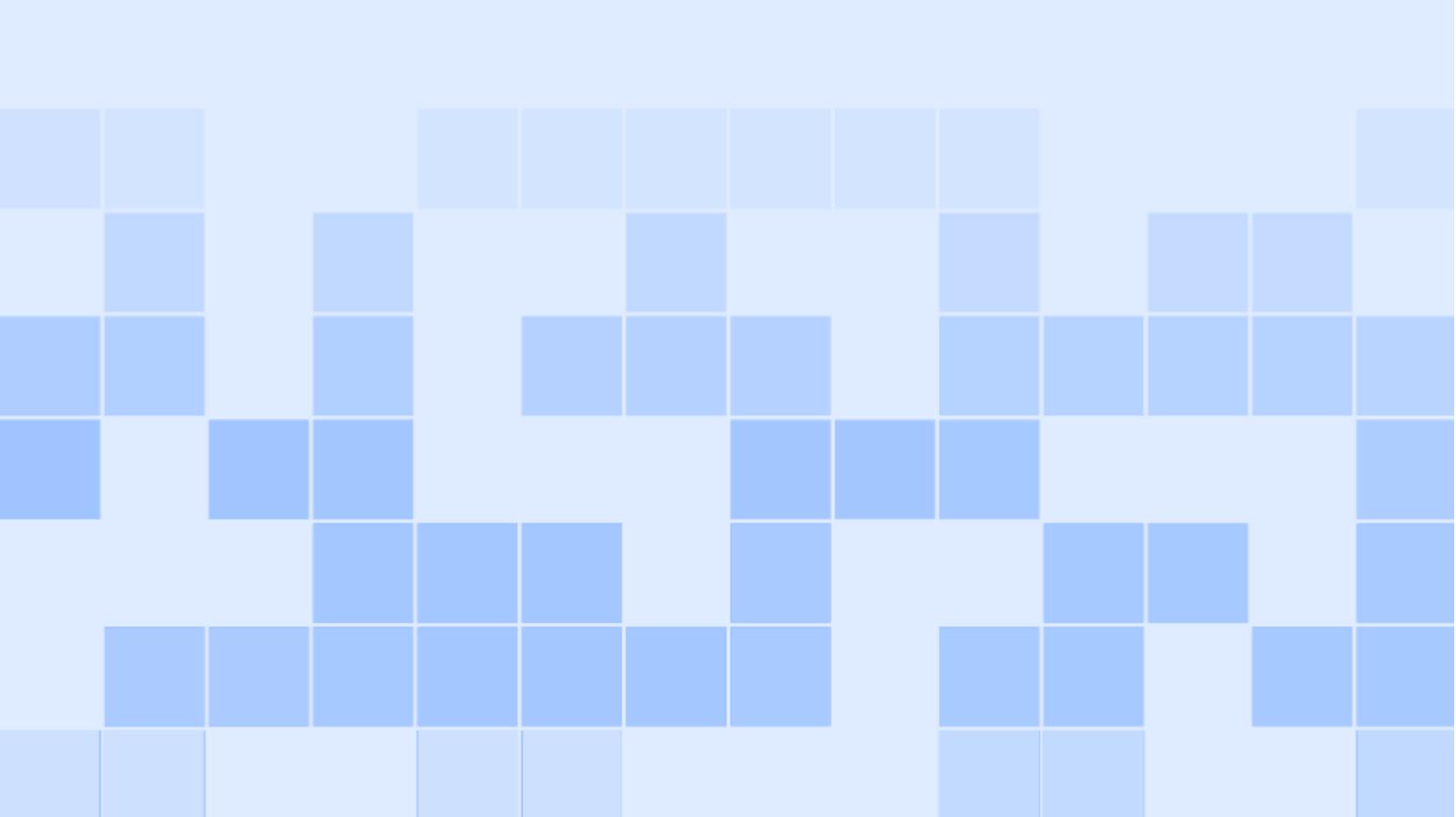


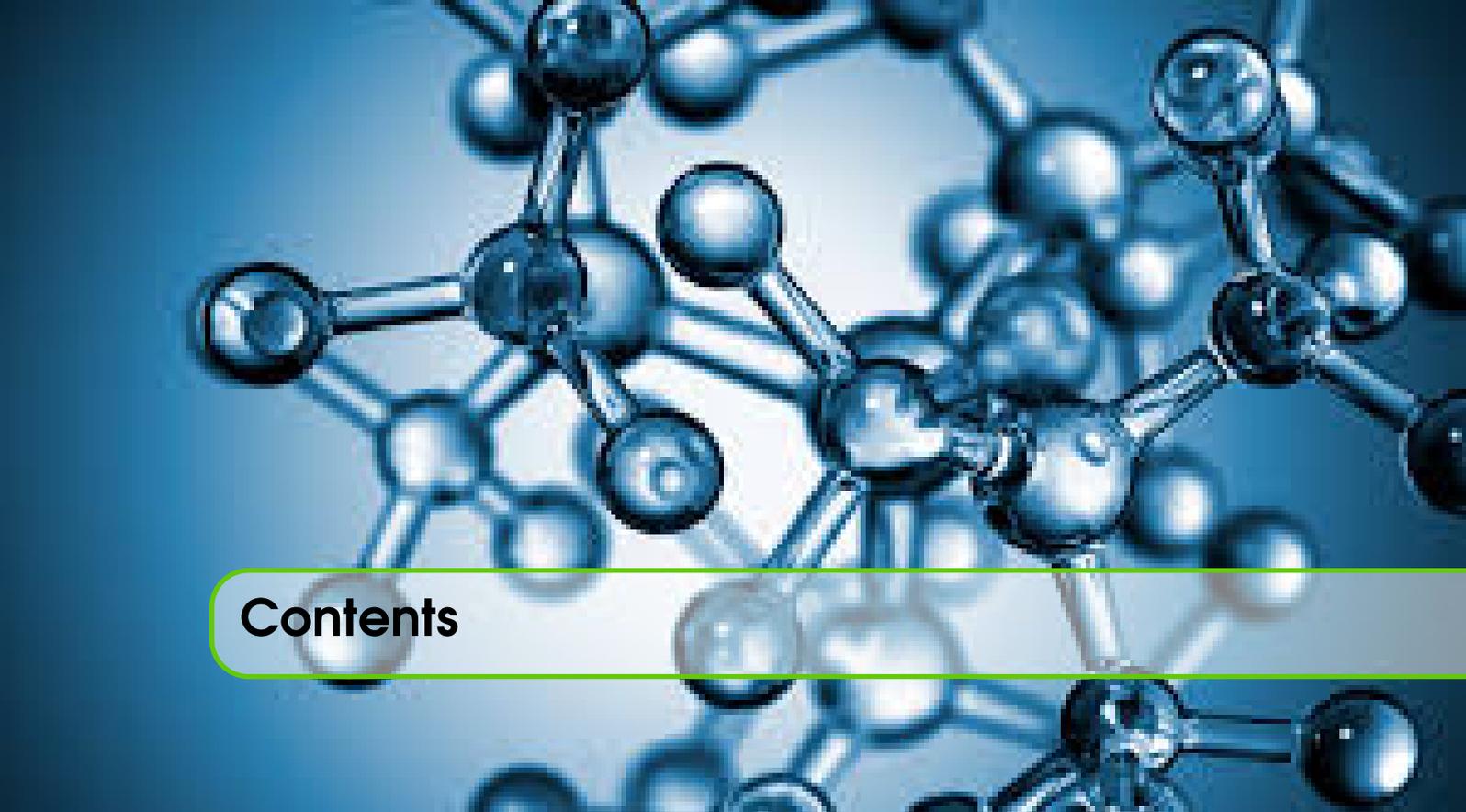
# **APPUNTI DI MICRO E NANO BIOSCOPIA**

**6 CFU**

**Arti Ahluwalia, Chiara Magliaro**







# Contents

I	Parte Prima	
<b>1</b>	<b>Le onde elettromagnetiche - Luce e Raggi X</b> .....	<b>3</b>
1.1	Lo spettro elettromagnetico	3
1.2	La luce	5
1.3	I raggi X	6
<b>2</b>	<b>Ottica</b> .....	<b>9</b>
<b>2.1</b>	<b>Ottica Geometrica</b>	<b>9</b>
2.1.1	Sorgenti luminose e corpi illuminati .....	9
2.1.2	Principio di Fermat .....	10
2.1.3	Riflessione .....	10
2.1.4	Rifrazione .....	11
2.1.5	Applicazione delle leggi della riflessione e della rifrazione .....	14
<b>2.2</b>	<b>Ottica Ondulatoria</b>	<b>20</b>
<b>2.3</b>	<b>Ottica molecolare</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>Strumenti ottici</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1</b>	<b>L'occhio umano</b>	<b>25</b>
3.1.1	Difetti visivi .....	26
<b>3.2</b>	<b>Componenti di un microscopio</b>	<b>28</b>
3.2.1	Sorgenti di luce di un microscopio ottico .....	30
3.2.2	Diffrazione della luce e risoluzione spaziale .....	30
3.2.3	Il condensatore .....	31
3.2.4	Gli obiettivi .....	31

<b>3.3</b>	<b>Diversi tipi di microscopio</b>	<b>31</b>
<b>3.4</b>	<b>La Optical Coherence Tomography (OCT)</b>	<b>31</b>
3.4.1	Principio di funzionamento dell'interferometria - l'interferometro di Michelson	32
3.4.2	Dall'interferometro all'OCT	33
<b>4</b>	<b>La micro-CT</b>	<b>37</b>
<b>4.1</b>	<b>Principi di funzionamento</b>	<b>37</b>
<b>4.2</b>	<b>Calcolo del profilo di assorbimento</b>	<b>40</b>
4.2.1	Radiografia vs Tomografia	41

## II

## Parte Seconda

<b>5</b>	<b>Come si forma una immagine</b>	<b>45</b>
<b>5.1</b>	<b>Acquisizione delle immagini</b>	<b>45</b>
5.1.1	Un semplice esempio di formazione dell'immagine	46
<b>6</b>	<b>Elementi di image processing usando MATLAB</b>	<b>47</b>
<b>6.1</b>	<b>Cos'è una immagine?</b>	<b>47</b>
6.1.1	Le immagini digitali	47
6.1.2	<b>MATLAB e le immagini: cosa sono e come le visualizzo</b>	48
6.1.3	Ottenere informazioni della tua immagine	50
6.1.4	<b>Data types e conversioni</b>	50
6.1.5	Proprietà di una immagine	50
<b>6.2</b>	<b>Cos'è l'image processing?</b>	<b>51</b>
6.2.1	A cosa serve l'image processing?	51
6.2.2	Un esempio di image processing task	53
6.2.3	Step dell'elaborazione	53
6.2.4	Classificazione dei metodi di processing	53
<b>6.3</b>	<b>Trasformazioni del dominio spaziale</b>	<b>54</b>
6.3.1	Istogramma dei livelli di grigio	54
6.3.2	Operazioni aritmetiche	55
6.3.3	Le trasformazioni di intensità	55
6.3.4	Funzione di trasformazione lineare a tratti	56
<b>6.4</b>	<b>Filtraggio spaziale</b>	<b>58</b>
6.4.1	Creazione di maschere per filtri spaziali	59
<b>6.5</b>	<b>Segmentazione</b>	<b>62</b>
6.5.1	Segmentazione per continuità	62
6.5.2	Operazioni morfologiche	63
<b>6.6</b>	<b>Elaborazione di immagini a colori</b>	<b>64</b>
6.6.1	Considerazioni di base sul colore	65
6.6.2	I modelli colore	65
6.6.3	Elaborare immagini a colori	68
<b>7</b>	<b>Metodi di chiarificazione tissutale per imaging</b>	<b>71</b>
<b>7.1</b>	<b>Le principali tecniche di chiarificazione: descrizione e comparazione</b>	<b>72</b>
<b>7.2</b>	<b>Come ottimizzare la procedura di chiarificazione?</b>	<b>73</b>

7.3	Conclusioni e prospettive future	73
8	<b>Matlab</b> .....	77
8.1	Nozioni di base	77



# Parte Prima

<b>1</b>	<b>Le onde elettromagnetiche - Luce e Raggi X</b> .....	<b>3</b>
1.1	Lo spettro elettromagnetico	
1.2	La luce	
1.3	I raggi X	
<b>2</b>	<b>Ottica</b> .....	<b>9</b>
2.1	Ottica Geometrica	
2.2	Ottica Ondulatoria	
2.3	Ottica molecolare	
<b>3</b>	<b>Strumenti ottici</b> .....	<b>25</b>
3.1	L'occhio umano	
3.2	Componenti di un microscopio	
3.3	Diversi tipi di microscopio	
3.4	La Optical Coherence Tomography (OCT)	
<b>4</b>	<b>La micro-CT</b> .....	<b>37</b>
4.1	Principi di funzionamento	
4.2	Calcolo del profilo di assorbimento	





# 1. Le onde elettromagnetiche - Luce e Raggi X

Supponiamo di avere un elettrone immobile; esso genera, a causa della sua carica, una forza elettrica nello spazio circostante - il campo elettrico - che diminuisce come l'inverso del quadrato della distanza.

Supponiamo ora di far oscillare avanti e indietro l'elettrone: il campo elettrico nei punti circostanti viene perturbato a causa del cambiamento di distanza dall'elettrone durante la sua oscillazione.

Una variazione di campo elettrico genera un campo magnetico. Queste oscillazioni del campo elettrico — e quindi anche del campo magnetico — si propagano dall'elettrone generando le **onde elettromagnetiche** (si veda Fig. 1.1).

Un secondo elettrone, che si trovi fermo ad una certa distanza dal primo, comincerà ad oscillare non appena investito dall'onda elettromagnetica prodotta da quell'elettrone. Anche il campo elettrico del secondo elettrone, allora, verrà perturbato dalle sue oscillazioni e genererà a sua volta un campo magnetico, consentendo così la propagazione dell'onda stessa.

Le dimensioni di un'onda, cioè l'ampiezza, danno una misura dell'intensità dell'onda elettromagnetica, ovvero dell'energia del campo elettromagnetico da essa trasportata.

## 1.1 Lo spettro elettromagnetico

A coronamento della sua opera, Maxwell nella seconda metà dell'800 dimostrò che un raggio di luce è una configurazione di campi elettrici e magnetici in moto, cioè un'onda elettromagnetica e che l'ottica, cioè lo studio della luce visibile, è una branca dell'elettromagnetismo. Ai tempi di Maxwell, la luce visibile e le radiazioni infrarosse erano le uniche radiazioni elettromagnetiche conosciute. Stimolato dalle previsioni di Maxwell, tuttavia, Hertz scoprì quelle che oggi vengono dette onde radio e verificò che esse si muovevano nel laboratorio alla stessa velocità della luce visibile.

Come si vede da Fig. 1.2, oggi si conosce un intero spettro di onde elettromagnetiche.

La scala delle lunghezze d'onda (e analogamente la corrispondente scala delle frequenze) è solitamente disegnata in modo che ogni trattino della scala rappresenti una variazione di lunghezze d'onda (e analogamente di frequenza) di un fattore 10.

Da un lato dello spettro troviamo le onde radio, che hanno una lunghezza d'onda miliardi di volte

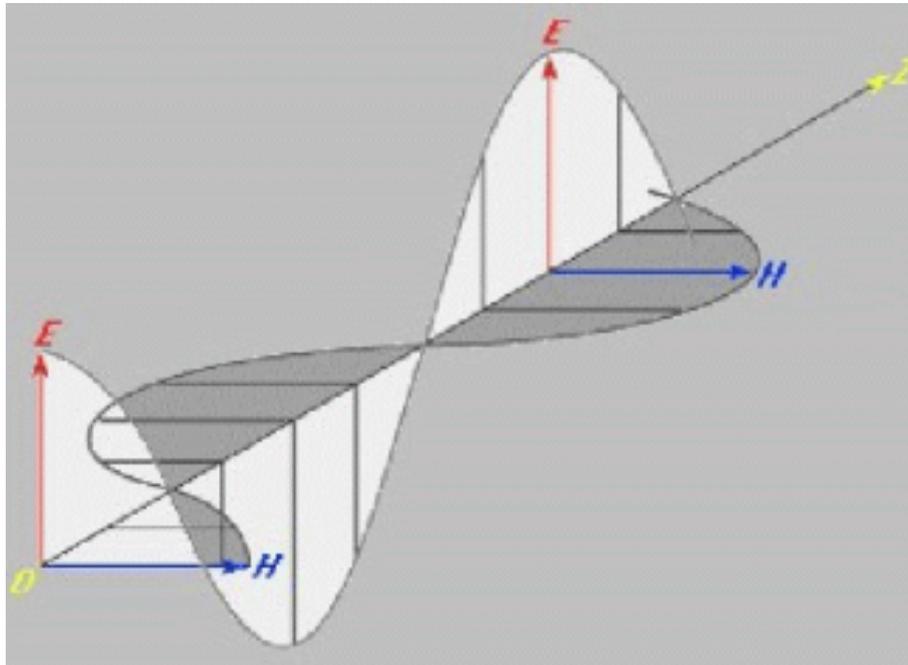


Figure 1.1: Rappresentazione grafica della propagazione nello spazio di un'onda elettromagnetica

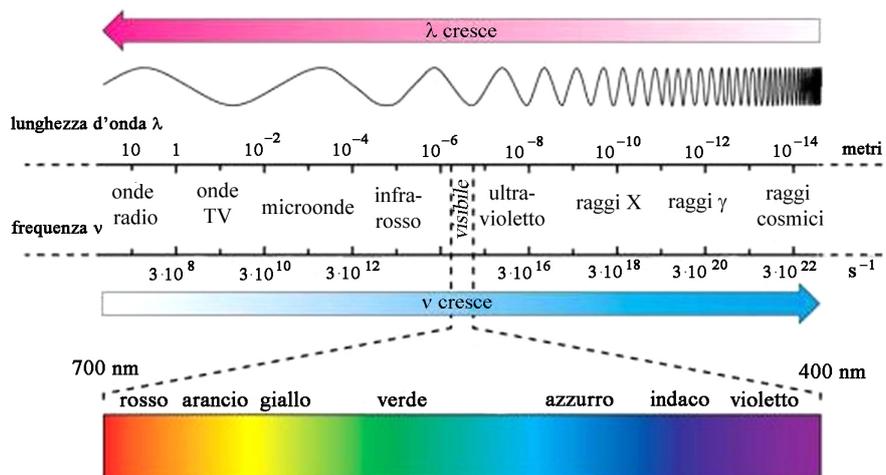


Figure 1.2: Spettro elettromagnetico e finestra della luce visibile

piu' grande rispetto alle onde della luce visibile.

Poi abbiamo le microonde, caratterizzate dal fatto che sono molto assorbite dall'acqua.

Poi abbiamo i raggi infrarossi, a cui e' associata energia termica (non si parla di movimenti di elettroni quanto piuttosto a movimenti di molecole o atomi).

A "destra" della luce visibile abbiamo i raggi ultravioletti, che sono dovuti allo spostamento di un elettrone nell'orbitale piu' esterno (non viene rimosso come nel caso dei raggi C, ma solo allontanato ad uno stato piu' energetico), portando a un cambiamento del livello energetico e a una sollecitazione dell'elettrone. Questi sono divisi in tre sottocategorie e hanno una banda molto stretta.

Ancora piu' a destra abbiamo i raggi X, che si generano quando un atomo viene ionizzato, cioe' quanto viene tolto un elettrone dagli orbitali piu' esterni.

I raggi gamma, invece, occupano la parte terminale dello spettro, la cui lunghezza d'onda e' milioni di volte piu' piccola di quelle della luce visibile. Esse sono generate quando si ha un atomo con peso atomico molto grande (ad esempio, l'uranio) che si scinde (fissione) in due atomi piu' piccoli. Si ha una accelerazione delle cariche positive e negative che si spostano nello spazio e si dividono. Il risultato e' l'onda elettromagnetica gamma.

Sia la luce che i raggi X sono prodotti da transizioni degli elettroni atomici tra orbite diverse; in particolare, mentre la transizione tra orbite esterne determina l'emissione di radiazione luminosa, quella tra i livelli energetici piu' interni provoca emissione di radiazione alle frequenze proprie dei raggi X. La radiazione gamma, infine, i cui effetti sono molto simili a quelli attribuibili ai raggi X, e' conseguenza delle trasformazioni energetiche che si verificano all'interno dei nuclei atomici.

Lo spettro elettromagnetico puo' essere espresso in termini di lunghezza d'onda, di frequenza o di energia. Queste tre grandezze sono messe in relazione dall'espressione  $\lambda = \frac{c}{f}$ , dove c e' la velocita' della luce. L'energia delle varie componenti dello spettro elettromagnetico e' data invece dalla relazione  $E = h \cdot f$ , in cui h e' la costante di Plank ( $6.626 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$ ).

Le onde elettromagnetiche possono essere rappresentate come delle onde sinusoidali in propagazione con una certa lunghezza d'onda  $\lambda$ , oppure possono essere pensate come un flusso di particelle senza massa, che viaggiano alla velocita' della luce seguendo un moto ondulatorio. Ogni particella senza massa possiede un certo quantitativo discreto di energia. Ogni quanto di energia e' detto FOTONE. Dalle relazioni precedenti, ricaviamo che l'energia e' direttamente proporzionale alla frequenza; quindi, una frequenza piu' alta, che corrisponde a una minore lunghezza d'onda, produce (trasporta) una maggiore quantita' di energia per fotone. Così, le onde radio hanno dei fotoni a bassa energia, le microonde invece hanno una maggiore energia rispetto alle onde radio, gli infrarossi ancora di piu' e così via.

## 1.2 La luce

La luce e' un particolare tipo di radiazione elettromagnetica, perche' puo' essere percepita dall'occhio umano. La sensibilita' relativa dell'occhio umano alle diverse lunghezze d'onda e' in Figura 1.3. La luce priva di colore e' chiamata luce monocromatica: l'unico attributo della luce monocromatica e' la sua intensita'. Poiche' l'intensita' della luce monocromatica e' percepita sotto forma di variazioni dal nero al grigio, il termine livello di grigio e' comunemente usato per connotare l'intensita' della luce monocromatica. L'insieme dei valori della luce monocromatica e' chiamato scala di grigio.

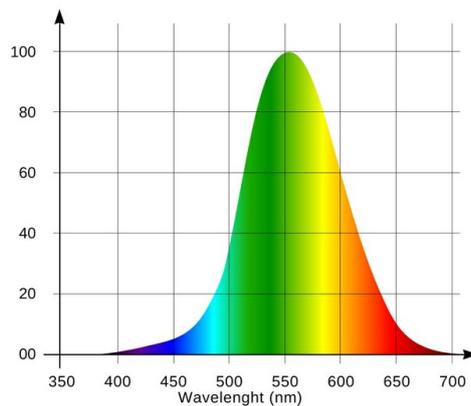


Figure 1.3: Sensibilità relativa dell'occhio umano alle diverse lunghezze d'onda

### La luce e i colori

Nel 1666, Isaac Newton scoprì che quando un fascio di luce solare passa attraverso un prisma di vetro, il fascio di luce uscente non è più bianco, ma forma uno spettro continuo di colori che vanno dal violetto al rosso. L'insieme dei colori da noi percepiti nella luce visibile rappresenta solo una minuscola parte dello spettro elettromagnetico.

La banda del visibile è molto stretta (range: 380-700 nm), ed è suddivisibile in colori:

- violetto: 380-450 nm
- blu: 450-475 nm
- ciano: 475-495 nm
- verde 495-570 nm
- giallo: 570-590 nm
- arancione: 590-620 nm
- rosso: 620-750 nm

NB Gli intervalli non sono netti, la suddivisione è esemplificativa.

## 1.3 I raggi X

I raggi X sono una radiazione elettromagnetica estremamente penetrante, caratterizzata da una lunghezza d'onda minore di quella della luce visibile, compresa tra circa 1 nm e 0,001 nm. Emessi da qualunque elemento chimico colpito da un fascio di elettroni ad alta energia, i raggi X possono essere prodotti artificialmente bombardando un campione di metallo pesante (in genere tungsteno) con elettroni accelerati ad alte velocità. I raggi X vennero scoperti accidentalmente nel 1895 dal fisico tedesco Wilhelm Conrad Röntgen, nel corso delle sue ricerche sui raggi catodici, con un tubo a vuoto sottoposto ad alta tensione. Röntgen si accorse che, malgrado il tubo dove si produceva la scarica elettrica fosse coperto da un pesante manto nero, uno schermo di platinocianuro di bario, posto casualmente in prossimità dell'apparato, emetteva luce fluorescente a ogni scarica. Dopo aver condotto vari esperimenti, a conferma delle osservazioni raccolte, Röntgen concluse che la fluorescenza era prodotta da una radiazione invisibile, ancora più penetrante della radiazione ultravioletta, che chiamò "raggi X", alludendo alla loro natura ignota. In seguito i raggi X furono spesso indicati anche col nome di raggi Röntgen, in onore del loro scopritore.

### Natura dei raggi X

L'energia e la capacità di penetrazione della radiazione sono inversamente proporzionali alla lunghezza d'onda: dei raggi X, quelli caratterizzati dalle lunghezze d'onda maggiori, ossia più

vicine alla banda ultravioletta dello spettro elettromagnetico, vengono comunemente detti molli; quelli con lunghezza d'onda minore, e dunque più vicini, o addirittura sovrapposti, alla regione dei raggi gamma, sono chiamati duri. Vengono inoltre detti "bianchi" i raggi X che risultano dalla sovrapposizione di più lunghezze d'onda e monocromatici quelli formati da radiazione di un'unica lunghezza d'onda, riprendendo esattamente la terminologia riferita alla regione visibile dello spettro.

I raggi X vengono generati anche quando elettroni liberi accelerati attraversano la materia. Quando un fascio di elettroni veloci viene inviato su un bersaglio, l'impatto tra le particelle incidenti e gli atomi del bersaglio determina delle transizioni quantistiche, accompagnate da emissione di energia nella forma di radiazione X. Durante questo processo, gran parte dell'energia posseduta dagli elettroni viene dissipata e ceduta all'ambiente sotto forma di calore. I raggi X emessi, che trasportano necessariamente una quantità di energia minore rispetto all'energia cinetica degli elettroni incidenti, non sono monocromatici, ma costituiti da un ampio intervallo di lunghezze d'onda, con un limite inferiore che corrisponde all'energia massima degli elettroni-proiettile. Lo spettro che si ottiene, detto radiazione di Bremsstrahlung (termine che in tedesco significa rottura, o rallentamento), ha la caratteristica di essere indipendente dalla natura del bersaglio. Tuttavia, se i raggi X emessi vengono indirizzati su un apposito spettrometro, è possibile rilevare poche righe discrete sovrapposte allo spettro continuo di Bremsstrahlung; queste righe, note come linee caratteristiche X, sono emesse dagli atomi del bersaglio, e la loro lunghezza d'onda dipende dalla composizione chimica di quest'ultimo. In altre parole, un elettrone veloce che colpisce un bersaglio dà luogo a emissione sia di radiazione X continua di energia massima pari alla propria energia cinetica, sia di raggi X pressoché monocromatici, la cui frequenza (o lunghezza d'onda) dipende dalla natura degli atomi che costituiscono il bersaglio.

### **Produzione dei Raggi X**

Il primo tubo per la produzione di raggi X fu realizzato dal chimico e fisico britannico William Crookes. Un grosso miglioramento si ebbe nel 1913 a opera del fisico statunitense William David Coolidge. Il tubo di Coolidge consiste essenzialmente di un tubo a vuoto molto spinto, all'interno del quale un filamento incandescente, riscaldato da una corrente ausiliaria, emette elettroni per effetto termoionico (vedi Figura 1.4). Gli elettroni emessi dal catodo incandescente vengono accelerati da un'elevata differenza di potenziale applicata ai capi del tubo. All'aumentare della tensione, il valore minimo di lunghezza d'onda della radiazione emessa diminuisce.

La maggior parte dei tubi X attualmente in uso sono tubi di Coolidge modificati. I tubi più grandi e potenti prevedono un circuito di raffreddamento ad acqua, che previene la fusione dell'anodo in seguito al riscaldamento provocato dall'impatto con gli elettroni ad alta energia. Il cosiddetto tubo a prova d'urto, una variante del tubo di Coolidge, prevede inoltre un sistema di isolamento del contenitore (con olio) e il collegamento a massa dei cavi del generatore. Strumenti simili, come il betatrone (vedi Acceleratori di particelle), vengono usati per produrre raggi X molto duri, di lunghezza d'onda addirittura inferiore a quella dei raggi gamma emessi da elementi radioattivi naturali.

### **Interazioni con la materia**

Esistono 3 diversi meccanismi di interazione tra raggi X e materia:

1. Effetto fotoelettrico: Quando colpisce un atomo, un quanto di radiazione, ovvero un fotone, può provocare l'estrazione di un elettrone dalle orbite più esterne. Se l'energia del fotone incidente è superiore all'energia di legame dell'elettrone, quest'ultimo si allontana con un'energia cinetica pari all'eccesso di energia. Questo fenomeno, chiamato effetto fotoelettrico, si verifica perlopiù per assorbimento di raggi X di bassa energia.
2. Effetto Compton: L'effetto Compton, scoperto nel 1923 dal fisico statunitense Arthur Holly Compton, è un fenomeno fisico che si osserva quando un fotone ad alta energia (e quindi

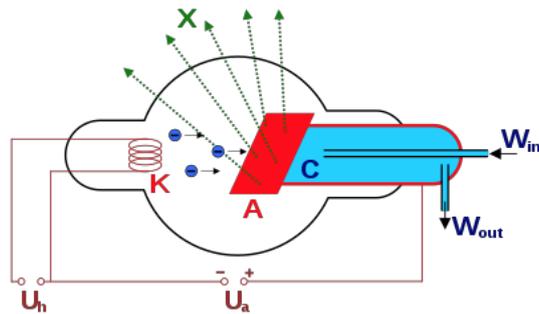


Figure 1.4: Produzione dei raggi X

anche un fotone di radiazione X) colpisce un elettrone. In base alle leggi di conservazione del momento, valide in generale nell'urto tra corpi, le due particelle deviano dalle rispettive traiettorie iniziali e il fotone uscente, avendo ceduto all'elettrone parte della propria energia, emerge con una lunghezza d'onda maggiore di quella iniziale.

3. Produzione di coppie: Un particolare fenomeno di interazione radiazione-materia si verifica quando elementi di alto peso atomico vengono irraggiati con radiazione X ad alta energia. Un fotone che penetra nello strato elettronico più vicino al nucleo di un atomo può determinare la formazione di una coppia elettrone-positrone (quest'ultimo è una particella con tutte le caratteristiche dell'elettrone, ma con carica positiva), ossia convertire la propria energia in massa. Perché si verifichi questo fenomeno, il fotone deve avere un'energia pari ad almeno 1,2 MeV, ossia all'equivalente in energia della somma delle masse delle due particelle da produrre. Se il fotone incidente possiede un'energia superiore a questo valore di soglia, l'eccesso di energia viene convertito in energia cinetica della coppia di particelle, che si allontanano in direzioni divergenti, come deve essere per il principio di conservazione del momento.

Le onde elettromagnetiche, i.e. la luce e i raggi X, sono utilizzate in diverse tecniche di imaging in ambito biomedico. In particolare, in questo corso si approfondiranno le nuove tecniche di microscopia ottica (confocale e a due fotoni) e la micro tomografia computerizzata (microCT), che permettono di acquisire e analizzare a risoluzione sub-micrometrica campioni di tessuti naturali o ingegnerizzati. In particolare, ci soffermeremo nello studio di diversi tipi di microscopi (che sfruttano i principi dell'ottica geometrica, ma anche le proprietà di fluorescenza e auto-fluorescenza di alcuni campioni biologici), la OCT (Optical Computer Tomography), che invece sfrutta l'interferenza tra onde luminose a diversa fase, e la microCT, che invece utilizza i raggi X per acquisire metalli pesanti presenti nei campioni biologici (ad esempio, campioni ossei).



## 2. Ottica

L'ottica è una parte della fisica che studia i fenomeni luminosi, cioè quei fenomeni provocati dall'emissione da parte di sorgenti di onde elettromagnetiche nello spettro del visibile (circa 430-690 nm). Alla fine dell'800, fu associato che la luce è un'onda elettromagnetica (come le onde radio, i raggi X, le micro-onde...): si parla quindi di ottica ondulatoria.

Per lo studio, però, di alcuni fenomeni ottici (quali la riflessione e la rifrazione) e delle loro applicazioni pratiche (lenti e specchi) è più opportuno utilizzare un modello semplificato (l'ottica geometrica) in cui si assume che la luce si propaga in maniera rettilinea e che, quindi, la sorgente luminosa emette raggi luminosi che rappresenteremo come semirette. Ciò è assolutamente plausibile nello studio di fenomeni macroscopici. Se è necessario valutare fenomeni su scala microscopica (ad esempio, i fenomeni di diffrazione e interferenza), è necessario abbandonare l'ipotesi di ottica geometrica e utilizzare le leggi dell'ottica ondulatoria.

### 2.1 Ottica Geometrica

Per quanto un'onda luminosa si espanda nell'irraggiamento dalla sorgente, spesso potremo approssimare il suo cammino a una linea retta. Lo studio delle proprietà della luce sotto questa approssimazione è chiamato ottica geometrica.

#### 2.1.1 Sorgenti luminose e corpi illuminati

Dal punto di vista delle sorgenti, esse si classificano in **SORGENTI PRIMARIE** se emettono luce propria (ad esempio, il sole e le stelle) e **SORGENTI SECONDARIE** se, ricevendo radiazioni da una sorgente primaria, la riemettono tutta o in parte. Tutti i corpi portati a una certa temperatura emettono una radiazione luminosa. L'intensità della radiazione luminosa (ovvero la potenza irradiata per unità di superficie disposta perpendicolarmente alla luce) diminuisce con l'inverso del quadrato della distanza. Per esempio, l'intensità della luce che arriva sulla superficie terrestre dal sole è una costante pari a  $1\text{kW/m}^2$ .

Dal punto di vista dei corpi che ricevono la radiazione luminosa, essi si classificano in **OPACO** se non si lascia attraversare dalla luce, **TRASPARENTE** se si lascia attraversare. Questi si dividono in **DIAFANI** se consentono di distinguere i contorni degli oggetti e **TRASLUCIDI** se permettono di

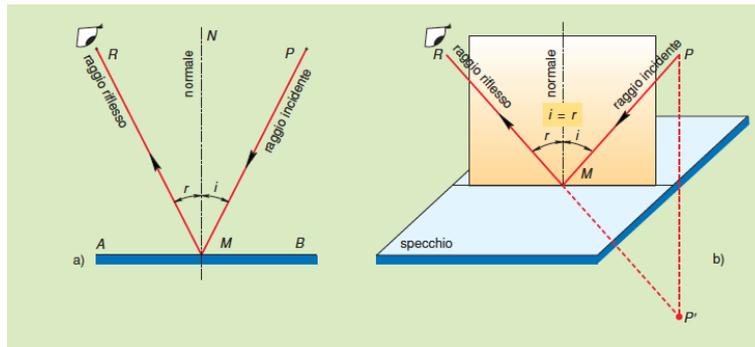


Figure 2.1: (a) La riflessione, (b) Leggi della riflessione. PM: raggio incidente, RM: raggio riflesso, MN: normale, angolo  $i$ : angolo di incidenza, angolo  $r$ : angolo di riflessione.

vedere i contorni solo in maniera imperfetta.

La luce di può propagare nel vuoto e nei mezzi trasparenti. La velocità della luce nel vuoto è  $c = 3 \times 10^8$  m/s, in ogni altro mezzo, la velocità della luce è minore di  $c$ .

### Le sorgenti di luce

Esistono principalmente 3 tipi diversi di sorgenti di luce:

1. LUCE COERENTE: luce con onde della stessa lunghezza d'onda, o con un range di lunghezze d'onda molto ridotto
2. LUCE COLLIMATA: la luce di una lampadina si diffonde in tutte le direzioni. Allontanandoci dalla sorgente, possiamo considerare la luce come fatta di fasci paralleli, quindi collimata. Si ottiene facendo passare la luce di una sorgente attraverso una lente.
3. LUCE POLARIZZATA: la luce è polarizzata quando l'oscillazione dei vettori campo elettrico e campo magnetico ha caratteristiche ben definite.

### 2.1.2 Principio di Fermat

Nell'ottica geometrica vale il principio di Fermat, che afferma che, di tutti i possibili cammini che un raggio di luce può percorrere per andare da un punto all'altro, esso segue il cammino che richiede il tempo più breve.

### 2.1.3 Riflessione

La riflessione è quel fenomeno per cui i raggi luminosi vengono respinti, generalmente con direzione diversa da quella di provenienza, quando incontrano una superficie liscia che separa il mezzo in cui si propagano da un altro.

Se un raggio luminoso  $P$  incontra in  $M$  una superficie levigata  $AB$ , esso devia con direzione  $MR$ , dando luogo alla riflessione (vedi Fig.2.1).

Il raggio riflesso trasporta una energia quasi uguale a quella del raggio incidente, e la superficie di separazione  $AB$  è detta superficie riflettente o specchio.

Il fenomeno della riflessione è regolato da due leggi:

1. Raggio incidente, raggio riflesso e normale alla superficie riflettente nel punto di incidenza giacciono sullo stesso piano.
2. L'angolo di incidenza e angolo di riflessione sono uguali.

Il secondo punto è dimostrabile con il principio di Fermat (VERIFICARE)

I prolungamenti dei raggi riflessi uscenti da  $P$  si incontrano tutti in un punto  $P'$  situato in posizione simmetrica di  $P$  rispetto al piano dello specchio.  $P'$  si chiama immagine virtuale di  $P$ . Chi raccoglie con i propri occhi i raggi riflessi, ha l'impressione che la luce provenga dal punto  $P'$  (vedi Fig. 2.1

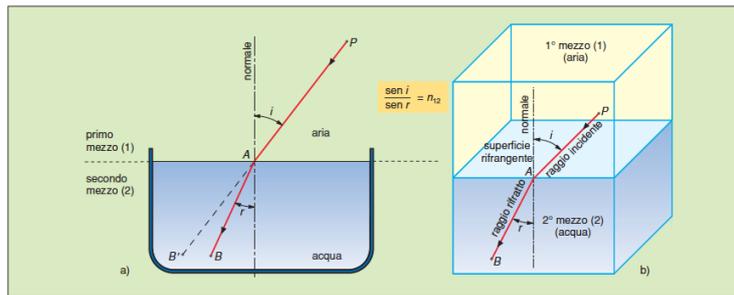


Figure 2.2: La rifrazione

B). Se la luce, anziché da un punto, provenisse da un corpo luminoso avente dimensioni determinate, lo specchio piano darebbe luogo a un'immagine virtuale perfettamente uguale e simmetrica rispetto al piano dello specchio.

### 2.1.4 Rifrazione

La rifrazione è un fenomeno fisico che si ha tutte le volte che un raggio luminoso passa da un mezzo trasparente a un altro di diversa densità. Ad esempio, dato un punto P nell'aria, che chiameremo mezzo 1, parte un raggio PA che incontra in A la superficie dell'acqua, che chiameremo mezzo 2. Il raggio, invece che continuare secondo la direzione AB', devia e si propaga nell'acqua secondo la direzione AB. Si dice che il raggio PA ha subito la rifrazione AB prende il nome di raggio rifratto. La superficie che separa i due mezzi si chiama superficie rifrangente (si veda Figura 2.2)

La rifrazione è regolata da due leggi:

1. Il raggio incidente, il raggio rifratto e la normale alla superficie rifrangente giacciono sullo stesso piano
2. Il rapporto tra il seno dell'angolo  $i$  di incidenza e il seno dell'angolo  $r$  di rifrazione è una costante, detta indice di rifrazione relativo ( $\frac{\sin(i)}{\sin(r)} = n_{12}$  (ad esempio,  $n_{12}$  per aria-acqua è 1.33, per aria vetro oscilla tra 1.51 e 1.60).

Se il primo mezzo di rifrazione è il vuoto (per cui  $n = 1$  per convenzione), l'indice di rifrazione del secondo mezzo rispetto al vuoto prende nome di indice di rifrazione assoluto. Dato  $n_1$  (indice di rifrazione assoluto del mezzo 1) e  $n_2$  (indice di rifrazione assoluto del mezzo 2),  $n_{12} = \frac{n_2}{n_1}$ . In generale, l'indice di rifrazione di una sostanza è dato da  $\frac{c}{v}$ , in cui  $c$  è la velocità della luce nel vuoto e  $v$  è la velocità nella sostanza in questione. Gli indici di rifrazione sono costanti adimensionali, che dipendono solo dal tipo di sostanza implicata nel fenomeno.

#### Legge di Snell

La seconda legge della rifrazione è anche detta Legge di Snell. Riscrivendo tale equazione come  $\sin(r) = \frac{n_1}{n_2} * \sin(i)$ , possiamo confrontare l'angolo di rifrazione con l'angolo di incidenza. Si vede che il valore di  $r$  dipende da  $i$ ,  $n_1$  e  $n_2$ . Possiamo in generale avere tre risultati (si veda Figura 2.3):

1. Se  $n_2 = n_1$ ,  $i = r$ . In questo caso, la rifrazione non piega il raggio incidente che procede senza deviazioni
2.  $n_2 > n_1$ , per cui  $r < i$ . In questo caso, la rifrazione piega il fascio incidente avvicinandolo alla normale
3.  $n_2 < n_1$ , per cui  $r > i$ . In questo caso, la rifrazione piega il fascio incidente allontanandolo dalla normale

La legge di Snell è dimostrabile a partire dal teorema di Fermat (VERIFICARE)

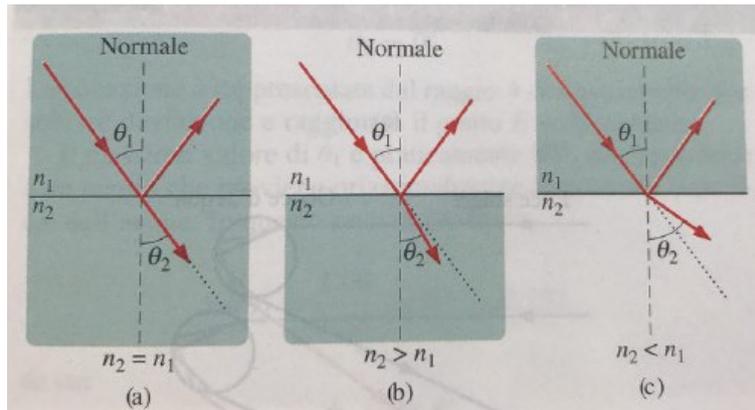


Figure 2.3: Luce che si rifrange nel passaggio da un mezzo con indice di rifrazione  $n_1$  a un mezzo con indice di rifrazione  $n_2$ : i 3 diversi casi.

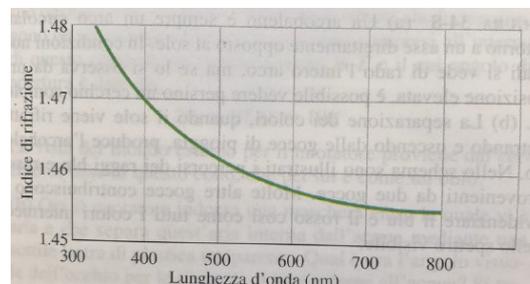


Figure 2.4: L'indice di rifrazione in funzione della lunghezza d'onda per il quarzo fuso

### Dispersione cromatica

L'indice di rifrazione  $n$  in qualsiasi mezzo, eccetto il vuoto, dipende dalla lunghezza d'onda della luce. Quindi, quando un raggio di luce è formato da componenti con lunghezze d'onda differenti, la rifrazione del raggio alla superficie ne separa le componenti così che esse assumono direzioni diverse. Questo effetto si chiama dispersione cromatica. In genere, l'indice di rifrazione in un mezzo è maggiore per una lunghezza d'onda minore (corrispondente alla luce blu), di quanto non sia per una lunghezza d'onda maggiore (per esempio, la luce rossa), come per esempio in figura 2.4. Questa dipendenza significa che quando un fascio di luce rossa e blu viene rifratto da una superficie, la componente blu deflette maggiormente di quella rossa.

La rifrazione non presenta dispersione cromatica, poiché stiamo considerando sempre raggi monocromatici. Nel caso volessimo considerare la luce bianca, cioè costituita, come già si è sottolineato, da componenti di tutti i colori dello spettro visibile con intensità approssimativamente uniforme, poiché la componente blu viene rifratta più della rossa, l'angolo di rifrazione del blu è minore dell'angolo del rosso. Nel caso in cui la luce passi dal vetro all'aria, la situazione sarà ribaltata (si veda figura 2.5)

L'esempio più affascinante di dispersione cromatica è l'arcobaleno. Quando la luce solare viene intercettata dalle goccioline di acqua nell'aria, parte della luce si rifrange quando penetra al loro interno, viene riflessa dalla superficie interna e poi rifratta all'esterno. La prima rifrazione separa la luce solare nei suoi colori componenti, e la seconda ne aumenta la separazione angolare. Il monocromatore sfrutta la dispersione cromatica per generare fasci di luce a determinate lunghezze d'onda.

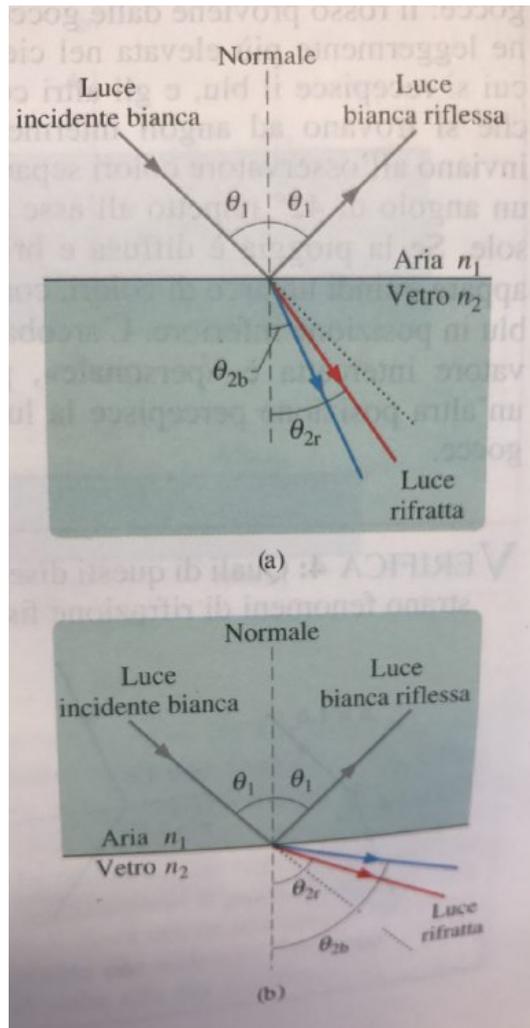


Figure 2.5: Dispersione cromatica della luce bianca

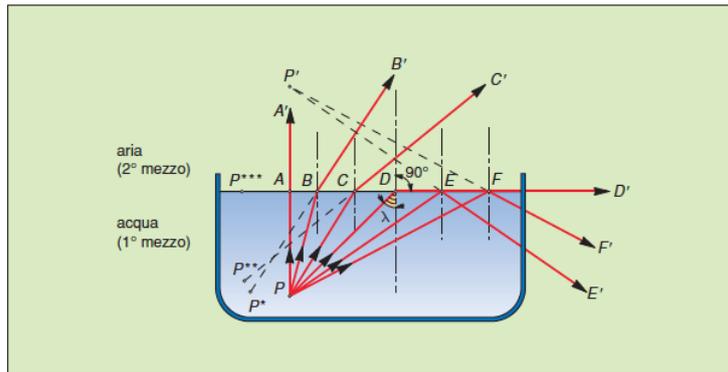


Figure 2.6: L'angolo limite e la riflessione totale

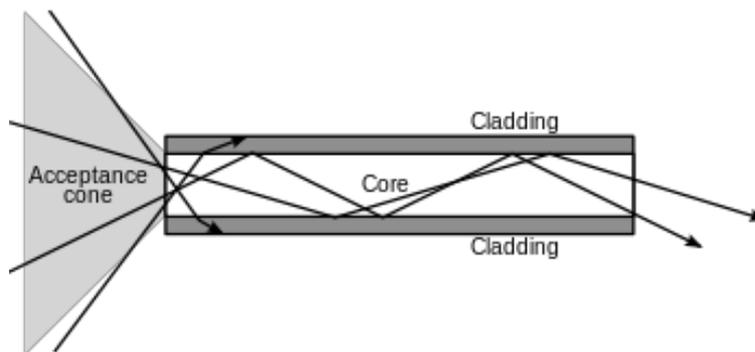


Figure 2.7: La fibra ottica

### Riflessione totale

Quando la luce passa da un mezzo con indice di rifrazione maggiore a uno con indice di rifrazione minore (ad esempio, passando da acqua a aria), il raggio rifratto si allontana dalla normale. Aumentando l'angolo di incidenza, aumenta anche l'angolo di rifrazione, fino ad arrivare a un certo angolo di incidenza, detto ANGOLO LIMITE, per cui l'angolo di rifrazione è 90. In questo caso, il raggio rifratto è radente alla superficie di separazione tra i due mezzi (Figura 2.6)

Aumentando ancora il valore dell'angolo di incidenza, il raggio rifratto manca: tutta la luce incidente viene riflessa all'interno del mezzo da cui proviene. Si parla quindi di riflessione totale. Dalla legge di Snell :  $n_1 \sin \theta_L = n_2 \sin 90$ , da cui  $\theta_L = \sin^{-1} (n_2/n_1)$ .

Una importante applicazione della riflessione totale si trova nelle fibre ottiche, dove fili di vetro o di plastica molto sottili sono in grado di guidare la luce da un posto all'altro (figura 2.7)

Secondo lo schema in figura, nel nucleo cilindrico interno viaggia la luce. Questo è circondato da una parete esterna detta mantello. I materiali di mantello e nucleo sono scelti in modo da avere  $n_1$  e  $n_2$  il cui rapporto permette di avere riflessione interna, facendo quindi viaggiare la luce a zig-zag. Il materiale del nucleo è scelto anche in modo da minimizzare l'assorbimento della luce, così essa può viaggiare per molti km senza diminuire di intensità in modo apprezzabile.

## 2.1.5 Applicazione delle leggi della riflessione e della rifrazione

### Specchi sferici

Negli specchi sferici, la superficie riflettente è una calotta sferica. Gli specchi sferici si classificano in CONCAVI o CONVESSI, a seconda se la superficie riflettente è all'interno o all'esterno (vedi Fig 2.8)

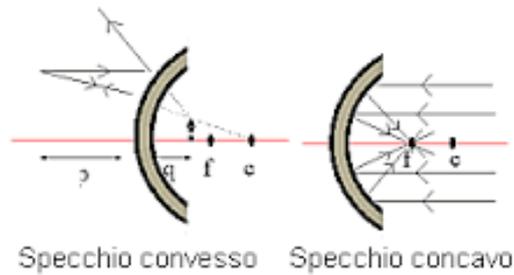


Figure 2.8: Specchio convesso e concavo

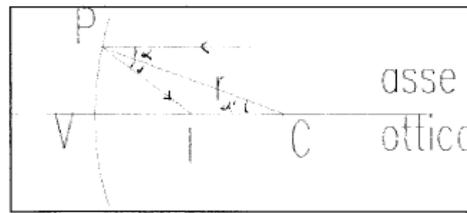


Figure 2.9: Fuoco di una lente

Nel nostro caso, prenderemo in considerazione calotte sferiche di raggio molto grande, in modo da avere specchi poco curvi. Si parla di specchi a piccola apertura, essendo l'apertura l'angolo sotteso dal centro della sfera. Negli specchi sferici, tutti i raggi paralleli all'asse ottico si riflettono in un punto detto fuoco (vedi Fig. 2.9)

Per piccole aperture, la distanza focale (VF) e' meta' del raggio (VC). DIMOSTRAZIONE: Data la normale allo specchio in PC (PC), gli angoli OPC e CPF sono uguali per la legge della riflessione. OPC e PCF sono uguali perche' angoli alterni interni. Quindi il triangolo PFC e' isoscele, con  $PF = FC$ . Se lo specchio ha un raggio molto grande, allora PF e' quasi uguale a VF. Quindi avremo  $VC = VF + FC = 2VF$ , con VC raggio e FV distanza focale.

**Regole per costruire l'immagine riflessa da uno specchio sferico** Supponiamo di voler costruire l'immagine P' di P ottenuta da uno specchio concavo (vedi Fig. 2.10)

Supponendo di essere in condizioni di parassialita', per cui i raggi che entrano ed escono da un sistema ottico rimangono confinti in prossimita' dell'asse ottico, per costruire l'immagine del

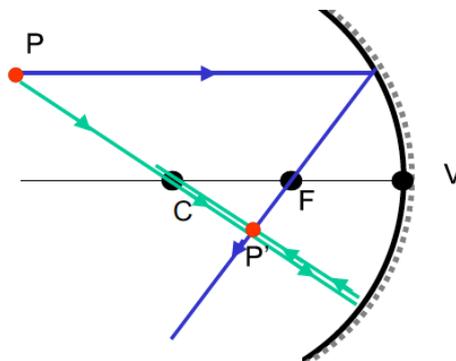


Figure 2.10: Immagine di un punto a uno specchio sferico concavo

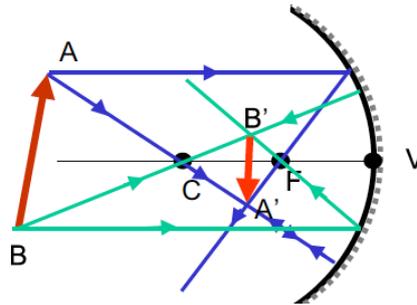


Figure 2.11: Immagine di un oggetto AB a uno specchio sferico concavo

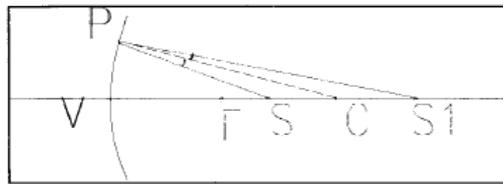


Figure 2.12: Dimostrazione dell'equazione dei punti coniugati

punto P ci si avvale di due regole:

1. Il raggio parallelo all'asse ottico passa per il fuoco
2. il raggio passante per il centro forma un angolo di incidenza nullo (perche'?), riflettendosi nella stessa direzione del raggio incidente.

I due raggi si incontrano in P'. Generalizzando per un oggetto AB, l'oggetto A'B' si ritrova tra fuoco e centro dello specchio. L'immagine risulta reale, capovolta e rimpicciolita (vedi Fig 2.11).

L'ingrandimento G e' definito come A'B'/AB: se  $G < 1$  l'immagine e' rimpicciolita, se  $G > 1$  l'immagine e' ingrandita.

**Equazione dei punti coniugati** Per conoscere a che distanza si formera' l'immagine data la distanza dell'oggetto dalla lente, ci si avvale dell'equazione dei punti coniugati.

Siano dati un oggetto luminoso S, la sua immagine S1, la distanza focale VF (o f), la distanza vertice-oggetto VS (o p), la distanza vertice-immagine VS1 (o q) e il raggio della lente VC (vedi Fig. 2.12)

Per le regole della riflessione, gli angoli SPC e CPS1 sono uguali: PC quindi risulta essere la bisettrice dell'angolo SPS1. Per il teorema della bisettrice,  $PS:SC = PS1:CS1$ . Nell'ipotesi di piccola apertura, PS1 e VS1 sono simili, come anche PS e VS, quindi:

$$\begin{aligned} \frac{VS}{SC} &= \frac{VS1}{CS1} \\ \frac{p}{(r-p)} &= \frac{q}{(q-r)} \\ p(q-r) &= q(r-p) \\ pq - pr &= qr - qp \end{aligned}$$

Divido tutto per pqr e ottengo:  $\frac{2}{r} = \frac{q}{pq} + \frac{p}{pq}$ , da cui  $\frac{2}{r} = \frac{1}{p} + \frac{1}{q} = \frac{1}{f}$

Nel caso di sorgenti luminose non puntiformi, possiamo quindi calcolare l'ingrandimento G. Si consideri la Fig 2.10: poiche' i triangoli VPS e VP'Q sono simili,  $G = \frac{q}{p} = \frac{f}{p-f} = \frac{q-f}{f}$ .

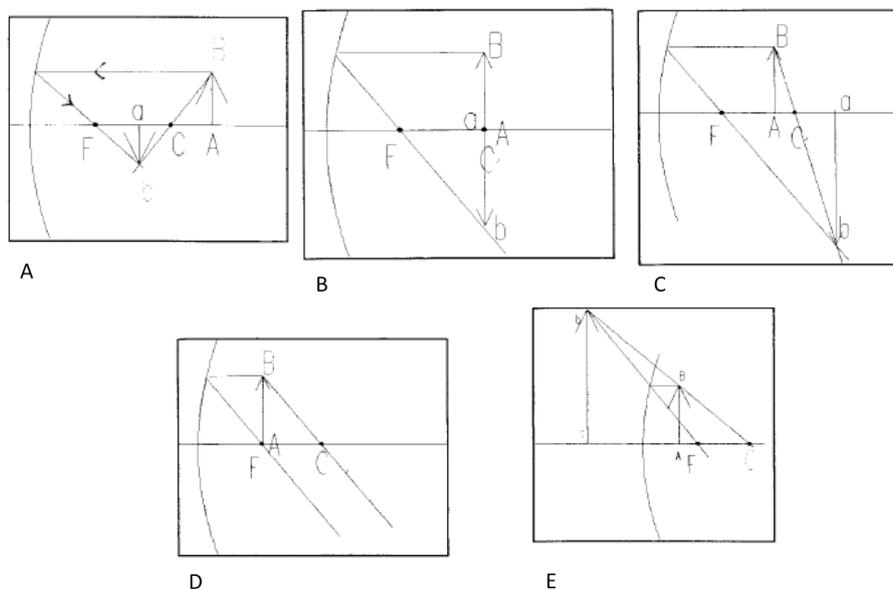


Figure 2.13: Immagini riflesse per gli specchi concavi, date diverse posizioni dell'oggetto rispetto al fuoco e al raggio dello specchio stesso

**Immagini riflesse - specchi concavi e convessi** Abbiamo già stabilito le due regole per disegnare l'immagine di un oggetto. A seconda della posizione dell'oggetto rispetto al fuoco dello specchio, otterremo immagini posizionate più o meno vicine alla lente, ingrandite o rimpicciolite, reali o virtuali.

1. CASO 1:  $p > r$ . Si otterrà una immagine reale, capovolta e rimpicciolita posizionata a  $f < q < r$  (vedi Fig 2.13 A)
2. CASO 2:  $p = r$ . Si otterrà una immagine reale capovolta e delle stesse dimensioni posizionata a  $q = r$  (vedi Fig 2.13 B)
3. CASO 3:  $p < f$ . Si otterrà una immagine virtuale, dritta e ingrandita posizionata a  $q < 0$  (vedi Fig 2.13 C)
4. CASO 4:  $p = f$ . Essendo i raggi paralleli, l'immagine si forma a  $q$  uguale a infinito (vedi Fig 2.13 D)
5. CASO 5:  $f < p < r$ : l'immagine reale capovolta e ingrandita si otterrà a  $q > r$  (vedi Fig 2.13 E).

Nel caso delle specchi convessi, il fuoco sarà sempre virtuale ( $f < 0$ ), quindi le immagini sono sempre date dai prolungamenti dei raggi e non dai raggi stessi. L'immagine quindi sarà sempre virtuale, dritta e rimpicciolita (VERIFICARE).

### Lenti sferiche

Le lenti sferiche sono oggetti trasparenti con due superfici rifrangenti i cui assi centrali coincidono, l'asse comune è detto asse della lente. Quando una lente è immersa in aria, la luce proveniente dall'aria si rifrange entrando nella lente, la attraversa ed è rifratta nuovamente emergendo nell'aria. Ciascun elemento di rifrazione può cambiare la direzione di propagazione della luce. // Le due superfici sferiche che delimitano una lente hanno di solito raggi differenti. Una delle due superfici può anche avere un raggio infinito, essere cioè un piano. Esistono per questo lenti di forme molto diverse ma, dal punto di vista dell'effetto che producono, esse possono essere classificate in due soli gruppi:

1. *Lenti convergenti - o biconvesse -*: sono più spesse al centro che ai bordi. Si chiamano così

perche' fanno convergere in un punto un fascio di raggi paralleli che le colpisce. Sono convergenti le lenti di ingrandimento, quelle degli occhiali da presbite e da ipermetropie;

2. *Lenti divergenti - o biconcave-*: sono piu' spesse ai bordi che al centro. Quando sono colpite da un fascio di raggi paralleli lo fanno divergere. Le lenti per gli occhiali da miope e quelle per lo spioncino della porta di ingresso sono divergenti.

Si chiama **asse ottico** di una lente la retta che congiunge i centri delle due superfici sferiche. Un raggio di luce che colpisce la superficie di una lente subisce due volte il fenomeno della rifrazione: una prima volta nel passare dall'aria al vetro e una seconda volta nel passare dal vetro all'aria. In generale, il raggio emergente risulta deviato rispetto alla direzione del raggio incidente. La deviazione avviene verso la parte piu' spessa della lente, cioe' verso l'asse se la lente e' convergente e in modo da allontanarsi dall'asse se la lente e' divergente.

In seguito, si parlera' di **lenti sottili**: esse hanno la proprieta' di avere uno spessore piccolo rispetto ai raggi delle superfici sferiche che le delimitano.

### **Lenti sferiche convergenti**

Si invii un sottile fascio di luce sulla parte centrale di una lente sottile convergente, e da una direzione parallela al suo asse ottico. Al di la' della lente emerge un cono luminoso che converge in un punto, poi diverge. Il punto in cui si concentra la luce del fascio luminoso si chiama **fuoco** della lente e si trova sull'asse ottico.

Nel fuoco convergono quindi tutti gli assi che incidono sulla lente parallelamente al suo asse ottico. Ogni lente ha due fuochi, che si trovano da parti opposte rispetto ad essa. Per le lenti sottili, e' possibile con buona approssimazione supporre che i fuochi si trovino alla stessa distanza dal centro. La distanza tra il fuoco e il centro della lente e' detto **distanza focale**.

Si disponga una sorgente luminosa S davanti ad una lente convergente L. Spostando uno schermo T, e' possibile individuare un punto in cui l'immagine della sorgente appaia disegnata nettamente. A meno che la sorgente e la lente non siano molto vicine, e' sempre possibile trovare un punto nel quale l'immagine che si forma su T e' nitida. Essa e' reale, dal momento che puo' essere raccolta su uno schermo, e capovolta. Se si avvicina la sorgente alla lente, per ritrovare l'immagine bisogna spostare lo schermo piu' lontano dalla lente/ L'immagine e' sempre reale e capovolta, ma tende a diventare piu' grande dell'oggetto.

Se la sorgente si trova molto vicina alla lente (a distanza piu' piccola di quella del fuoco) non e' possibile raccogliere una immagine sullo schermo: l'immagine si dice allora virtuale.

**Regole per ottenere una immagine da una lente sottile** Consideriamo una sorgente luminosa puntiforme S. La sua immagine e' il punto S' dove si intersecano i raggi luminosi provenienti da S dopo essere stati rifratti dalla lente.

Per trovare S' scegliamo, tra gli infiniti raggi che partono da S, due raggi particolari, dei quali e' facile determinare i corrispondenti raggi rifratti. Uno e' il raggio SP parallelo all'asse, che e' deviato dalla lente in modo da passare per il fuoco F. L'altro e' il raggio che attraversa il centro O della lente, che procede senza essere praticamente deviato (perche' nella zona vicina al centro, la lente si comporta come una lastra a facce piane e parallele) (Fig. 2.14).

Se davanti alla lente si pone una sorgente non puntiforme, da ciascuno dei suoi punti partono raggi luminosi che, dopo la rifrazione, danno l'immagine dell'oggetto.

**NB ESERCITARSI A COMPORRE L'IMMAGINE DI UN OGGETTO AL CAMBIARE DELLA DISTANZA, COME IN FIG 2.15**

### **La formula delle lenti sottili**

La distanza dalla lente sottile a cui si forma l'immagine dipende dalle caratteristiche della distanza focale e dalla posizione dell'oggetto rispetto alla lente. // Facendo riferimento alla Fig 2.16, e ipotizzando che le lenti siano sottili (quindi che tutta la rifrazione abbia luogo quando i raggi

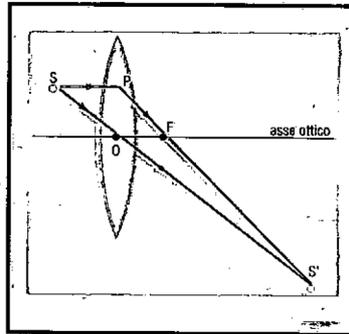


Figure 2.14: I raggi diffratti da una lente convergente

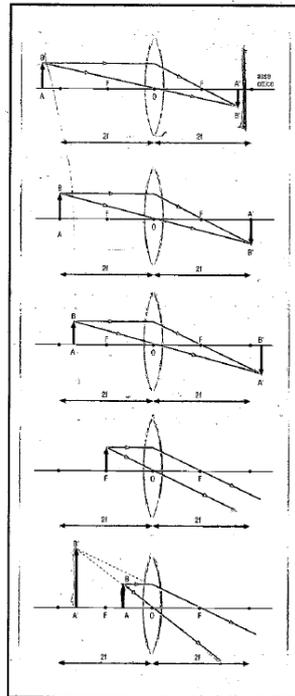


Figure 2.15: Immagine della freccia AB al cambiare della distanza dalla lente

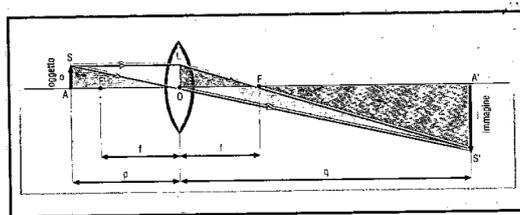


Figure 2.16: Formula delle lenti sottili

attraversano il piano perpendicolare all'asse ottico e passando per il centro della lente), dalla similitudine tra i due triangoli SAO e OA'S' si ottiene  $\frac{i}{o} = \frac{q}{p}$ . Il rapporto  $\frac{i}{o}$  è l'ingrandimento, cioè il rapporto tra la dimensione dell'immagine e quella dell'oggetto. Essendo anche OLF e FA'S' simili,  $\frac{i}{o} = \frac{q-f}{f}$ , quindi  $\frac{q}{p} = \frac{q-f}{f}$  e  $\frac{1}{p} + \frac{1}{q} = \frac{1}{f}$ , detta la formula delle lenti sottili. Se conosciamo la distanza focale della lente e la distanza p dell'oggetto dalla lente, sappiamo calcolare a che distanza q dalla lente si forma l'immagine. La quantità  $\frac{1}{f}$  è detta potere diottrico della lente.

### Lenti sferiche divergenti

Per trovare l'immagine di una sorgente luminosa data da una lente sferica divergente si usano metodi analoghi a quelli usati per le lenti sferiche convergenti. Essi mostrano che le lenti sferiche danno sempre immagini dritte e virtuali, perché qualunque sia la distanza dalla lente della sorgente luminosa S, la sua immagine è sempre il punto di incontro dei prolungamenti dei raggi rifratti. Anche i fuochi di una lente divergente sono virtuali; quindi, i raggi paralleli all'asse divergono, in seguito a rifrazione, in direzioni tali che i loro prolungamenti passino per il fuoco.

La formula delle lenti sottili è valida anche per le lenti divergenti, ma la distanza focale assume valore negativo.

## 2.2 Ottica Ondulatoria

Come già sottolineato in precedenza, non è sempre possibile trascurare la natura ondulatoria della luce. Quando, per esempio, andiamo ad analizzare fenomeni di sovrapposizione di onde, il modello approssimato non è più sufficiente e bisogna, più correttamente, analizzare la propagazione della luce dal punto di vista della propagazione di onde. In questa sezione, parleremo in particolare di interferenza.

### Interferenza

La luce del sole è una composizione di tutti i colori dello spettro visibile. I colori si rivelano nell'arcobaleno perché le lunghezze d'onda incidenti sono inclinate a diversi angoli quando passano attraverso le gocce di pioggia che formano l'arco. Diversamente, gli straordinari colori delle bolle di sapone sono prodotti non per rifrazione ma per interferenza costruttiva o distruttiva della luce riflessa. Le onde che interferiscono si combinano sia per esaltare sia per opprimere certi colori nello spettro della luce solare incidente. L'interferenza delle onde luminose è quindi un fenomeno di sovrapposizione. Questa esaltazione o soppressione selettiva di particolari lunghezze d'onda ha molte applicazioni.

per interpretare il fenomeno dell'interferenza bisogna abbandonare le restrizioni dell'ottica geometrica e servirsi della teoria ondulatoria.

La prima persona ad avanzare la teoria che la luce è un'onda fu il fisico olandese Huygens, e fu dimostrata successivamente da Thomas Young con un esperimento. Per comprenderlo però bisogna capire le caratteristiche principali del fenomeno della diffrazione delle onde. Se un'onda incontra una barriera che ha una apertura di dimensioni simili alla lunghezza d'onda, l'onda diffrange nella

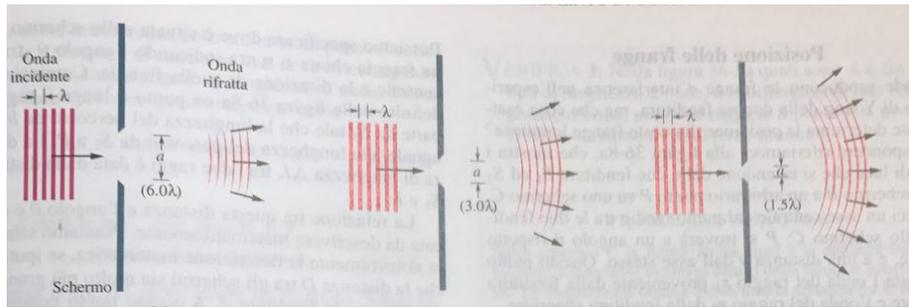


Figure 2.17: La diffrazione spiegata schematicamente

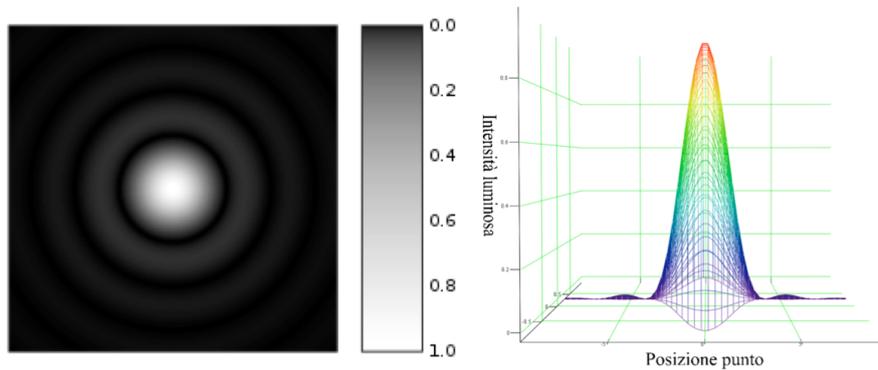


Figure 2.18: Disco di Airy

sona oltre la barriera. La figura 2.17 illustra schematicamente il caso di un'onda piana incidente di lunghezza d'onda  $\lambda$  che incontra una fenditura. L'onda si sparpaglia e, più stretta è la fenditura, più evidente sarà la diffrazione.

Il modello di diffrazione che risulta da un'apertura circolare uniformemente illuminata ha una regione luminosa nel centro, conosciuta come Disco di Airy che, assieme ad una serie di anelli concentrici, viene chiamata modello di Airy (fig 2.18). Il diametro di questo disco è funzione della lunghezza d'onda della luce illuminante e del diametro dell'apertura circolare. Il pattern di diffrazione chiaro-scuro ha una forma caratteristica (point spread function): al centro abbiamo tanta luce e a seconda della lunghezza d'onda e dell'apertura del foro abbiamo zone più scure e più chiare. L'angolo al quale il primo minimo avviene, misurato nella direzione da cui proviene la luce e' dato da:  $\sin(\theta) = 1.22 \cdot \frac{\lambda}{D}$ , in cui  $\lambda$  e' la lunghezza d'onda della luce e  $D$  il diametro dell'apertura. Da questo si evince il criterio di Rayleigh che dice che, per riuscire a risolvere due oggetti, il centro del disco di Airy per il primo oggetto deve essere nel primo minimo del disco di Airy del secondo. Questo significa che la risoluzione angolare di un sistema limitato dalla diffrazione, come per l'acquisizione della maggior parte dei campioni biologici, e' data dalla stessa formula. Se  $\theta$  e' piccolo, possiamo approssimare la formula a  $\frac{x}{f} = 1.22 \cdot \frac{\lambda}{D}$ , in cui  $x$  e' la separazione delle immagini dei due oggetti e  $f$  e' a distanza delle lenti. il rapporto  $\frac{f}{d}$  e' detto rapporto focale o f number. Questo numero indica la potenza della raccolta di energia luminosa da parte di una lente.

Un sistema ottico con la capacità di produrre immagini con risoluzione angolare così buona fino al limite teorico dello strumento viene detto con termine inglese diffraction limited, che significa letteralmente "limitato dalla sola diffrazione". In pratica il limite della sua risoluzione è quello imposto dalla diffrazione e non può pertanto essere ulteriormente perfezionato. Il potere risolvibile

di un sistema di imaging ottico come un microscopio può essere limitato da molteplici fattori come imperfezioni o male allineamenti nelle lenti. C'è comunque un massimo fondamentale nella risoluzione di ogni sistema ottico che è dovuto alla diffrazione. Il potere risolvibile di un dato strumento è proporzionale alla grandezza del suo obiettivo, e inversamente proporzionale alla lunghezza d'onda della luce che viene osservata. Per un microscopio, la grandezza del più piccolo dettaglio osservabile di un'immagine limitata dalla sola diffrazione è la dimensione del disco di Airy.

Il limite di diffrazione è definito dalla relazione di Abbe  $d = \frac{\lambda}{2n \sin(\theta)}$ , in cui  $\theta$  è l'angolo di raccolta della luce.

Si notano ora i limiti dell'ottica geometrica. Il punto di vista geometrico vale solo se le barriere, le fenditure o le aperture che possono trovarsi sul percorso di un fascio di luce non hanno dimensioni comparabili o addirittura minori della lunghezza d'onda della luce.

## 2.3 Ottica molecolare

### Assorbanza

Quando la luce interagisce con un oggetto, essa può essere assorbita, può cambiare velocità e può essere riflessa. L'assorbanza è quel fenomeno che si ha quando la luce viene assorbita dal mezzo. La luce entrando in un mezzo, diminuisce la sua ampiezza. Questa diminuzione è descritta in termini di profondità di penetrazione. Nel caso di liquidi, si utilizza la legge di Lambert-Beer:  $I(x) = I_0 e^{(-\alpha x)}$ .  $\alpha$  è il coefficiente di estinzione e dipende dalla lunghezza d'onda (è solitamente maggiore nel blu che nel verde).

Consideriamo un liquido completamente trasparente, e sciogliamo in questo liquido una sostanza con un certo assorbimento a una data concentrazione  $C$ . Aumentando la concentrazione, aumenta anche la quantità di luce assorbita. Infatti  $I_{in} - I_{out}$  è proporzionale alla concentrazione della sostanza e alla lunghezza del cammino ottico che percorre la luce nella soluzione.

L'assorbanza è definita come  $\log(I_{in}/I_{out})$ .

**Spettrofotometro** Il fenomeno dell'assorbanza è molto utilizzato nei sistemi biologici, poiché sia le proteine che il DNA assorbono luce. Quindi solitamente, utilizzo lo spettrofotometro, che utilizza la legge di Lambert-Beer per conoscere, dall'assorbimento di luce, la concentrazione della proteina. Quando facciamo misure di assorbanza, utilizziamo dei contenitori, dette Cuvette, che hanno dimensioni ben definite (1 cm \* 1 cm \* 2 cm), all'interno del quale mettiamo la soluzione della quale vogliamo conoscere la concentrazione di una data proteina. Il contenitore viene poi messo nello spettrofotometro, insieme ad un'altra cuvetta contenente solo solvente (solitamente acqua). La luce dello spettrofotometro, dopo essere passata da un monocromatore che seleziona solo le lunghezze d'onda desiderate, verrà indirizzata parte verso la cuvetta di controllo e parte verso la cuvetta da misurare tramite un beam splitter. A questo punto, misureremo due intensità di luce:  $I_{sfondo}$  e  $I_{sfondo} + I_{assorbita}$ , e possiamo calcolare l'assorbanza. Variando le lunghezze d'onda di ingresso al monocromatore, possiamo calcolare il grafico dell'assorbanza a diverse lunghezze d'onda. Inoltre, possiamo calcolare l'assorbanza in funzione della concentrazione del soluto fissando la lunghezza d'onda. L'assorbanza, per concentrazioni basse, aumenta linearmente con le concentrazioni; per alte concentrazioni, non siamo più in grado di distinguere le variazioni di intensità (le intensità si saturano) e quindi nemmeno l'assorbanza.

### Fluorescenza

Associato al concetto di assorbanza, c'è il fenomeno della fluorescenza, dovuto a un assorbimento della luce incidente da parte del campione e a una successiva emissione di radiazioni di lunghezza d'onda diversa da quella incidente. È un fenomeno che ha a che fare con il trasferimento di energia da un fotone a un elettrone ed è dovuto all'eccitazione degli elettroni negli orbitali esterni. Questi

elettroni sono eccitati quando colpiti da un fotone. Normalmente quando una molecola viene colpita da un fotone l'elettrone dopo essere stato eccitato torna allo stato ground emettendo solo calore (convezione interna). In alcuni casi (per esempio con la presenza di doppi legami, quindi con un sistema di orbitali molto rigido), può succedere che l'elettrone dallo stato eccitato torni allo stato ground passando prima per convezione interna in uno stato intermedio e poi emettendo il fotone. I tempi di emissione della fluorescenza sono più bassi di quelli dell'assorbimento. Essendo l'energia di assorbimento maggiore di quella legata alla fluorescenza, le lunghezze d'onda della luce emessa saranno minori.

La fluorescenza è un fenomeno diverso dalla fosforescenza. Questo fenomeno si osserva in quanto gli elettroni presenti nel livello orbitalico fondamentale passano, per azione di un fotone, ad un livello superiore di singoletto (molteplicità spettrale unitaria, presenza di elettroni appaiati). Successivamente, il ritorno allo stato fondamentale stabile con emissione raggianti può avvenire essenzialmente con due modalità: una conversione singoletto-singoletto o, alternativamente, un passaggio ad una configurazione quantomeccanica di tipo tripletto e il successivo decadimento allo stato fondamentale di singoletto (conversione intersistema).

Nel primo caso si ha emissione raggianti fluorescente mentre nel secondo si verifica il fenomeno dell'emissione fosforescente. Oltre alla già descritta differenza fondamentale esistente tra i due fenomeni luminescenti, è da notare che il decadimento che produce fosforescenza è temporalmente più lungo di quello implicante la fluorescenza: la fosforescenza segue con un certo ritardo l'eccitazione e si protrae anche qualche minuto oltre.

La fluorescenza è caratterizzata da due cose: 1) la differenza tra lo spettro di eccitazione e quello di emissione (detta stoke shift) e 2) l'alta sensibilità alle condizioni ambientali (posso cambiare la fluorescenza cambiando la polarità della soluzione, ossigenando l'ambiente o cambiando la temperatura). La resa quantistica, cioè l'efficienza della fluorescenza, è definita come  $\frac{\text{numero fotoni emessi}}{\text{numero fotoni assorbiti}}$ .

## Scattering

La diffusione ottica (o dispersione), scattering in inglese, si riferisce a un'ampia classe di fenomeni di interazione radiazione-materia in cui onde o particelle vengono deflesse (ovvero cambiano traiettoria) a causa della collisione con altre particelle o onde (dal punto di vista quantistico). La deflessione avviene in maniera disordinata e in buona misura casuale (il significato letterale di scattering è "sparpagliamento") e per questo la diffusione si distingue dalla riflessione e dalla rifrazione, che invece cambiano le traiettorie in maniera regolare e determinata. Sono considerati processi di scattering solo le interazioni elastiche o quasi elastiche, che cioè non comportino rilevanti cessioni o guadagni di energia.

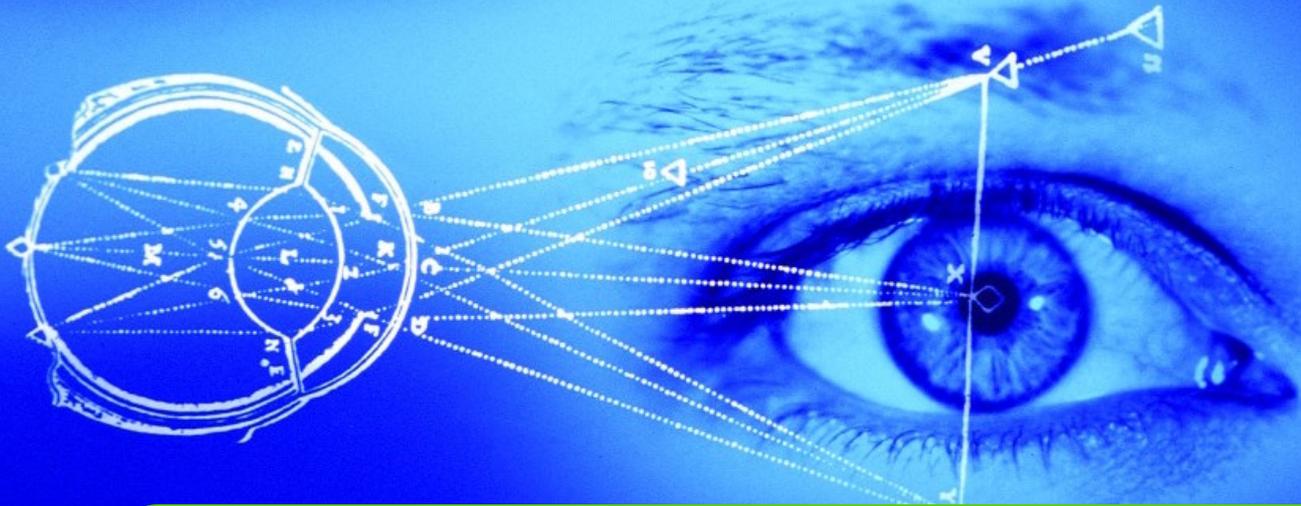
In ottica la diffusione è riferita alla dispersione della luce da parte di oggetti più o meno microscopici come le particelle colloidali in liquidi o i solidi polverizzati o il pulviscolo o le molecole dell'atmosfera.

Un esempio molto comune di diffusione della luce (scattering di Rayleigh) è dato dal colore blu del cielo: la luce (bianca) del sole incide sull'atmosfera terrestre, le cui molecole diffondono con più facilità le frequenze più alte (ovvero i colori più vicini al blu e al violetto); di conseguenza, mentre il grosso della luce ci arriva direttamente dal sole, la luce blu diffusa ci proviene da tutte le direzioni. E il sole che, quasi per definizione, dovrebbe essere perfettamente bianco, ci appare giallastro, perché gli è stata sottratta un po' di luce blu.

Un altro esempio tipico è il colore bianco del latte o della farina o delle nuvole: in questo caso le particelle del latte o della farina, o le goccioline d'acqua delle nuvole, diffondono uniformemente tutte le frequenze e, siccome il processo si ripete moltissime volte all'interno del mezzo, la direzione di provenienza della luce non è più riconoscibile e il mezzo assume un colore bianco.

Le equazioni che descrivono la diffusione sono molto complesse () e, specialmente quando questo fenomeno si ripete molte volte, impossibili da risolvere esattamente nel caso generale. Una

soluzione approssimata molto usata è quella detta di Rayleigh: nel caso in cui le particelle responsabili della diffusione abbiano dimensioni molto minori della lunghezza d'onda della luce incidente, la dispersione della luce è isotropa e il coefficiente di diffusione è proporzionale a  $\frac{1}{\lambda^4}$ , in cui  $\lambda$  è la lunghezza d'onda della luce incidente.



## 3. Strumenti ottici

Uno strumento ottico è uno strumento atto a processare onde luminose per migliorare la visione di una immagine (ad esempio: cannocchiali, lenti per occhiali, macchine fotografiche, microscopi). Questi strumenti si affidano alle **leggi della riflessione e della rifrazione** (che permettono di determinare il cammino dei raggi luminosi in mezzi più o meno trasparenti) per il loro funzionamento.

### 3.1 L'occhio umano

Per comprendere come è costituito uno strumento ottico, possiamo prendere a modello l'occhio umano (Fig 3.1). Esso è composto da tre principali componenti:

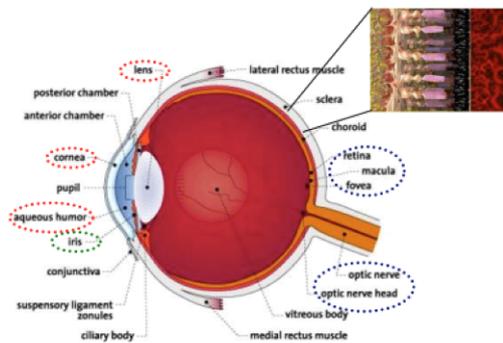
1. *Lente composta*, costituita da una lente, il cristallino, con  $n=1.38$  a  $1.4$  (che, variando la forma grazie ai muscoli ciliari, permette la messa a fuoco), la cornea (che ha  $n = 1.376$ . Da' all'occhio il suo potere refrattivo perché la luce passando da aria a cornea viene deviata e quindi convogliata maggiormente nell'occhio. È fatta di collagene) e l'umor vitreo ( $n=1.337$ );
2. *Diaframma*, che permette di regolare la dimensione del fascio di luce entrante nell'occhio;
3. *Rivelatore* che rivelano l'informazione ottica, trasmessa tramite impulso nervoso al cervello. Ci sono due principali rivelatori: i *coni* (circa 7 milioni, concentrati nella fovea e caratterizzati da una alta sensibilità ai colori. Organizzati in modo molto regolare a formare dei mosaici esagonali. La distanza tra due coni adiacenti è circa  $3 \mu\text{m}$ ) e i *bastoncelli* (circa 120 milioni, distribuiti su tutta la retina ma non la fovea, caratterizzati da alta sensibilità alla luce). I coni hanno diversa sensibilità ai colori: per esempio, il più sono molto meno sensibili, quindi hanno bisogno di una intensità maggiore.

Il punto cieco è l'area dove si incontrano tutti i dendriti delle cellule retiniche, convogliate nel nervo ottico. In questo punto non ci sono fotorecettori.

Un occhio sano ha un campo visivo (la sezione di sfera di visione che abbiamo) di circa 200 gradi a sinistra/destra e 180 gradi sopra/sotto.

In linea con l'asse ottico dell'occhio c'è la fovea, il punto della retina più sensibile alla luce. Ha una specie di concavità in cui si concentrano tantissimi coni. La risoluzione massima dell'occhio umano dipende dalla distanza di due recettori nella fovea

Come si è già accennato, il cristallino può cambiare la sua curvatura, e quindi la sua potenza,



- **Lente composta**
- **Diaframma**
- **Rivelatore (coni e bastoncelli)**

Figure 3.1: L'occhio umano

grazie alla contrazione dei muscoli ciliari. Questa capacita' di adattamento della lente si chiama ACCOMODAMENTO. Definendo due distanze:

1. PUNTO REMOTO: PR massima distanza degli oggetti lontani che riusciamo a vedere quando l'occhio e' rilassato. Per un occhio sano e' infinito.
2. PUNTO VICINO: PV minima distanza a cui possiamo vedere in maniera nitida due oggetti vicini (circa 10-12 cm, a una distanza 'comoda' e' 20-25 cm)

possiamo definire la potenza di accomodamento come  $\frac{1}{PV} - \frac{1}{PR}$ .

Solitamente, ci si riferisce a un modello semplificato dell'occhio, che rappresenta l'organo nello stato rilassato. quindi quando vede un oggetto da lontano. La potenza del modello semplificato dell'occhio e' di 60 diottrie, mentre N (punto nodale all'interno del nostro occhio, dove i raggi che passano non vengono rifratti) e' a 16.7 mm dalla retina.

ESERCIZIO: qual e' la minima distanza tra due punti che possiamo risolvere?

### 3.1.1 Difetti visivi

I difetti visivi sono difetti legati all'ottica e non a patologie oculari. Piu' della meta' della popolazione fa uso di occhiali, ed e' definito individuo AMETROPE. Gli ametropi possono essere miopi, astigmatici o ipermetropi. Chi non soffre di disturbi refrattivi (o vizi ottici) e' detto EMMETROPE.

1. MIOPE: vede bene le cose vicine ma ha problemi nel focalizzare le cose distanti. Il suo PR non e' all'infinito.
2. IPERMETROPE: vede male le cose da vicino
3. ASTIGMATICO: ha un problema legato alla non sfericita' della lente: la curvatura della cornea e' diversa, e quindi a seconda del piano attraverso il quale passa la luce vediamo cose focalizzarsi in modo differente.

#### Miopia

La miopia puo' essere causata da due diversi problemi: l'occhio e' troppo lungo o la lente troppo tonda. Infatti, quando la luce arriva dall'infinito, puo' non venire focalizzata dalla retina ma prima perche' l'occhio e' piu' lungo del normale o il cristallino e' troppo tondo e focalizza prima (Fig. 2.17)

Bisogna quindi correggere il difetto facendo arrivare il fascio piu' lontano verso la retina: per questo motivo si utilizzano lenti divergenti. E' necessario avere una lente divergente chea abbia un punto focale uguale al punto remoto della persona (fig 3.3).

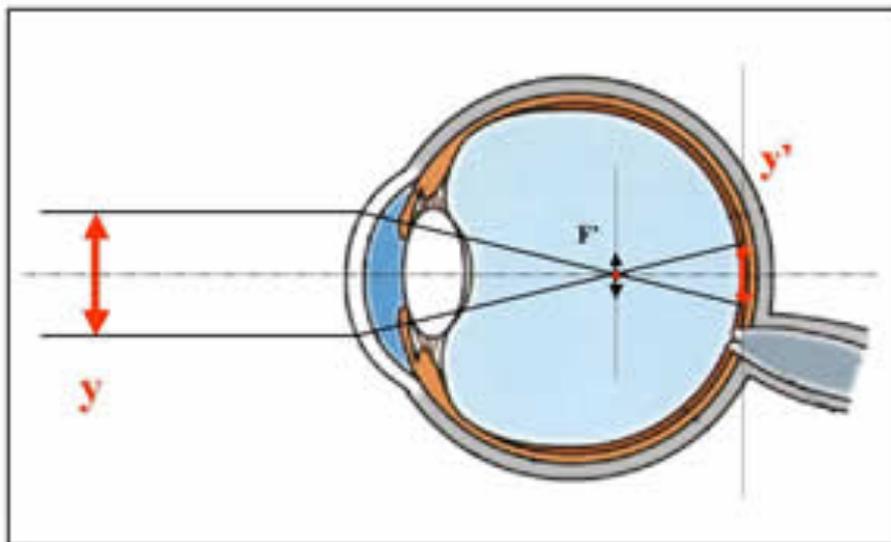


Figure 3.2: L'occhio miope

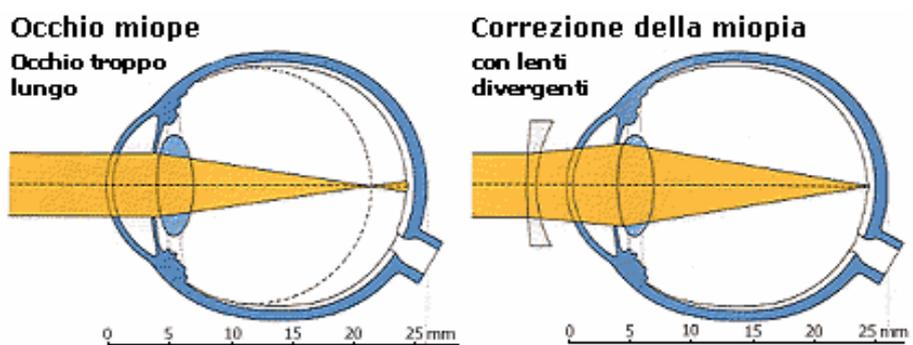


Figure 3.3: L'occhio miope: correzione

### Ipermetropia

L'ipermetropia può essere causata dal fatto che l'occhio è troppo corto, o la lente poco poco tondo. L'immagine allora si formerà dopo la retina. In questo caso, ovviamente si ha bisogno di una lente che mi faccia focalizzare prima, con una lente convergente.

### Astigmatismo

Una differente curvatura della cornea, tipica dell'astigmatismo, fa sì che i fasci di luce vengano focalizzati in punti diversi, ottenendo una immagine non nitida. Questo si compensa utilizzando delle lenti cilindriche, che compensano le differenze di curvatura nelle diverse direzioni.

Per diagnosticare i difetti ottici l'oculista ci sottopone al diagramma di Snellen: le lettere e la distanza a cui siamo posti e' specifica in modo da permettere al dottore di definire l'acuita' visiva:

$$\frac{\text{distanza dell'oggetto in m}}{\text{distanza di taglio dell'oggetto in mm}}$$

ESERCIZIO: per una acuita' visiva di 20/20, quale sarà l'angolo di apertura della lente?

## 3.2 Componenti di un microscopio

Il microscopio ottico composto è uno strumento ottico che usa la luce per produrre una immagine ingrandita di un oggetto (o campione), che è poi proiettata o sulla retina dell'occhio o su una superficie fotosensibile di un qualsiasi strumento di imaging.

Il termine "composto" si riferisce al fatto che le due lenti (o gruppi di lenti) che lo compongono, l'obiettivo e l'oculare, lavorano insieme a produrre l'ingrandimento totale:  $M_{tot} = M_{oculare} * M_{obiettivo}$ . Nell'ottica di comporre l'immagine ingrandita, due sono i componenti principali di un microscopio ottico:

1. **OBIETTIVO**: raccoglie la luce diffratta dal campione e forma una immagine reale ingrandita, chiamata immagine reale intermedia,
2. **CONDENSATORE**: focalizza la luce dalla sorgente di luce in una piccola area del campione da analizzare.

NB Ricordiamo che una immagine reale può essere vista su uno schermo o su una lastra (proprietà di cui non gode l'immagine virtuale).

La disposizione dei diversi componenti di un microscopio diritto (in alto) è mostrato in alto Fig 3.4. Per il microscopio invertito, si veda Fig 3.5.

Il campione può essere osservato in due modi diversi, a cui corrispondono due diverse sorgenti: la luce trasmessa (o DIASCOPICA) per il brightfield e l'interferenza, e la luce riflessa (o EPISCOPICA) per la fluorescenza. Sia l'obiettivo che il condensatore contengono più lenti che lavorano al limite dei loro limiti teorici, e per questo sono molto costose e richiedono quindi di essere utilizzate con la massima attenzione. Altri componenti meno critici per la formazione dell'immagine sono l'oculare, i filtri, i polarizzatori e lo stativo, che permette il movimento x,y per analizzare diverse zone del campione, e il movimento su z per la messa a fuoco.

Per comprendere come l'immagine viene ingrandita e come viene poi percepita dall'occhio, si guardi la Fig 3.6.

Il campione, opportunamente posizionato sullo stativo del microscopio, è dapprima esaminato dall'obiettivo, che produce una immagine ingrandita reale dell'oggetto in corrispondenza del punto focale dell'oculare. Quando guardiamo al microscopio, l'oculare proietta, grazie alla cornea e alle lenti dell'occhio stesso, un'immagine ancora più ingrandita sulla retina, dove è percepita e interpretata dal cervello come una immagine virtuale ingrandita a distanza di circa 25 cm dall'occhio. Per poter essere fotografata, l'immagine intermedia è proiettata come una immagine reale in una camera.

Come già accennato, esistono microscopi diretti o invertiti. In entrambi i design, la posizione

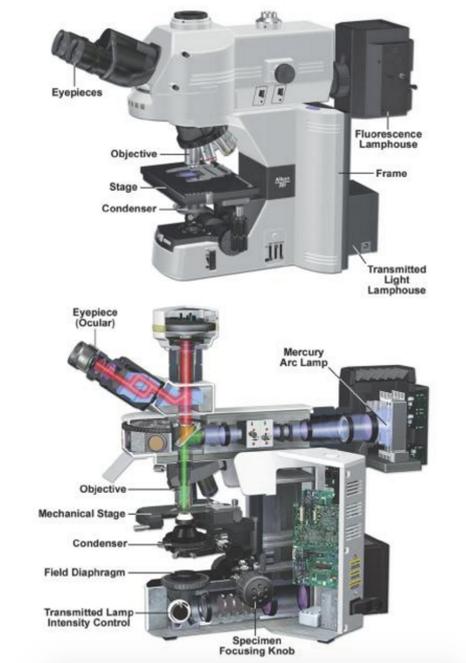


Figure 3.4: Schema del microscopio diritto

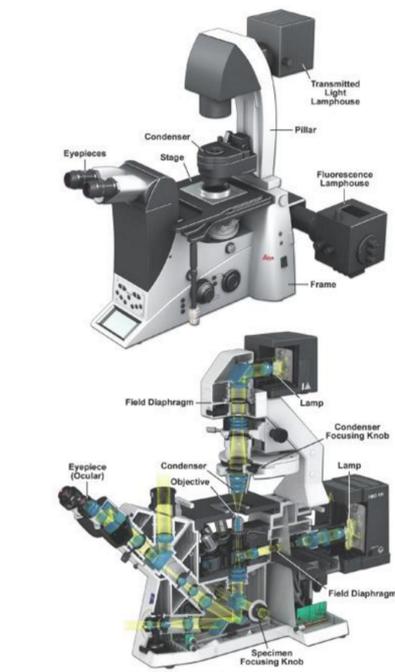


Figure 3.5: Schema del microscopio invertito

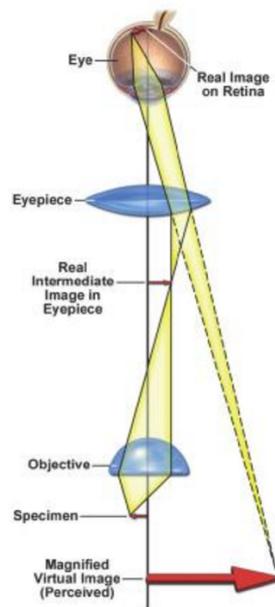


Figure 3.6: Percezione dell'immagine virtuale ingrandita di un campione al microscopio.

del punto focale dell'oculare e' fissa, e il microscopio muove dei componenti per far si' che l'immagine intermedia si formi in corrispondenza del punto focale dell'oculare. Nella maggior parte dei microscopi diretti, gli obiettivi sono montati su una torretta sul corpo del microscopio stesso, e il controllo del fuoco muove il campione su e giu' per portare l'immagine nel preciso punto focale dell'oculare. Nei microscopi invertiti solitamente lo stage e' fisso, ed e' la torretta degli obiettivi a muoversi su e giu' per posizionare l'immagine perfettamente in corrispondenza del punto focale. I microscopi invertiti sono diventati rapidamente molto popolari perche' permettono di osservare cellule in-vivo (ad esempio, in Petri riempite di medium di coltura) dal basso, evitando le problematiche dovute all'evaporazione del medium. Inoltre, l'utente ha dall'alto la possibilita' di accedere alla coltura, per esempio per cambiare il medium o per monitorare dei parametri fisiologici. Infine, avendo il centro di massa piu' vicino al tavolo di lavoro, sono meno sensibili alle vibrazioni. Dall'altra parte, gli obiettivi sono piu' a rischio danneggiamento, poiche' possono urtare con maggior probabilita' contro lo stage del microscopio. Altro problema puo' derivare dall'utilizzo di obiettivi ad olio, che per gravita' puo' entrare in contatto con le lenti, diminuendo le performance ottiche dell'obiettivo stesso.

### 3.2.1 Sorgenti di luce di un microscopio ottico

Ci sono diverse sorgenti di luce utilizzate per illuminare i campioni al microscopio. Le piu' comuni sorgenti di luce sono, per il suo basso costo e lunga vita, la lampada alogena di Tungsteno e, per la sua luminosita' e basso costo, la lampada allo Xeno. Nei microscopi a fluorescenza, particolarmente utilizzati nell'imaging digitale, si utilizzano lampade a diodi.

### 3.2.2 Diffrazione della luce e risoluzione spaziale

Secondo Ernst Abbe, i dettagli di un campione possono essere risolti se un obiettivo e' in grado di catturare luce diffratta. Quindi, se viene utilizzato un mezzo a indice di rifrazione maggiore di quello dell'aria (ad esempio, negli obiettivi ad immersione ad olio, in cui l'olio e' posizionato tra la lente dell'obiettivo e il vetrino su cui il campione e' fissato), l'angolo di diffrazione viene ridotto, e il "ventaglio" di luce rifratta diminuisce (Fig 3.7). Inoltre, poiche' la luce blu e' diffratta a un

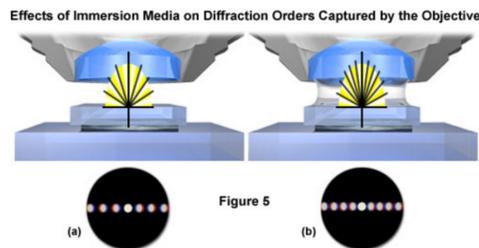


Figure 3.7: Differenza tra un obiettivo ad olio (b) e uno normale (a)

angolo minore rispetto che alla luce verde o rossa, una lente caratterizzata da una certa apertura puo' catturare un ventaglio piu' o meno ampio di luce a seconda della lunghezza d'onda investigata. Questi due principi sono riassunti nella **equazione di Rayleigh**:  $d = 1.22 * \frac{\lambda}{2 * NA}$ , dove  $d$  e' la risoluzione,  $\lambda$  la lunghezza d'onda e  $NA$  e' l'apertura numerica di un obiettivo, che e' una funzione di  $n$  (indice di rifrazione del mezzo tra obiettivo e campione).

Considerando il limite di diffrazione, la risoluzione massima di un microscopio e' circa  $2 \mu m$ .

### 3.2.3 Il condensatore

Nel design di un microscopio, bisogna tener conto di come i raggi luminosi sono organizzati, per poterli guidare con precisione attraverso lo strumento. L'illuminazione e' infatti una delle variabili piu' importanti da controllare per avere immagini di buona qualita': una scarsa luminosita' potrebbe non essere un problema in microscopia brightfield, ma in tecniche come il contrasto di fase, il contrasto a interferenza differenziale, la fluorescenza sono utilizzati elementi ottici aggiuntivi che diminuiscono la porzione di luce utile, rendendo le immagini molto scure. Per ovviare a cio', e' utilizzato il **condensatore**, sistema di lenti provvisto di un "diaframma di apertura" che permette di modificare l'ampiezza del cono di luce che da esso esce.

### 3.2.4 Gli obiettivi

L'obiettivo e' un sistema multi-lente che focalizza le onde luminose provenienti dal campione, formando una immagine intermedia, successivamente ingrandita dall'oculare. Gli obiettivi sono quindi responsabili della formazione della prima immagine del campione, quindi sono punti critici per la qualita' dell'immagine che il microscopio e' in grado di riprodurre. Inoltre, l'ingrandimento di un particolare campione e la risoluzione dipendono fortemente dall'obiettivo utilizzato.

La risoluzione di un obiettivo, ossia la minima distanza tra due oggetti che sono chiaramente divisibili, e' data dall'equazione di Rayleigh precedentemente descritta. L'apertura numerica, definita come  $\frac{D}{f}$  (con  $D$  diametro della lente e  $f$  distanza focale) e' una delle principali caratteristiche dell'obiettivo elencate nei datasheet. In prima approssimazione, e non tenendo conto di aberrazioni ottiche, possiamo considerare che la relazione che lega la risoluzione laterale ( $d$ , ovvero distanza tra due punti tra loro risolti), l'apertura numerica di un sistema ottico (tutto il sistema) e la lunghezza d'onda della radiazione utilizzata sia:  $d = \frac{1.22 * \lambda}{Aperturanumerica}$ .

## 3.3 Diversi tipi di microscopio

DA SCRIVERE

## 3.4 La Optical Coherence Tomography (OCT)

La Optical Coherent Tomography (o tomografia a coerenza ottica) sfrutta l'interferenza tra le onde luminose per avere informazioni sulle strutture interne di un campione biologico.

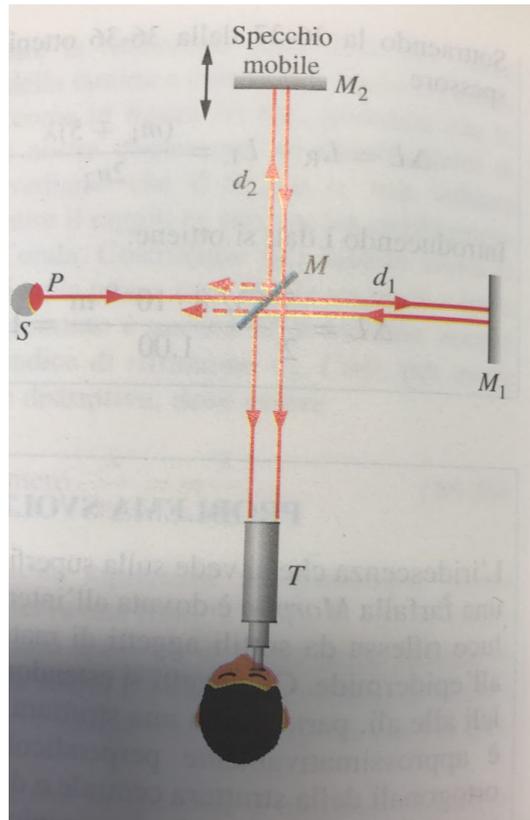


Figure 3.8: Schema di base di un interferometro

Nell'ecografia viene misurato il tempo impiegato da un'onda sonora per raggiungere un tessuto per calcolarne la posizione, e misurata l'intensità dell'onda riflessa per valutare la densità del tessuto. Nell'OCT, la luce utilizzata per l'acquisizione si propaga ad una velocità talmente elevata, che non è possibile misurare il tempo impiegato per raggiungere le strutture da esaminare. Per questo motivo, gli OCT, per localizzare le strutture e valutarne la riflettività sfruttano il principio dell'interferometria.

Quando un fascio di luce è diretto all'interno del campione biologico, si riflette a livello delle interfacce tra i differenti tessuti e diffonde in maniera diversa in tessuti che hanno proprietà ottiche differenti. Le distanze e le dimensioni delle differenti strutture all'interno del campione possono essere determinate misurando il tempo di ritardo dell'eco di luce che viene riflessa o retrodiffusa dalle differenti strutture.

### 3.4.1 Principio di funzionamento dell'interferometria - l'interferometro di Michelson

Il principio di funzionamento della OCT si basa sull'interferometro di Michelson. Un interferometro è un dispositivo che può essere usato per misurare lunghezze o differenze di lunghezze con grande accuratezza per mezzo delle frange di interferenza. Si consideri una luce che proviene dal punto P appartenente a una sorgente estesa S (si veda Fig 3.8) e che incontra un divisore di fascio M.

È questo uno specchio semiriflettente con la capacità di trasmettere metà della luce incidente, riflettendone l'altra metà; nella figura abbiamo assunto, per convenienza, che questo specchio abbia uno spessore trascurabile. In M quindi la luce si divide in due onde. Una viene trasmessa verso lo specchio M1; l'altra viene riflessa verso M2. Le onde si riflettono in ognuno di questi specchi e vengono rinviate lungo la loro direzione di incidenza; alla fine raggiungono entrambe l'occhio dell'osservatore. Quello che l'osservatore vede è una figura di interferenza a frange

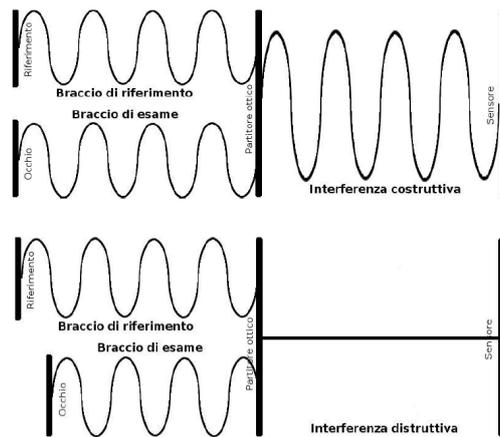


Figure 3.9: Rappresentazione di un'interferenza costruttiva e distruttiva

curve o approssimativamente diritte che rassomigliano alle strisce di una zebra. La differenza di cammino per le due onde quando si riuniscono è  $2*d_2-2*d_1$ , e se questa differenza di cammino subisce qualche cambiamento, cioè provocherà una variazione di fase tra queste due onde. Per esempio, se si muove lo specchio M2 di un tratto pari a  $0.58\lambda$ , la differenza di cammino varia di una quantità pari a  $\lambda$  e la figura di interferenza si sposta di una frangia.

Un cambiamento nella figura di interferenza può anche essere causato dall'inserimento di un sottile materiale trasparente nel percorso ottico di uno degli specchi, per esempio M1. Se il materiale ha uno spessore  $L$  e indice di rifrazione  $n$ , allora il numero di lunghezze d'onda lungo il doppio percorso attraverso il materiale è  $N_m = \frac{2*L*n}{\lambda}$ . Il numero di lunghezze d'onda nello stesso tratto di aria precedente all'inserimento del materiale è  $N_a = \frac{2*L}{\lambda}$ . Quindi quando il materiale è inserito, la luce che ritorna dallo specchio M1 subisce un cambiamento di fase in termini di lunghezza d'onda di  $N_m-N_a = (\frac{2*L}{\lambda}) * (n - 1)$ . Per ogni variazione nella fase di una lunghezza d'onda, la figura di interferenza, la figura si sposta di una frangia. Quindi contando il numero delle frange che a causa del materiale generano la modifica nella figura, e sostituendo questo numero nell'espressione  $N_m-N_a$ , si può determinare lo spessore  $L$  del materiale in funzione di  $\lambda$ . Grazie a tali tecniche si possono esprimere le lunghezze degli oggetti in termini di lunghezze d'onda della luce.

### 3.4.2 Dall'interferometro all'OCT

La sorgente luminosa dell'OCT viene quindi suddivisa da un partitore ottico in due fasci di luce coerente. Uno di questi fasci viene indirizzato in un braccio di riferimento di lunghezza nota. L'altro fascio viene convogliato nel braccio di esplorazione, cioè sui tessuti oculari da esaminare. La luce riflessa dal braccio di riferimento, e dal braccio di esplorazione, viene quindi ricombinata ed inviata ad un sensore

I fasci luminosi provenienti dal braccio di riferimento e dal braccio di esplorazione, ricombinandosi generano un nuovo fascio luminoso, con caratteristiche diverse a seconda del grado di "coerenza" della luce proveniente dai 2 bracci; da questo deriva la "C" nell'acronimo che identifica l'OCT. Se i 2 fasci luminosi sono "coerenti", ossia se le loro onde hanno i picchi massimi e minimi in punti corrispondenti, danno origine ad un'interferenza costruttiva, che aumenta l'ampiezza del fascio risultante (elevato segnale). Se i 2 fasci luminosi sono in opposizione di fase, ossia se le loro onde hanno i picchi massimi e minimi in punti opposti, danno origine ad un'interferenza distruttiva, che annulla l'ampiezza del fascio risultante (elevato nullo). Si veda Fig 3.9

Nei primi strumenti OCT (time domain OCT) la lunghezza del braccio di riferimento veniva

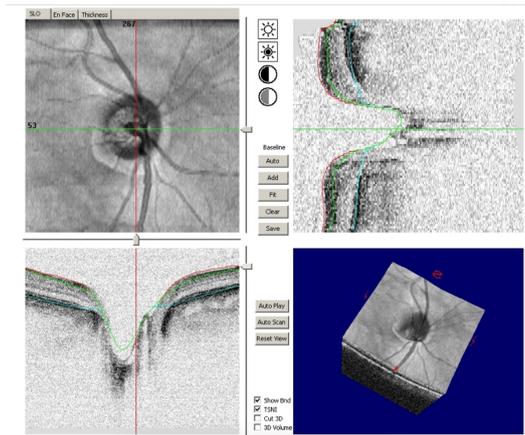


Figure 3.10: Valutazione della configurazione della testa del nervo ottico mediante C-scan. Sono visibili anche le sezioni B-scan orizzontale e verticale eseguite in corrispondenza delle linee verde e rossa.

variata, per verificare se, alla corrispondente profondità, nel braccio di esplorazione c'erano tessuti riflettenti che potevano generare un'interferenza costruttiva. Questi strumenti richiedevano parti meccaniche in movimento durante l'esame, e le scansioni erano piuttosto lente, sgranate, ed influenzate dai movimenti oculari.

Nei più moderni strumenti OCT (Fourier Domain OCT, o Spectral Domain OCT) sono state eliminate le parti meccaniche in movimento durante l'esame, o variando la lunghezza d'onda della sorgente luminosa, oppure utilizzando uno spettrometro che analizza le differenze di lunghezza d'onda nel braccio di riferimento ed in quello di esplorazione. I nuovi apparecchi hanno consentito di ridurre enormemente i tempi di acquisizione delle immagini:

1. da 400 a 40000 A-scan al secondo
2. da 1 B-scan a bassa risoluzione in 1,6 secondi, a 1 B-scan ad alta risoluzione della lunghezza di 6 mm in 4 centesimi di secondo

La maggiore velocità di acquisizione ha permesso di:

1. ridurre ad 1/30 gli artefatti da movimento
2. ripetere più volte la stessa scansione, per eseguire sommatoria dei valori misurati in ogni punto esaminato, ed ottenere delle immagini con miglioramento del rapporto segnale rumore
3. eseguire molte scansioni B-scan affiancate per ottenere una ricostruzione tridimensionale dei tessuti (C-scan) ed esaminarli anche per strati (scansioni en-face) dalla superficie verso la profondità

Come nell'ecografia, con l'OCT si possono ottenere tre diversi tipi di immagini definite A-scan, B-scan, e C-scan.

I tracciati A-scan, o monodimensionali, analizzano la riflettività delle strutture e la loro profondità lungo un singolo raggio luminoso. In OCT sono utilizzate molto di rado.

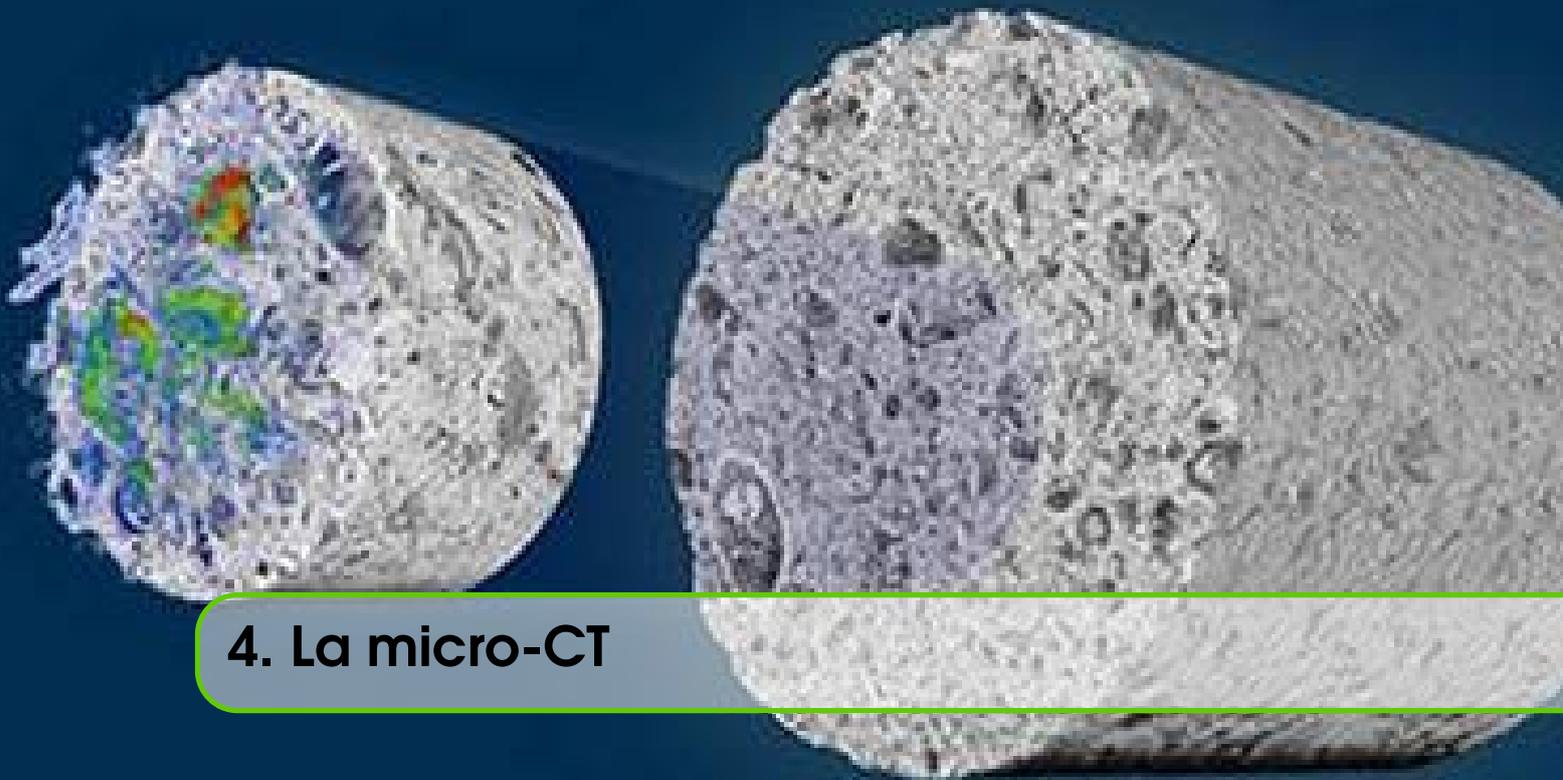
I tracciati B-scan, o bidimensionali, vengono ottenuti affiancando circa diverse scansioni A-scan, eseguite lungo una linea. Sono le rappresentazioni più frequentemente utilizzate in oculistica. Sono immagini molto simili alle sezioni istologiche (i preparati utilizzati per gli esami microscopici tradizionali) dei tessuti. Consentono di valutare la struttura interna dei tessuti, e di eseguire misure degli spessori.

I tracciati C-scan, o tridimensionali, vengono ottenuti affiancando molte scansioni B-scan orizzontali. Un esempio di C-scan è in Fig 3.10.

Il vantaggio dell'OCT, rispetto all'ecografia, dipende dalle dimensioni delle onde utilizzate per eseguire l'esame; le onde luminose utilizzate dagli OCT sono molto più "piccole" (la lunghezza

d'onda è variabile da 820 a 870 nanometri) rispetto alle onde acustiche dell'ecografia, e quindi consentono di ottenere immagini molto più risolte.





## 4. La micro-CT

### 4.1 Principi di funzionamento

La tomografia computerizzata (CT) e' una metodica per immagini che sfrutta le radiazioni ionizzanti e consente di riprodurre sezioni o strati (da cui il termine tomografia) di un campione ed effettuare elaborazioni tridimensionali. Per la produzione di immagini e' necessario l'intervento di un elaboratore di dati.

Attraverso la tomografia computerizzata, si acquisiscono profili monodimensionali: in pratica, un fascio di raggi X attraversa il campione, e dopo averlo attraversato, viene registrato il profilo trasmesso. L'acquisizione e' fatta con raggi che incidono sul campione da piu' direzioni (si arriva a tenere una copertura completa con una rotazione di 360 gradi intorno al campione stesso).

I microscopi ottici ed elettronici tradizionali permettono la visualizzazione di immagini bidimensionali, o di acquisire la superficie di campioni poco spessi. In molti casi, tuttavia, nella maggior parte dei casi di studio e' impossibile trarre conclusioni veritiere su strutture originariamente tridimensionali sulla base di informazioni in due dimensioni.

Si potrebbe ottenere informazioni tridimensionali di queste strutture tagliandole in fettine molto sottili, che possono essere visualizzate da un microscopio ottico e interpolare successivamente le informazioni 2D in un modello 3D. Questo metodo tuttavia non e' molto agevole, e inoltre non garantisce di avere un modello affidabile, dal momento che le strutture da investigare potrebbero essere alterate durante la preparazione del campione, e spesso la distanza tra le due fettine e' troppo elevata: in questo modo, c'e' una perdita inevitabile di utili informazioni.

Un raggio X produce immagini bidimensionali dell'ombra della struttura tridimensionale interna, ma anche in questo caso una singola proiezione di questa ombra porta alla perdita di informazione sul 3D. Solo un raggio tomografico ci permette di visualizzare e misurare complete strutture in 3D senza particolari preparazioni del campione o fissazioni chimiche. Tipicamente, la risoluzione spaziale di un scanner medico convenzionale e' circa 1-2.5 mm, che corrispondono a voxel di 1-10 mm<sup>3</sup>. La microtomografia ci da la possibilita' di aumentare la risoluzione spaziale fino ad ottenere voxel di 10<sup>-6</sup> mm<sup>3</sup>. Come per le CT mediche, le strutture interne possono essere ricostruite e analizzate senza distruggere il campione stesso.

Supponiamo di analizzare una immagine ai raggi X: come si e' gia' detto, essa rappresenta

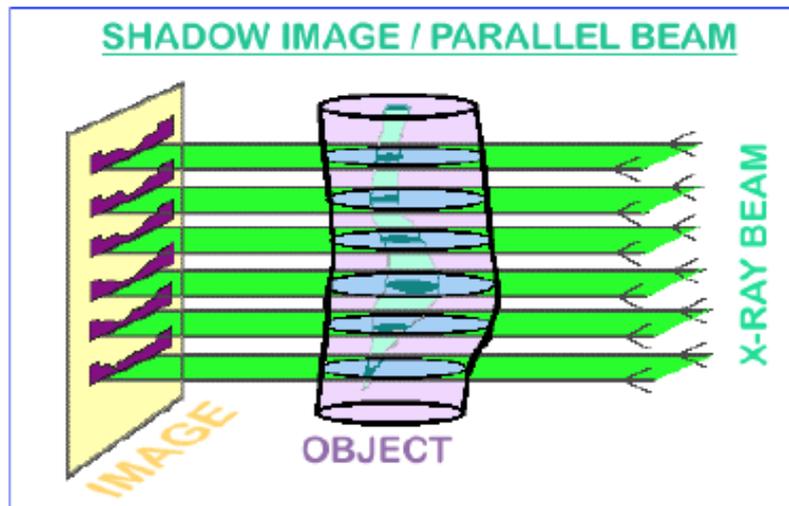


Figure 4.1: Schema della formazione di una immagine 2D ai raggi X (i.e. radiografia).

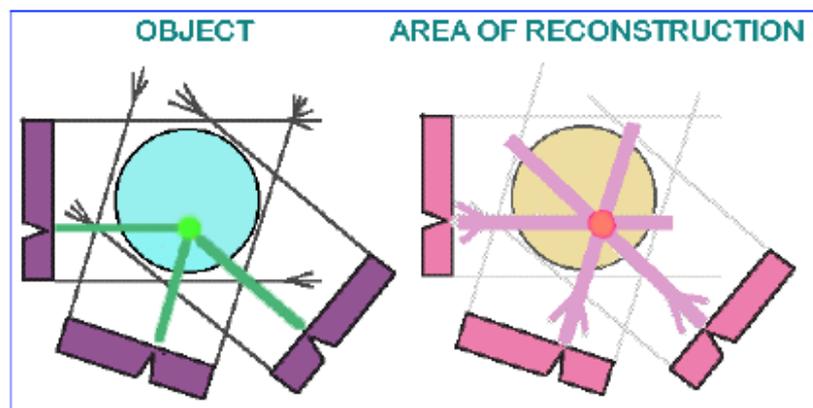


Figure 4.2: Schema della formazione di una immagine 3D ai raggi X (i.e. tomografia).

una proiezione di un oggetto tridimensionale. Nel caso piu' semplice possiamo descrivere l'illuminazione dei raggi X come paralleli: in questa approssimazione, ogni punto dell'immagine contiene l'integrazione delle informazioni di assorbimento all'interno del campione 3D lungo il percorso del corrispondente raggio X (si veda figura 4.1).

Per i principi della geometria parallela, e' possibile dividere il problema di ricostruzione 3D di una struttura da proiezioni bi-dimensionali in una ricostruzione seriale di oggetti 2D da una linea di ombra monodimensionale. E' questo il principio che sfrutta la tomografia. Vediamone un esempio semplice, di un oggetto con un unico punto con un assorbimento significativo posizionato in un punto indefinito del campione. In una linea d'ombra monodimensionale, si vedra' una diminuzione dell'assorbimento in un determinato punto dell'oggetto (si veda figura 4.2).

Se inizializzassimo nella memoria del computer un array di pixel, ognuno corrispondente a una possibile punto dell'oggetto, potremmo essere sicuri che tutte le parti dell'oggetto ricostruito siano all'interno del campo "visivo". Poiche' abbiamo la posizione dell'ombra nel punto di assorbimento dell'oggetto, possiamo riconoscere nell'array il punto con massimo assorbimento, quindi la posizione del punto ad assorbimento significativo nell'oggetto. Ora, supponiamo di

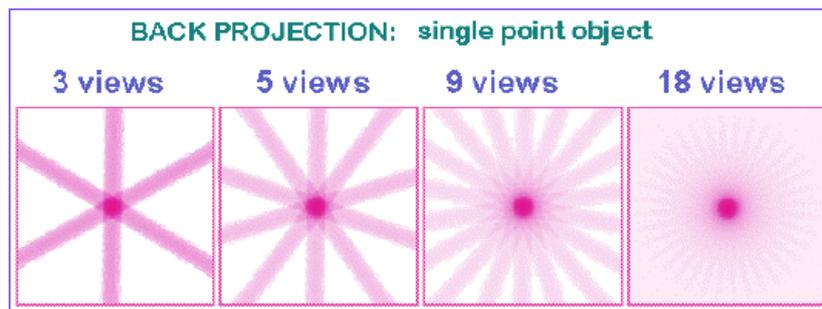


Figure 4.3: Esempio di back-projection.

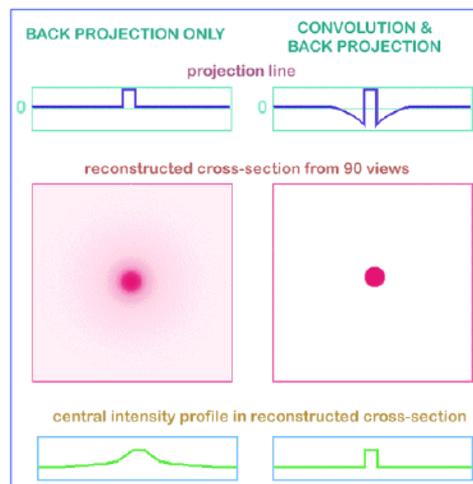


Figure 4.4: Esempio di convoluzione.

ripetere l'operazione ruotando il nostro oggetto. In ogni nuova rotazione, aggiungiamo all'area di ricostruzione le linee delle possibili posizioni dell'oggetto ad assorbimento significativo. Questa operazione e' detta back-projection. Dopo diverse rotazioni, possiamo localizzare la posizione del punto di assorbimento nell'area di ricostruzione. Aumentando il numero di proiezioni da diversi punti di vista (quindi diverse rotazioni), la localizzazione diventa via via piu' definita (si veda figura 4.3).

In caso di ricostruzione ottenuta da un infinito numero di proiezioni, si potrebbe idealmente ottenere una buona definizione della posizione del punto di assorbimento all'interno dell'oggetto scannerizzato. Allo stesso tempo, un'area di sfocamento accompagnera' il punto-immagine, dovuta alla sovrapposizione di diverse linee di ombra a diversa inclinazione. Sapendo che l'immagine e' prodotta da un punto oggetto, e' possibile correggere l'informazione delle linee di assorbimento per avere una immagine corrispondente piu' fedelmente all'oggetto reale. Questa correzione (si veda figura 4.4) e' detta convoluzione.

Lo stesso algoritmo descritto puo' essere usato per produrre immagini non solo da un singolo punto di assorbimento ma per ogni oggetto reale. Oggi l'oggetto puo' essere rappresentato come un volume di voxel, ognuno caratterizzato da un certo assorbimento ai raggi X, e l'assorbimento lineare per ogni raggio X corrisponde alla somma di tutti gli assorbimenti dei voxel colpiti dal raggio. In questo caso, ogni sezione dell'oggetto viene ricostruita da linee monodimensionali ottenute a diverse orientazioni.

Tuttavia, la maggior parte delle sorgenti non genera raggi paralleli. Nel caso reale, si avra' un cono

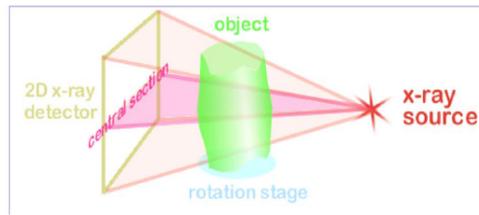


Figure 4.5: Esempio di raggio conico che irradia il campione

di raggi che irradia il campione (si veda figura 4.5)

Nel caso di acquisizione ai raggi X, l'immagine contiene informazione sulla riduzione di intensità all'interno dell'oggetto tridimensionale. Poiché l'assorbimento del raggio segue una legge esponenziale (si veda il prossimo paragrafo), la ricostruzione segue una legge logaritmica. Essendo una operazione non lineare, anche piccoli rumori in una area delimitata potrebbero produrre errori significativi di ricostruzione. Per eliminare questi errori, i dati vengono generalmente mediati prima della ricostruzione. In alternativa, si cerca di ottimizzare il tempo di esposizione del campione, in modo da aumentare il rapporto segnale-rumore. Un modo più efficace per ridurre il rumore nella ricostruzione è selezionare un opportuno filtro per la convoluzione prima della back-projection. Nel caso della micro tomografia, l'informazione di un voxel proviene da una porzione fisica del campione davvero molto ridotta: per questo motivo, la giusta scelta dei parametri per la riduzione del rumore diventa essenziale.

Durante l'acquisizione, il campione ruoterà di 180 o 360 gradi. Ad ogni posizione angolare, si acquisirà una immagine di ombre. Il programma di acquisizione salverà tutte le proiezioni e, a fine acquisizione, partirà la fase di ricostruzione. L'angolo scelto sarà usato per la ricostruzione delle fettine virtuali attraverso l'oggetto 3D. Successivamente, per ogni sezione si genereranno dei dati grezzi (i.e. raw data), che non sono ancora immagini, ma solo una matrice di valori di assorbimento. Quello che si acquisisce è il SINOGRAMMA, consistente nella sovrapposizione dei vari profili acquisiti con un certo angolo sempre crescente. Si parla di sinogramma perché ogni punto man mano che la sorgente si sposta, descrive una sinusoide. Si usano angoli da 0 a 180 gradi perché in teoria se ho un fascio parallelo, l'acquisizione fatta in un verso corrisponde a quella fatta nel verso opposto. Per la ricostruzione tomografica, è necessario considerare la forma conica dell'irraggiamento. Infatti, con la geometria conica, i raggi che attraversano il campione da un lato e dall'altro (in maniera speculare) non saranno gli stessi dal punto di vista del detector. Ulteriori algoritmi di ricostruzioni, partendo dalle informazioni di assorbimento, creeranno le immagini e le successive interpolazioni per ottenere l'oggetto virtuale in 3D.

## 4.2 Calcolo del profilo di assorbimento

Il profilo è calcolato come segue:

$$I(x) = I_0 * e^{-\mu x} \quad (4.1)$$

$$\log\left(\frac{I_0}{I(X)}\right) = \mu * x = P(X) \quad (4.2)$$

Essendo in generale il campione da acquisire una struttura non omogenea, i raggi incontreranno layer diversi, ognuno con un  $\mu$  diverso, quindi l'equazione corretta è:

$$I(x) = I_0 * e^{-\sum \mu * x} \quad (4.3)$$

$$\log\left(\frac{I_0}{I(X)}\right) = \mu_{EFF} * x = P(X) \quad (4.4)$$

Il tutto viene ricostruito attraverso tre tecniche principali: trasformata di Fourier, retroproiezione e tecniche iterative.

#### 4.2.1 Radiografia vs Tomografia

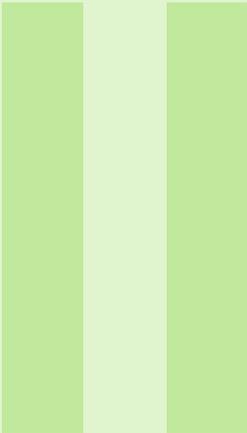
##### **RADIOGRAFIA**

- contrasto non elevato a causa dell'effetto compton (scattering)
- profilo bidimensionale: la proiezione di una informazione 3D in 2D nasconde le differenze che ci sono tra strutture parallele

##### **TOMOGRAFIA**

- contrasto piu' elevato, ma il campione e' nettamente piu' irraggiato
- profili monodimensionali calcolati in base a profili di attenuazione





# Parte Seconda

<b>5</b>	<b>Come si forma una immagine</b> .....	<b>45</b>
5.1	Acquisizione delle immagini	
<b>6</b>	<b>Elementi di image processing usando MATLAB</b> .....	<b>47</b>
6.1	Cos'è una immagine?	
6.2	Cos'è l' image processing?	
6.3	Trasformazioni del dominio spaziale	
6.4	Filtraggio spaziale	
6.5	Segmentazione	
6.6	Elaborazione di immagini a colori	
<b>7</b>	<b>Metodi di chiarificazione tissutale per imaging</b> .....	<b>71</b>
7.1	Le principali tecniche di chiarificazione: descrizione e comparazione	
7.2	Come ottimizzare la procedura di chiarificazione?	
7.3	Conclusioni e prospettive future	
<b>8</b>	<b>Matlab</b> .....	<b>77</b>
8.1	Nozioni di base	





## 5. Come si forma una immagine

### 5.1 Acquisizione delle immagini

La maggior parte delle immagini che prenderemo in esame sono generate dalla combinazione di una fonte di illuminazione e dalla riflessione o dall'assorbimento dell'energia da parte degli elementi della scena visualizzata. L'illuminazione può essere generata da una fonte di energia elettromagnetica come i radar, gli infrarossi, un sistema di raggi X, oppure da fonti meno tradizionali, come gli ultrasuoni per esempio. In relazione alla natura della fonte, l'energia dell'illuminazione è riflessa dagli oggetti (ad esempio, la luce riflessa da una superficie piana) o trasmessa attraverso gli oggetti (ad esempio, i raggi X che passano attraverso il corpo del paziente). In alcune applicazioni, l'energia riflessa o trasmessa è focalizzata su un fotoconvertitore che converte l'energia in luce visibile. La microscopia elettronica sfrutta proprio questo metodo. La figura 5.1 mostra le tre principali modalità di acquisizione di un sensore volte alla trasformazione dell'energia luminosa in immagini digitali. L'idea è semplice: l'energia in entrata è trasformata in tensione elettrica grazie alla combinazione dell'elettricità in input e del materiale del sensore sensibile a un particolare tipo di luce rilevata. La forma d'onda della tensione di uscita è la risposta del sensore, e una quantità digitale viene ottenuta da ciascun sensore attraverso la digitalizzazione di questa risposta. Uno dei sensori più comuni è il fotodiodo di silicio la cui corrente in uscita è proporzionale alla luce. La disposizione dei sensori in linea viene utilizzata più frequentemente dei singoli sensori, per velocizzare l'acquisizione. Allo stesso modo, i sensori possono essere disposti in modo da formare un array bidimensionale (fig 5.1).

I più comuni sono i CCD (Charge Coupled Device), la cui risposta del singolo sensore è direttamente proporzionale all'integrale dell'energia luminosa proiettata sulla superficie del sensore. La riduzione del rumore si realizza lasciando che il sensore integri il segnale luminoso in input per qualche tempo  $t$ . Il vantaggio principale di questo tipo di sensori è che non serve più spostare il singolo sensore per acquisire una immagine.

Per creare una immagine digitale, abbiamo bisogno di convertire i dati continui in una forma digitale: questa operazione comprende due processi: il campionamento e la quantizzazione.

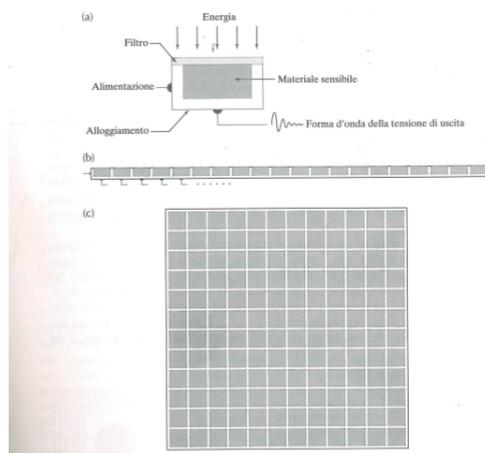


Figure 5.1: (a) Singolo sensore di imaging, (b) sensori in linea (c) matrice di sensori

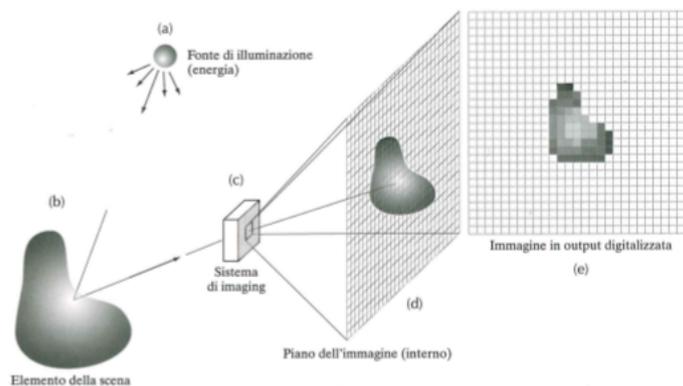
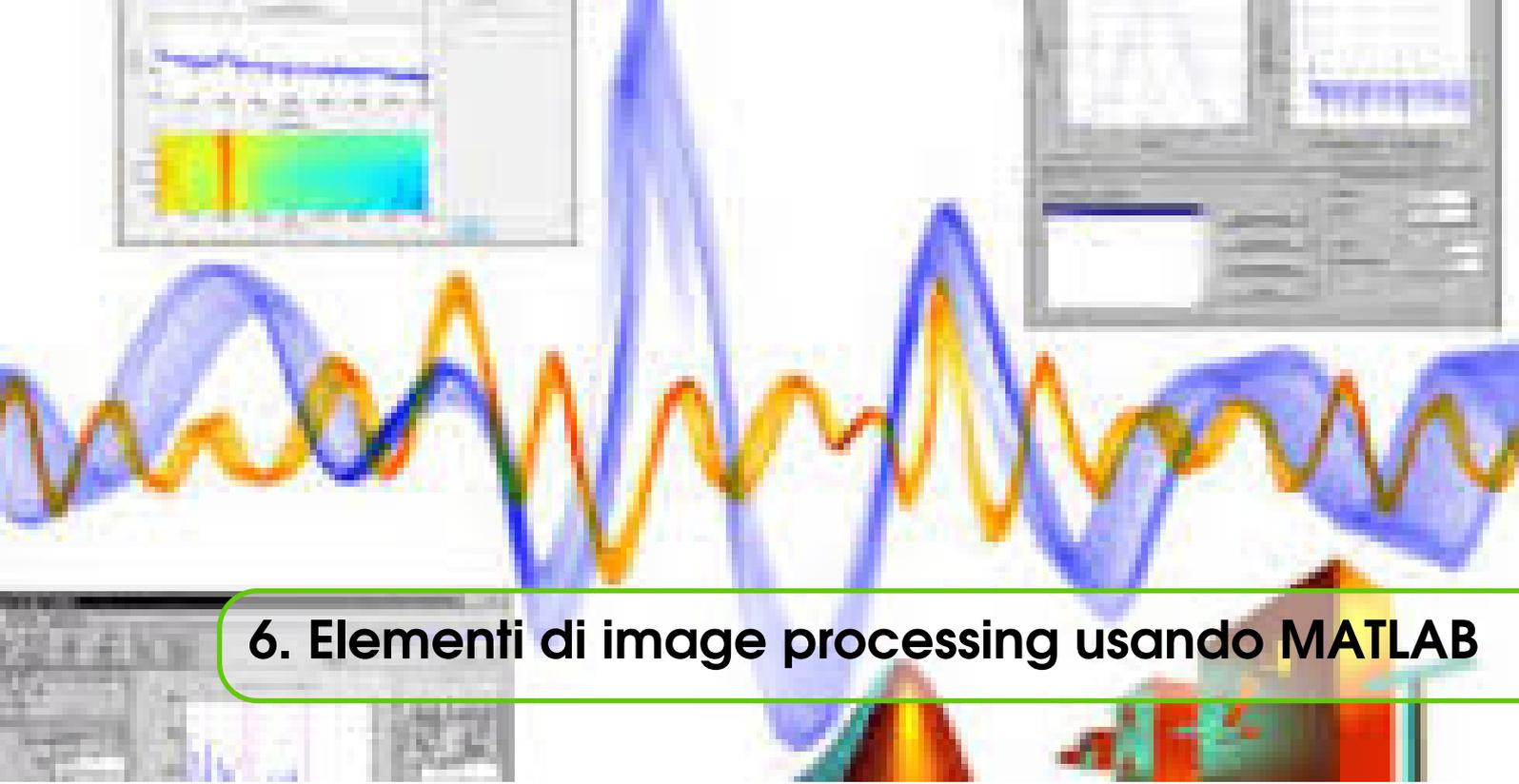


Figure 5.2: Esempio del processo di acquisizione delle immagini digitali: (a) fonte di energia (b) elemento della scena (c) sistema di imaging (d) proiezione della scena sul piano dell'immagine e (e) immagine digitalizzata

### 5.1.1 Un semplice esempio di formazione dell'immagine

Le immagini sono denotate da una funzione bidimensionale nella forma  $f(x,y)$ . Il valore o l'ampiezza  $f$  nelle coordinate spaziali  $(x,y)$  e' una quantita' scalare positiva il cui significato fisico e' determinato dalla fonte dell'immagine. Quando l'immagine e' generata a partire dall'elaborazione fisica,  $f(x,y)$  deve essere finita e diversa da zero. La funzione  $f(x,y)$  puo' essere caratterizzata da due componenti: la quantita' di luce diretta incidente sulla scena e la quantita' di luce riflessa dagli oggetti presenti nella scena. Sono dette componenti di ILLUMINAZIONE e RIFLETTANZA, e sono espresse rispettivamente da  $i(x,y)$  e  $r(x,y)$ , che combinate danno origine alla funzione  $f(x,y)$ . Mentre la riflettanza  $r$  puo' assumere valori da 0 (totale assorbimento) a 1 (totale riflessione) e dipende dalle caratteristiche degli oggetti, la natura di  $i$  dipende dalla fonte di illuminazione. Tutti gli elementi discussi sono schematizzati in fig 5.2.



## 6. Elementi di image processing usando MATLAB

### 6.1 Cos'è una immagine?

Gli esseri umani sono creature che utilizzano la vista più che gli altri sensi per interagire con il mondo che ci circonda. Gli esseri umani hanno evoluto infatti nel tempo abilità ottiche molto precise: sappiamo identificare una faccia in un istante, possiamo differenziare colori e possiamo processare una enorme quantità di informazioni visive molto velocemente. Siamo capaci di interagire con immagini singole, degli “snapshots”, come anche elaborare scene che cambiano nel tempo: in questo contesto, parleremo in particolare di singole immagini.

Una IMMAGINE è una singola figura che rappresenta qualcosa. Può essere una fotografia di una persona, di gruppi di persone o di animali, una microfotografia di un componente elettronico o il risultato di imaging medico.

#### 6.1.1 Le immagini digitali

Immaginiamo di avere un'immagine semplice a livelli di grigio, ad esempio una foto. Un'immagine monocromatica può essere definita come una funzione bidimensionale  $f(x,y)$ , dove  $x$  e  $y$  sono le coordinate spaziali sul piano, e l'ampiezza  $f$  in ogni coppia di coordinate  $(x,y)$  viene chiamata intensità o livello di grigio dell'immagine in quel determinato punto. Quando  $x$ ,  $y$  e i valori dell'ampiezza  $f$  sono tutti finiti, quindi quantità discrete, possiamo definire l'immagine come immagine digitale. La digitalizzazione è frutto di sampling (su  $x$  e  $y$ ) e di quantization (su  $f$ ), come mostrato in Fig 6.1.

Assumiamo che i valori di intensità di livello di grigio possano assumere qualunque valore reale nel range 0 (NERO) e 1 (BIANCO). Il range di  $x$  e  $y$  dipendono chiaramente dall'immagine, ma possono assumere solo determinati valori tra il minimo e il massimo suddetti.

Una immagine digitale differisce da una foto perché i valori di  $x$ ,  $y$  e  $f(x,y)$  sono discreti. In particolare, questi valori sono di solito interi che vanno da 0 (NERO) a 255 (BIANCO) (Fig 6.2).

Una immagine digitale può essere quindi considerata come un array di punti discreti, ed ad ognuno di essi è associato un valore discreto di intensità di grigio. Questi punti sono detti PICTURE ELEMENTS, o PIXEL. I pixel che circondano un dato pixel  $P$  costituiscono il NEIGHBOURHOOD. Il neighbourhood può avere forme diverse (ad esempio,  $3 \times 3$  o  $3 \times 7$ ). Tranne

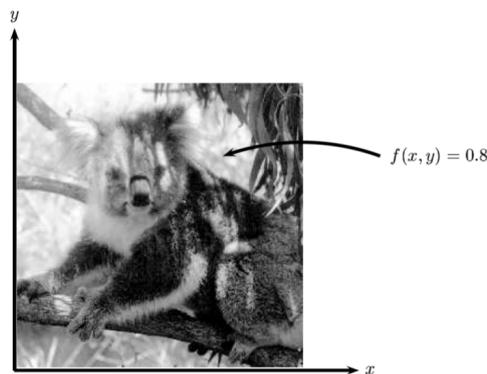


Figure 6.1: Una immagine vista come funzione bidimensionale

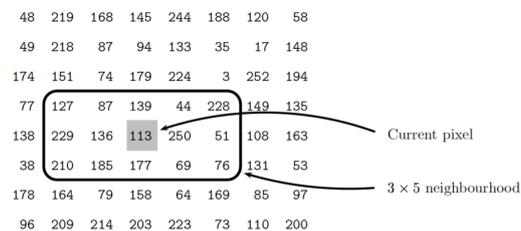


Figure 6.2: Un pixel e il neighbourhood 3x5

che in circostanze particolari, i neighbourhood hanno numero dispari di righe e colonne: in questo modo, il pixel P da analizzare e' sempre al centro.

### Tipi di immagini digitali

Considereremo 4 tipi base di immagini digitali:

1. **BINARY**: ogni pixel puo' essere solo o nero o bianco. Poiche' ci sono solo due possibili valori per ogni pixel, e' necessario solo un bit per pixel: per questo motivo, le immagini binarie sono molto efficienti in termini di storage.
2. **GREYSCALE** (o **A LIVELLI DI GRIGIO**): ogni pixel e una sfumatura di grigio, normalmente da 0 (nero) a 255 (bianco), quindi ogni pixel ha bisogno di 8 bit per poter essere rappresentato.
3. **TRUE COLOUR** (o **RGB**): Ogni pixel ha un particolare colore, che viene descritto da un acerto quantitativo di rosso, verde e blu. Se ognuna di queste componenti ha un range 0-255, e' possibile descrivere  $255^3$  diversi colori, con un totale di 24 bit per ogni pixel.
4. **INDEXED**: i colori della maggior parte delle immagini possono essere rappresentate da un piccolo sottoinsieme dei 6 milioni di colori possibili. Per aumentare l'efficienza di storage, l'immagine ha associata una colour map, o colour palette, che e' semplicemente una lista di tutti i colori usati nell'immagine. Ogni pixel ha un valore che non e' direttamente legato al suo colore (come nelle immagini RGB), ma un indice al colore della mappa. Un esempio e' in Fig 6.3.

#### 6.1.2 MATLAB e le immagini: cosa sono e come le visualizzo

Come visto nella precedente sezione, MATLAB permette di lavorare con le matrici con molta semplicita'. Le immagini possono essere considerate come delle matrici, i cui elementi altro non sono che i valori dei pixel dell'immagine. In questa sezione, impareremo come le possibilita' di operare con le matrici in MATLAB ci permetta di analizzare le immagini e le loro proprieta'.

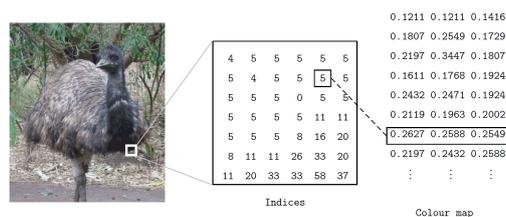


Figure 6.3: Un esempio di immagine INDEXED

## Le immagini greyscale

Supponiamo di aprire MATLAB, e di scrivere nella command window:

```
» w=imread('greyscale.jpg');
```

questo comando prende i valori di grigio dell'immagine greyscale wombats.tif (che e' in qualche cartella del nostro computer, che specificheremo in MATLAB prima di avviare qualsiasi operazione) e li stocka nella matrice w. Questa matrice w e' una variabile MATLAB, quindi come tale possiamo utilizzarla per fare diverse operazioni. In generale, quindi, *imread* legge i valori dei pixel di un file immagine e ritorna una matrice con tutti i valori dei pixel.

Se volessimo visualizzare la matrice come una immagine grayscale, dovremmo utilizzare il comando:

```
» figure, imshow(w), impixelinfo
```

In realta', ci sono tre diversi comandi in questa riga (utilizzandola virgola, MATLAB permette di scrivere piu' comandi su una stessa riga di codice):

1. **figure**: crea una figure a monitor. La figure e' una finestra in cui puo' essere visualizzato un oggetto grafico
2. **imshow**: mostra la matrice w come una immagine. Nel caso di una immagine monocromatica a profondita' di bit maggiore di 8bit, usare la funzione *imagesc*
3. **impixelinfo**: mostra in basso a sinistra nella figure i valori dei pixel puntati dal cursore

## Immagini RGB

MATLAB utilizza gli stessi comandi visti nel precedente paragrafo per leggere e visualizzare una immagine 24-bit RGB. In questo caso, pero', i valori dei pixel consisteranno in 3 numeri, corrispondenti alle componenti, rosse, verde e blu rispettivamente dei colori di ogni pixel.

Un'altra importante differenza e' data dalla matrice restituita dal comando *imread*, che risultera' essere tridimensionale. Infatti, una immagine RGB in MATLAB e' vista come uno stack di tre diverse matrici bidimensionali, ognuna delle quali stocka l'informazione sul canale rosso, verde e blu rispettivamente.

**NOTA: come visualizzo solo un canale a video?**

## Immagini INDEXED a colori

Nel caso in cui cerchiamo di leggere una immagine INDEXED a colori come fatto precedentemente, i tre valori dei pixel non saranno tre numeri interi tra 0 e 255 come sopra, bensì tre frazioni tra 0 e 1. Quindi, se visualizzata con il comando *imshow*, avremo una immagine molto scura: l'immagine non e' vista come a colori, ma come una immagine grayscale.

Infatti, le immagini indexed consistono in due matrici: una colour map e una matrice con gli indici alla colour map. Per ottenere anche le informazioni della colour map, i comandi *imread* e *imshow* verranno usati come segue:

```
» [em,map]=imread('emu.tif');
» figure,imshow(em, map), impixelinfo
```

MATLAB storerà i valori RGB dell'immagine indexed come double, con valori nel range 0-1.

### 6.1.3 Ottenere informazioni della tua immagine

Molte informazioni sull'immagine possono essere ottenute dalla funzione *imfinfo*.

```
»imfinfo('rgb.jpeg')
```

Molte delle informazioni non ci sono utili: tuttavia, possiamo ottenere la grandezza dell'immagine, la dimensione del file in bytes, il numero di bits per pixel e il colour type (per esempio, indexed).

### 6.1.4 Data types e conversioni

Gli elementi che compongono una matrice in MATLAB possono essere di diversi data types: i più comuni sono:

1. **int8**: interi 8-bit; range -128,127
2. **uint8**: interi senza segno 8-bit; range 0,255
3. **int16**: interi 16-bit; range -32768,32767
4. **uint16**: interi 16-bit senza segno; range 0,65535
5. **double**: numeri reali; range dipendente dalla macchina

Importante sottolineare che non sono possibili operazioni tra immagini che non siano dello stesso datatype.

Una immagine grayscale è **uint8**: per poter effettuare qualsiasi operazione aritmetica, è necessario prima convertirla in double.

È possibile convertire una immagine da un data type a un altro, tramite i comandi:

1. **y=ind2gray(x,map)**: da indexed a greyscale
2. **[y,map]=gray2ind(x)**: da greyscale a indexed
3. **y=rgb2gray(x)**: da RGB a greyscale
4. **y=gray2rgb(x)**: da greyscale a RGB
5. **y=ind2rgb(x,map)**: da indexed a RGB

Nota che **gray2rgb** crea una immagine a colori semplicemente replicando i valori dei grigi sui tre canali.

### 6.1.5 Proprietà di una immagine

#### Risoluzione spaziale

La risoluzione spaziale è la densità dei pixel all'interno dell'immagine: maggiore è la risoluzione spaziale, più pixel servono per descriverla.

Possiamo sperimentare la risoluzione spaziale utilizzando il comando MATLAB *imresize*. Supponiamo di avere una immagine 256x256 greyscale. Il comando

```
» imresize(x,0.5)
```

dimezza la dimensione dell'immagine, eliminando gli elementi pari della matrice, sia sulle colonne che sulle righe. Cambiando i parametri a *imresize*, possiamo cambiare la risoluzione effettiva di una immagine, come notiamo in fig 6.4:

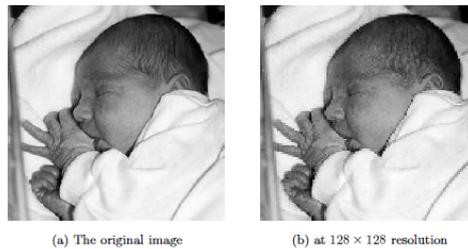


Figure 1.28: Reducing resolution of an image

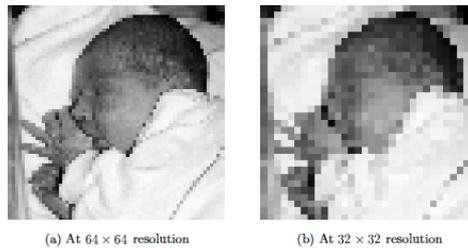


Figure 6.4: Un esempio di come funziona la funzione imresize

## 6.2 Cos'è l'Image processing?

L'Image processing comporta cambiamenti nella natura dell'immagine, per:

1. migliorarne le informazioni per l'interpretazione umana;
2. renderla più adatta alla percezione da parte di macchine autonome (i.e. robot).

Una procedura che soddisfa il punto (1) probabilmente sarà la scelta peggiore dal punto di vista del punto (2): infatti, mentre gli esseri umani prediligono immagini chiare, nitide e dettagliate, le macchine preferiscono interfacciarsi con immagini semplici.

Esempi di procedure che soddisfano (1), in Fig 6.5:

- intensificazione dei contorni di una immagine per renderla più nitida (sharpening)
- rimozione del rumore da una immagine (noise removing)
- rimozione del motion blur da una immagine (deblurring)

Esempi di procedure tipiche di (2), in Fig 6.6:

- ottenere i contorni di una immagine, ad esempio per effettuare delle misure sull'immagine (edges finding)
- rimozione dei dettagli da una immagine, ad esempio per contare gli oggetti (blurring)

### 6.2.1 A cosa serve l'Image processing?

È talvolta utile suddividere i diversi algoritmi di image processing in sottoclassi. Ci sono algoritmi differenti per risolvere problemi differenti, ed è importante saper distinguere la natura del task da portare a termine:

1. Image enhancement: ci si riferisce all'elaborazione di una immagine per renderla più idonea a una particolare applicazione (esempi: sharpening o deblurring, aumentare i contorni, migliorare il contrasto di una immagine, o renderla più luminosa, eliminare il rumore)
2. Image restoration, per eliminare un danno all'immagine causato da danni noti (esempi: eliminazione del blur dovuto a movimento lineare, rimozione di distorsioni ottiche o di interferenze periodiche)
3. Image segmentation, che permette di suddividere una immagine nelle sue parti costituenti, o



Figure 6.5: Esempi di sharpening, noise removing e deblurring

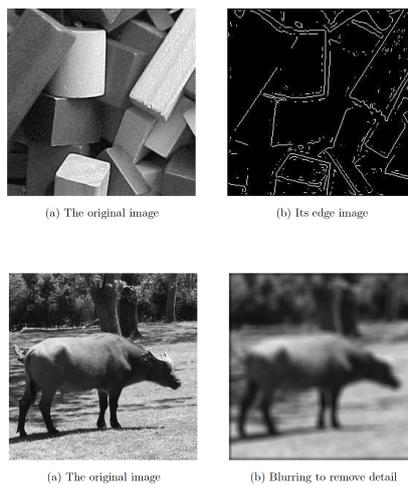


Figure 6.6: Esempi di edge finding e blurring

di isolare certi aspetti di una immagine (esempi: trovare cerchi o oggetti di particolari forme, identificazione di macchine o strade in una immagine fatta dall'alto)

Queste classi non sono disgiunte: un certo algoritmo ha spesso bisogno sia di image enhancement che di image restoration, ad esempio.

### 6.2.2 Un esempio di image processing task

E' importante, per avere un buon algoritmo di image processing, sapere, dato un determinato problema, quali sono gli step da fare per risolverlo, magari in maniera automatica. Il work-flow usualmente prevede:

1. Acquisizione dell'immagine digitale, utilizzando per esempio una camera CCD o uno scanner
2. Pre-processing, che permette di ottenere un'immagine piu' idonea per le successive elaborazioni (esempio: aumento del contrasto, rimozione del rumore..)
3. Segmentazione, che permette di estrarre dall'immagine le informazioni di cui abbiamo bisogno (esempio: conta degli oggetti in una immagine)
4. Rappresentazione e descrizione, che permette di estrarre particolari caratteristiche che permettono di differenziare gli oggetti in una immagine
5. Riconoscimento e interpretazione, che permette di assegnare delle etichette (label) agli oggetti basati su dei descrittori e assegnare un significato specifico alle label.

### 6.2.3 Step dell'elaborazione

L'elaborazione dell'immagine e' un processo costituito da massimo tre passaggi:

1. IMAGE PROCESSING: comprende tutte le trasformazioni che rendono l'immagine idonea per l'image analysis. In ingresso ha un'immagine e in uscita una immagine, debitamente trasformata;
2. IMAGE ANALYSIS: comprende tutte le trasformazioni che permettono di estrarre delle misure quantitative da una immagine. In ingresso ha un'immagine e in uscita uno o piu' valori numerici;
3. IMAGE UNDERSTANDING: e' lo step decisivo in cui l'operatore, con le sue capacita' e conoscenze, estrae un risultato significativo dagli step successivi.

### 6.2.4 Classificazione dei metodi di processing

Ogni operazione di elaborazione delle immagini trasforma i valori dei livelli di grigio dei pixel. In ogni caso, tali operazioni possono essere divise in tre grandi classi, sulla base delle informazioni richieste per effettuare la trasformazione:

1. TRANSFORMATE: una trasformatrice rappresenta i valori dei pixel in un'altra forma ad essi equivalente. Le trasformate permettono di ottenere algoritmi efficienti e molto potenti, perche' permettono di processare una unica immagine come un singolo grande blocco. Il workflow di una trasformazione di questo genere e' in Fig 6.7
2. NEIGHBORHOOD PROCESSING (filtraggio spaziale): permette di cambiare il valore di livello di grigio di un singolo pixel conoscendo il valore di livello di grigio di un piccolo kernel intorno al dato pixel.
3. POINT OPERATION (o trasformazioni di intensita'): permette di cambiare il valore di livello di grigio di un singolo pixel conoscendo il valore di livello di grigio del dato pixel, senza avere informazioni sui pixel circostanti.

In questo contesto, ci riserviamo di studiare sia il neighbourhood processing che il point operation, entrambi facenti parte delle trasformazioni nel dominio spaziale.

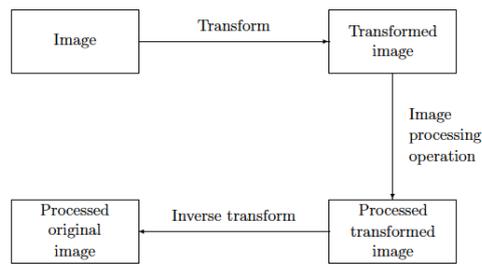


Figure 6.7: Schema di un processo di elaborazione di immagine avvalendosi di una trasformata

## 6.3 Trasformazioni del dominio spaziale

I processi del dominio spaziale possono essere riassunti nell'espressione  $g(x,y) = T[f(x,y)]$ , in cui  $f(x,y)$  è l'immagine in ingresso,  $T$  è l'operatore su  $f$  in un intorno di un punto  $(x,y)$  e  $g(x,y)$  è l'immagine in uscita. L'operatore si può applicare a una singola immagine o a più immagini.

Il processo consiste nello spostamento dell'origine dell'intorno del pixel e nell'applicazione dell'operatore  $T$  ai pixel della regione, per produrre l'output in quel punto. Di solito, il processo comincia alla sommità sinistra dell'immagine di input e procede pixel dopo pixel in maniera orizzontale, una riga alla volta.

La procedura appena descritta viene detta filtraggio spaziale, in cui l'intorno e la relativa operazione predefinita danno luogo a un filtro spaziale o kernel. La più piccola regione possibile misura  $1 \times 1$ . In questo caso,  $g$  dipende solo dal valore di  $f$  nel singolo punto e si parla di point operation. L'operatore  $T$  diventa una trasformazione di intensità, la cui formula è  $s = T(r)$ . A seconda della trasformazione di intensità, possiamo implementare diversi tipi di elaborazione dell'immagine, ma tutte vanno a lavorare sulla forma dell'istogramma dei livelli di grigio.

Dopo aver definito cos'è un istogramma dei livelli di grigio, la maggior parte degli esempi che studieremo riguarderanno il miglioramento (enhancement) dell'immagine. L'enhancement è un processo di manipolazione dell'immagine tale che il risultato sia più adatto dell'originale a una specifica applicazione. L'aggettivo specifica è importante perché stabilisce fin dall'inizio che le tecniche di miglioramento sono problemi dedicati: non esiste una teoria specifica per il miglioramento dell'immagine.

### 6.3.1 Istogramma dei livelli di grigio

Prima di poter procedere con lo studio delle trasformazioni nel dominio spaziale, dobbiamo definire cos'è l'istogramma dei livelli di grigio di una immagine. Data un'immagine monocromatica, l'istogramma è un grafico che indica il numero di volte in cui ogni singolo livello di grigio è presente.

A seconda della forma dell'istogramma, possiamo avere delle utili informazioni sulla immagine stessa:

- in una immagine scura, i valori di livello di grigio saranno raggruppati nella zona più a sinistra dell'istogramma
- in una immagine chiara, i valori di livello di grigio saranno raggruppati nella zona più a destra dell'istogramma
- in una immagine ben contrastata\*, i livelli di grigio saranno piuttosto sparpagliati a coprire l'intero range dell'immagine

\* Il contrasto in un'immagine è il rapporto o differenza tra il valore più alto (punto più luminoso) e il valore più basso (punto più scuro) della luminosità nell'immagine.

**Il comando MATLAB per visualizzare l'istogramma dei livelli di grigio di una immagine  $x$  è**

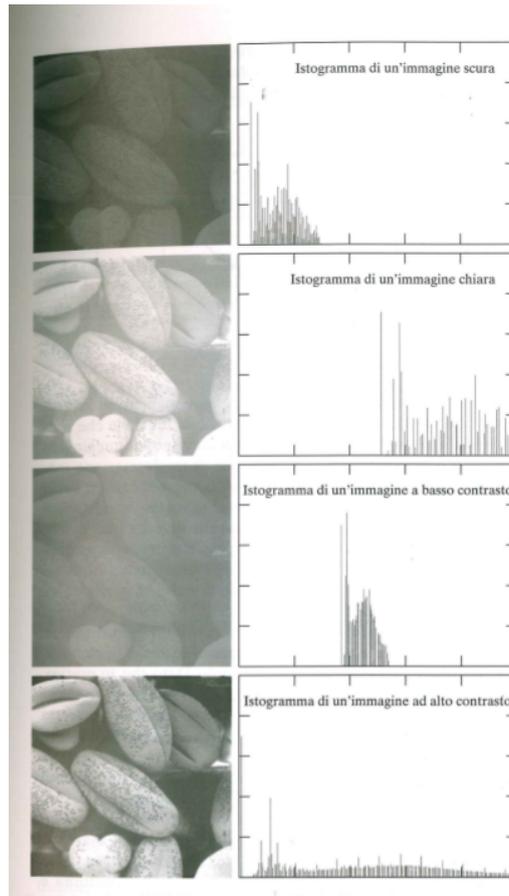


Figure 6.8: Quattro tipi di immagine base e i corrispondenti istogrammi

*imhist(x).*

Un esempio di istogramma e' in fig 6.4.

Gli istogrammi sono la base per numerose tecniche di elaborazione del dominio spaziale, come ad esempio il miglioramento dell'immagine. Gli istogrammi consentono di analizzare le immagini digitali fornendo una serie di informazioni utilizzabili anche per la segmentazione. Si consideri a riguardo la fig 6.8

### 6.3.2 Operazioni aritmetiche

Le operazioni aritmetiche sulle immagini possono essere riassunte applicando  $y = f(x)$  ad ogni livello di grigio in una immagine. Assumendo di lavorare con una immagine monocromatica a 8-bit, la piu' semplice operazione di questo genere puo' essere, ad esempio,  $y = f(x) \pm C$ , o  $y = C * f(x)$ , con C costante.

In MATLAB, le funzioni per effettuare operazioni aritmetiche sono: *imadd*, *imsubtract* e *immultiply*.

NB Cosa cambia all'istogramma dei livelli di grigio?

### 6.3.3 Le trasformazioni di intensita'

Le trasformazioni di intensita' sono tra le piu' semplici tecniche di elaborazione dell'immagine, esprimibili dalla formula  $s=T(r)$ , dove T e' una trasformazione che mappa il valore r di un pixel nel corrispondente valore s. In fig 6.9 si mostrano differenti tipologie base di funzioni utilizzate

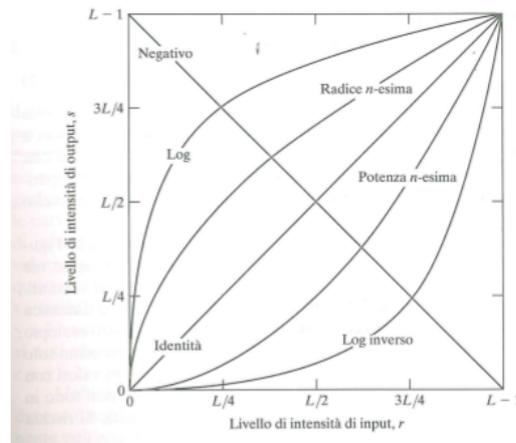


Figure 6.9: Alcune funzioni di base per la trasformazione di intensità

frequentemente per i miglioramento dell'immagine:

- LINEARE: trasformazioni negative ( $s = L-1-r$ ) e identità (in cui l'immagine di uscita è uguale a quella in ingresso)
- LOGARITMICHE: trasformazioni log ( $s = c \cdot \log(1+r)$ )
- DI POTENZA: trasformazioni della potenza n-esima ( $s = c \cdot r^\gamma$ )

### 6.3.4 Funzione di trasformazione lineare a tratti

Un approccio alternativo ai metodi presentati nei tre paragrafi precedenti è l'utilizzo di funzioni lineari a tratti. Il vantaggio principale rispetto agli altri tipi di funzioni viste è che la forma di questo tipo di funzioni può essere arbitrariamente complessa. Infatti, l'implementazione pratica di alcune importanti trasformazioni può essere formulata solo tramite funzioni. Lo svantaggio principale è che esse richiedono input maggiori da parte dell'utente.

#### Espansione del contrasto (stretching)

Una delle più semplici funzioni lineari a tratti è lo stretching del contrasto. Lo stretching è un processo che amplia la gamma dei livelli di intensità di una immagine in modo tale che venga utilizzata l'intera gamma di valori.

In fig 6.10 si mostra una trasformazione tipica usata per lo stretching del contrasto. Le posizioni  $(r_1, s_1)$  e  $(r_2, s_2)$  determinano la forma della curva. Se  $r_1=s_1$  e  $r_2=s_2$ , la trasformazione è una funzione lineare che non produce cambiamenti nei livelli di intensità. Se  $r_1=s_1$ ,  $s_1=0$  e  $s_2=L-1$ , la trasformazione diventa una funzione soglia che crea una immagine binaria. I valori intermedi di  $(r_1, s_1)$  e  $(r_2, s_2)$  producono vari gradi di stretching dei livelli di intensità dell'immagine di output, con ripercussioni sul contrasto. In generale, si suppone  $r_1 \leq s_1$  e  $r_2 \leq s_2$ , in modo da avere una funzione monotona crescente. Questa condizione mantiene l'ordine dei livelli di intensità, prevenendo eventuali artefatti nell'immagine finale.

In MATLAB, lo stretching dell'istogramma può essere ottenuto tramite il comando `imadjust(im, [r1 r2],[s1 s2])`. In particolare, tramite la variabile  $\gamma$  è possibile anche descrivere la forma della funzione tra le coordinate  $(r_1, s_1)$  e  $(r_2, s_2)$ . Se il default è  $\gamma = 1$ , valori più bassi produrranno una funzione concava, mentre valori più alti produrranno una funzione convessa, come in fig 6.11.

#### Equalizzazione dell'istogramma

Uno dei problemi più grandi tra i metodi di stretching dell'istogramma sopra menzionati è che richiedono degli input da parte dell'utente. A volte, un approccio migliore è dato dall'equalizzazione

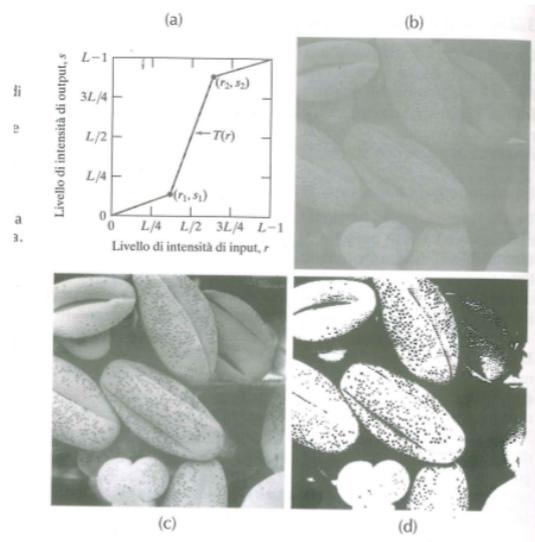


Figure 6.10: Esempio di stretching del contrasto

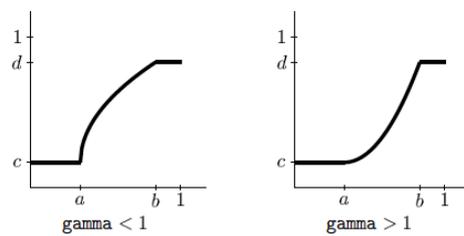


Figure 6.11: La funzione imadjust con  $\gamma$  non uguale a uno

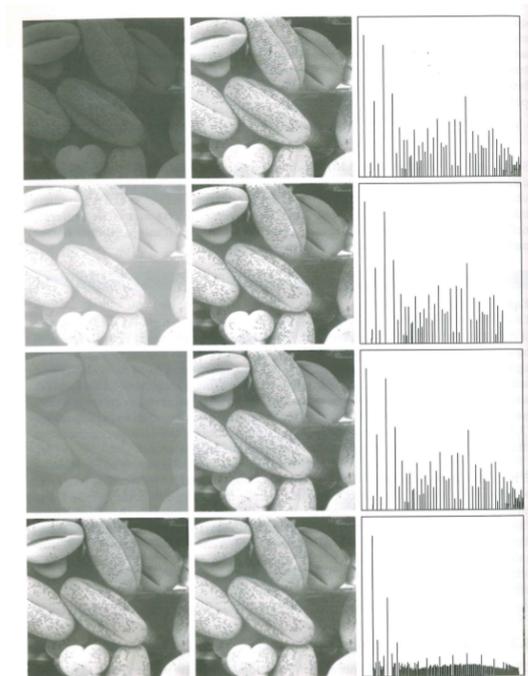


Figure 6.12: Esempi di equalizzazione

dell'istogramma, che è una procedura interamente automatica. L'idea è quella di cambiare l'istogramma con uno uniforme: cioè significa che ogni barra ha la stessa altezza, in modo che ogni livello di grigio dell'immagine ricorra con la stessa frequenza.

Supponiamo di avere una immagine con  $L$  diversi livelli di grigio ( $0-L-1$ ) e che l' $i$ -esimo livello si ripeta  $n_i$  volte nell'immagine. Supponiamo anche che il numero totale di pixel nell'immagine sia  $n$ . Per trasformare i livelli di grigio per ottenere una immagine equalizzata, cambiamo i livelli di grigio in modo da avere:

$$\frac{n_0 + n_1 + \dots + n_i}{n} * (L - 1) \quad (6.1)$$

arrotondando il numero all'intero più vicino.

Esempi di equalizzazione sono riportati in fig 6.12

In MATLAB, l'equalizzazione dell'istogramma può essere ottenuto tramite il comando *histeq(im)*

## 6.4 Filtraggio spaziale

In questa sezione, presentiamo alcuni concetti riguardanti l'utilizzo dei filtri spaziali per l'elaborazioni delle immagini. Il filtraggio spaziale è uno degli strumenti principali dell'immagine processing. Il termine filtro si riferisce all'accettazione o al rigetto di alcune componenti in frequenza, lavorando quindi nel dominio della frequenza. È possibile avere risultati analoghi utilizzando filtri spaziali (chiamati anche kernel) direttamente sull'immagine. Infatti, c'è una corrispondenza uno-a-uno tra i filtri spaziali lineari e i filtri nel dominio della frequenza. Comunque, i filtri spaziali offrono maggiore versatilità perché possono essere utilizzati anche per filtri non lineari, cosa che non è possibile nel dominio della frequenza.

Un filtro spaziale, consiste in:

- una regione di prossimità

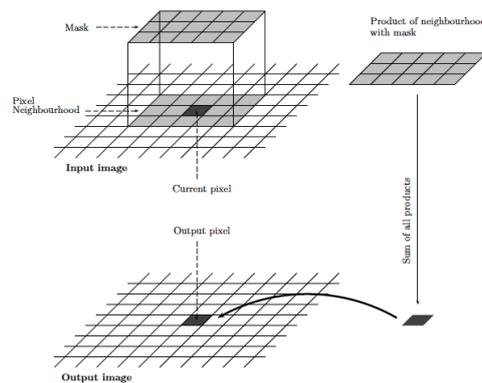


Figure 6.13: Operazione di filtraggio spaziale

- una operazione predefinita che viene applicata ai pixel dell'immagine appartenente alla regione

Il filtraggio crea un nuovo pixel con le stesse coordinate spaziali del centro dell'intorno, il cui valore e' il risultato dell'operazione di filtraggio. Una immagine filtrata viene creata dalle modifiche introdotte dal filtro su ogni pixel dell'immagine di input. La fig 6.13 riassume quanto detto:

In particolare, per ogni punto  $(x,y)$  dell'immagine, la trasformazione  $g(x,y)$  del filtro e' la somma dei prodotti dei coefficienti del filtro con i pixel dell'immagine interessati dal filtro stesso. Si noti che il coefficiente centrale del filtro si allinea con il pixel in posizione  $(x,y)$ . In generale, il filtraggio spaziale di una immagine di dimensioni  $M \times N$  con un filtro di dimensioni  $m \times n$  e' dato dalla seguente espressione:

$$g(x,y) = \sum_{s=-a}^a \sum_{t=-b}^b w(s,t) f(x+s, y+t)$$

dove  $x$  e  $y$  variano in modo tale che ogni pixel di  $w$  visiti ogni pixel di  $f$ .

#### 6.4.1 Creazione di maschere per filtri spaziali

La creazione di un filtro spaziale lineare  $m \times n$  richiede che vengano specificati i coefficienti della maschera. Questi coefficienti vengono scelti in base a cosa si suppone il filtro debba fare, tenendo conto che il filtraggio lineare non e' altro che implementare una somma di prodotti.

Ad esempio, supponiamo di voler sostituire i pixel di una immagine con l'intensita' media di una regione  $3 \times 3$  centrata su questi pixel. Il valor medio di ogni punto  $(x,y)$  sara' la somma dei valori delle 9 intensita' della regione  $3 \times 3$  centrata su  $(x,y)$  diviso 9. In altre parole, il filtraggio lineare con una maschera  $3 \times 3$  i cui coefficienti sono  $1/9$  implementa la media desiderata.

Su questa falsa riga, implementiamo diversi filtri spaziali.

##### Filtri spaziali di smoothing

I filtri di smoothing vengono utilizzati per produrre immagini sfuocate e per la riduzione del rumore. E' possibile, ad esempio, rimuovere piccoli dettagli da una immagine per cui e' prioritario portare alla luce grandi oggetti e colmare le piccole interruzioni in linee e curve. In particolare, studieremo i filtri lineari, detti anche filtri low pass. Sostituendo il valore di ogni pixel di una immagine con la media dei livelli di intensita' nella regione definita dalla maschera del filtro, questo processo fornisce una immagine in cui le transizioni di intensita' brusche vengono appianate. Purtroppo, l'applicazione di un filtro di questo tipo causa anche un effetto di sfuocamento lungo gli edge che di solito rappresentano caratteristiche visive importanti. Un'altra applicazione di questo tipo di procedimento e' l'eliminazione di falsi contorni che derivano dall'utilizzo di un numero insufficiente di livelli di intensita'. L'uso piu' comune di questo tipo di filtri e' comunque quello della riduzione dei dettagli

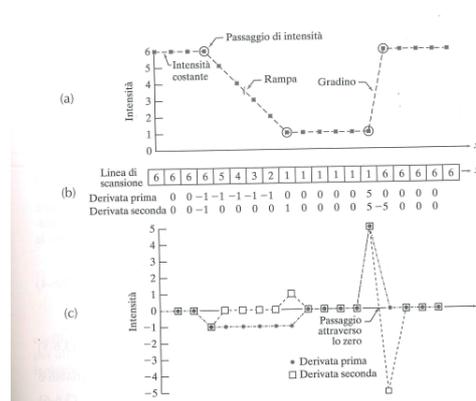


Figure 6.14: Una funzione digitale 1D, con la corrispondente derivata prima e seconda.

irrilevanti di una immagine. Per irrilevanti intendiamo le regioni di pixel che sono piccole rispetto alle dimensioni della maschera del filtro. In seguito, si riportano due filtri di smoothing 3x3.

$$\begin{matrix}
 1/9 & 1/9 & 1/9 \\
 1/9 & 1/9 & 1/9 \\
 1/9 & 1/9 & 1/9
 \end{matrix} \tag{6.2}$$

$$\begin{matrix}
 1/16 & 1/8 & 1/16 \\
 1/8 & 1/4 & 1/8 \\
 1/16 & 1/8 & 1/16
 \end{matrix} \tag{6.3}$$

Mentre il primo filtro e' un esempio di media, il secondo introduce la cosiddetta media ponderata: i pixel vengono infatti moltiplicati per coefficienti diversi, dando piu' peso a determinati pixel rispetto che ad altri. Nel caso specifico, il pixel al centro della maschera e' moltiplicato per un valore superiore a qualunque altro; gli altri pixel sono pesati in funzione della loro distanza dal centro. Questo tipo di maschera ci permette di ridurre la sfocatura nel processo di smoothing.

### Filtri spaziali di sharpening

L'obiettivo principale dei filtri di sharpening e' di mettere in evidenza le transizioni di intensita'. Nel precedente paragrafo, abbiamo visto che e' possibile sfocare un'immagine facendo la media dei pixel in un intorno spaziale. Dato che il calcolo della media e' un procedimento analogo all'integrazione, e' logico concludere che l'operazione di sharpening puo' essere attuata tramite la derivata parziale.

Le derivate di una funzione digitale si definiscono utilizzando le differenze locali. A prescindere dalla definizione usata, un operatore che approssima la derivata prima (1) deve essere zero nelle aree di intensita' costante e (2) deve essere diverso da zero su un gradino (o rampa) di intensita'. Per comprendere come funzionano filtri del genere, si riporta una illustrazione in fig 6.14 delle derivate prima e seconda di una funzione digitale 1-D che rappresenta la sezione di un profilo di orizzontale di intensita' di una immagine.

**Il filtro laplaciano** Il metodo laplaciano consiste nella definizione di una formulazione discreta della derivata seconda e la successiva costruzione di una maschera filtro. Per semplicita', si implementeranno filtri isotropici, la cui risposta e' indipendente dalla direzione delle discontinuita'

dell'immagine a cui il filtro e' applicato. Il filtro laplaciano ha la forma:

$$\begin{bmatrix} 0 & 1 & 0 \\ 1 & -4 & 1 \\ 0 & 1 & 0 \end{bmatrix} \quad (6.4)$$

NB la dimostrazione di come si costruisce un filtro laplaciano la vedremo durante l'esercitazione.

**Uso della derivata prima per lo sharpening: il gradiente** Le derivate prime vengono implementate utilizzando una approssimazione del gradiente. Per una funzione  $f(x,y)$ , il gradiente di  $f$  alle coordinate  $(x,y)$  e' definito come un vettore colonna bidimensionale:

$$\nabla f = \text{grad}(f) = \left[ \frac{\delta f}{\delta x}, \frac{\delta f}{\delta y} \right]'$$

questo vettore ha una proprieta' geometrica importante: esso punta verso la direzione dove e' piu' concentrata la piu' alta percentuale di variazione della  $f$  rispetto al punto  $(x, y)$ .

I due filtri piu' famosi che implementano l'operatore gradiente sono i filtri 2x2 di Roberts, detti anche operatori a croce:

$$\begin{bmatrix} -1 & 0 \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (6.5)$$

$$\begin{bmatrix} 0 & 1 \\ -1 & 0 \end{bmatrix} \quad (6.6)$$

e gli operatori di Sobel:

$$\begin{bmatrix} -1 & -2 & -1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 1 & 2 & 1 \end{bmatrix} \quad (6.7)$$

$$\begin{bmatrix} -1 & 0 & -1 \\ -2 & 0 & 2 \\ -1 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (6.8)$$

In MATLAB, la funzione `filter2(filter, image, shape)` permette di implementare operazioni di filtraggio. Il parametro 'shape' e' optionale: ad esempio, usando 'same' permette di riprodurre una matrice di uguale grandezza di quella originale usando lo zero padding (contorna la matrice originale con degli zero per permettere alla maschera di poter sovrapporsi a tutta l'immagine); usando 'valid' permette di applicare la mask solo ai pixel dentro la matrice, quindi riprodurre una matrice piu' piccola.

Oltre a creare manualmente le maschere da utilizzare, possiamo utilizzare la funzione `fspecial`, che permette di utilizzare filtri gia' implementati in MATLAB. Per esempio, `fspecial('average', [5 7])` crea una maschera 5x7 che implementa un filtro di smoothing. `fspecial` permette di implementare vari filtri visti, come quello di Sobel, il laplaciano etc (vedi HELP in linea).

NB le matrici che crea `filter2` sono matrici di double, possiamo mostrarle a video con il comando `imshow` trasformandole in uint8 o dividendo tutto per 255 o usando `mat2gray`.

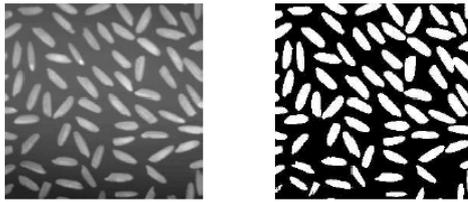


Figure 6.15: Sogliatura di grani di riso

## 6.5 Segmentazione

La segmentazione è un procedimento che suddivide un'immagine nelle regioni o negli oggetti che la compongono. È, in generale, uno degli obiettivi più difficili da raggiungere nell'ambito dell'elaborazione delle immagini: l'accuratezza della segmentazione determina l'eventuale riuscita o l'eventuale fallimento delle procedure di analisi computerizzata.

La maggior parte degli algoritmi di segmentazione si basa su una delle due proprietà di base dei valori di intensità: discontinuità e similarità. Nel primo caso si tende a partizionare un'immagine basandosi sui bruschi cambiamenti di intensità, come ad esempio di edge. Nel secondo caso, ci si basa sulla similarità tra regioni facendo riferimento a un insieme di criteri di similarità predefiniti. Rientrano in questa ultima categoria le tecniche di sogliatura (thresholding) e di crescita delle regioni (region growing). In questa sede, parleremo in maniera più approfondita della sogliatura.

### 6.5.1 Segmentazione per continuità'

#### Sogliatura

Una immagine a livelli di grigio è convertita in immagine binaria (quindi in bianco e nero) in due step: dapprima si sceglie un livello di grigio  $T$  a seconda che esso sia più piccolo o più grande di  $T$ . In particolare, un pixel  $p(x,y)$  diventerà bianco se il suo livello di grigio è maggiore di  $T$ , e nero se il suo livello di grigio è minore o uguale a  $T$ .

Un esempio di segmentazione è mostrato in fig 6.15.

La sogliatura è fatta in modo molto semplice in MATLAB. Supponendo di avere una immagine  $X$  a 8 bit, il comando:

```
» X>T
```

effettua la segmentazione. Infatti, il comando  $X > T$  fa diventare true (quindi 1) tutti i pixel che hanno valore maggiore di  $T$ , e false (quindi 0) tutti i pixel che hanno valore minore di  $T$ . Il risultato quindi sarà una immagine binaria, perché ad ogni pixel corrisponderà un valore logico. Il risultato verrà sempre visualizzato con il comando *imshow*. Oltre al comando suddetto, MATLAB utilizza *im2bw(image, level)*, in cui *level* indica la frazione di livello di da convertire in bianco. Infatti, visto che *im2bw* lavora indifferentemente su immagini uint8 o uint16, automaticamente scala il valore di livello di grigio rispetto all'immagine che si sta elaborando.

#### Sogliatura doppia

In questo caso, si sceglieranno due valori di livelli di grigio,  $T_1$  e  $T_2$ , tali che un pixel  $p(x,y)$  diventa bianco se il suo valore di livello di grigio è tra  $T_1$  e  $T_2$ , nero altrimenti.

In MATLAB, questo verrà implementato con:

```
» X>T1 & X<T2
```

in cui  $\&$  funziona come un and logico, quindi si otterrà il valore uno, bianco, solo se entrambi le condizioni sono soddisfatte.

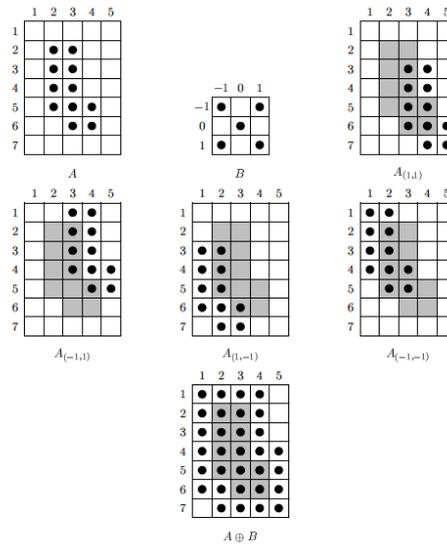


Figure 6.16: Dilatazione utilizzando un elemento strutturale a X

### Applicazioni della sogliatura

La sogliatura puo' essere molto utile in diverse applicazioni:

- quando vogliamo eliminare dettagli non necessari in una immagine;
- per evidenziare dettagli nascosti;
- per eliminare le variazioni nel background nell'immagine.

### 6.5.2 Operazioni morfologiche

La morfologia e' uno strumento utile per la rappresentazione e la descrizione della forma di una regione. E' uno strumento matematico atto a studiare una regione, sia esso in bianco e nero o a livello di grigio.

#### Idea di base

Parleremo nel dettaglio di due operazioni di base, nel senso che tutte le altre operazioni sono costruite come combinazione di queste due.

**Dilatazione** Siano A e B due set di pixel. La dilatazione di A con B e' definito come  $\bigcup_{x \in B} A_x$ . Questo vuol dire che per ogni elemento x appartenente a B (detto elemento strutturale), trasleremo A di quelle coordinate e faremo l'unione di tutte le traslazioni. Un esempio e' in fig 6.16.

**Erosione** Dati due set A e B, l'erosione di A con B e' definito come:  $w: B_w \subseteq A$ . In altre parole, l'erosione di A con B consiste in tutti i punti  $w = (i,j)$  per cui  $B_w$  e' in A. Per poter effettuare l'erosione, dobbiamo muovere B su A e trovare tutti i posti in cui B fitta su A. Un esempio e' dato in fig 6.17

in MATLAB, le operazioni morfologiche sono implementate con i comandi *imdilate(image, kernel)* e *imerode, kernel*. Il kernel viene modellato tramite il comando *strel*.

**Opening e Closing** Queste operazioni possono essere considerate operazioni di secondo livello, perche' possono essere ottenute a partire dalle operazioni base di erosione e dilatazione.

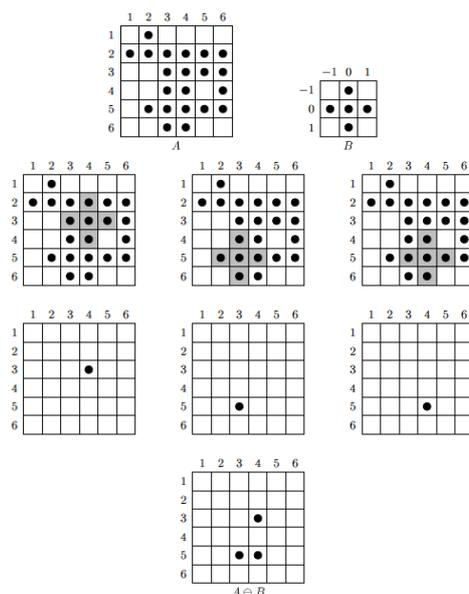


Figure 6.17: Erosione utilizzando un elemento strutturale a croce

L'operazione di apertura (o opening) permette di separare forme che si toccano senza denaturare grossolanamente la reale forma degli oggetti stessi. Essa consiste in una erosione seguita da una dilatazione, sempre utilizzando lo stesso elemento strutturale.

L'operazione di chiusura (o closing), di contro, permette di unire forme.

in MATLAB, le operazioni morfologiche sono implementate con i comandi *imopen(image, kernel)* e *imclose, kernel)*.

**Altre operazioni morfologiche** Le operazioni morfologiche sulle immagini binarie possono essere varie. in MATLAB, molte di esse sono implementate con il comando *bwmorph*. **VEDETE HELP IN LINEA**

## 6.6 Elaborazione di immagini a colori

L'uso del colore nelle elaborazioni delle immagini e' motivato da due fattori principali. Per prima cosa, il colore e' un descrittore che semplifica l'identificazione di un oggetto e la sua estrazione da una scena. In secondo luogo, gli uomini sono in grado di distinguere migliaia di gradazioni di colori e di intensita', in confronto a solo due dozzine di tonalita' di grigio. Cio' e' di particolare importanza nell'analisi manuale dell'immagine attuata dagli esseri umani.// In particolare, distinguiamo l'elaborazione full-color e quella a falsi colori. Nel primo caso, le immagini in questione vengono acquisite con un sensore full-color, come una macchina fotografica o uno scanner. Nel secondo caso, si assegna un colore a particolari valori di intensita' monocromatici o appartenenti a una gamma di intensita'. Le tecniche di elaborazioni a falsi colori sono state per molto tempo le uniche modalita' di trattamento del colore nelle immagini. Negli ultimi anni, la disponibilita' di sensori a colori e di hardware in grado di elaborare immagini a colori ha fatto si che le tecniche di elaborazione full-color possano essere usate in numerose applicazioni.

Alcuni metodi in scala di grigio illustrati nelle sezioni precedenti sono facilmente applicabili alle immagini a colori. Alcune tecniche invece richiedono una specifica riformulazione per essere coerenti con le proprieta' degli spazi colore.

### 6.6.1 Considerazioni di base sul colore

Anche se il processo seguito dal cervello umano nel percepire e interpretare il colore è un fenomeno fisiopsicologico che non è stato ancora interamente compreso, la natura fisica del colore può essere espressa su base formale supportata da risultati sperimentali e teorici.

Nel 1666 Newton scoprì che, quando un raggio di luce passa attraverso un prisma di vetro, il raggio di luce in uscita non è bianco ma consiste, invece, di uno spettro continuo di colori che vanno dal viola al rosso. Lo spettro del colore è stato successivamente diviso in 6 ampie regioni: viola, blu, verde, giallo, arancio e rosso. A piena risoluzione cromatica, nessun colore nello spettro termina bruscamente, ma ogni colore sfuma gradualmente nel successivo. // I colori che gli esseri umani e alcuni animali percepiscono in un oggetto sono determinati dalla natura della luce riflessa dall'oggetto. La luce visibile è composta da una banda relativamente stretta di frequenze nello spettro elettromagnetico. Un corpo che riflette completamente la luce apparirà bianco. Un corpo che favorisce la riflessività in una gamma limitata dello spettro visibile mostra alcune gradazioni di colore. Ad esempio, gli oggetti verdi riflettono la luce con lunghezze d'onda principalmente nella gamma 500-570 nm, mentre assorbono la maggior parte dell'energia dalle altre lunghezze d'onda. La caratterizzazione della luce è un nodo centrale della scelta del colore. Se la luce è acromatica e senza colore e il suo unico attributo è l'intensità: il termine livello di grigio usato finora si riferisce a una misura scalare di intensità che va dal nero ai grigi e infine al bianco. La luce cromatica invece copre lo spettro elettromagnetico da circa 400 fino a 700 nm. Per descrivere la qualità di una fonte di luce cromatica vengono usate tre quantità di base:

- **radianza**: è la quantità totale di energia che fuoriesce dalla fonte di luce, ed è solitamente misurata in watt (W).
- **luminanza**: è la misura della quantità di energia che un osservatore percepisce da una fonte di luce ed è misurata in lumen (lm). Ad esempio, la luce emessa da una fonte di energia infrarossa potrebbe avere una alta radianza, ma un osservatore difficilmente la percepirebbe.
- **luminosità**: è un descrittore soggettivo che è praticamente impossibile da misurare.

Nell'occhio umano, i coni sono i sensori dell'occhio responsabili della visione del colore. Evidenze sperimentali hanno stabilito che i circa 6-7 milioni di coni dell'occhio umano possono essere divisi in tre principali categorie percettive, corrispondenti grosso modo al rosso, verde e blu. Circa il 65 % di tutti i coni è sensibile alla luce rossa, il 33 % è sensibile alla luce verde e il 3 % al blu (ma i coni blu sono più sensibili). Grazie a queste caratteristiche dell'occhio umano, i colori vengono visti come combinazioni variabili dei suddetti colori primari: R - red, G - green, e B - blue. I colori primari possono essere mescolati per ottenere i colori secondari (magenta = rosso + blu, ciano = verde + blu, giallo = rosso + verde).

Le caratteristiche generalmente utilizzate per distinguere un colore da un altro sono:

- **luminosità**: grandezza che ingloba la nozione acromatica di intensità.
- **tonalità**: è un attributo associato alla lunghezza d'onda dominante in un insieme di onde luminose
- **saturazione**: si riferisce alla purezza relativa alla quantità di luce bianca mescolata a una data tonalità. I colori puri dello spettro sono completamente saturi. Colori come rosa (rosso + bianco) sono meno saturi, con un grado di saturazione inversamente proporzionale alla quantità di bianco.

Tonalità e saturazione prese insieme vengono dette cromaticità e quindi un colore può essere caratterizzato dalla sua luminosità e cromaticità.

### 6.6.2 I modelli colore

Lo scopo di un modello colore (detto anche spazio colore o sistema colore) è quello di facilitare e standardizzare la specifica dei colori. In sostanza, un modello colore è un sistema di coordinate e di un sottospazio all'interno di quel sistema dove ogni colore è rappresentato da un singolo punto.

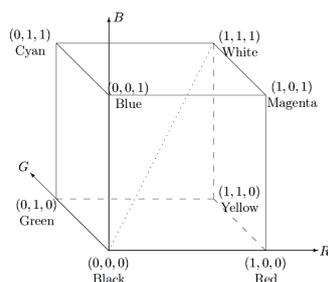


Figure 6.18: Schema del cubo RGB

La maggior parte dei modelli colore attualmente in uso sono orientati all'hardware (come monitor o stampanti a colori) e verso applicazioni dove l'obiettivo è la manipolazione del colore (come la grafica a colori per l'animazione). In termini di image processing, i modelli più comunemente utilizzati sono il modello RGB (rosso, verde, blu), per monitor e telecamere a colori; i modelli CMY (ciano, magenta, giallo) e CMYK (ciano, magenta, giallo, nero) per stampanti a colori e modello HSI (tonalità, saturazione e intensità) che corrisponde meglio con il modo in cui gli uomini descrivono e interpretano i colori. Il modello HSI ha anche il vantaggio di decorrelare le informazioni dei colori a quelle della scala di grigio: ciò rende adattabili alle immagini a colori molte delle tecniche viste in precedenza per la scala di grigio. Esistono altri modelli colore.

### Il modello RGB

Nel modello RGB, ogni colore è rappresentato dalle sue componenti primarie spettrali di rosso, verde e blu. Questo modello si basa su un sistema di coordinate cartesiane, mentre il sottospazio di interesse è il cubo mostrato in figura 6.18, i cui i valori primari RGB si trovano su tre spigoli: i colori secondari ciano, magenta e giallo sono sugli altri tre spigoli, il nero è all'origine e il bianco si trova sullo spigolo più lontano dall'origine.

In questo modello, i toni di grigio vanno dal nero al bianco lungo la linea che unisce questi due punti. I diversi colori in questo modello sono punti all'interno o sulla superficie di questo cubo e vengono definiti in maniera vettoriale. Per convenienza, si assume che tutti i valori siano stati normalizzati in modo che il cubo sia unitario: tutti i valori di R, G e B sono nel range [0, 1].

Le immagini rappresentate nel modello RGB sono formate da tre immagini, una per ogni colore primario. Il numero di bit utilizzato per rappresentare ogni pixel dello spazio RGB è detto profondità di pixel. Si consideri una immagine RGB in cui ognuna delle immagini rossa, verde e blu è una immagine e 8 bit: ogni pixel colore RGB di tale immagine sarà rappresentato da 24bit.

### I modelli CMY e CMYK

Ciano, magenta e giallo sono i colori secondari di luce e colori primari per pigmenti. Per comprendere questo concetto, consideriamo una superficie coperta di pigmenti ciano illuminata da una luce bianca: nessuna luce rossa verrà riflessa, perché il pigmento ciano sottrae luce rossa alla luce bianca, che è composta da quantità uguali di luce rossa, verde e blu. La maggior parte dei dispositivi che depositano pigmenti colorati su carta, come stampanti o fotocopiatrici a colori, richiedono input di dati CMY o applicano una conversione da RGB a CMY. Questa conversione è fatta applicando l'equazione:

$$\begin{bmatrix} C \\ M \\ Y \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 \\ 1 \\ 1 \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} R \\ G \\ B \end{bmatrix}$$

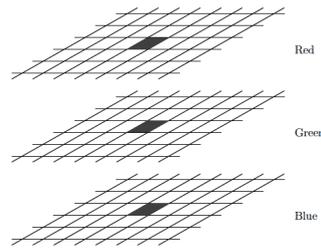


Figure 6.19: Struttura di un array tri-dimensionale per una immagine RGB.

dove la condizione è che tutti i valori siano stati normalizzati nel range [0,1]. L'equazione dimostra anche la luce riflessa da una superficie coperta con ciano puro non contiene rosso (perché  $C = 1-R$ ). In modo simile il magenta puro non riflette il verde e il giallo puro non riflette in blu. Nell'elaborazione delle immagini questo modello colore viene utilizzato per la creazione degli output di stampa. Teoricamente, uguali quantità di pigmenti ciano, magenta e giallo dovrebbe produrre il nero. In pratica, si ottiene un colore simile al nero: per il "vero" vero si aggiunge un quarto canale, dando origine al modello CMYK.

### Il modello HSI (o HSV)

Creare i colori nei modelli RGB e CMY e passare da un modello all'altro è un processo abbastanza semplice. Come già detto, questi sistemi sono idealmente pensati per implementazioni su hardware. In più, il modello RGB si abbina facilmente con il fatto che l'occhio umano è fortemente sensibile ai colori primari rosso, verde e blu. Sfortunatamente, i modelli RGB e CMY e altri modelli simili non sono molto adatti a descrivere i colori in termini pratici: per esempio, non ci si riferisce al colore di una automobile dando le percentuali di rosso, verde e blu dei colori primari che la compongono. Quando gli uomini vedono un oggetto colorato, lo descrivono tramite la sua tonalità, saturazione e luminosità. Ricordiamo che la tonalità è un attributo del colore che descrive un colore puro, mentre la saturazione da una misura del grado in cui il colore puro è diluito dalla luce bianca. La luminosità è un descrittore soggettivo che è praticamente impossibile da misurare. Esso ingloba la nozione acromatica di intensità ed è uno dei fattori chiave per descrivere la percezione di un colore. Quest'ultima è misurabile (sono i livelli di grigio) ed è facilmente interpretabile. Quindi, il modello HSI divide la componente intensità dalle informazioni relative al colore: come risultato, il modello HSI è uno strumento ideale per sviluppare gli algoritmi di elaborazione di una immagine in quanto si basa su descrizioni dei colori che sono più naturali e intuitive.

Poiché una immagine a colori richiede almeno tre elementi separati per ogni pixel, una immagine a colori  $m \times n$  è rappresentata in Matlab da un array di dimensioni  $m \times n \times 3$ : un array tridimensionale. Possiamo pensare a questo array come a una unica entità formata da tre matrici separate allineate verticalmente, come in fig 6.19.

Supponiamo di leggere una immagine RGB in MATLAB:

```

» x = imread('lily.tif')
»size(x)
»ans =
186 230 3

```

possiamo isolare le singole componenti di colore come:

- $x(:, :, 1)$  per la componente rossa
- $x(:, :, 2)$  per la componente verde
- $x(:, :, 3)$  per la componente blu



Figure 6.20: Esempio di immagine RGB e sue componenti



Figure 6.21: Componenti HSV dell'immagine di fig 6.20

che possono essere mostrate singolarmente con la funzione `imshow`:

- `>>imshow(x(:,:,1))`
- `>>imshow(x(:,:,2))`
- `>>imshow(x(:,:,3))`

come mostrato in fig 6.20:

Si noti dalla figura come i colori con alta tonalita' si mostrano con alta intensita' nelle loro rispettive componenti. Per esempio, la rosa in alto a destra e' prevalentemente rossa, e il canale rosso mostra alta intensita' per quei pixel.

Possiamo convertire l'immagine da RGB a HSV con il comando `rgb2hsv`. le tre componenti sono mostrate in fig 6.21

### 6.6.3 Elaborare immagini a colori

Ci sono due metodi per elaborare una immagine a colori:

- possiamo processare i tre canali separatamente;
- possiamo trasportare lo spazio colore in un altro in cui le intensita' sono separate dai colori, ed elaborare solo la componente di intensita'.

Per quanto concerne il miglioramento del contrasto, per come e' definito, e' meglio elaborare solo la componente di intensita'. Lo dimostriamo migliorando prima l'immagine equalizzando i 3 canali che compongono l'immagine RGB, e poi convertendo l'immagine in HSV, equalizzando solo il canale H e poi ritornando in RGB. Il flusso di lavoro e' mostrato in fig 6.22

Il risultato e' mostrato in fig 6.23: elaborando singolarmente le componenti, appaiono artefatti colorimetrici che non sono accettabili.

Stesso risultato si ottiene per il filtraggio spaziale (come si vede in fig reffig38).

Nel caso si abbiano immagini in cui i tre canali sono acquisiti singolarmente (ad esempio, le immagini ottenute con microscopia confocale) puo' essere invece piu' opportuno processare i canali singolarmente.

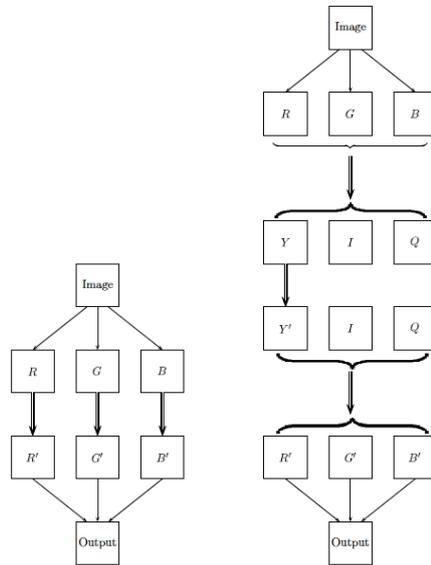


Figure 6.22: Elaborazione RGB vs elaborazione sulle intensita'

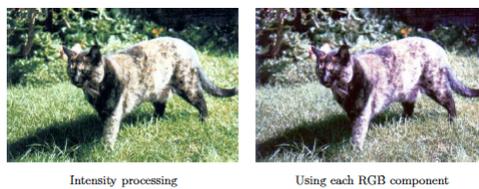


Figure 6.23: Risultato Elaborazione RGB vs elaborazione sulle intensita'





## 7. Metodi di chiarificazione tissutale per imaging

Una delle sfide più grandi delle neuroscienze moderne è mappare l'architettura dei circuiti neurali per ottenere la completa delineazione della connettività cerebrale (il **Connettoma**). L'ostacolo più grande per lo studio dei sistemi biologici è la presenza di lipidi all'interno del tessuto, soprattutto quello cerebrale, che causano scattering della luce e costituiscono una barriera impermeabile agli anticorpi. In particolare, la microscopia a singoli fotoni riesce a penetrare nel campione circa 50 micron e la microscopia a doppio fotone non può essere usata per acquisire più in profondità di 800 micron. Queste profondità non sono abbastanza per acquisire e poi ricostruire le grandi proiezioni dei neuroni, o intere popolazioni neuronali.

Per superare queste limitazioni, ci sono due approcci differenti: una possibile soluzione è fare sezioni seriali dell'intero cervello con metodi meccanici, mentre un altro approccio è rendere l'intero cervello trasparente in modo che possa essere analizzato senza dover essere sezionato. Nel primo caso, per analizzare un intero cervello murino, l'organo deve essere diviso in molte fette (o slice), ognuna delle quali deve essere acquisita tramite un microscopio, e poi le immagini 2D sono ricostruite per formare un volume 3D. Ci sono molti svantaggi nell'utilizzo di questa tecnica: il processo è costoso, laborioso e parte del tessuto viene perso durante il taglio; inoltre, il tessuto si deforma sotto la lama e la tecnica può essere applicata solo su pezzi piccoli di cervello. Per quanto riguarda invece i metodi di chiarificazione ottica, poiché i fenomeni di scattering avvengono quando l'indice di rifrazione del campione è diverso da quello del medium, un approccio è quello di ridurre le variazioni dell'indice di rifrazione e lo scattering della luce sostituendo l'acqua del campione con un solvente organico o una soluzione acquosa con lo stesso indice di rifrazione delle membrane lipidiche, in modo da avere un tessuto che risulta trasparente. I metodi basati su questo principio sono: 3DISCO, Slare, ClearT e SeeDB. Comunque sia, queste tecniche di chiarificazione non sono compatibili con la fenotipizzazione molecolare: solo i fotoni, infatti, riescono a penetrare in profondità nel tessuto, mentre biomolecole fluorescenti, come gli anticorpi, essenziali per la fenotipizzazione molecolare, non possono passare attraverso il tessuto. Per questo motivo, un approccio differente è stato sviluppato, che prevede la modificazione del tessuto cerebrale in modo da renderlo permeabile sia alle biomolecole che ai fotoni. Questo metodo è chiamato CLARITY ed è usato per rimuovere i lipidi nel cervello, sostituendoli con un hydrogel trasparente che blocca

nella loro poliszione alcune bio-molecole (come acidi nucleici, proteine e piccoli neurotrasmettitori), evitando che la struttura collassi. Tuttavia e' un metodo molto complesso, e molti dei passaggi del protocollo sono tecnicamente difficili (in particolare, l'uso della camera elettroforetica a causa delle numerosi variabili coinvolte). Per questa ragione, una semplificazione della procedura CLARITY (detta CLARITY2) e' stata successivamente sviluppata, che permette di chiarificare fette da 1-1.5 mm senza l'utilizzo della camera elettroforetica. Il metodo si presta, nell'utilizzo, per applicazioni in cui non serve studiare tutto il cervello, ma solo alcune parti di esso (ad esempio, una unica popolazione neuronale). In fatti, tagliare il tessuto in fette spesse permette di semplificare e accelerare la chiarificazione, la colorazione e l'acquisizione.

## 7.1 Le principali tecniche di chiarificazione: descrizione e comparazione

In generale, il primo passaggio della chiarificazione tessutale e' la deidratazione del tessuto, seguita dall'impregnazione del tessuto con un agente ottico chiarificante, che ha approssimativamente lo stesso indice di rifrazione del tessuto post-impregnazione.

- **3DISCO**: usa etere dibenzilico (DBE) come solvente organico in combinazione con il tetraidrofurano (THF). La procedura di chiarificazione e' effettuata a temperatura ambiente ed e' basata su step di lavaggi consecutivi a concentrazioni di tetraidofurano crescenti (dal 50 % al 100 %). La durata tipica della procedura di chiarificazione con il 3DISCO e' 2-5 giorni.
- **Scale**: usa un mix di glicerolo e urea come soluzione di chiarificazione. In particolare, la soluzione piu' efficace per la chiarificazione e' composta da urea 4M, 10 % in volume di glicerolo (il cui scopo e' quello di prevenire l'idratazione tissutale e minimizzare l'espansione del tessuto), e 0.1 % di Triton X-100. Dopo la preparazione del tessuto, il campione e' trasferito in questa soluzione (circa 10 ml per grammo di tessuto) in una vial trasparente e incubato a 4C per 2-14 giorni agitando leggermente di tanto in tanto e monitorando la trasparenza nel tempo.
- **ClearT**: usa formalina e un composto a base di polietilene. Come per il 3DISCO, la procedura di chiarificazione e' basata su consecutivi lavaggi a concentrazione crescente di formalina (dal 20 % al 95 %). La procedura e' fatta a temperatura ambiente e dura 1 giorno.
- **SeeDB**: usa una soluzione di fruttosio in acqua con lo 0.5 % di alfa-thioglicogeno. La procedura di chiarificazione consiste in incubazioni seriali: i) dopo la fissazione del tessuto a 4 % di PFA a 4C agitando gentilmente overnight, il campione e' messo in agarosio all'1 % in PBS; ii) il campione e' trasferito in una falcon da 50 ml contenente sequenzialmente 20 %, 40 %, e 60% di fruttosio, ogni volta per 4-8 ore; iii) il campione e' trasferito in una falcon da 50 ml contenente SeeDB per 24h; iv) il tessuto e' acquisito a 25C.

Se si ha bisogno che gli anticorpi penetrino del tessuto, il CLARITY e' l'alternativa migliore. La tecnica permette di trasformare il tessuto biologico in un ibrido i cui lipidi, che causano scattering della luce e sono impermeabili alle macro-molecole, sono rimossi tramite solubilizzazione in un detergente ionico e con consecutivo lavaggio elettroforetico. I lipidi sono sostituiti con una matrice di hydrogel che conserva le bio-molecole nella loro posizione originale. Il processo e' riassunto in Figura 7.1.

Il campione e' dapprima perfuso a temperature basse con una soluzione di monomero contenente acrilammide, bis-acrilammide e paraformaldeide. L'acrilammide e la bis-acrilammide, tramite una reazione con la paraformaldeide, crea una mesh in cui "intrappola" le bio-molecole con legami covalenti ma lascia liberi i lipidi, perche' non hanno i gruppi funzionali necessari per essere incorporati nell'idrogel. Usando un iniziatore termico, l'hydrogel si polimerizza e forma la matrice di hydrogel.

Nella camera elettroforetica, un campo elettrico e' applicato al campione immerso in una soluzione ionica per estrarre i lipidi. In particolare, micelle ionico contenenti i lipidi vengono trasportate attivamente fuori dal tessuto ibrido, lasciando le bio-molecole nelle loro posizioni.

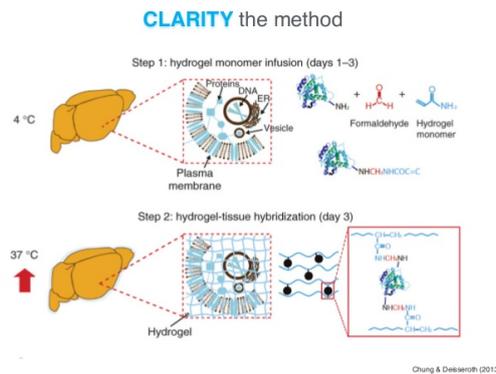


Figure 7.1: Schema del protocollo CLARITY

Gli step della chiarificazione sono numerosi e tecnicamente difficili: per questo motivo, una versione semplificata per scquisire campioni di cervello, il CLARITY2, e' stata sviluppata. Qui, dopo la fissazione del tessuto, il cervello e' tagliato in fette da 1-1.5 mm usando un vibratomo. La camera elettroforetica (che rappresenta la parte del processo piu' elaborata e difficile di tutto il protocollo) non e' in questo modo piu' necessaria. Per la procedura di chiarificazione, il cervello e' solo inserito in una falcon da 50 ml con 10 ml di soluzione di chiarificazione per 7 giorni a 37C, cambiando la soluzione ogni 3 giorni. Anche lo step di acquisizione e' semplificato e accelerato, se comparato al protocollo originale. E' comunque possibile penetrare piu' di 250 micron con un microscopio confocale e acquisire l'intero spessore di fetta utilizzando un microscopio a doppio fotone.

La Tabella riassume tutte le tecnologie viste, comparandone pro e contro, complessita', durata della procedura e tecniche di imaging utilizzabili.

## 7.2 Come ottimizzare la procedura di chiarificazione?

Per questa parte, si scarichi e si studi <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2016.00179/full>

## 7.3 Conclusioni e prospettive future

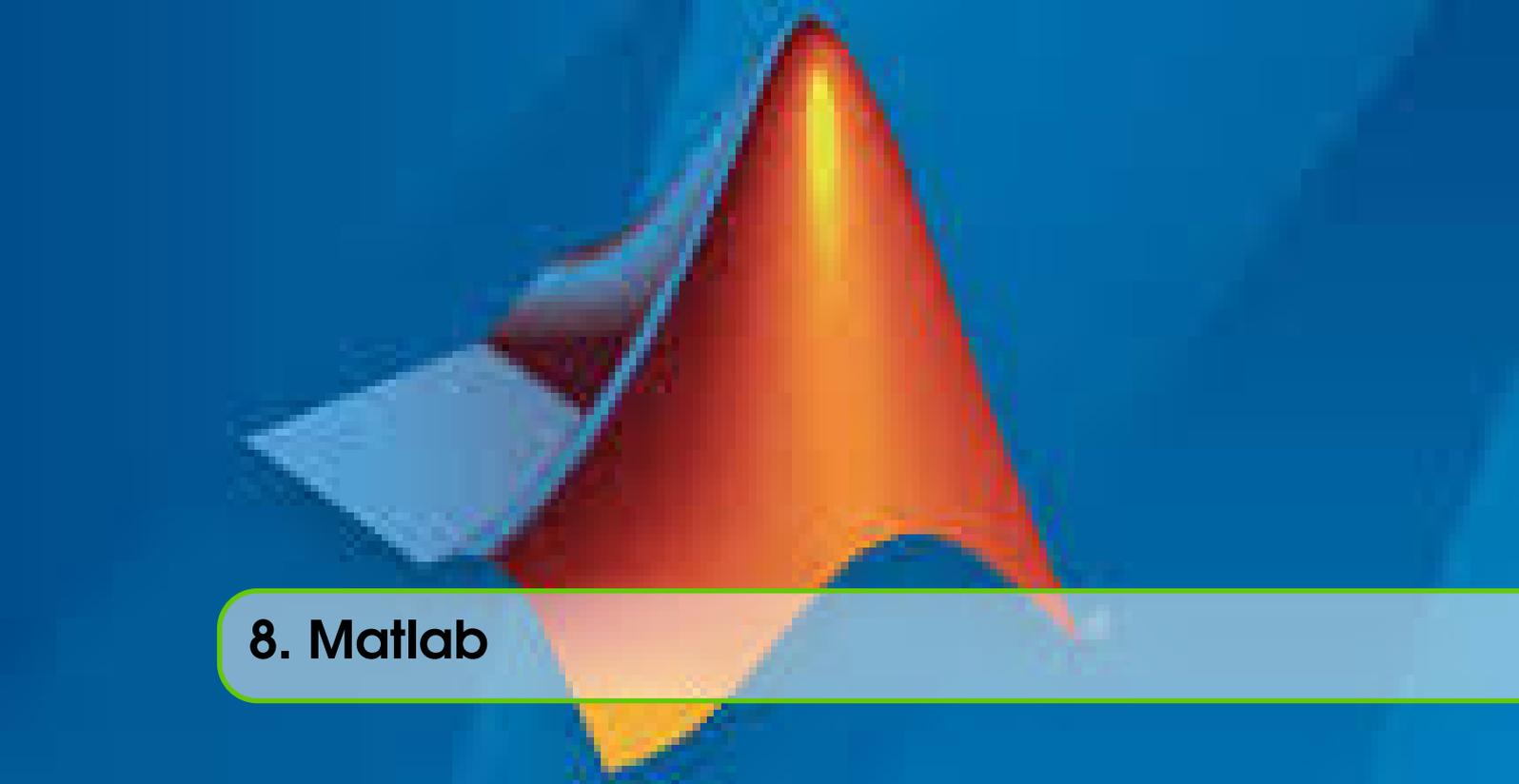
Sia l'analisi strutturale (senza sezionare il campione) sia la fenotipizzazione molecolare sono necessarie per ottenere informazioni sui meccanismi cerebrali. E' molto difficile poter ottenere entrambe le informazioni su tessuto intatto. Metodi che permettono l'analisi strutturale sono di solito incompatibili con la fenotipizzazione molecolare (vedi 3DISCO, ClearT, Scale, SeeDB), mentre le tecniche che si focalizzano sul labeling molecolare hanno bisogno del sezionamento del tessuto, quindi limitano l'imaging. Clarity e' stato sviluppato per superare queste limitazioni: permette di avere sia la fenotipizzazione molecolare sia di acquisire i tessuti intatti. In particolare, il CLARITY permette di tracciare le connessioni neurali all'interno del cervello, e di ottenere una informazione completa sulla funzione cellulare. In combinazione con la colorazione tramite anticorpi, permette ai ricercatori di segmentare i circuiti neurali all'interno del cervello, di vedere le relazioni tra le cellule, di investigare la struttura sub-cellulare e le relazioni chimiche tra complessi di proteine, acidi nucleici e neurotrasmettitori. il CLARITY puo' essere usato anche per diagnosticare condizioni patologiche come cancro infezioni e altre malattie. A causa della recente pubblicazione del metodo (2013), ci sono tante cose da mettere ancora a punto, riguardanti soprattutto il protocollo di immuno-staining, in quanto il passaggio per diffusione degli anticorpi e' ancora troppo lento. Il CLARITY2, che evita l'uso della camera elettroforetica, rappresenta una valida alternativa del

Table 7.1: State of Art of the principal tissue clarification methods, with their pros and cons.

	Optical Clearing	Advantages	Disadvantages	Imaging techniques available
			<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Changes in chemical nature of the tissue are registered</li> <li>2. Method not compatible with prolonged imaging due to the use of organic solvents, which rapidly quench most fluorescent protein signals</li> <li>3. Because of limited antibody penetration, immunolabeling of large tissue is difficult</li> <li>4. Method incompatible with whole-tissue molecular phenotyping</li> <li>5. Not reversible</li> <li>6. Because optical clearing damages the lipids structures, electron microscopy cannot be used</li> </ol>	
<b>3DISCO [erturk2012three]</b>	Demonstrated in whole adult mouse, brain and spinal cord segments	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Low duration (2-5 day for clearing a whole, adult mouse brain)</li> <li>2. Highly reproducible method</li> <li>3. No tissue expansion</li> <li>4. Versatility (it is applicable on a variety of biological samples including central nervous system organs, immune organs and solid tumors)</li> <li>5. Method, compatible with many labeling methods (fluorophores, synthetic dyes and antibody labeling)</li> </ol>		<p>Cleared tissue can be imaged using light-sheet laser-scanning ultramicroscope (that costs about half the price of a confocal microscope), two-photon microscopy or confocal microscopy. However, the maximum imaging area and depth of the last two techniques are small if compared with light-sheet microscopy: 0.5-1 mm, versus 10-20mm and 0.2-2.2 versus 10-20 mm respectively.</p>
			<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Large expansion in tissue volume</li> <li>2. Because of partial denaturation and loss of proteins by urea, samples are soft and fragile</li> <li>3. Method not compatible with lipophilic dyes</li> <li>4. Method not fully reversible because of protein denaturation and tissue deformation</li> <li>5. Myelin-rich brain regions remain opaque</li> <li>6. Long time periods required for clearance (3 weeks for clearing a whole adult mouse brain)</li> <li>7. Changes in chemical nature of the samples are registered</li> <li>8. Method incompatible with whole-tissue molecular phenotyping</li> </ol>	
<b>SCALE [hama2011scale]</b>	Demonstrated in whole young mouse brain, although myelin-rich white matter not completely clear	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Reagent formula is public and easy and inexpensive; researchers can modify its composition according to the nature of the sample that have to be cleared</li> <li>2. Fluorescent signals are preserved</li> </ol>		<p>Cleared tissue can be imaged using one- or two-photon microscopy, that allow to achieve a depth of 2 mm. In deep regions, two-photon microscopy shows a better signal-to-noise ratio.</p>
		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. No or mild tissue expansion</li> <li>2. Compatible with lipophilic dye tracing</li> <li>3. Short time incubation (1 day) for clearing an intact mouse embryo (no data available for adult mouse brain)</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Not compatible with fluorescent proteins</li> <li>2. Formamide is unsuitable for long-term tissue storage</li> <li>3. Method incompatible with whole-tissue molecular phenotyping</li> </ol>	
<b>ClearT [kuwajima2013clearT]</b>	Demonstrated in whole young mouse brain and in sections from adult mouse brain			<p>Cleared tissue can be imaged using stereomicroscope or dissecting microscope.</p>

SeeDB [ke2013seedb]	Demonstrated in whole young mouse brain but reported to be difficult in adult mouse	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. No tissue expansion</li> <li>2. No fluorescent proteins and lipophilic neuronal tracers quenching observed</li> <li>3. Reversible with PBS multiple times</li> <li>4. Short time incubation for clearing (3 days for immature brain); clearing adult brain reportedly difficult</li> <li>5. No changes in chemical nature of the samples</li> <li>6. It can be combined with immunochemistry without loss of antigenicity</li> <li>7. Minimum reagents and efforts required</li> <li>8. Both gray and white matter can be cleared</li> <li>9. Easy and inexpensive method, no special equipment required</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Clearing of large pieces of tissue such as whole adult mice brain is difficult without sample incubation at high temperature, that causes some fluorescent loss</li> <li>2. Limited penetration of antibodies that can only penetrate a depth of 100-250 <math>\mu\text{m}</math></li> <li>3. Limited penetration of chemical dyes for counterstaining</li> <li>4. Method incompatible with whole-tissue molecular phenotyping</li> </ol>	<p>It is possible to reach &gt;1,000 <math>\mu\text{m}</math> depth with confocal microscopy and to image fixed mouse brain samples at mm-scale level with two-photon microscopy</p>
CLARITY [chung2013clarity]	Demonstrated in whole adult mouse brain, adult zebrafish brain and postmortem human brain tissue	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. No fluorophore quenching observed</li> <li>2. Reversible tissue expansion during the process</li> <li>3. Lipids are completely removed without mechanical disassembly of the tissue</li> <li>4. Multiple rounds of molecular phenotyping are allowed</li> <li>5. Method compatible with immunostaining</li> <li>6. Versatility</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Method not compatible with lipophilic dyes</li> <li>2. Not reversible</li> <li>3. Change in chemical nature of the samples are registered</li> <li>4. Technically difficult: method involves custom set-up assembly and many experimental steps with a lot of variables to be controlled</li> <li>5. High start-up and consumable material costs</li> <li>6. Immunostaining is time-consuming</li> <li>7. Long time periods required for clearance (2 weeks)</li> </ol>	<p>Confocal microscopy, by exposing the tissue to excitation light, causes photobleaching of fluorescent molecules. With two-photon microscopy, it is possible to overcome this limit but both single and two-photon imaging techniques are characterized by low image acquisition rate. For imaging large samples at high resolution and high image acquisition rate, selective-plane microscopy is the most effective choice.</p>

metodo originale e, data la semplicità sperimentale, può essere preferita dai ricercatori interessati più a chiarificare porzioni di cervello che l'intero organo. Questo metodo semplificato, infatti, non soffre delle difficoltà relative alla camera elettroforetica, permettendo di avere risultati più riproducibili rispetto al protocollo originale.



## 8. Matlab

### 8.1 Nozioni di base

MATLAB e' un tool di analisi e visualizzazione dati. Un punto vincente di MATLAB e' sicuramente l'uso di un set di programmi sviluppati per supportare un particolare task. Questi set di programmi sono detti TOOLBOX; il nostro toolbox di interesse e' l'IMAGE PROCESSING TOOLBOX.

In questa sede, ci occuperemo principalmente di quegli aspetti di MATLAB necessari per poter elaborare immagini.

Una funzione MATLAB e' keyword che accetta diversi parametri in input e che puo' dare in uscita diversi tipi di output: una stringa, una matrice, un grafico, etc. Esempi di funzioni: *sin*, *imread*, *imclose*. Ci sono tantissime funzioni in MATLAB, ed e' molto semplice, e spesso necessario, scriverne una. Un COMANDO e' un particolare uso di una funzione. Un esempio di comando potrebbe essere:

```
» sin(pi/3);  
» c=imread('cameraman.tif');  
» a=imclose(c);
```

Il tipo di dati che MATLAB utilizza e' una matrice: tutti i dati sono collezionati come matrici (un valore numerico, per esempio, e' visto come una matrice 1x1).

#### Come trattare le matrici

MATLAB ha una enorme quantita' di comandi che permettono di generare e manipolare la matrici. Dal momento che una immagine greyscale e' considerabile come una matrice, possiamo usare alcuni di questi comandi per analizzare aspetti di una immagine.

Una matrice puo' essere scritta in MATLAB: listando gli elementi riga per riga, usando spazi o virgole come delimitatori degli elementi di ogni riga, e usando i punti e virgola per separare le righe. Per questo, la matrice:

$$a = \begin{bmatrix} 4 & -2 & -4 & 7 \\ 1 & 5 & -3 & 2 \\ 6 & -8 & -5 & -6 \\ -7 & 3 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

deve essere scritta come:

```
» a=[4 -2 -4 7; 1 5 -3 2; 6 -8 -5 -6; -7 3 -1]
```

Gli elementi di una matrice possono essere ottenuti usando lo schema standard "row,column indexing". Quindi, per la nostra matrice a, il comando

```
» a(2,3)
```

```
ans =  
-3
```

ritorna l'elemento della matrice in riga 2 - colonna 3.

MATLAB permette anche di individuare un elemento di una matrice con un unico indice, che corrisponde alla posizione dell'elemento se la matrice fosse scritta come una singola colonna: in generale, per una matrice M con r righe e c colonne, l'elemento m(i,j) corrisponde a m(i+r(j-1)). Il metodo a singolo indice permette di estrarre multipli valori da una matrice:

```
» a([1 6 11 16])  
ans =  
4 5 -5 1
```

Per ottenere una riga di valori, si utilizza l'operatore MATLAB (:). Ad esempio, dati a e b interi, il comando

```
a:b
```

lista tutti i valori interi da a a b. La versione piu' generale di questo comando

```
a:i:b
```

lista tutti i valori interi da a a b, con un incremento di i. Applicato a una matrice, ad esempio la nostra matrice a,

```
» a(2,1:3)  
ans =  
6 -8 -5
```

lista tutti gli elementi in riga 2 che sono tra colonna 1 a 3. E' possibile anche scegliere un blocco di valori, ad esempio

```
» a(2:3,3:4)  
ans =  
-3 2  
-5 -6
```

Per listare tutti gli elementi lungo una particolare riga o colonna, si utilizza il solo operatore (:). Ad esempio

```
» a(3,:)
ans =
6 -8 -5 -6
```

**Operazioni tra matrici** MATLAB supporta tutte le principali operazioni matriciali: possiamo sommare, sottrarre, moltiplicare, trasporre (') e invertire (**inv**) matrici. Oltre a queste operazioni standard, MATLAB supporta diverse operazioni geometriche: le matrici possono essere capovolte verticalmente (**flipplr**) o orizzontalmente (*flipud*), oppure ruotate di 90 gradi (*rot90*). La funzione *reshape* produce una matrice con gli elementi presi colonna per colonna da una data matrice. Per esempio:

```
»reshape(a, 2, 8)
» ans=
+4 +6 -2 -8 -4 -5 +7 -6
+1 -7 +5 +3 -3 +0 +2 +1
```

Tutti questi comandi lavorano anche con vettori: infatti, MATLAB non fa distinzione tra vettori e matrici.

**L'operatore dot** Una classe di operatori distinta e' quella che usa il punto (.), che permette di fare operazioni elemento per elemento, e non operazioni matriciali. Per esempio, se  $a*b$  e' una moltiplicazione tra matrici,  $a.*b$  e' una moltiplicazione elemento per elemento delle matrici.

### **Grafici in MATLAB**

MATLAB ha numerosi comandi per graficare i risultati: in questo contesto, guarderemo solo semplici plot. Dati due comandi x e y delle stesse dimensioni, il comando

```
» plot(x,y)
```

mostrera' il grafico  $y = f(x)$ .

...per il resto... **USATE L'HELP IN LINEA!**

