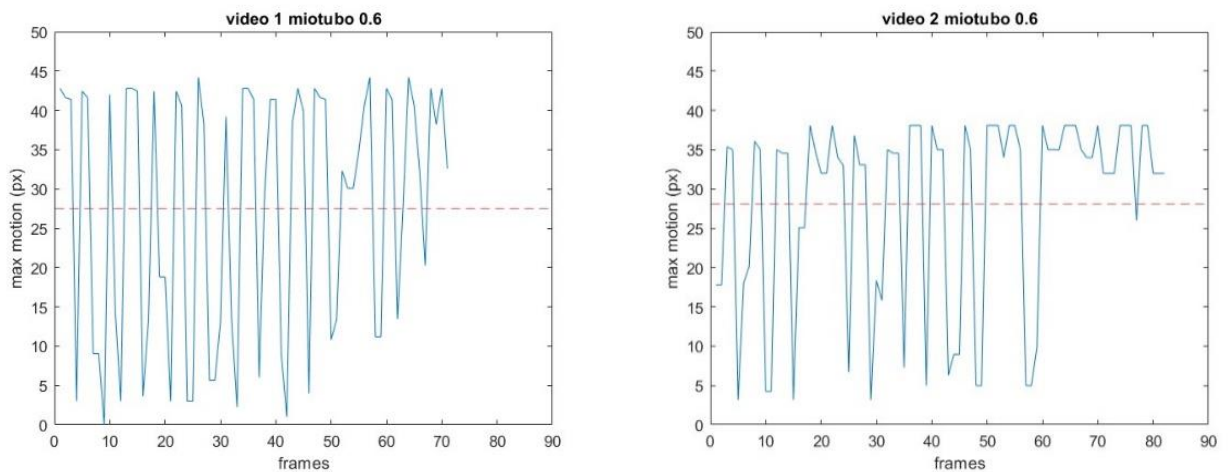
In Figura 26 vengono riportati i grafici finali del vettore spostamento massimo (in blu) e della media di tutti i vettori spostamento (in rosso) frame per frame di ognuno dei cinque video analizzati del miotubo trattato con statina con concentrazione di 0.6 nM:

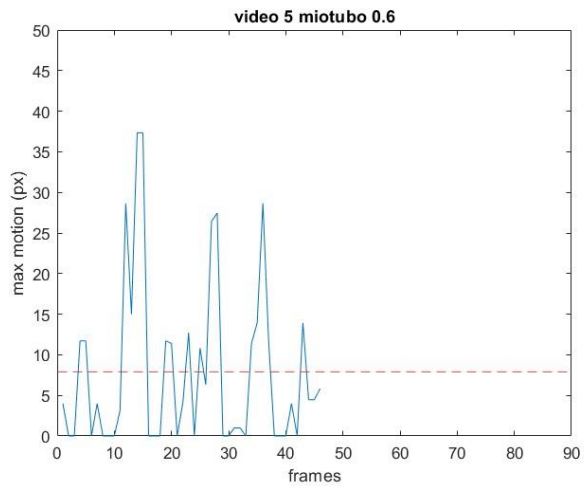
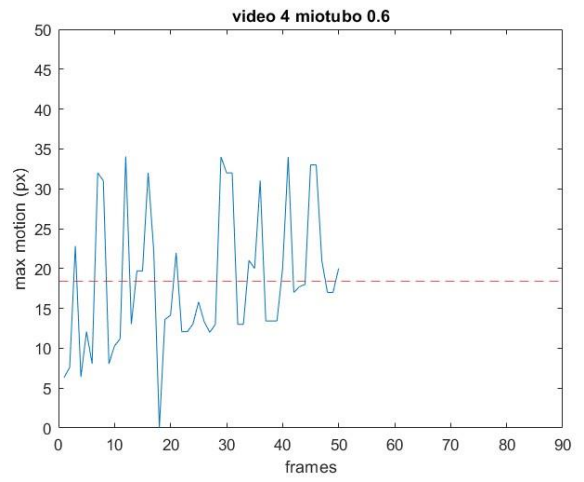
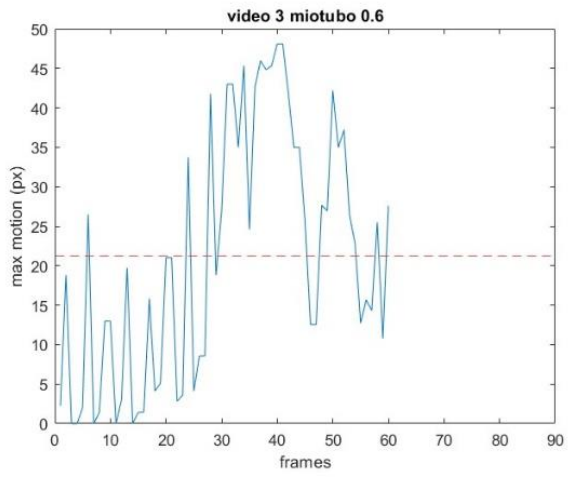




**Figura 26:** grafici finali del vettore spostamento massimo (in blu) e della media di tutti i vettori spostamento (in rosso) frame per frame di ognuno dei cinque video analizzati del miotubo trattato con STAT 0.6

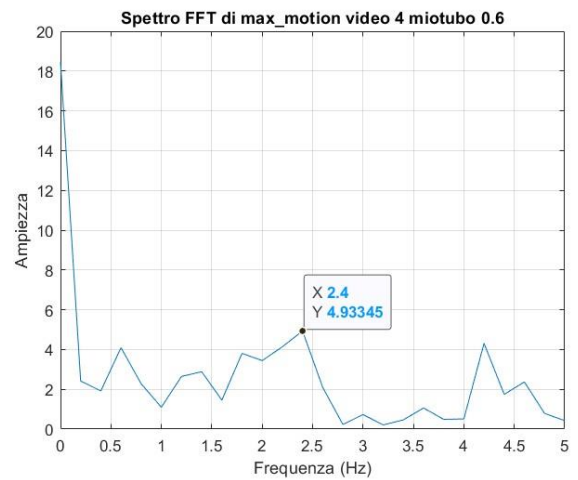
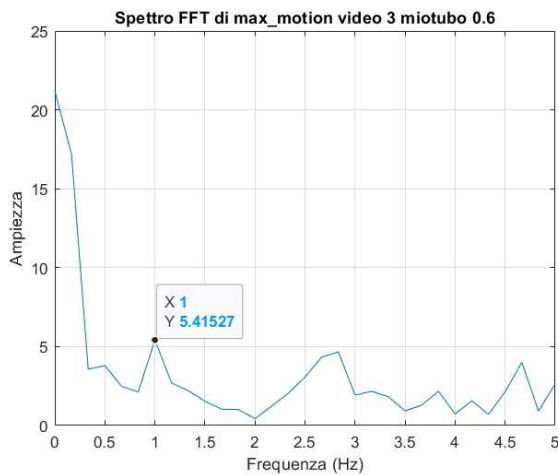
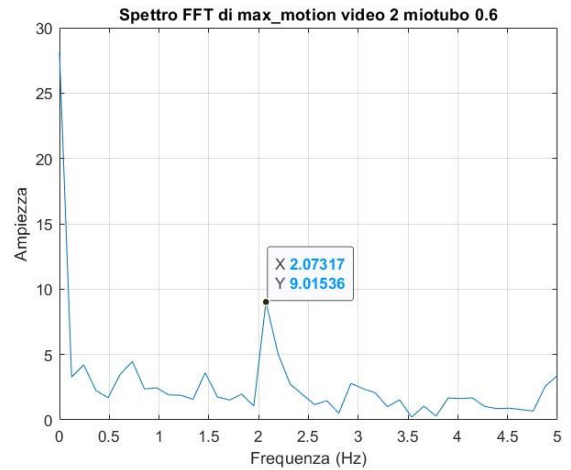
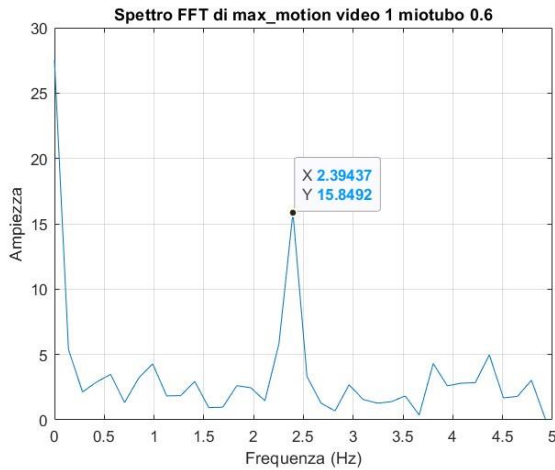
I grafici della contrazione frame per frame di tutti e cinque i video, per quanto riguarda i vettori spostamento massimi registrati, vengono rappresentati in Figura 27.

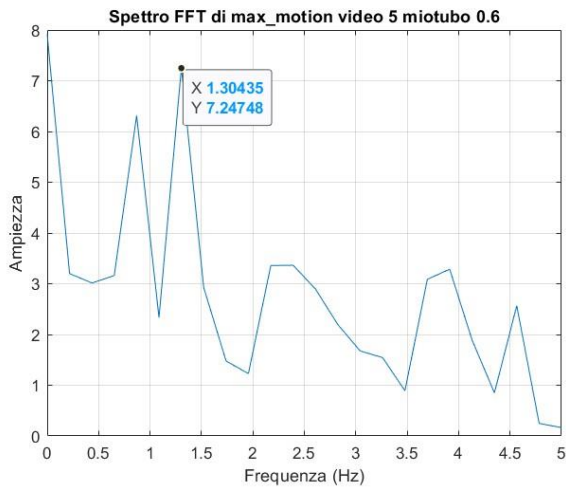




**Figura 27:** grafici della contrazione frame per frame dei cinque video del miotubo trattato con STAT 0.6

In Figura 28 vengono riportati gli spettri del vettore *max\_motion* calcolato per ogni video con relativo picco corrispondente alla frequenza di contrazione registrata. Si nota come il valore di questa frequenza vari senza un'apparente logica tra i cinque video analizzati per il miotubo in esame.





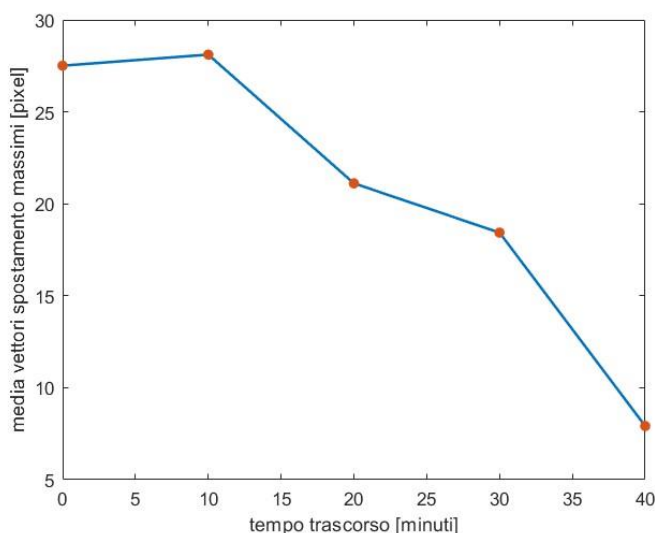
**Figura 28:** spettri del vettore *max\_motion* calcolato per ogni video del miotubo in esame (STAT 0.6) con relativo picco corrispondente alla frequenza di contrazione registrata

Si riporta nuovamente la Tabella 5 in cui sono indicate la media dei vettori spostamento massimi e della frequenza delle contrazioni per ogni video del miotubo preso in esame.

**Tabella 5:** valori della media dei vettori spostamento massimi e della frequenza delle contrazioni per ogni video del miotubo preso in esame ( STAT 0.6)

	<b>Orario</b>	<b>Media dei vettori spostamento massimi (px)</b>	<b>Frequenza delle contrazioni (Hz)</b>
<b>Video 1</b>	15.29	27.5098	2.39437
<b>Video 2</b>	15.39	28.1123	2.07317
<b>Video 3</b>	15.49	21.1941	1
<b>Video 4</b>	15.59	18.4326	2.4
<b>Video 5</b>	16.09	7.9185	1.30435

Infine viene mostrato l'andamento della contrazione ed in particolare delle medie dei vettori spostamento massimi del miotubo in esame, con i punti rossi che corrispondono ad ognuno dei cinque video analizzati.



**Figura 24:** andamento della contrazione del miotubo in esame (STAT 0.6) nel tempo, i punti rossi corrispondono al valore della media dei vettori spostamento massimi per i cinque video

Come già esposto nell'esempio del capitolo 2.2, i grafici ottenuti e i valori calcolati rispettano quanto ci si aspettava, infatti si nota un leggero aumento nell'entità della contrazione dal primo al secondo video, successivamente il miotubo inizia gradualmente a contrarsi sempre meno. Questa tendenza è visibile nel grafico in Figura 24, ma anche osservando i grafici in Figura 27.

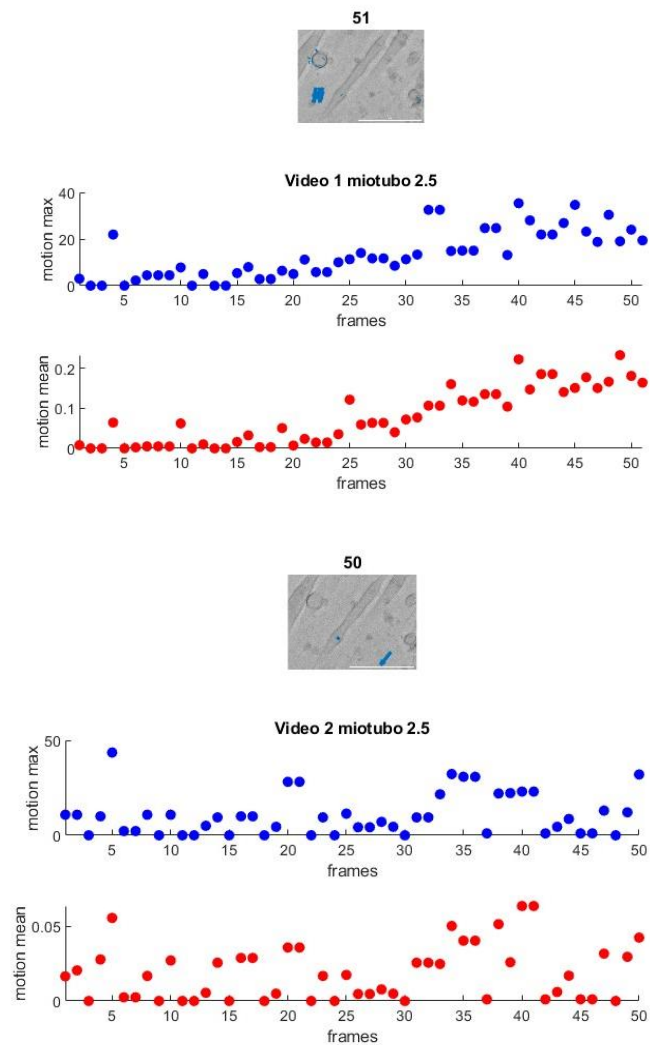
Quindi si può evincere che dal punto di vista della correlazione tra tempo trascorso dalla prima contrazione e variazione del campo di spostamento, i miotubi trattati con statina con concentrazione di 0.6 nM mostrano coerenza con quanto atteso.

Le frequenze di contrazione trovate attraverso la *fft* risultano difficili da interpretare logicamente, dunque non verranno prese in considerazione in quanto non attendibili.

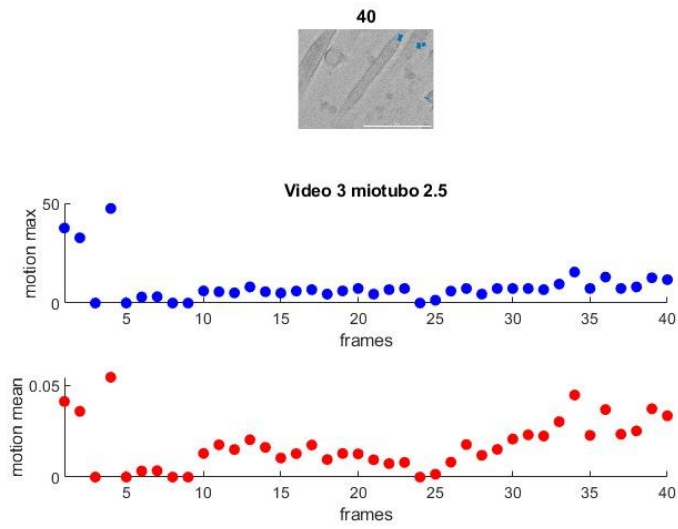
Gli effetti sulla contrazione del trattamento eseguito verranno analizzati in seguito, dopo aver citato i risultati delle elaborazioni fatte per i miotubi trattati nelle altre condizioni, così da avere concreti termini di paragone.

### 3.2 Analisi dei miotubi trattati con statina con concentrazione di 2.5 nM

In figura 29 vengono riportati i grafici finali del vettore spostamento massimo (in blu) e della media di tutti i vettori spostamento (in rosso) frame per frame di ognuno dei tre video analizzati del miotubo trattato con statina con concentrazione di 2.5 nM:

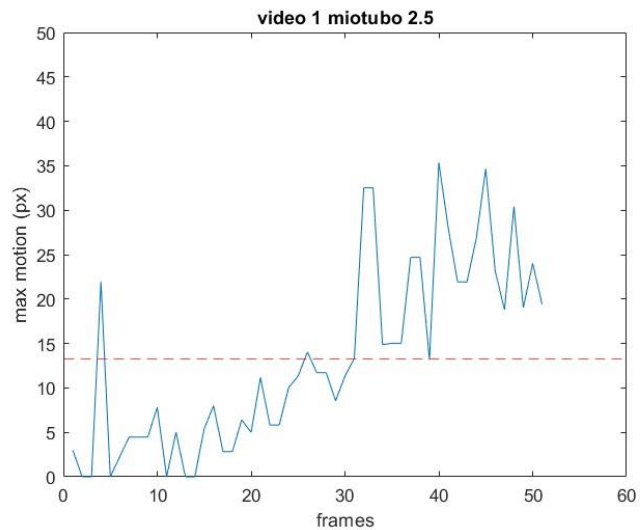


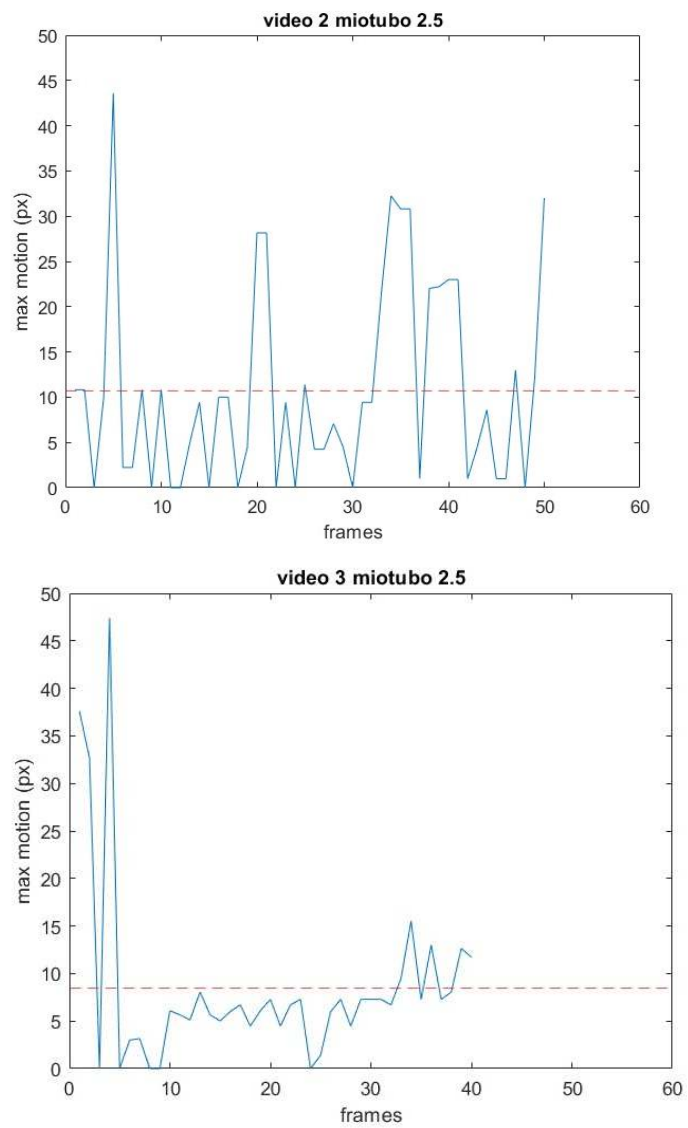




**Figura 29:** grafici finali del vettore spostamento massimo (in blu) e della media di tutti i vettori spostamento (in rosso) frame per frame di ognuno dei tre video analizzati del miotubo trattato con STAT 2.5

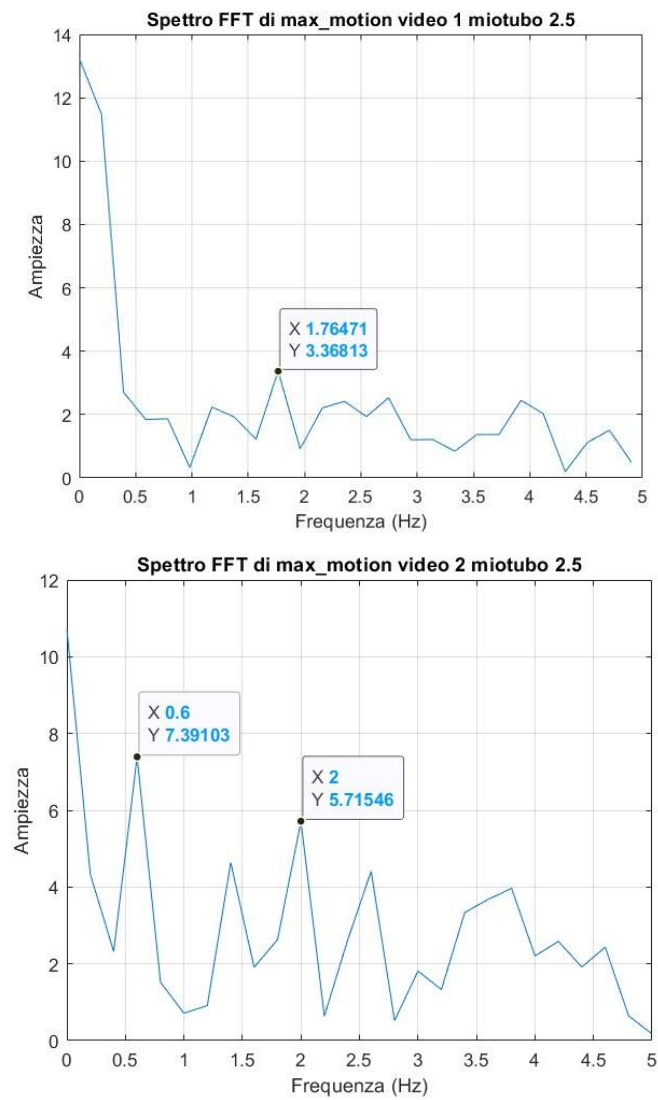
I grafici della contrazione frame per frame di tutti e tre i video, per quanto riguarda i vettori spostamento massimi registrati, vengono rappresentati in Figura 30.

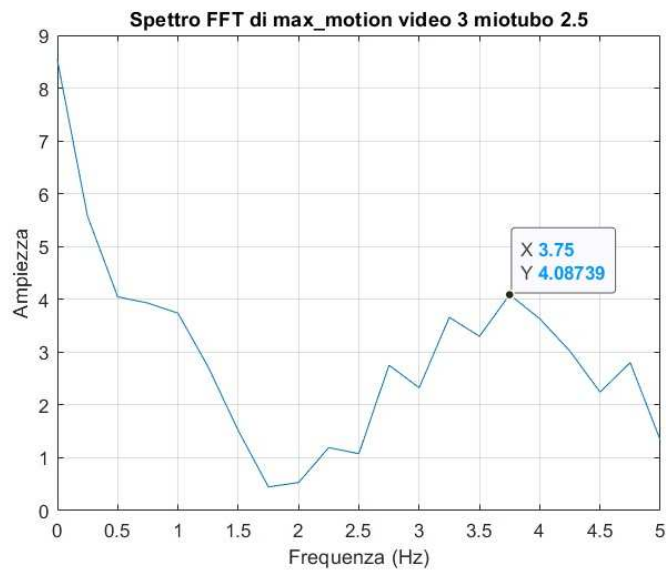




**Figura 30:** grafici della contrazione frame per frame dei tre video del miotubo trattato con STAT 2.5

In Figura 31 vengono riportati gli spettri del vettore *max\_motion* calcolato per ogni video con relativo picco corrispondente alla frequenza di contrazione registrata. Si nota come il valore di questa frequenza vari senza un'apparente logica tra i tre video analizzati per il miotubo in esame.





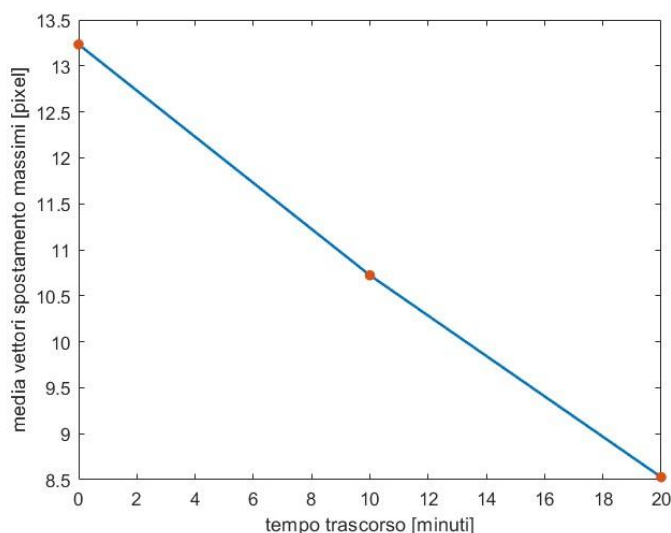
**Figura 31:** spettri del vettore *max\_motion* calcolato per ogni video del miotubo in esame (STAT 2.5) con relativo picco corrispondente alla frequenza di contrazione registrata

Si riporta la Tabella 6 con indicati i valori della media dei vettori spostamento massimi e della frequenza delle contrazioni per ogni video del miotubo preso in esame (STAT 2.5).

**Tabella 6:** valori della media dei vettori spostamento massimi e della frequenza delle contrazioni per ogni video del miotubo preso in esame, trattato con STAT 2.5

	<b>Orario</b>	<b>Media dei vettori spostamento massimi (px)</b>	<b>Frequenza delle contrazioni (Hz)</b>
<b>Video 1</b>	16.32	13.2326	1.76471
<b>Video 2</b>	16.42	10.7229	0.6
<b>Video 3</b>	16.52	8.5273	3.75

Infine viene mostrato l'andamento della contrazione ed in particolare delle medie dei vettori spostamento massimi del miotubo in esame, con i punti rossi che corrispondono ad ognuno dei tre video analizzati.



**Figura 32:** andamento della contrazione del miotubo in esame (STAT 2.5) nel tempo, i punti rossi corrispondono al valore della media dei vettori spostamento massimi per i tre video

Anche in questo caso i grafici ottenuti e i valori calcolati rispettano quanto previsto, con una differenza però rispetto al caso dei miotubi trattati con una concentrazione minore di statina; infatti qui non si nota un leggero aumento nell'entità della contrazione dal primo al secondo video, ma invece troviamo il picco massimo di contrazione immediatamente nel primo video e successivamente il miotubo inizia gradualmente a contrarsi sempre meno. Questo sembra indicare, coerentemente con quanto atteso, che l'aumento di statina provoca una contrazione maggiore nell'immediato ma che tende poi a far terminare in tempi minori il movimento dei miotubi, facendoli "stancare" prima.

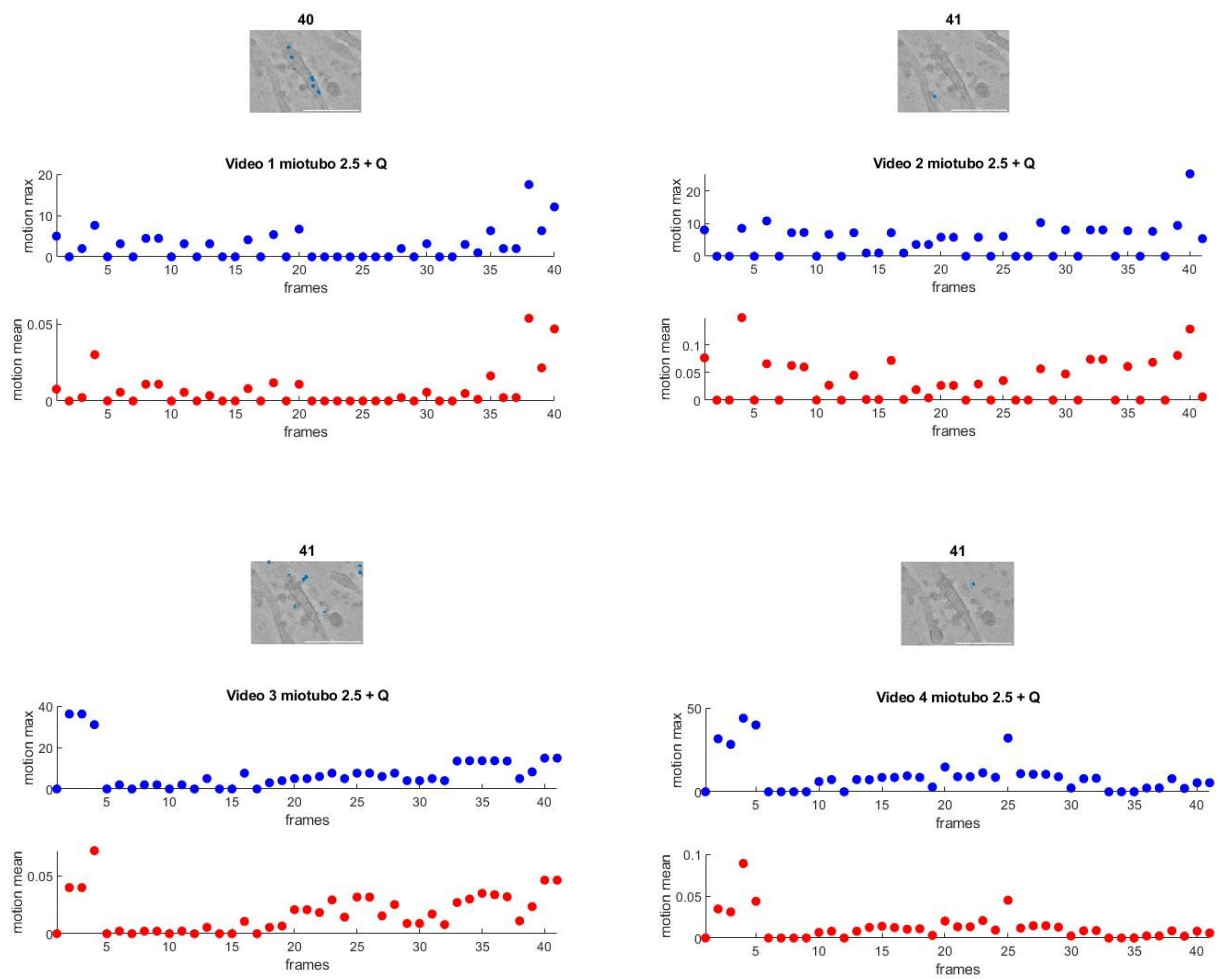
Quindi possiamo dire che dal punto di vista della correlazione tra tempo trascorso dalla prima contrazione e variazione del campo di spostamento, i miotubi trattati con statina a concentrazione 2.5 nM mostrano coerenza con quanto atteso.

Le frequenze di contrazione trovate attraverso la *fft* risultano nuovamente difficili da interpretare, dunque non verranno prese in considerazione.

Osservando attentamente i grafici è possibile notare la presenza di picchi anomali, che possiamo definire outliers, ovvero valori raggiunti dai vettori spostamento non coerenti con il generale andamento della contrazione, probabilmente dovuti a interferenze create da altri miotubi. Tuttavia resta chiara la tendenza del miotubo nella propria contrazione, dunque possiamo considerare questi casi irrilevanti.

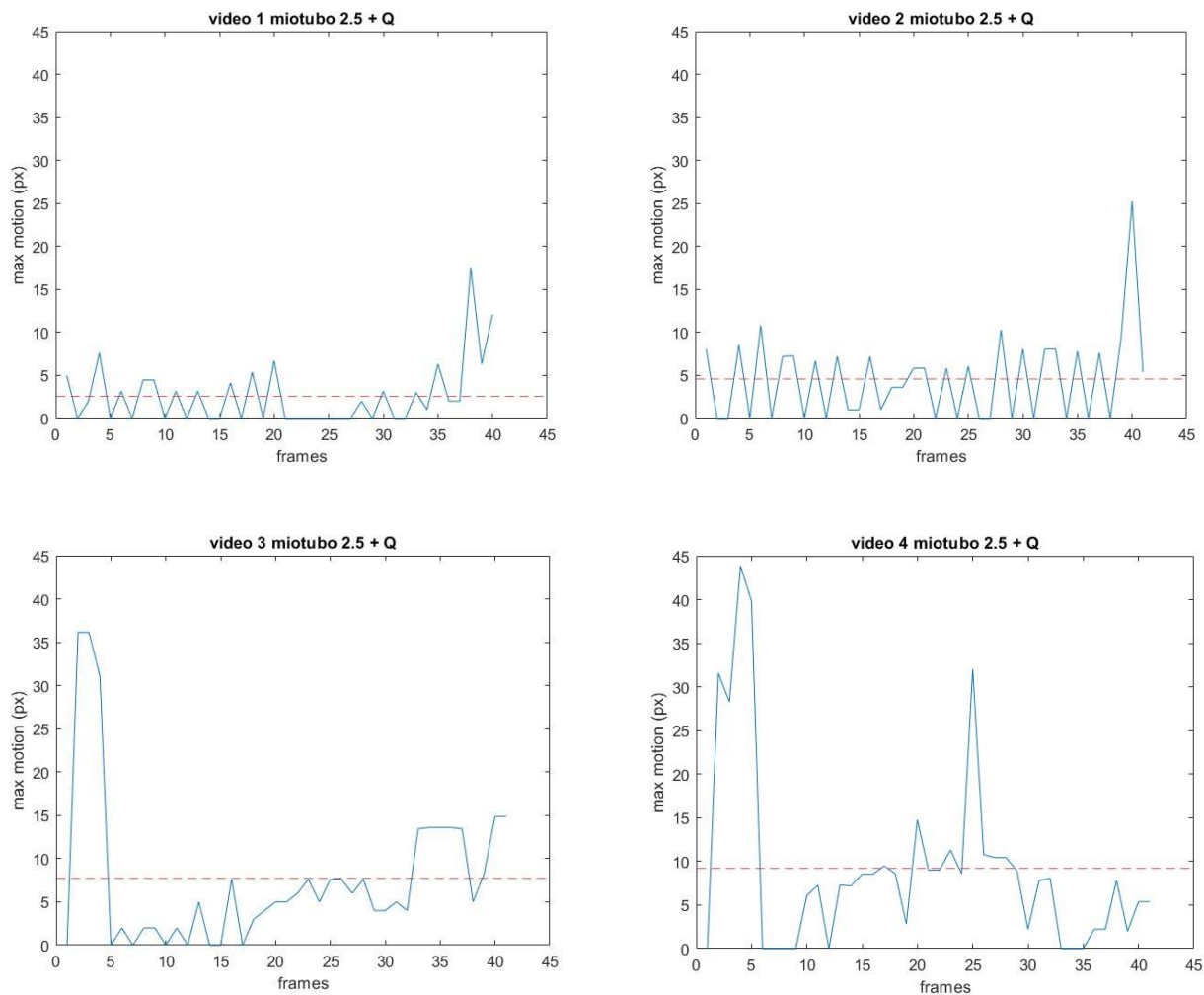
### 3.3 Analisi dei miotubi trattati con statina con concentrazione di 2.5 nM e coenzima Q

Di seguito, in Figura 33, sono riportati i grafici finali del vettore spostamento massimo (in blu) e della media di tutti i vettori spostamento (in rosso) frame per frame di ognuno dei quattro video analizzati del miotubo trattato con statina con concentrazione di 2.5 nM e coenzima Q:



**Figura 33:** grafici finali del vettore spostamento massimo (in blu) e della media di tutti i vettori spostamento (in rosso) frame per frame di ognuno dei quattro video analizzati del miotubo trattato con STAT 2.5 + Q

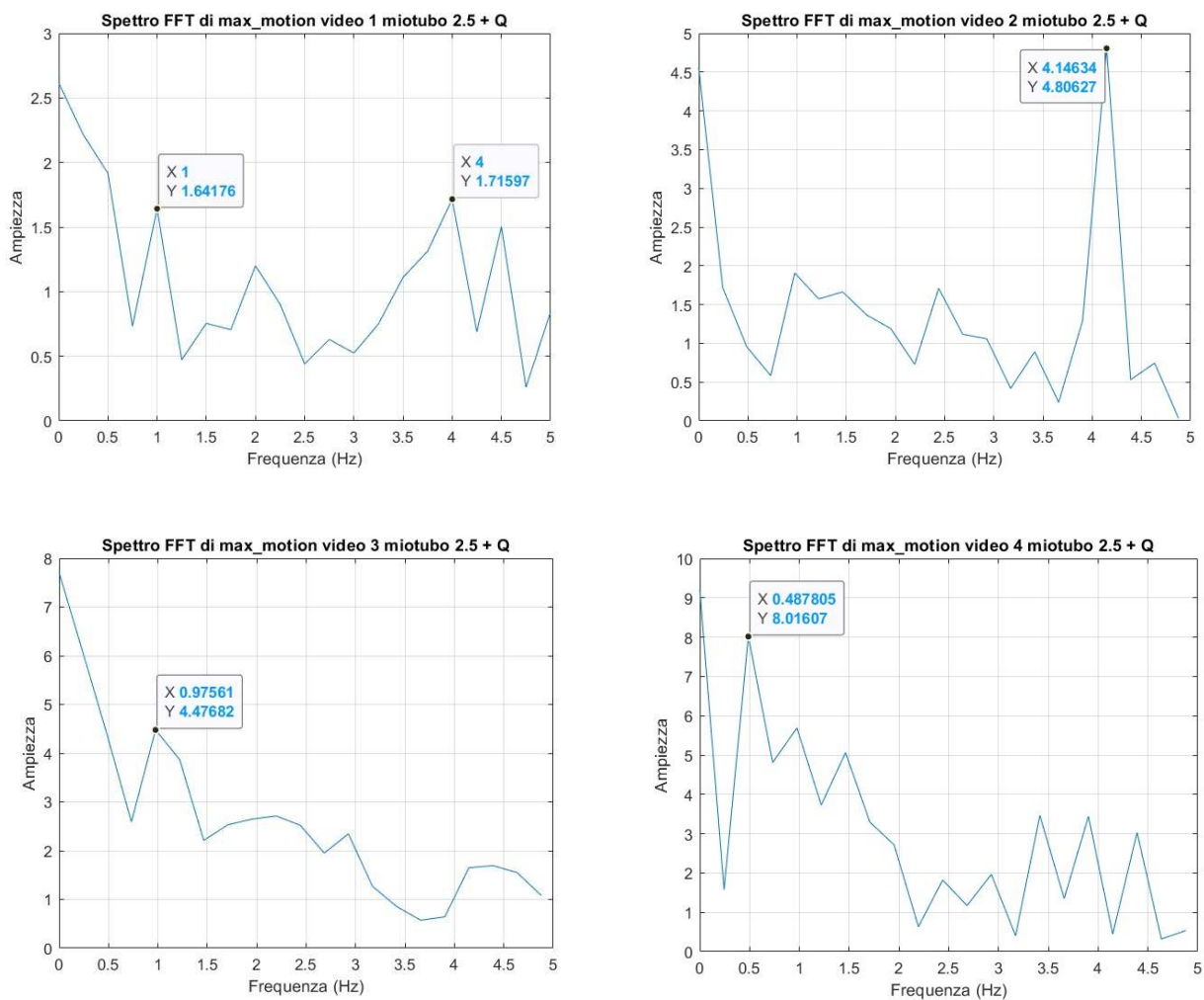
I grafici della contrazione frame per frame di tutti e quattro i video, per quanto riguarda i vettori spostamento massimi registrati, vengono rappresentati in Figura 34.



**Figura 34:** grafici della contrazione frame per frame dei quattro video del miotubo trattato con STAT 2.5 + Q



In Figura 35 vengono riportati gli spettri del vettore *max\_motion* calcolato per ogni video con relativo picco corrispondente alla frequenza di contrazione registrata. Si nota come il valore di questa frequenza vari senza un'apparente logica tra i quattro video analizzati per il miotubo in esame.



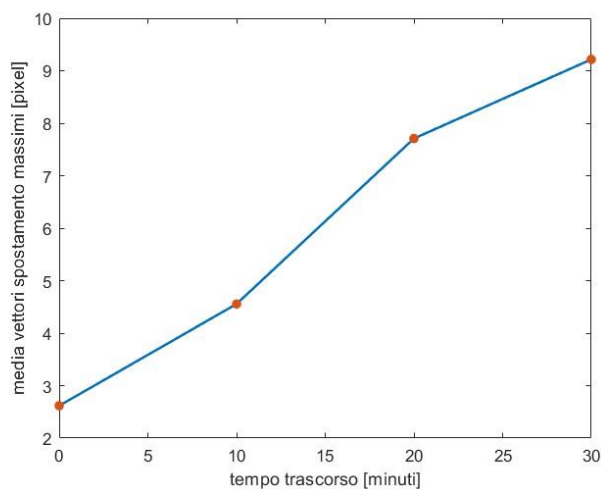
**Figura 35:** spettri del vettore *max\_motion* calcolato per ogni video del miotubo in esame (STAT 2.5 + Q) con relativo picco corrispondente alla frequenza di contrazione registrata

Si riporta la Tabella 7 con indicati i valori della media dei vettori spostamento massimi e della frequenza delle contrazioni per ogni video del miotubo preso in esame (STAT 2.5 + Q).

*Tabella 7: valori della media dei vettori spostamento massimi e della frequenza delle contrazioni per ogni video del miotubo preso in esame, trattato con STAT 2.5 + Q*

	<b>Orario</b>	<b>Media dei vettori spostamento massimi (px)</b>	<b>Frequenza delle contrazioni (Hz)</b>
<b>Video 1</b>	16.16	2.6163	4
<b>Video 2</b>	16.26	4.5560	4.14634
<b>Video 3</b>	16.36	7.7084	0.97561
<b>Video 4</b>	16.46	9.2161	0.487805

L'andamento della contrazione nel tempo non sembra essere in questo caso coerente con quanto si ipotizzava, infatti il valore delle medie dei vettori spostamento massimi cresce col passare dei video, indicando una contrazione sempre maggiore, ma vedendo i video registrati si nota come in realtà essa dovrebbe diminuire video dopo video fino quasi ad arrestarsi. La possibile motivazione di questa discrepanza potrebbe essere la presenza di eccessivo rumore o outliers che rendono i risultati delle elaborazioni poco rilevanti. Ciò si può immediatamente intuire anche dal grafico in Figura 36, assolutamente discordante con le stesse tipologie di grafico viste nei due casi precedenti:



**Figura 36:** andamento della contrazione del miotubo in esame (STAT 2.5 + Q) nel tempo, i punti rossi corrispondono al valore della media dei vettori spostamento massimi per i quattro video

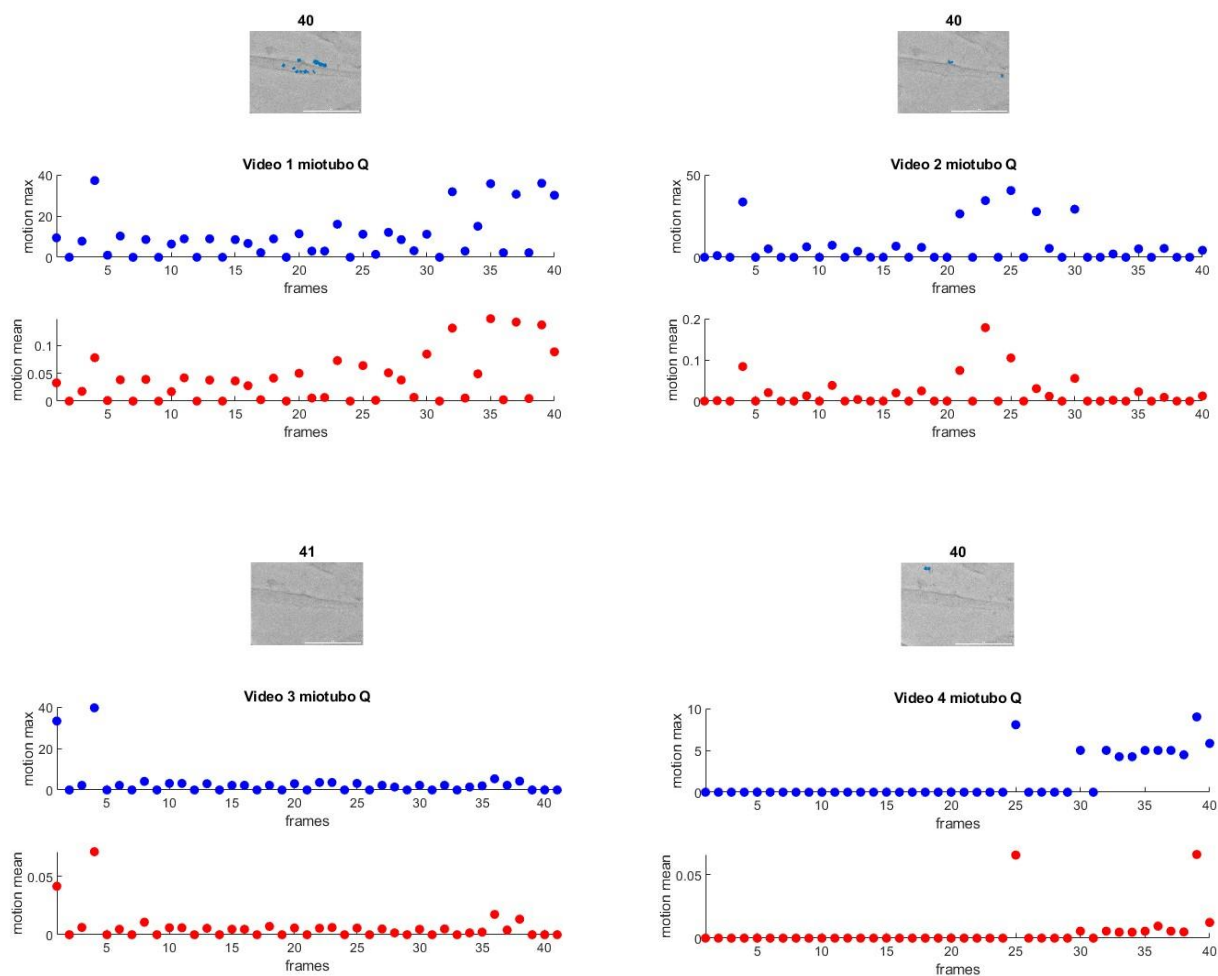
Per quanto osservare il grafico delle medie dei massimi vettori spostamento per frame, come già detto, risulta poco rilevante per via della presenza di troppi outliers che disturbano le acquisizioni; osservando invece l'andamento generale dei grafici in Figura 33 e in Figura 34, senza soffermarsi troppo sugli outliers, si può intuire quello che è il veritiero andamento della contrazione dei miotubi, con una fase iniziale in aumento e una decrescita successiva fino a praticamente fermarsi nell'ultimo video.

Anche in questa condizione un'analisi basata sulle frequenze di contrazione trovate mediante *fft* risulta poco rilevante.

Il doppio trattamento effettuato sulle cellule, costituito sia dall'applicazione di statina che di coenzima Q doveva, da un lato velocizzare la fine della contrazione, ma dall'altro rallentarla. Tuttavia è complicato verificare la validità di questa ipotesi con i dati registrati; servirebbero ulteriori analisi con video di partenza meno rumorosi o un programma di elaborazione più sofisticato, che permetta di selezionare finestre più piccole, in modo da riuscire a registrare solamente i vettori spostamento relativi al miotubo di interesse.

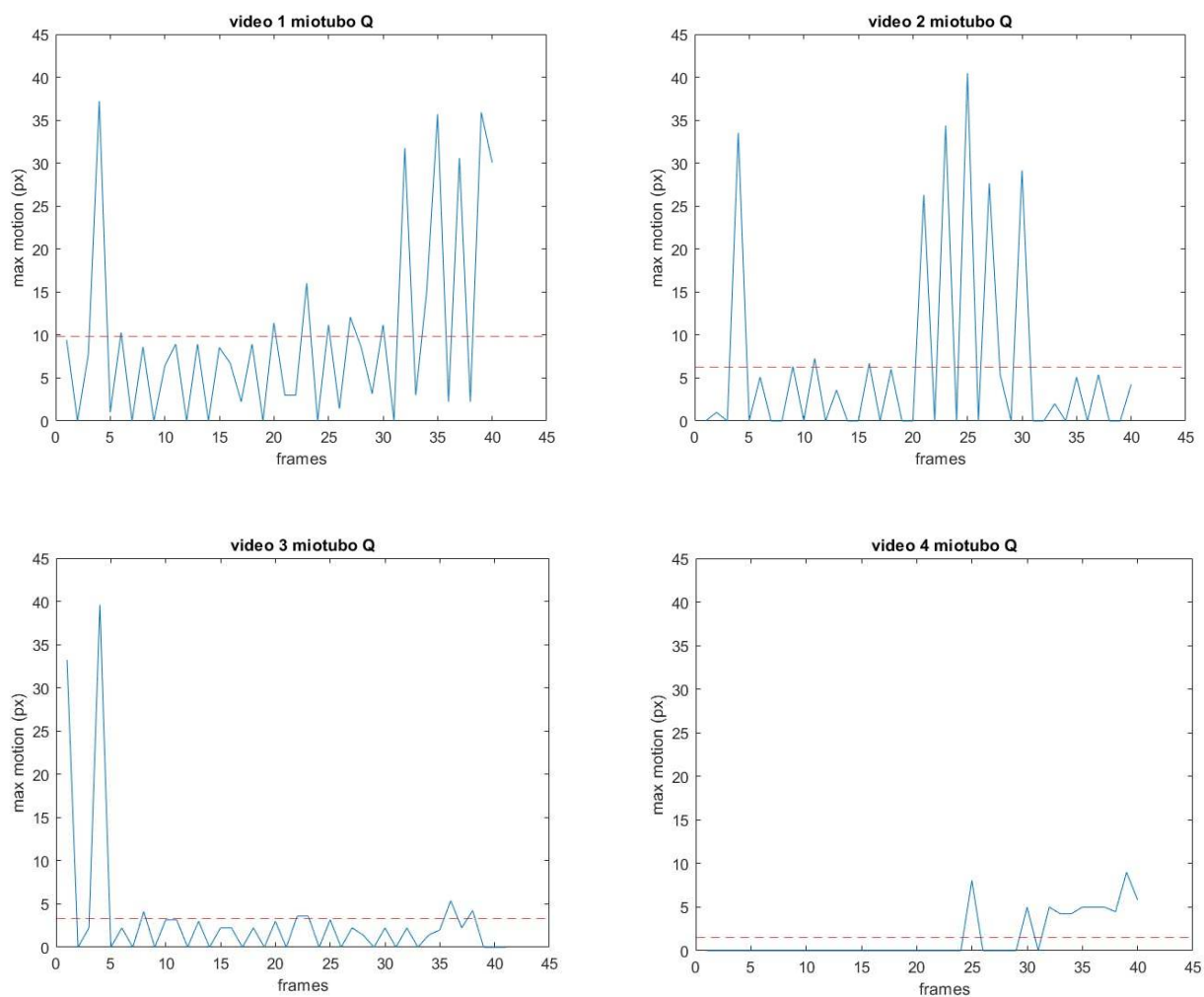
### 3.4 Analisi dei microtubi trattati con coenzima Q

In Figura 37 vengono riportati i grafici finali del vettore spostamento massimo (in blu) e della media di tutti i vettori spostamento (in rosso) frame per frame di ognuno dei quattro video analizzati del microtubo trattato con coenzima Q:



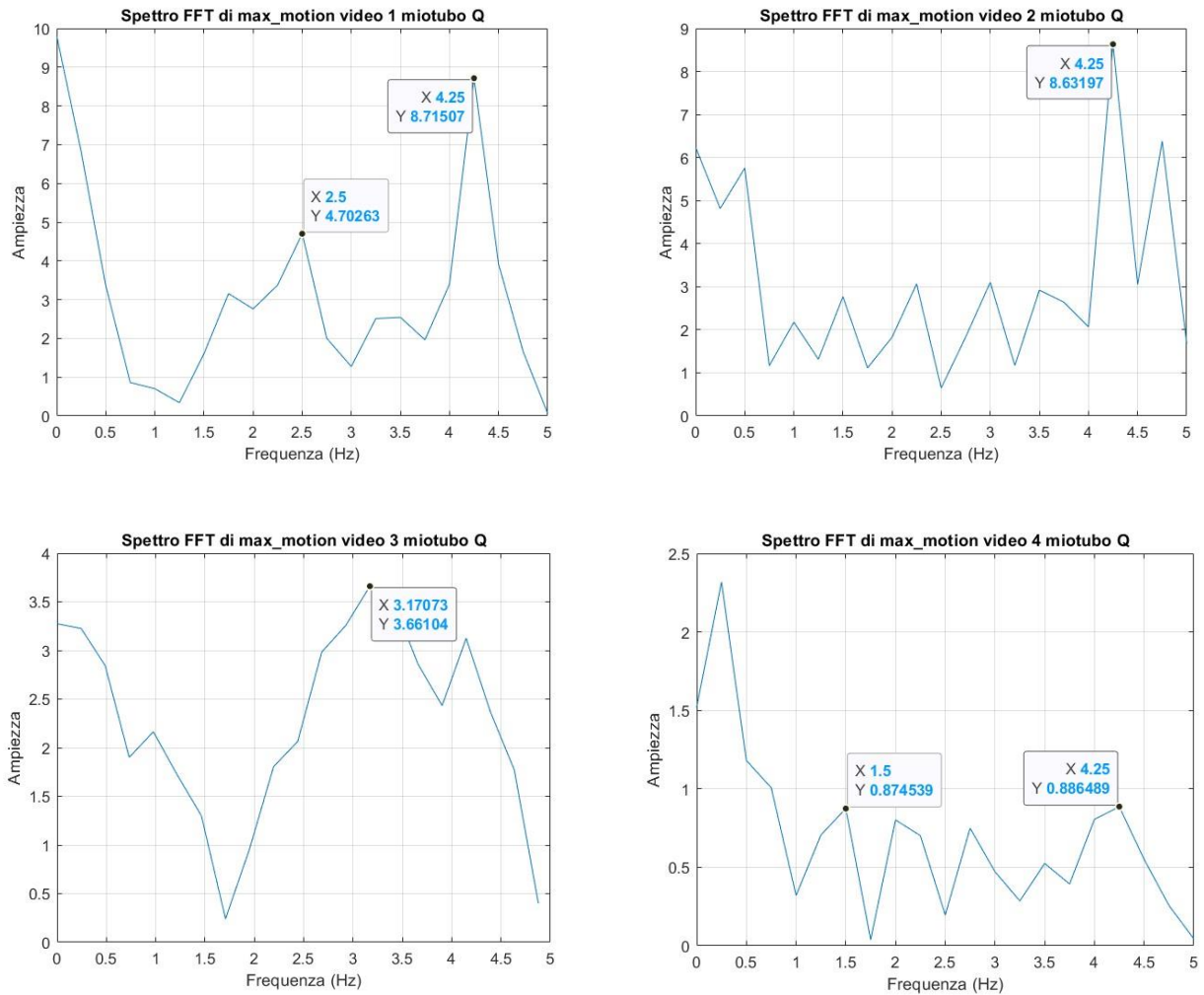
**Figura 37:** grafici finali del vettore spostamento massimo (in blu) e della media di tutti i vettori spostamento (in rosso) frame per frame di ognuno dei quattro video analizzati del microtubo trattato con coenzima Q

I grafici della contrazione frame per frame di tutti e quattro i video, per quanto riguarda i vettori spostamento massimi registrati, vengono rappresentati in Figura 38.



**Figura 38:** grafici della contrazione frame per frame dei quattro video del miotubo trattato con coenzima  $Q$

In Figura 39 vengono riportati gli spettri del vettore *max\_motion* calcolato per ogni video con relativo picco corrispondente alla frequenza di contrazione registrata.



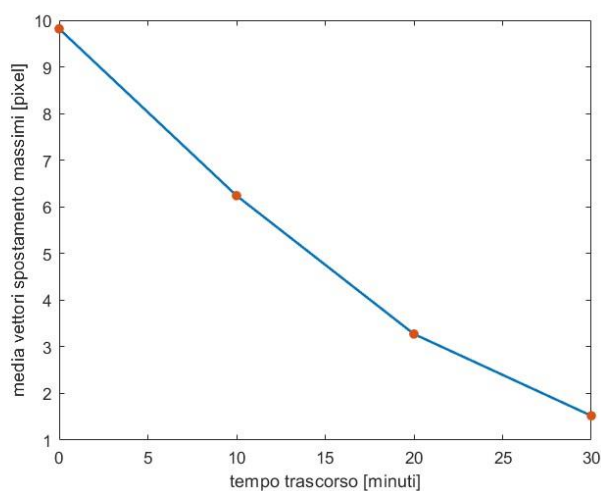
**Figura 39:** spettri del vettore *max\_motion* calcolato per ogni video del miotubo in esame (Q) con relativo picco corrispondente alla frequenza di contrazione registrata

Si riporta la Tabella 8 con indicati i valori della media dei vettori spostamento massimi e della frequenza delle contrazioni per ogni video del miotubo preso in esame (Q).

**Tabella 8:** valori della media dei vettori spostamento massimi e della frequenza delle contrazioni per ogni video del miotubo preso in esame, trattato con coenzima Q

	<b>Orario</b>	<b>Media dei vettori spostamento massimi (px)</b>	<b>Frequenza delle contrazioni (Hz)</b>
<b>Video 1</b>	13.50	9.8160	4.25
<b>Video 2</b>	14.00	6.2400	4.25
<b>Video 3</b>	14.10	3.2742	3.17
<b>Video 4</b>	14.20	1.5213	4.25

Infine viene mostrato l'andamento della contrazione ed in particolare delle medie dei vettori spostamento massimi del miotubo in esame, con i punti rossi che corrispondono ad ognuno dei quattro video analizzati.



**Figura 40:** andamento della contrazione del miotubo in esame (Q) nel tempo, i punti rossi corrispondono al valore della media dei vettori spostamento massimi per i quattro video

I grafici ottenuti e i valori calcolati mostrano un andamento analogo a quello visto nella condizione STAT 2.5, cioè con una decrescita costante della contrazione dall'istante iniziale a quello finale dei quattro video. Nell'ultimo video, in particolare, è evidente come il miotubo si fermi completamente mantenendo per diversi frame di fila un valore di spostamento pari a 0. Il fatto che nel finale vi siano di nuovo dei valori di spostamento elevato è dovuto ancora una volta alla registrazione di segnali rumorosi, come facilmente osservabile dalla raffigurazione dei vettori spostamento frame per frame del quarto video implementata in Matlab in Figura 37 e in Figura 38.

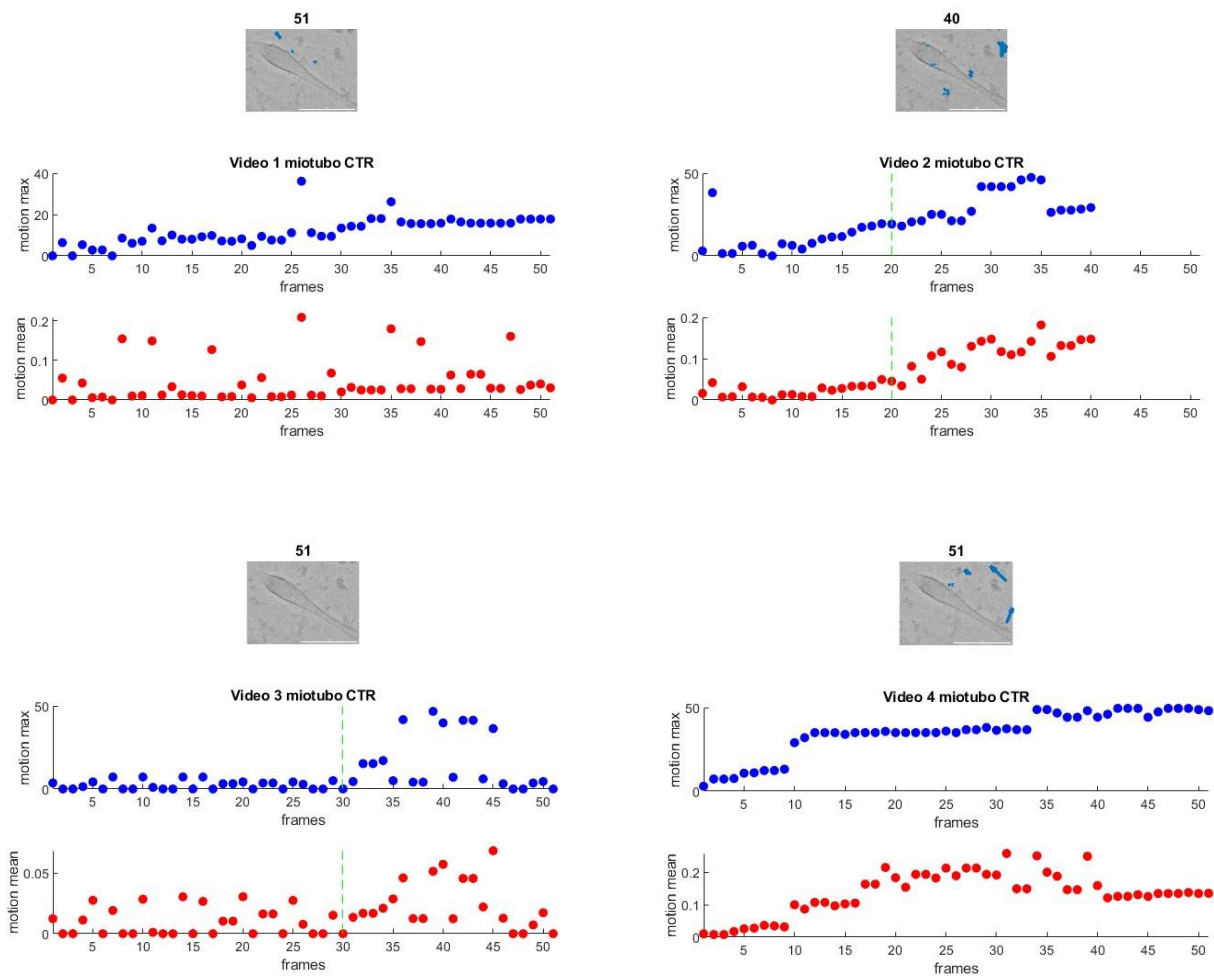
Quindi possiamo dire che dal punto di vista della correlazione tra tempo trascorso dalla prima contrazione e variazione del campo di spostamento, anche i miotubi con coenzima Q tornano a mostrare coerenza con quanto atteso.

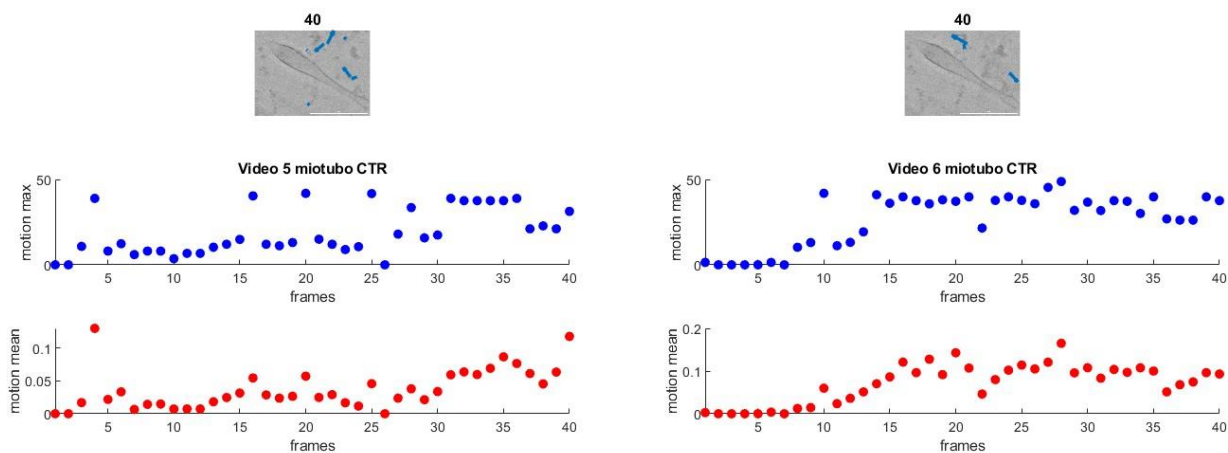
In questo caso gli spettri fatti con la *fft* rilevano picchi corrispondenti a valori incoerenti in frequenza, infatti in tre dei quattro video si nota un valore di 4.25 Hz, troppo elevato per essere veritiero. Solo in un video non si ottiene tale valore, ma è comunque presente un picco, seppur non il più elevato in ampiezza, in corrispondenza sempre di 4.25 Hz. Anche se non ci si soffermasse sull'errato valore, non si ha in ogni caso alcuna diminuzione della frequenza di contrazione dal primo all'ultimo video, come invece si poteva ipotizzare. Sarebbero comunque necessarie ulteriori e più sofisticate analisi per verificare tale conclusione.



### 3.5 Analisi dei miotubi di controllo

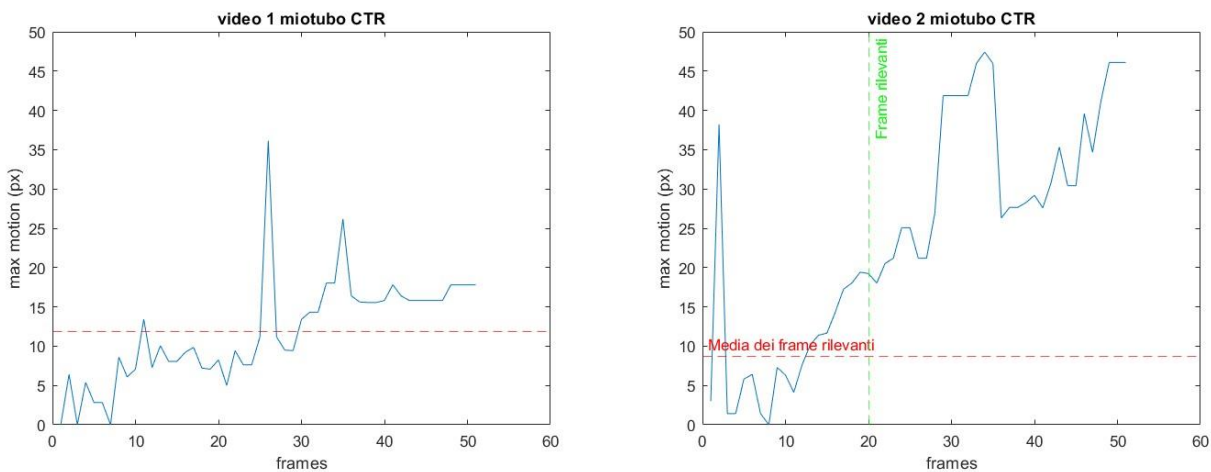
In Figura 41 vengono riportati i grafici finali del vettore spostamento massimo (in blu) e della media di tutti i vettori spostamento (in rosso) frame per frame di ognuno dei sei video analizzati del miotubo di controllo, cioè privo di ulteriori trattamenti. Nei grafici per il secondo e terzo video è visibile una linea tratteggiata verde che rappresenta il limite dei frame considerati, in quanto successivamente si registrano principalmente outliers.

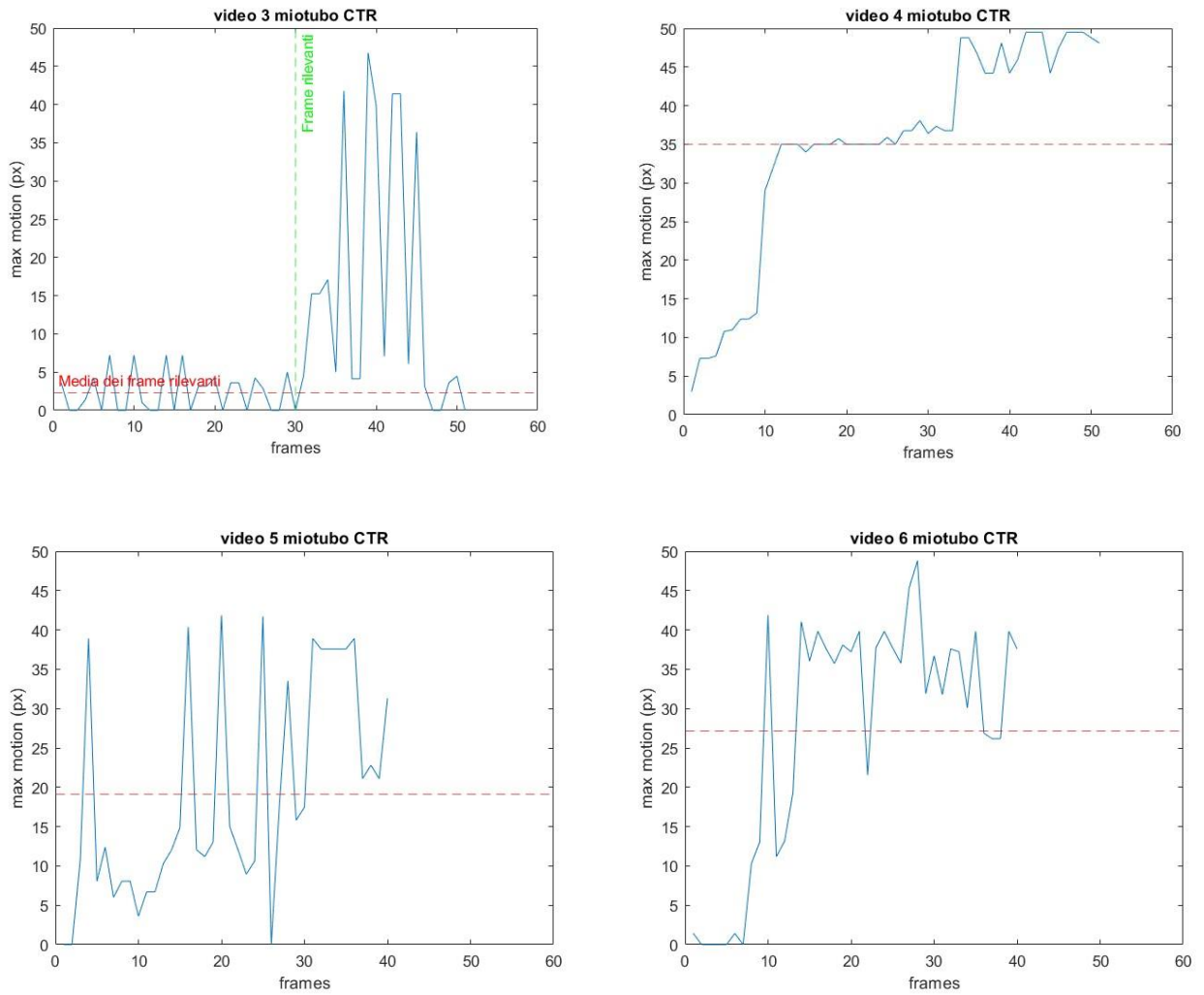




**Figura 41:** grafici finali del vettore spostamento massimo (in blu) e della media di tutti i vettori spostamento (in rosso) frame per frame di ognuno dei sei video analizzati del miotubo di controllo

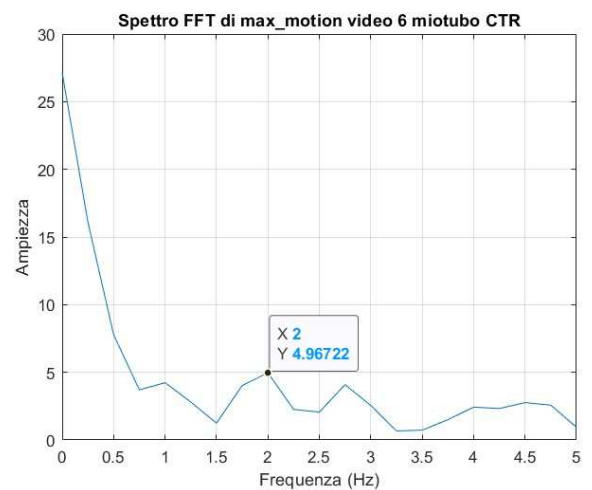
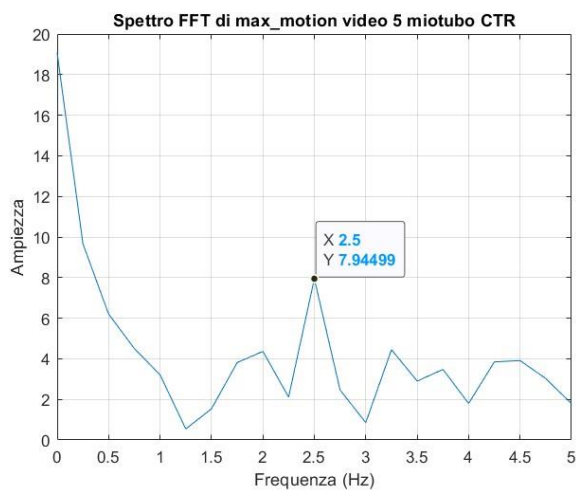
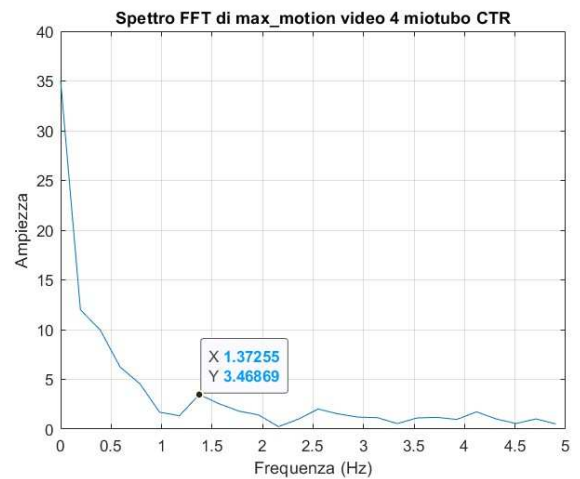
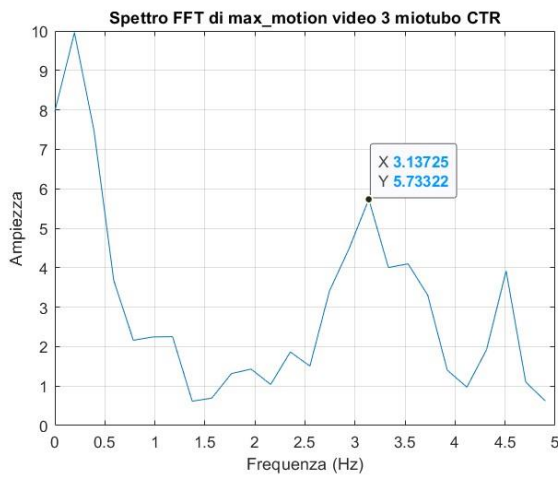
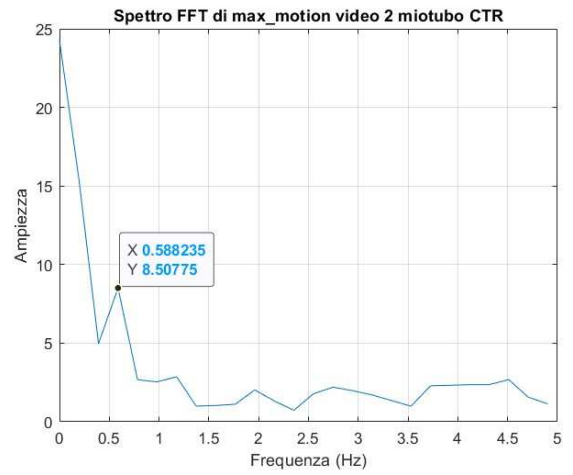
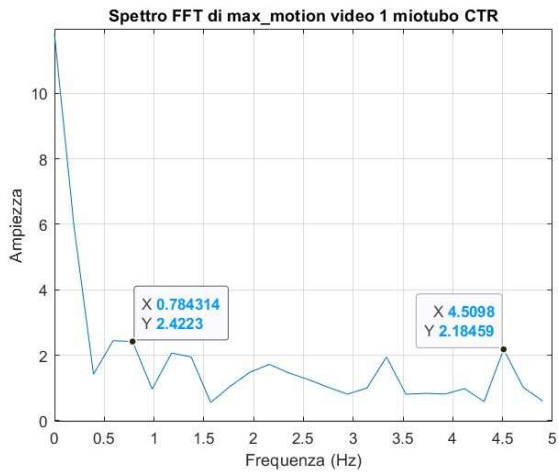
I grafici della contrazione frame per frame di tutti e sei i video, per quanto riguarda i vettori spostamento massimi registrati, vengono rappresentati in Figura 42.





**Figura 42:** grafici della contrazione frame per frame dei sei video del miotubo di controllo

In Figura 43 vengono riportati gli spettri del vettore *max\_motion* calcolato per ogni video con relativo picco corrispondente alla frequenza di contrazione registrata. Si nota come il valore di questa frequenza vari senza un'apparente logica tra i sei video analizzati per il miotubo in esame.



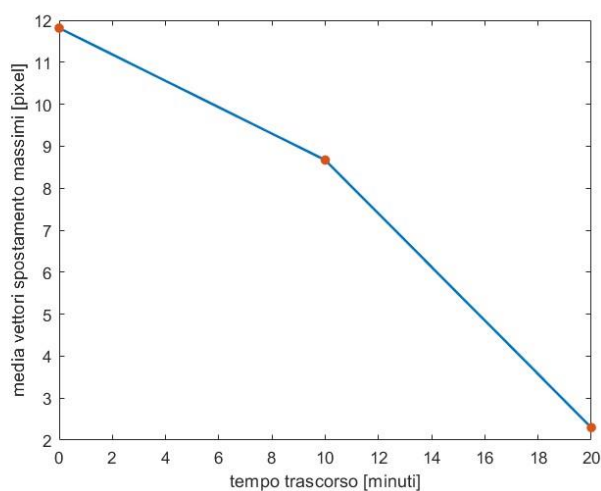
**Figura 43:** spettri del vettore max\_motion calcolato per ogni video del miotubo in esame (CTR) con relativo picco corrispondente alla frequenza di contrazione registrata

Si riporta la Tabella 9 con indicati i valori della media dei vettori spostamento massimi e della frequenza delle contrazioni per ogni video del miotubo preso in esame (CTR).

*Tabella 9: valori della media dei vettori spostamento massimi e della frequenza delle contrazioni per ogni video del miotubo di controllo*

	<b>Orario</b>	<b>Media dei vettori spostamento massimi (px)</b>	<b>Frequenza delle contrazioni (Hz)</b>
<b>Video 1</b>	11.13	11.8127	0.784314
<b>Video 2</b>	11.23	8.6696 (calcolato solo per i primi 20 frame del video perché dopo si registra solamente rumore)	0.588235
<b>Video 3</b>	11.33	2.2985 (calcolato solo per i primi 30 frame del video perché dopo si registra solamente rumore)	3.13725
<b>Video 4</b>	11.43	Segnale completamente rumoroso (35.0375)	1.37255
<b>Video 5</b>	11.53	Segnale completamente rumoroso (19.0642)	2.5
<b>Video 6</b>	12.03	Segnale completamente rumoroso (27.1390)	2

Per i primi tre video (nel secondo i primi 20 frame e nel terzo i primi 30 frame) l'andamento della contrazione è decrescente come dovrebbe essere, mentre successivamente ciò che si rileva è solamente rumore. Di conseguenza, nonostante sono stati analizzati sei video, verranno presi in considerazione solo i primi tre. Presumibilmente si può comunque ipotizzare che dalle elaborazioni degli ultimi tre video, se privi di disturbi, si sarebbe continuata a vedere una diminuzione dei valori di spostamento del miotubo fino a fermarsi, come effettivamente verificabile dalla visione dei video. In Figura 44 è rappresentato l'andamento delle medie dei massimi vettori spostamento frame per frame proprio di questi tre video.



**Figura 44:** andamento della contrazione del miotubo in esame (CTR) nel tempo, i punti rossi corrispondono al valore della media dei vettori spostamento massimi per i primi tre video

Per il miotubo di controllo analizzato, se si considerano solamente i primi tre video, i grafici ottenuti e i valori calcolati tendono a rispettare quanto ci si aspettava, cioè una tendenza della contrazione a decrescere col passare del tempo, seppur l'analisi è risultata difficile in quanto molti dei valori registrati non erano relativi al miotubo in esame, ma dati dal movimento di altre zone limitrofe o da rumore.

Ancora una volta, purtroppo, non si è riusciti a trovare alcuna coerenza a livello di frequenza di contrazione individuata dal picco ottenuto con la *fft*. Si è deciso tuttavia di riportare sia il metodo utilizzato per farlo, con tanto di codice Matlab in appendice, sia i grafici ottenuti grazie ad esso. Questi possono infatti fungere da base per eventuali sviluppi futuri.

### ***3.6 Analisi complessiva dei risultati e confronto tra i diversi trattamenti dei miotubi***

Fino a questo momento sono stati analizzati i risultati singolarmente, trattamento per trattamento, mentre in questa sezione si cercherà di fare un confronto generale tra trattamenti diversi.

I miotubi di controllo sono il caso che verrà considerato standard, cioè il caso di riferimento su cui poi basare le considerazioni in base al trattamento fatto con statina e/o coenzima Q. Si ricorda che a livello teorico il coenzima Q avrebbe dovuto far registrare tempi di contrazione più lunghi rispetto ai miotubi di controllo, mentre la statina tempi di contrazione più brevi.

Dunque, sempre basandosi sulla teoria, avremmo dovuto vedere i miotubi trattati con STAT 2.5 fermarsi nei tempi più brevi, seguiti da quelli trattati con STAT 0.6, da quelli di controllo CTR e da quelli trattati con coenzima Q, i più lenti a fermarsi. Il trattamento con statina e coenzima Q era il caso più complicato, in quanto le due sostanze avrebbero dovuto dare effetti opposti e dunque sarebbe stato difficile a prescindere prevedere la loro collocazione nella classificazione precedente.

Tuttavia è molto complicato riscontrare la veridicità di tutto ciò per diverse ragioni:

- Il primo fattore riguarda banalmente i miotubi, ovvero quelli trattati non erano provenienti tutti dalla stessa semina di partenza; quindi alcuni trattamenti sono stati applicati su miotubi molto “forti” in origine mentre altri su miotubi molto “fragili” e questo rende particolarmente difficile giudicare il comportamento della contrazione in relazione al trattamento, in quanto probabilmente incide di più lo stato iniziale dei miotubi.
- In secondo piano i video sono stati registrati manualmente, individuando i miotubi su cui registrare i video muovendosi all’interno del pozzetto. Questo crea ulteriore incertezza, infatti per alcuni miotubi il primo video registrato può essere stato fatto partire non appena il primo impulso di elettrostimolazione è stato mandato, mentre per altri dopo diversi minuti.

Ciò rende comprensibilmente difficile giudicare gli stati della contrazione nel tempo, in quanto il tempo 0 di un miotubo può essere diverso dal tempo 0 di un altro.

- Altro aspetto fondamentale in questa disamina riguarda il fatto che è stato quasi impossibile trovare zone all'interno dei pozzetti in cui un miotubo isolato si muovesse con tutti quelli intorno immobili. Da questo deriva che nell'applicazione del codice Matlab, e in particolare della tecnica del Block Matching, venissero registrati dei vettori spostamento non relativi al miotubo in esame, bensì a miotubi vicini. Se questo disturbo fosse stato costante nel valore per ogni video sarebbe stato facile renderlo irrilevante, ma ovviamente non è stato così ed eliminare un problema di questo tipo risulta molto complicato.
- In ultimo è possibile citare il grado di accuratezza del codice Matlab, infatti, per quanto assolutamente funzionante, avrebbe sicuramente bisogno di essere reso ancora più sofisticato per poter essere applicato anche a quei casi in cui si registrano altri miotubi muoversi o un segnale corrotto da rumore. Da qui si può comunque partire per eventuali sviluppi futuri.

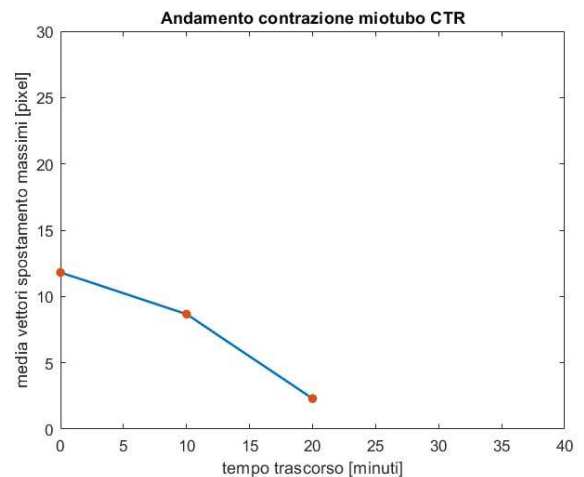
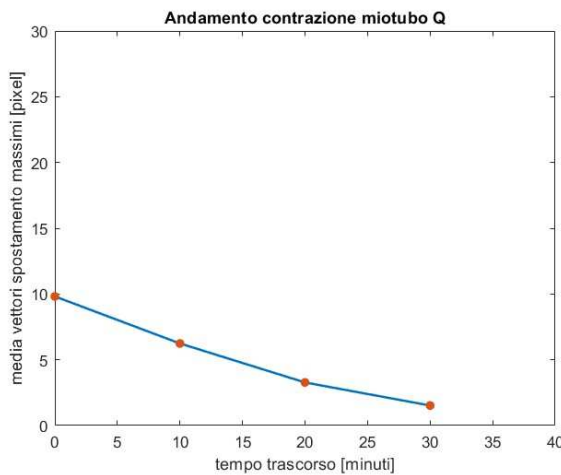
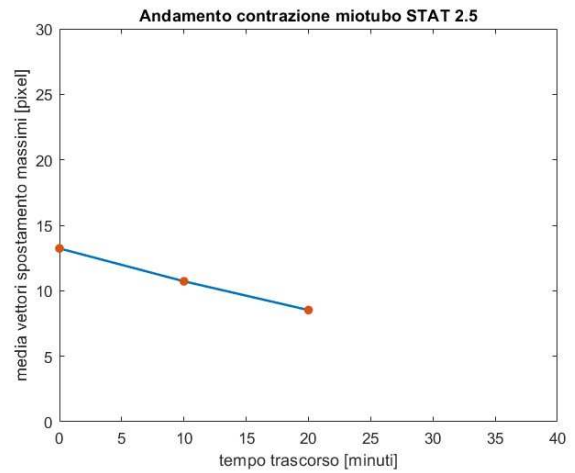
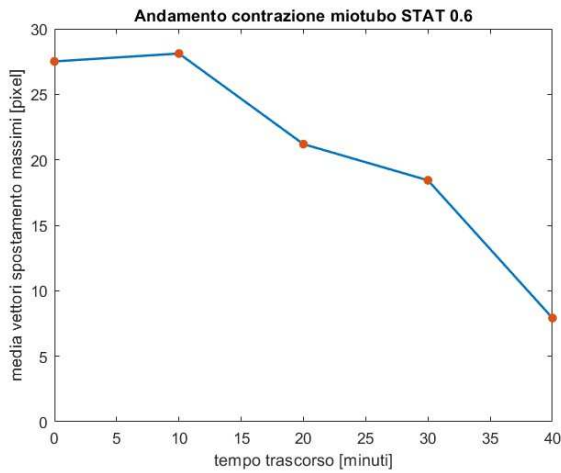
Fatte le giuste premesse si è cercato comunque di fare un confronto tra i trattamenti effettuati, escludendo solamente il caso dei miotubi trattati contemporaneamente con statina e coenzima Q, in quanto troppo influenzato dalla presenza di rumore indesiderato e dunque difficile da giudicare.

Inoltre si è scelto di non tener conto delle elaborazioni fatte tramite *fft*, in quanto hanno restituito risultati non attendibili, come già spiegato in precedenza.

Si è deciso di confrontare l'andamento delle medie dei vettori spostamento massimi per video per tutte le restanti condizioni di trattamento, valutando in particolare la pendenza di queste linee. Più la pendenza è ripida più il miotubo smette di contrarsi velocemente.

Si riportano nuovamente i grafici delle medie, già mostrati precedentemente in Figura 45, ma in questo caso con assi limitati agli stessi valori, così da avere un'idea ancora più chiara del confronto che si andrà ad effettuare tra trattamenti diversi:





**Figura 45:** andamento della contrazione (media dei vettori spostamento per video) dei miotubi rispettivamente nelle condizioni STAT 0.6, STAT 2.5, Q e CTR.

Osservando i grafici si nota che l'unica situazione in cui si verifica un'iniziale aumento di contrazione è quella del miotubo trattato con STAT 0.6, dove viene raggiunto il picco massimo dopo 10 minuti, mentre in tutti gli altri casi il picco è registrato nel primo video per poi avere un graduale decadimento dell'entità della contrazione. Dire se ciò è correlato al trattamento risulta complicato e servirebbero analisi di ulteriori video.

Si è pensato anche di valutare la relazione tra trattamento e tempistiche di contrazione attraverso la Tabella 10, che mostra il decadimento percentuale video dopo video della media dei vettori spostamento massimi di ognuna delle quattro condizioni di trattamento approfondite:

**Tabella 10:** *decadimento percentuale della media dei vettori spostamento massimi video dopo video per ognuna delle quattro condizioni di trattamento analizzate*

	<b>STAT 0.6</b>	<b>STAT 2.5</b>	<b>Q</b>	<b>CTR</b>
<b>Video 1</b>	27.5098 px	13.2326 px	9.8160 px	11.8127 px
<b>Video 2</b>	Aumento del 2%	Diminuzione del 23%	Diminuzione del 36%	Diminuzione del 27%
<b>Video 3</b>	Diminuzione del 23%	Diminuzione del 36%	Diminuzione del 67%	Diminuzione del 81%
<b>Video 4</b>	Diminuzione del 33%	X	Diminuzione del 85%	X
<b>Video 5</b>	Diminuzione del 71%	X	X	X

La tabella aiuta a capire il reale decadimento nel tempo della contrazione in relazione al trattamento effettuato. Ci sono dei fattori che rispettano quanto atteso mentre altri che sono completamente in contrasto.

- ✓ Si nota ad esempio che la contrazione dei miotubi trattati con STAT 2.5 decade più rapidamente di quelli trattati con STAT 0.6. Questo risulta essere verosimile in quanto una maggiore quantità di statina dovrebbe velocizzare il percorso di contrazione e far “stancare” prima i miotubi.
- ✓ È assolutamente anomalo, tuttavia, che i miotubi di controllo decadano più velocemente di quelli trattati con statina e addirittura più lentamente di quelli trattati con coenzima Q, che dovrebbero essere i più lenti a terminare la propria contrazione e invece sono i più rapidi.

Complessivamente si può affermare che da un lato è possibile analizzare il comportamento dello stesso miotubo in contrazione nel corso di video successivi, intervallati di 10 minuti, con buona riuscita, ma dall’altro è davvero complicato fare un confronto tra le elaborazioni fatte su video di miotubi diversi e trattati in condizioni differenti.

## ***CONCLUSIONI***

In seguito allo studio fatto si può concludere che la tecnica del Block Matching è un ottimo metodo per valutare l'evolversi del campo di spostamento di miotubi murini in video successivi, in quanto riesce a quantificare in numeri e grafici l'andamento della contrazione del miotubo in esame. Bisogna solo stare attenti in quei casi in cui vi sono un numero molto elevato di outliers che possono portare a risultati incoerenti. Visionare l'evolversi dei vettori spostamento frame per frame mentre il codice elabora il video è un ottimo modo per comprendere se si sta misurando il reale spostamento del miotubo in esame, o solo interferenze circostanti.

Risulta invece più complesso utilizzare questa tecnica per fare confronti tra miotubi diversi o trattati diversamente, in quanto i valori trovati dei vettori spostamento non sono confrontabili e, anche se si prova a fare un paragone basandosi sul decadimento percentuale della contrazione, in ogni caso si arriva spesso a risultati non coerenti.

Il fattore principale che ha portato a tale incoerenza è sicuramente la presenza di tanti outliers registrati in fase di elaborazione video. Se, in linea generale, si può dire che essi non determinano anomalie nell'analisi di video dello stesso miotubo, decisamente invece lo fanno quando si confrontano miotubi diversi. Ciò è evidente dal fatto che, ad esempio, i miotubi trattati con coenzima Q decadono nella contrazione più velocemente dei miotubi trattati con statina, quando dovrebbe essere esattamente il contrario.

Altro elemento fondamentale che ha creato queste illogicità è la dipendenza dei valori trovati dalle caratteristiche dei miotubi di partenza, più che dal trattamento effettuato su di essi. Da questa constatazione deriva che miotubi più "resistenti" in principio, seppur trattati con statina, si contraggono più a lungo di miotubi più "fragili" trattati con coenzima Q. Idealmente si sarebbero dovuti usare sempre gli stessi identici miotubi di partenza.

## ***Sviluppi futuri***

Nonostante alcune delle analisi fatte non hanno portato a confermare le ipotesi ideate inizialmente, questo progetto getta le basi per possibili sviluppi futuri, che possano perfezionare il metodo utilizzato e portare a risultati più coerenti.

Il primo possibile miglioramento riguarda l'acquisizione dei video: durante questa fase si è cercato di ottenere video con una messa a fuoco ed un'esposizione alla luce ottimali, tuttavia video registrati con qualità superiore avrebbero sicuramente portato a risultati migliori. Dunque servirebbe un passo in avanti da questo punto di vista per avere una risoluzione grafica migliore, poter dividere l'immagine in blocchi di pixel più piccoli e registrare i vettori spostamento in maniera più accurata.

Altro aspetto fondamentale riguarda il codice Matlab utilizzato per l'applicazione della tecnica del Block Matching. Enormi step in avanti deriverebbero dalla selezione di una finestra più ristretta dei frame del video di partenza, infatti ciò risolverebbe il problema della registrazione di tutti i vettori spostamento non inerenti al miotubo in esame, ma dati dai miotubi limitrofi o da semplice rumore. Un ulteriore perfezionamento sarebbe dato da analisi approfondite sui parametri adoperati nella funzione *Vision.BlockMatcher*, che, se modificati nel giusto modo, possono portare a risultati migliori.

Inoltre un suggerimento potrebbe essere quello di utilizzare la stessa semina di miotubi di partenza e trattarli in modo differente, per poi elaborare video essendo sicuri che i risultati ottenuti non derivino dalle caratteristiche dei miotubi di partenza, ma solo dal trattamento effettuato.

Infine un'analisi svolta su un numero maggiore di video consecutivi dello stesso miotubo e su un numero maggiore di miotubi diversi può sicuramente portare ad un'indagine più completa e a diminuire le anomalie create dalla specificità dei miotubi in esame.

## ***Bibliografia e sitografia***

- [1] Statine. Tratto da SapereSalute.it.  
Available: <https://www.saperesalute.it/statine/>
- [2] Vitamina Q (coenzima Q). Tratto da IRCC Humanitas Research Hospital.  
Available: <https://www.humanitas.it/enciclopedia/vitamine/vitamina-q-coenzima-q/#:~:text=La%20vitamina%20Q%2C%20o%20coenzima,fegato%2C%20il%20pancreas%20e%20i%20reni.>
- [3] Microscopio BioTek Lionheart FX. Tratto da Agilent. Available: <https://www.agilent.com/en/product/cell-analysis/cell-imaging-microscopy/automated-cell-imagers/biotek-lionheart-fx-automated-microscope-1623188>
- [4] *Block Matching*. Available: <https://it.mathworks.com/help/vision/ref/vision.blockmatcher-system-object.html>.
- [5] *Quiver*. Available: <https://it.mathworks.com/help/matlab/ref/quiver.html>.
- [6] *Fast Fourier transform*. Available: <https://it.mathworks.com/help/matlab/ref/fft.html>.

## Appendice

Si riporta qui di seguito il codice Matlab utilizzato in fase di elaborazione e analisi dei video per l'applicazione della tecnica del Block Matching [4]:

```
%% load video
video = importdata('240523_111244.mp4');
size(video)

%% initial frame identification

for ii=1:size(video,4)
    videomiotubo_gray_double(:,:,ii)=im2double(rgb2gray(video(:,:,,ii)));
    videomiotubo_gray(:,:,ii)=rgb2gray(video(:,:,,ii));
end

figure
for ii=1:size(videomiotubo_gray,3)
    surf(videomiotubo_gray(:,:,ii),'EdgeColor','none')
    view([0 90])
    title(['frame', num2str(ii)])
    pause(1)
end

%% select initial frame and set parameters matching
ini_frame = 1;
img1 = im2double(im2gray(video(:,:,,ini_frame)));
% Create a block matcher and alpha blender object.
size_ROI = 35;
hbm = vision.BlockMatcher("ReferenceFrameSource",...
    "Input port","BlockSize",[size_ROI size_ROI]);
hbm.MaximumDisplacement = [35 35];
hbm.OutputValue = "Horizontal and vertical components in complex form";
% Offset the first image by [5 5] pixels to create a second image.

%% motion estimation
figure
for jj = 1:size(video,4)-ini_frame
    img2 = im2double(im2gray(video(:,:,,jj+ini_frame)));
    % Compute motion for the two images.
    motion(:,:,jj) = hbm(img1,img2);
    max_motion(jj) = max(max(abs(motion(:,:,jj))));
    avg_motion(jj) = mean(abs(motion(:,:,jj)),[1 2]);
    % Use a quiver plot to show the direction of motion on the images.
    [X,Y] = meshgrid(1:size_ROI:size(img1,2),1:size_ROI:size(img1,1));
```

```

subplot(311)
imshow(img2)
hold on
quiver(X,Y,5*real(motion(:,:,jj)),5*imag(motion(:,:,jj)),0,'LineWidth',2)
hold off
title(num2str(jj))

subplot(312)
scatter(jj,max_motion(jj),'filled','b')
hold on
xlim([1 size(video,4)-ini_frame])
xlabel('frames')
ylabel('motion max')
title('Video 2 miotubo 0.6')

subplot(313)
scatter(jj,avg_motion(jj),'filled','r')
hold on
xlim([1 size(video,4)-ini_frame])
xlabel('frames')
ylabel('motion mean')
pause(0.1)
end

%% graph max_motion frame by frame
mean_motion= mean(max_motion);
figure
plot(max_motion)
xlabel('frames')
ylabel('max motion (px)')
title ('video 2 miotubo 0.6')
yline(mean_motion, '--r', 'LabelHorizontalAlignment', 'left');
hold off
xlim([0 90])
ylim([0 50])

```

```

%% FFT calculation of max_motion
Fs = 10; % Frequenza di campionamento (ipotesi: 10 fps)
L = length(max_motion); % Lunghezza del segnale

Y = fft(max_motion); % Calcola la FFT
P2 = abs(Y/L); % Doppio lato spettrale
P1 = P2(1:L/2+1); % Singolo lato spettrale
P1(2:end-1) = 2*P1(2:end-1); % Normalizza

%% Plot della FFT
figure;
plot(f, P1)
title('Spettro FFT di max_motion video 2 miotubo 0.6')
xlabel('Frequenza (Hz)')
ylabel('Ampiezza')
grid on

%% Plot delle medie
% x = vettore con valori delle medie per video
% y = vettore con valori da 0 a N minuti di 10 minuti in 10 minuti,
% dove N = (numero video - 1)*10
figure;
plot(x, y, '-', 'LineWidth', 1.5);
hold on;
plot(x, y, '.', 'MarkerSize', 20);

xlabel('tempo trascorso [minuti]')
ylabel('media vettori spostamento massimi [pixel]')

```



## *Ringraziamenti*

Per concludere questo mio elaborato vorrei ringraziare tutti coloro che hanno dato il proprio contributo e reso realtà uno dei traguardi più importanti della mia vita.

Per iniziare vorrei esprimere la mia gratitudine alla mia relatrice, prof.ssa Milena Martarelli, e al mio correlatore, dr. Alessandro Annessi, per l'accuratezza e la dedizione con cui hanno seguito lo svilupparsi di questo progetto.

Ai miei genitori, Nadia e Alessandro, per avermi supportato nei periodi più impegnativi e per aver gioito con me in quelli più soddisfacenti. Senza di loro tutto questo non sarebbe stato possibile.

A mio fratello, Danilo, per essere stato la mia guida ed il mio modello, per avermi sempre aiutato a credere che avrei raggiunto i miei obiettivi. Se sono riuscito a spingermi oltre quelli che credevo fossero i miei limiti è soprattutto grazie a lui.

Alla mia metà, Camilla, per l'amore che mi ha sempre dimostrato e che mi dimostra quotidianamente, per la dolcezza con cui mi culla nelle giornate più dure e per rendere speciale ogni attimo passato insieme.

A tutta la mia famiglia, per il legame speciale che mi unisce ad ognuno di loro. In particolare a Matilde, ultima arrivata da poco più di due anni, che con la sua innocenza e purezza mi ha rallegrato il cuore e regalato sorrisi, semplicemente trascorrendo qualche minuto con lei.

Infine, grazie ai miei meravigliosi nonni e alla mia cara bisnonna, Rosa, che ci ha lasciato qualche anno fa, ma che mi è sempre vicina: sono sicuro che è fiera di me e del cammino che mi ha portato fin qui, da quando mi coccolava appena nato tra le sue braccia al raggiungimento di questa laurea triennale in Ingegneria Biomedica.

Voglio tanto bene ad ognuno di voi.

Grazie davvero di tutto.