

Analisi d'immagine

L'analisi d'immagine si propone di trarre dalle immagini informazioni significative in esse contenute.

Si basa sulla digitalizzazione delle immagini. Un'immagine digitalizzata è costituita da un certo numero di pixel. Un **pixel** (*picture element*) è il più piccolo elemento autonomo dell'immagine.

Più pixel compongono una certa immagine, maggiore è la definizione dell'immagine stessa. Il numero di pixel da cui è composta l'immagine ne determina la risoluzione.

Ogni pixel è caratterizzato da un colore e da un'intensità, che possono essere espressi numericamente in diverse scale. Se si considera solo il bianco e il nero, i valori possibili sono solo 0 (nero) o 1 (bianco); se si considera una scala di grigi, i valori considerati sono in genere 256 (da 0=nero a 255= bianco); nel caso del colore, le cose sono più complesse, ed esistono diversi modelli di rappresentazione del colore.

Il modello RGB (Red, Green, Blue), considera 3 colori fondamentali, rosso, verde e blu, ciascuno su una scala da 0 (nero) a 255 (colore puro); le combinazioni possibili di tutti questi valori sono $256 \times 256 \times 256 = 16,777,216$ milioni di colori. Il modello RGB può essere rappresentato da un cubo, in cui le tre dimensioni sono i tre colori fondamentali. Il colore di ogni pixel è definito da un valore per ciascuno dei 3 colori fondamentali e ha quindi una sua posizione in questo cubo. I valori 0/0/0 e 255/255/255 corrispondono rispettivamente al nero e al bianco. Valori intermedi fra 0 e 255 uguali per tutti e tre i colori costituiscono la scala di grigi; 255/0/0, 0/255/0 e 0/0/255 corrispondono ai singoli colori fondamentali, ecc. Perciò ogni immagine può essere definita dalla posizione e dai valori RGB dei suoi pixel.

Tuttavia il nostro occhio non è sensibile allo stesso modo ai tre colori fondamentali, ed è più sensibile alle differenze di luminosità che a quelle di colore, cioè distingue più facilmente differenze di intensità dello stesso colore che differenze di sfumatura. E' stato quindi elaborato anche un altro modello, che tiene più conto della percezione da parte dell'occhio umano, il modello HSI (Hue, Saturation, Intensity). Hue è la tinta, e dipende dalla lunghezza d'onda dominante nel colore; Saturazione è la purezza del colore, e dipende dalla quantità di bianco aggiunto al colore puro (il colore bianco ha $S=0$); Intensità è la brillantezza del colore, e dipende dalla quantità di nero aggiunto (il colore nero ha $I=0$). Lo spazio HSI può essere rappresentato con un cono, in cui Hue è rappresentata sulla base dall'angolo ($0^\circ/360^\circ$ = rosso, 120° = verde, 240° = blu), S dalla posizione lungo il raggio (al centro $S=0$, sulla circonferenza $S=1$ o 100 a seconda della scala usata), I dall'altezza (al vertice $I=0$, alla base $I=1$ o 100).

Il colore di ogni pixel quindi è definito da un valore per ciascuno dei 3 colori fondamentali. Essendo ciascun pixel caratterizzato in termini numerici, è possibile trattare l'immagine matematicamente ed elaborarla, quantificare alcuni parametri, confrontarla con altre.

Miglioramento della qualità dell'immagine

Può essere aumentato il contrasto fra zone chiare e zone scure, per esempio abbassando i valori delle zone più scure (rendendole quindi più scure) e aumentando quelli delle zone più chiare (rendendole più chiare) oppure espandendo l'istogramma dell'immagine su un numero di valori più ampio (per esempio, se su una scala di grigi i valori dei pixel di un'immagine sono tutti compresi fra 100 e 150, si può applicare una funzione che trasformi i valori in modo che siano distribuiti su tutta la scala dei livelli di grigio).

Segmentazione dell'immagine

E' possibile separare ed evidenziare diverse parti dell'immagine: per esempio, se si hanno nuclei scuri su un fondo grigio più chiaro, l'istogramma dei valori sarà composto da due picchi, uno per i nuclei e l'altro per il fondo. Si può quindi stabilire un valore soglia, al di sopra del quale si trova il fondo e al di sotto del quale si trovano i nuclei, e trasformare l'immagine in un'immagine binaria in bianco e nero, dando il valore 0 a tutti i pixel del primo picco (i nuclei saranno neri) e il valore 1 a

tutti i pixel del secondo picco (il fondo sarà bianco). Oppure si potranno delimitare i confini fra gli oggetti e il fondo, sulla base delle discontinuità fra pixel vicini: dove c'è il confine fra l'oggetto e il fondo la differenza di intensità fra i pixel sarà superiore a un certo valore, mentre all'interno dell'oggetto o all'interno del fondo le differenze sono più gradualità.

Una volta segmentata l'immagine, si potrà rendere più evidenti i diversi componenti attribuendo loro diversi falsi colori.

Analisi quantitative

In opportune condizioni, l'analisi d'immagine permette di determinare le caratteristiche morfologiche (area, perimetro, forma), l'intensità della colorazione ecc. degli oggetti e, se queste costituiscono caratteristiche tipiche di certi oggetti, è possibile elaborare sistemi di riconoscimento automatico.

Si possono per esempio quantificare:

area: numero di pixel che formano l'immagine

perimetro: numero di pixel che delimitano l'immagine

asse maggiore (altezza): linea più lunga che può essere tracciata tra due punti dell'immagine

asse minore (spessore): linea più lunga perpendicolare all'asse maggiore

Anche la forma dell'oggetto può essere espressa con parametri quantitativi, e questo è importante nel caso delle cellule, perché il differenziamento delle cellule stesse o diversi trattamenti o patologie possono manifestarsi come cambiamenti di dimensioni, ma anche di forma.

Per descrivere la forma sono stati elaborati diversi parametri, per esempio:

aspetto: rapporto fra asse maggiore (altezza) e asse minore (spessore); più alto è il valore, più la forma è allungata, ma forme ugualmente allungate con contorno molto diverso (più o meno frastagliato) hanno valori di questo rapporto molto vicini.

Ci vogliono quindi più parametri per descrivere la forma di un oggetto. Sono stati elaborati molti sistemi diversi, con diverse denominazioni, per cui è necessario definire bene i parametri che si usano. Per definire con maggiore completezza un oggetto, si può per esempio utilizzare la combinazione di questi tre parametri:

- **circolarità** (somiglianza a perfetto cerchio), definibile come: rapporto fra il perimetro di un cerchio avente la stessa area dell'oggetto e il perimetro dell'oggetto; se l'oggetto è un cerchio, la circolarità è 1; se la forma è allungata e/o il contorno frastagliato, il valore si abbassa; tuttavia un oggetto non molto allungato con contorno frastagliato potrà avere circolarità simile a un oggetto allungato con superficie liscia; la circolarità quindi non dà conto della lunghezza dell'oggetto e della irregolarità della superficie.

- **convessità** indice della regolarità della superficie; se la superficie è liscia il valore è 1; più la superficie è irregolare, più si abbassa il valore; tuttavia, oggetti lisci di qualunque forma (circolari, ellittici, quadrati ecc.) avranno sempre valore 1;

- **allungamento** = $(1 - \text{asse minore} / \text{asse maggiore})$; un oggetto con assi uguali (es. un cerchio o un quadrato) ha valore 0; più diversi sono gli assi, più il valore si approssima a 1, ma oggetti con stesso rapporto altezza/spessore avranno lo stesso valore, indipendentemente dal fatto che siano rettangolari, ellittici o con contorno frastagliato.

La combinazione dei tre parametri permette di caratterizzare bene le diverse forme l'una dall'altra.

Applicazioni

Riconoscimento automatico, conteggio e misurazione degli oggetti

I singoli oggetti vengono identificati delineandone i confini rispetto al fondo; vengono quindi numerati progressivamente, contati e per ciascuno di essi vengono misurati i parametri di interesse; i dati vengono elaborati statisticamente, e possono essere confrontati i dati relativi a diversi campioni (ad esempio: forma e dimensioni di grani di riso di diverse varietà; determinazione delle dimensioni e della forma di globuli rossi, che possono essere indicatori di diverse patologie; numero e lunghezza di neuriti; dimensioni e forma di fibre muscolari in biopsie; riconoscimento e determinazione della percentuale di cellule marcate dopo reazione immunocitochimica; riconoscimento e conteggio automatico degli spot fluorescenti dopo ibridazione in situ per il DNA).

Sovrapposizione di immagini

La sovrapposizione di immagini dello stesso campo, ottenute con filtri diversi (es. fluorescenza su Contrasto di fase o DIC; doppia o tripla fluorescenza) o di sezioni successive trattate in modo diverso (es. immunocitochimica su due sezioni seriali con anticorpi diretti contro proteine diverse), permette di verificare la localizzazione di una marcatura nella cellula, o la colocalizzazione di sostanze diverse. Nel caso di doppia o tripla fluorescenza, le immagini possono essere acquisite singolarmente in scala di grigi, colorate ciascuna con un falso colore corrispondente alla lunghezza d'onda di emissione del fluorocromo, e sovrapposte l'una sull'altra, oppure acquisite direttamente a colori e sovrapposte in trasparenza come tali.

Determinazione dell'intensità della colorazione in cellule pigmentate

Con software opportuno, si può determinare l'intensità media dei parametri del colore (p.es HSI) per ciascuna cellula e studiare la distribuzione di questi valori in una popolazione; operando in condizioni standardizzate di illuminazione, acquisizione ecc. è quindi possibile confrontare la distribuzione dell'intensità della colorazione (e quindi per esempio la produzione di pigmento) in diverse popolazioni, e verificare l'effetto di diversi trattamenti, volti per esempio a incrementare la produzione di pigmento.