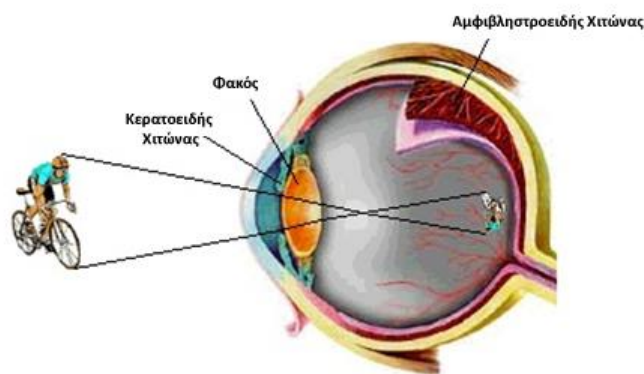


ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ 5
ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ

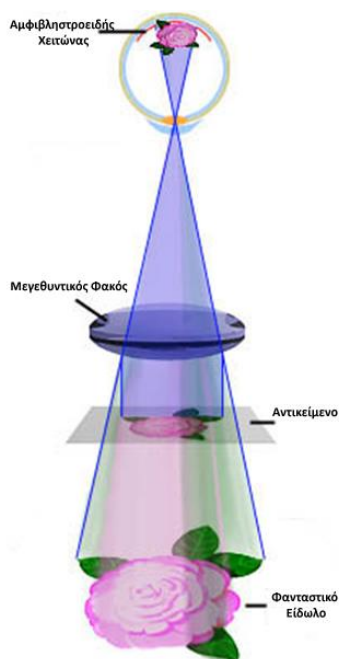
1. Το Μικροσκόπιο

Το μικροσκόπιο είναι όργανο, σχεδιασμένο να δημιουργεί μεγεθυμένες εικόνες μικρών αντικειμένων, να διαχωρίζει λεπτομέρειες της εικόνας οι οποίες δεν είναι δυνατό να παρατηρηθούν με γυμνό μάτι και να μεταφέρει αυτά τα στοιχεία για οπτική παρατήρηση ή φωτογραφική καταγραφή τους.

Στο ανθρώπινο μάτι το είδωλο δημιουργείται στον αμφιβληστροειδή. Οι διαστάσεις ενός αντικειμένου, που παρατηρούμε με το μάτι, αυξάνονται καθώς αυτό πλησιάζει στο μάτι μας. Υπάρχει ωστόσο μία ελάχιστη απόσταση ευκρινούς οράσεως στην οποία ένα αντικείμενο μπορεί να παρατηρηθεί ευκρινώς και άκοπα από το μάτι. Η απόσταση αυτή είναι 25 cm για τους νέους και αυξάνεται με την αύξηση της ηλικίας.



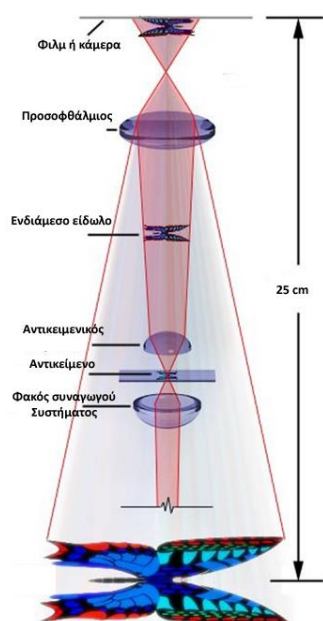
Δημιουργία ειδώλου στον αμφιβληστροειδή του οφθαλμού



Το μέγεθος του ειδώλου που σχηματίζεται στον αμφιβληστροειδή εξαρτάται από τη γωνία οράσεως θ , τη γωνία με την οποία δηλαδή βλέπει το μάτι το αντικείμενο. Καθώς το αντικείμενο πλησιάζει το μάτι, η γωνία θ αυξάνεται και το αντικείμενο φαίνεται μεγαλύτερο. Η θ έχει τη μεγαλύτερη τιμή της όταν το αντικείμενο βρίσκεται στα 25 cm. Θέλοντας να αυξήσουμε τη γωνία θ , επομένως και το μέγεθος του αντικειμένου, χρησιμοποιούμε το μεγεθυντικό φακό.

Ο μεγεθυντικός φακός (ένας συγκλίνοντας δηλαδή φακός) είναι η απλούστερη διάταξη με την οποία μπορούμε να επιτύχουμε μεγέθυνση. Ο φακός αυτός τοποθετείται μεταξύ του ματιού και του αντικειμένου και αυξάνει την γωνία υποδοχής και επομένως και το μέγεθος του σχηματιζόμενου ειδώλου. Έτσι το μάτι

αντιλαμβάνεται ένα φανταστικό είδωλο (μεγαλύτερο του πραγματικού) το οποίο βρίσκεται σε μεγαλύτερη απόσταση από αυτήν στην οποία βρίσκεται το πραγματικό αντικείμενο.



Για ακόμη μεγαλύτερες μεγεθύνσεις χρησιμοποιούμε ένα σύστημα φακών. Σε ένα τέτοιο σύστημα βασίζεται και η αρχή λειτουργίας του μικροσκοπίου.

1.1. Σύνθετο Μικροσκόπιο

Ένα μικροσκόπιο αποτελείται από ένα σταθερό τμήμα, που ονομάζεται βάση, πάνω στην οποία είναι προσαρτημένο το οπτικό τμήμα καθώς και οι άλλες διατάξεις όπως η στήριξη των παρασκευασμάτων που θα μελετηθούν (αντικειμενοφόρος πλάκα), το σύνολο των μηχανισμών κίνησης για εστίαση και η συσκευή φωτισμού.

Το φως διέρχεται από το σύστημα φωτισμού στο συναγωγό σύστημα, ένα σύστημα φακών που επιτρέπει τον ομοιόμορφο φωτισμό του παρασκευάσματος. Με τη βοήθεια διαφράγματος ρυθμίζεται κατάλληλα η ένταση της δέσμης.

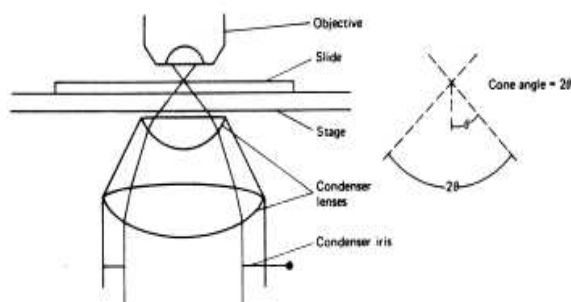
Το σύστημα των δύο φακών που συμμετέχουν στη διαδικασία σχηματισμού του ειδώλου του αντικειμένου αποτελείται από τον αντικειμενικό φακό, που είναι κοντά στο προς παρατήρηση αντικείμενο και από τον προσοφθάλμιο που είναι κοντά στο μάτι του παρατηρητή. Ο αντικειμενικός δίνει το είδωλο πραγματικό αντεστραμμένο και μεγεθυμένο κοντά στο εστιακό επίπεδο του προσοφθάλμιου φακού. Ο προσοφθάλμιος φακός λειτουργεί κατά ανάλογο τρόπο με ένα φακό μεγεθύνσεως δίνοντας ένα φανταστικό μεγεθυμένο είδωλο που παραμένει αντεστραμμένο.

Οι αντικειμενικοί φακοί είναι τοποθετημένοι σε μια υποδοχή η οποία περιστρέφεται έτσι ώστε να γίνεται εύκολα η αντικατάστασή τους κατά τη διάρκεια της παρατήρησης και να μεταβάλλεται η μεγέθυνση. Η συνολική μεγέθυνση του τελικού ειδώλου σε σχέση με το αντικείμενο είναι το γινόμενο των μεγεθύνσεων του

αντικειμενικού και του προσοφθάλμιου. Έτσι για αντικειμενικό με μεγέθυνση 40x και προσοφθάλμιο με 10x, η συνολική μεγέθυνση είναι 400x.

Εκτός όμως από την μεγέθυνση το μικροσκόπιο προσφέρει τη δυνατότητα να αναδειχθούν τα δομικά στοιχεία που συναποτελούν τα αντικείμενα. Ως όριο διακριτικής ικανότητας ορίζεται η ελάχιστη απόσταση μεταξύ δύο σημείων του παρατηρούμενου αντικειμένου που μπορούν να παρατηρηθούν ξεχωριστά. Το όριο αυτό για το μάτι του ανθρώπου είναι περίπου 0.1 mm ενώ για ένα καλής ποιότητας οπτικό μικροσκόπιο είναι περίπου 0.2 μm , δηλ. 500 φορές βελτιωμένη.

Μπορεί ναδειχθεί ότι το **όριο διακριτικής ικανότητας (l.r. : limit of resolution)**, δίνεται από τη σχέση :



$$l.r. = \frac{0.61\lambda}{N.A.} \quad (\text{σχέση Abbe}), \text{ όπου}$$

λ το μήκος κύματος του χρησιμοποιούμενου φωτός,

N.A. το αριθμητικό άνοιγμα του αντικειμενικού φακού (που καθορίζει τη γωνία εισόδου του φωτός σε

αυτόν). $N.A. = n \sin \theta$, n: ο δείκτης διάθλασης του μέσου που παρεμβάλλεται μεταξύ του αντικειμενικού και του αντικειμένου και θ η γωνία που σχηματίζει μια φωτεινή ακτίνα που προέρχεται από το αντικείμενο και συλλέγεται από τον αντικειμενικό φακό, με τον άξονά του.

Επειδή η διακριτική ικανότητα είναι περιορισμένη μια μεγέθυνση πέρα από κάποιο όριο (μέγιστη χρήσιμη μεγέθυνση), δεν παρέχει καμία επιπλέον πληροφορία. Μεγαλύτερη μεγέθυνση από το όριο αυτό θα έχει σαν αποτέλεσμα να ελαττωθεί η ποιότητα του ειδώλου. Έτσι στην πράξη δεν χρησιμοποιούνται μεγεθύνσεις μεγαλύτερες από 2500x.

Η διακριτική ικανότητα μπορεί να βελτιωθεί και επομένως να χρησιμοποιηθούν και μεγαλύτερες μεγεθύνσεις ενεργώντας κατά τρεις τρόπους:

- (i) ελαττώνοντας το λ ,
- (ii) αυξάνοντας το θ , δηλαδή το άνοιγμα του αντικειμενικού φακού και
- (iii) αυξάνοντας το n με παρεμβολή μεταξύ αντικειμενικού και αντικειμένου ενός μέσου με $\delta.\delta. > 1$. Το μέσο που χρησιμοποιείται είναι συνήθως ένα ειδικό έλαιο.

Στο τέλος του 19^{ου} αιώνα χρησιμοποιώντας αντικειμενικούς φακούς με ειδικά έλαια, επιτεύχθηκε μία τιμή του N.A. 1.4, η οποία επιτρέπει στα οπτικά μικροσκόπια να ξεχωρίζουν δύο σημεία τα οποία απέχουν μεταξύ τους 0.2 μm . Με εξαίρεση ορισμένων ασυνήθιστων υγρών ως μέσα, ή με χρήση υπεριώδους πηγής φωτός, το όριο αυτό παραμένει μέχρι και σήμερα για τα οπτικά μικροσκόπια.

Με το μικροσκόπιο μπορούμε να εστιάσουμε σε ένα μικρό πάχος παρασκευάσματος. Αυτό το πάχος ονομάζεται *βάθος εστίασης* (ή βάθος πεδίου), εξαρτάται από τον αντικειμενικό φακό που χρησιμοποιούμε και μειώνεται σημαντικά καθώς το N.A. αυξάνει. Επίσης ένα άλλο χαρακτηριστικό είναι η *διάμετρος* του πεδίου, που είναι αντιστρόφως ανάλογη της ολικής μεγένθυσης.

Η *αντίθεση* (contrast) του σχηματιζόμενου ειδώλου ελέγχεται από το *διάφραγμα* του συναγωγού συστήματος (condenser iris). Αρκετές φορές είναι απαραίτητο να κλείνουμε λίγο το διάφραγμα, γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα να μειώνεται η διακριτική ικανότητα, αλλά να βελτιώνεται δραστικά η αντίθεση καθώς και το βάθος εστίασης. Η αντίθεση μπορεί να βελτιωθεί και με τη χρήση έγχρωμων φίλτρων. Συνήθως στην πράξη χρησιμοποιείται πράσινο φίλτρο ($\lambda = 500\text{-}600\text{ nm}$).

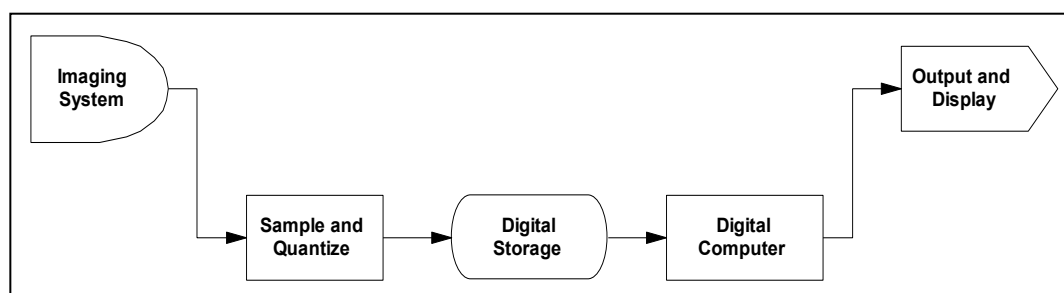
Η φωτεινότητα ρυθμίζεται από τη διάταξη μετασχηματιστή στη βάση του μικροσκοπίου, που ελαττώνει την ένταση του φωτός χωρίς να μεταβάλλεται όμως η χρωματική ποιότητα του φωτισμού.

2. Απεικονιστικό Σύστημα

Χρησιμοποιήθηκαν ένα μικροσκόπιο Unitron BU-13 μια color Sony CCD Iris camera και ένας H/Y.

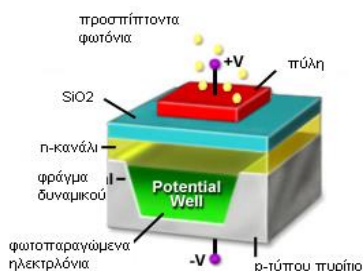
Πριν περάσουμε στην ανάλυση της κάθε συσκευής η οποία χρησιμοποιήθηκε στην ανάπτυξη του απεικονιστικού συστήματος, θα αναφέρουμε μια λογική ακολουθιακή διάταξη ενός τυπικού ψηφιακού συστήματος επεξεργασίας εικόνας, πάνω στο οποίο βασίστηκε και το απεικονιστικό σύστημα, το οποίο εξετάζουμε.

Από το σχήμα βλέπουμε ότι πρώτο στάδιο είναι η παρατήρηση της εικόνας την οποία θέλουμε να επεξεργαστούμε με μια απεικονιστική συσκευή. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιούμε μία color CCD camera. Το επόμενο στάδιο είναι η ψηφιοποίηση της εισαγόμενης εικόνας (δειγματοληψία και κβαντοποίηση του αναλογικού σήματος). Το τρίτο στάδιο είναι η αποθήκευση των εικόνων οι οποίες μας ενδιαφέρουν στο σκληρό δίσκο ενός H/Y. Έπειτα ακολουθεί το βασικό στάδιο της ψηφιακής επεξεργασίας των εικόνων, το οποίο είναι το πιο βασικό για την εξαγωγή αποτελεσμάτων. Τέλος, έχουμε την εμφάνιση της εξαγόμενης εικόνας, η οποία έχει προκύψει από την επεξεργασία.



2.1. Συσκευές Ψηφιοποίησης για Επεξεργασίας Εικόνας - CCD Camera

Εν αντιθέσει με τις αναλογικές κάμερες όπου η εικόνα αποτυπώνεται σε φιλμ, οι ψηφιακές κάμερες στηρίζονται στην τεχνολογία των φωτοευαίσθητων αισθητήρων για την καταγραφή των εικόνων. Οι αισθητήρες που χρησιμοποιούνται κυρίως στα ψηφιακά απεικονιστικά συστήματα είναι οι CCD αισθητήρες. Ένα CCD στοιχείο αποτελείται από εκατομμύρια φωτοδιόδους διατεταγμένες κατά έναν πίνακα δυο διαστάσεων σε υπόστρωμα πυριτίου. Οι ιδιότητες του πυριτίου ως ημιαγωγού επιτρέπουν στο CCD chip να ανιχνεύσει τα φωτόνια που προσπίπτουν στην επιφάνειά του προκαλώντας ανάλογη ροή φορτίων, κάτω από κατάλληλες συνθήκες πόλωσης. Θεμελιώδης φωτοευαίσθητη μονάδα στο CCD στοιχείο είναι ένα MOS χωρητικοτήτων το οποίο λειτουργεί τόσο ως φωτοδίοδος όσο και ως αποθηκευτική μονάδα. Ένα τέτοιο MOS απεικονίζεται στην εικόνα.



Στην προκειμένη περίπτωση, η ανάστροφη πόλωση προκαλεί ροή ηλεκτρονίων προς την περιοχή κάτω από τη θετικά φορτισμένη πύλη, ενώ ταυτόχρονα δημιουργούνται οπές στις περιοχές από τις οποίες μεταναστεύουν τα ηλεκτρόνια. Για κάθε φωτόνιο που απορροφάται δημιουργείται ένα ζεύγος ηλεκτρονίου-οπής, και το αντίστοιχο φορτίο που παράγεται είναι ανάλογο του αριθμού των προσπιπτόντων φωτονίων. Τα ηλεκτρόνια που απελευθερώνονται μετά την πρόσπτωση φωτονίων κατακρατούνται στην περιοχή του πηγαδίου δυναμικού. Όταν χιλιάδες τέτοια MOS στοιχεία διατάσσονται σε έναν CCD πίνακα, τα φορτία από τα πηγάδια δυναμικού μεταφέρονται στην έξοδο υποβάλλοντας εξωτερικά μια διαφορά τάσης. Ο αριθμός των ηλεκτρονίων που συλλέγονται από κάθε στοιχείο καθορίζει τη φωτεινότητα στο αντίστοιχο pixel της εικόνας. Έτσι ανασυντίθεται η εικόνα.

Οι εικόνες που ανακατασκευάζονται με αυτόν τον τρόπο είναι μονόχρωμες, έχουν τιμές φωτεινότητας της κλίμακας του γκρι. Για την απόδοση των χρωμάτων χρησιμοποιούνται δυο τεχνικές: είτε ανακατασκευάζονται τα χρώματα με κάποιον αλγόριθμο για να αντιστοιχούν στο RGB πρωτόκολλο, είτε χρησιμοποιούνται φίλτρα

τα οποία επιτρέπουν τη διέλευση συγκεκριμένων μηκών κύματος που ανιχνεύονται από τον CCD αισθητήρα.

2.2. Το Μικροσκόπιο

Η CCD camera προσαρτήθηκε στη βάση ενός οπτικού μικροσκοπίου UNITRON. Έτσι ότι εικόνα μπορούμε να παρατηρήσουμε από τους φακούς με το μάτι, μπορούμε να την παρατηρήσουμε μέσω της CCD camera στην οθόνη του υπολογιστή.

Το δείγμα (συνήθως βρίσκεται επάνω σε ένα πλακίδιο), τοποθετείται στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Μετακινώντας τους μικρομετρικούς ρυθμιστές της αντικειμενοφόρου πλάκας, μπορούμε να πάρουμε μια στιγμιαία λήψη της εικόνας του πλακιδίου, η οποία μας ενδιαφέρει.

Οι αντικειμενικοί φακοί είναι διάφορων μεγεθύνσεων (10x, 20x, 40x), ενώ οι προσοφθάλμιοι είναι 10x. Έτσι η συνολική μεγέθυνση κυμαίνεται από 100x έως 400x.

Στο συγκεκριμένο μικροσκόπιο, ο φωτισμός βρίσκεται στο επάνω μέρος του, ενώ το σύστημα των αντικειμενικών φακών βρίσκεται κάτω από το επίπεδο της αντικειμενοφόρου πλάκας (ανάστροφο μικροσκόπιο).

3. Image Analysis (Ανάλυση Εικόνας).

3.1. Γενικά

Ο όρος *μονόχρωμη εικόνα* (monochrome image) ή πιο απλά εικόνα (image), αναφέρεται σε μία διδιάσταση συνάρτηση έντασης φωτεινότητας $f(x,y)$, όπου τα x και y υποδηλώνουν χωρικές συντεταγμένες (spatial coordinates) και η τιμή της f σε κάθε σημείο (x,y) αναφέρεται στην φωτεινότητα (brightness) ή στο gray - level της εικόνας σε εκείνο το σημείο.

Μία ψηφιακή εικόνα (digital image) είναι μία εικόνα $f(x,y)$, η οποία έχει υποστεί διακριτοποίηση (discretized) και στις δύο συντεταγμένες τις (spatial coordinates) και στην φωτεινότητά της (brightness). Μπορούμε να θεωρήσουμε μία ψηφιακή εικόνα ως ένα πίνακα, του οποίου οι στήλες και οι γραμμές δείχνουν ένα σημείο στην εικόνα, και η τιμή του στοιχείου αυτού του πίνακα, δείχνει την φωτεινότητα ή την τιμή του επιπέδου του γκρι (gray - level) σε εκείνο το σημείο. Τα στοιχεία ενός τέτοιου πίνακα ονομάζονται *στοιχεία εικόνας* (picture elements) ή απλώς *pixels*. Έχει πρακτική σημασία το διάστημα στο οποίο μπορεί να αλλάζει η τιμή της f . Τα διαστήματα αυτά λέγονται *samples*.

Αν και το μέγεθος ενός τέτοιου πίνακα ποικίλει, υπάρχουν πολλά πλεονεκτήματα στην επεξεργασία του, αν χρησιμοποιούμε τετραγωνικούς πίνακες με συνολικές τιμές φωτεινότητας ακέραιες δυνάμεις του 2. Για π.χ. ένα τυπικό μέγεθος πίνακα το οποίο

συγκρίνεται σε ποιότητα με μία μονόχρωμη εικόνα τηλεόρασης είναι 512x512 pixels με 128 gray levels.

Η έννοια του sampling περιλαμβάνει δύο παράγοντες: το διάστημα δειγματοληψίας (sampling interval), το οποίο καθορίζει αν αναπαριστάται όλη η πληροφορία της εικόνας, στην ψηφιακή της μορφή που θα πάρουμε, και τις τιμές της έντασης (gray level value) του κάθε pixel.

Η έννοια της δειγματοληψίας (*sampling*) περιλαμβάνει δύο παράγοντες:

- το διάστημα δειγματοληψίας (sampling interval), το οποίο καθορίζει αν αναπαριστάται όλη η πληροφορία της εικόνας, στην ψηφιακή της μορφή που θα πάρουμε, και
- τις τιμές της έντασης (gray level value) του κάθε pixel.

Συνηθισμένα formats εικόνων:

- 8-bit gray scale, (256 χρώματα gray)
- 8-bit color, (256 χρώματα color)
- 24-bit color images. (16 εκ. χρώματα color)

Τα pixels αναπαρίστανται ως 8-bit unsigned integers είτε σε μονοχρωματική κλίμακα (single value) είτε σε έγχρωμες παλέτες (BGR triple values), με τιμή φωτεινότητας κυμαινόμενη από 0 ως 255. Σε κλίμακα γκρι (gray scale) ένα pixel παίρνει τιμές από 0 (απεικονίζεται μαύρο) ως 255 (απεικονίζεται άσπρο).

Η ανάλυση εικόνας αφορά τον υπολογισμό *ποσοτικών μετρήσεων* (quantitative measurements) από την συγκεκριμένη εικόνα ώστε να παραχθεί μία *περιγραφή* αυτής ή των στοιχείων που μας ενδιαφέρουν.

Οι τεχνικές ανάλυσης εικόνας απαιτούν *εξαγωγή ορισμένων βασικών χαρακτηριστικών*, τα οποία βοηθούν στην αναγνώριση των στοιχείων (αντικειμένων π.χ.) τα οποία μας ενδιαφέρουν.

Τεχνικές *Τεμαχισμού* (Segmentation) χρησιμοποιούνται για να απομονώσουν το αντικείμενο που μας ενδιαφέρει από την όλη εικόνα, έτσι ώστε οι ποσοτικές μετρήσεις να γίνονται πάνω σε αυτό το αντικείμενο ξεχωριστά.

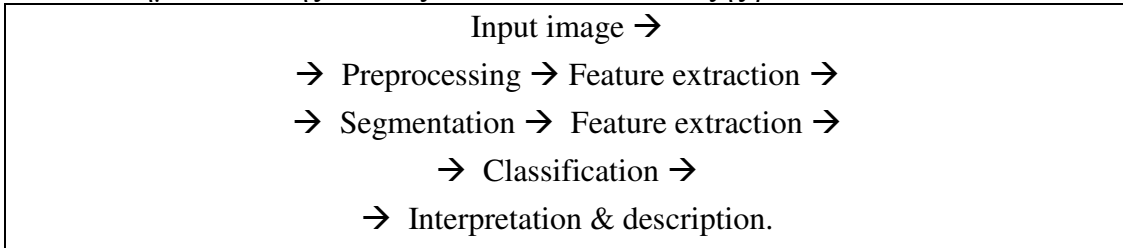
Οι ποσοτικές μετρήσεις (Quantitative measurements) σε ένα αντικείμενο επιτρέπουν ταξινόμηση (*classification*) και περιγραφή (*description*) της εικόνας.

Ο σκοπός σε όλες τις εφαρμογές επεξεργασίας εικόνας είναι η εξαγωγή σημαντικών χαρακτηριστικών (features) από τα δεδομένα της εικόνας, από τα οποία ο υπολογιστής μπορεί να δώσει μία περιγραφή (*description*), ερμηνεία (*interpretation*), και κατανόηση (*understanding*) της εικόνας (*computer vision*).

Για παράδειγμα, ένα σύστημα computer vision, θα μπορεί να ξεχωρίσει ένα αντικείμενο από όλη την εικόνα (background). Πιο 'έξυπνα' συστήματα computer vision, μπορούν να εκτιμήσουν τα αποτελέσματα της ανάλυσης της εικόνας (image analysis) και να περιγράψουν τα διάφορα αντικείμενα και τις σχέσεις τους με την όλη

εικόνα. Με αυτή την έννοια η ανάλυση της εικόνας (image analysis) είναι διαφορετική από μία διαδικασία επεξεργασίας εικόνας, όπου το αποτέλεσμα (Output), το οποίο παίρνουμε είναι μια άλλη εικόνα.

Ένα σύστημα ανάλυσης εικόνας αποτελείται από τα εξής βασικά στάδια:



Η αρχική εικόνα επεξεργάζεται, αν είναι αναγκαίο, (*preprocessing* π.χ. βελτίωση εικόνας - *enhancement*). Έπειτα εξάγονται μερικά βασικά χαρακτηριστικά τα οποία είναι αναγκαία για τον τεμαχισμό (*segmentation*) της εικόνας στα στοιχεία που την αποτελούν και τα οποία μας ενδιαφέρουν (π.χ. εξαγωγή διαφορετικών αντικειμένων σε μία εικόνα βρίσκοντας τα όριά τους - *boundary extraction*). Η τεμαχισμένη εικόνα εισάγεται σε ένα σύστημα κατηγοριοποίησης (*classifier*)

Το επόμενο και τελευταίο βήμα συνδέει την image analysis με το computer vision, δηλ. το σύστημα βρίσκει τις σχέσεις μεταξύ των διάφορων αντικειμένων και της εικόνας στην οποία βρίσκονται έτσι ώστε να είναι δυνατή η περιγραφή της.

Δηλ : *image analysis* -> *computer vision*.

Η ανάλυση της εικόνας (image analysis) βασικά περιλαμβάνει τις τεχνικές:

- **εξαγωγής χαρακτηριστικών (feature extraction)**
 - Χωρικά χαρακτηριστικά (*Spatial features*) π.χ. gray level of an object
 - Χαρακτηριστικά μετασχηματισμών (*Transform features*) π.χ. Furrier
 - Ακμές, όρια (*Edges, boundaries*)
 - Χαρακτηριστικά σχήματος (*Shape features*)
 - Γεωμετρικά χαρακτηριστικά (*Geometry featurees*)
 - Αναμορφωτικά χαρακτηριστικά (*Regenerative features*) , π.χ. Όρια, Περιοχές, Δομικά χαρακτηριστικά, ταίριασμα και αναγνώριση αντικειμένων.
 - Υφή αντικειμένων (*Texture*) π.χ. τα δομικά στοιχεία επιφάνειας π.χ. ξύλο, άμμος).
- **τεμαχισμού (segmentation)**
 - Τεχνικές κατωφλίου, (*Thresholding*)
 - Εξαγωγή ακμών, ανεύρεση ορίων (*Edge and Boundary detection*)
 - Εξαγωγή περιοχών με όμοια υφή (*Texture matching*)
 - Εξαγωγή περιοχών οι οποίες έχουν όμοια χαρακτηριστικά (*Region Growing*)
- **κατηγοριοποίησης (classification)**

- Στατιστική κατηγοριοποίηση (*Statistical classification*)
- Κατηγοριοποίηση με βάση την ομοιότητα (*Similarity measures*)

3.2. Γεωμετρικά Χαρακτηριστικά Αντικειμένων.

Εμβαδόν E (Area) : Η επιφάνεια του αντικειμένου, μετρούμενη σε αριθμό pixels. Αν έχει γίνει χωρική βαθμονόμηση, τότε η επιφάνεια της εικόνας μετράται σε μονάδες της συγκεκριμένης βαθμονόμησης, αλλιώς εκφράζεται σε pixels.

Περίμετρος P (Perimeter): Το μήκος του εξωτερικού συνόρου του αντικειμένου, μετρούμενο σε αριθμό pixels.

Καμπυλότητα (Roundness): Υπολογίζεται ως :

$$\text{ROUNDNESS} \equiv \frac{4\pi E}{P^2}$$

Το αποτέλεσμα δίνει έναν αριθμό ανάμεσα στο 0 και 1. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή, τόσο στρογγυλότερο (rounder) είναι το αντικείμενο. Αν το αποτέλεσμα είναι ίσο με 1, το αντικείμενο είναι κυκλικός δίσκος και όσο η τιμή του παραπάνω λόγου αποκλίνει από το 1, τόσο το αντικείμενο παρεκκλίνει από το κυκλικό σχήμα.

Επιφάνεια περιγεγραμμένου τετραπλεύρου (Bounding Box Area): Η επιφάνεια του μικρότερου τετράπλευρου, η οποία μπορεί να σχεδιαστεί περικλείοντας το αντικείμενο. Είναι ίση με το γινόμενο του μήκους του μεγαλύτερου άξονα (major axis) επί το μήκος του μικρότερου άξονα (minor axis).

Επιμήκυνση (Elongation): Είναι ίση με το λόγο του μήκους του μικρότερου άξονα (minor axis) διά το μήκος του μεγαλύτερου άξονα (major axis). Το αποτέλεσμα είναι μία τιμή ανάμεσα στο 0 και το 1. Αν η τιμή είναι κοντά στο 1, το αντικείμενο προσεγγίζει είτε τετράγωνο είτε κυκλικό δίσκο. Καθώς ο λόγος ελαττώνεται από το 1, το αντικείμενο γίνεται πιο επίμηκες.

Διάμετρος Feret (Feret Diameter): Η διάμετρος του κυκλικού δίσκου, ο οποίος έχει ίδια επιφάνεια με αυτή του αντικειμένου. Υπολογίζεται με βάση τη σχέση:

$$\text{FERET_DIAMETER} \equiv \sqrt{\frac{4E}{\pi}}$$

Μήκος μέγιστου άξονα (Major Axis Length): Το μήκος της μεγαλύτερης γραμμής που μπορεί να σχεδιαστεί μέσα στο αντικείμενο.

Μήκος ελάχιστου άξονα (Minor Axis Length): Το μήκος της γραμμής με το μικρότερο μήκος, που μπορεί να σχεδιαστεί μέσα στο αντικείμενο.

Κεντροειδές (Centroid): Το κεντρικό σημείο (center of mass) του αντικειμένου. Υπολογίζεται ως ο μέσος όρος των συντεταγμένων x , y όλων των σημείων του αντικειμένου.

4. Ανάλυση Εικόνας στην Κυτταροπαθολογία-Πλεονεκτήματα

Η επεξεργασία εικόνων μικροσκοπίου με υπολογιστή στην κυτταροπαθολογία και την ιστοπαθολογία προσφέρει δυνατότητα ποσοτικοποίησης και αντικειμενοποίησης στη λήψη διαγνωστικών αποφάσεων. Η εισαγωγή στις ποσοτικές διαδικασίες αρχίζει να έχει μια πιο ευρεία επίδραση, οδηγώντας στην εξερεύνηση των διαδικασιών οι οποίες υπόκεινται σε υποκειμενική ανθρώπινη κρίση για διαγνωστικούς σκοπούς. Η επικύρωση τέτοιων κρίσεων οδηγεί στην επίτευξη του υπέρτατου στόχου: «αλήθεια» στην διάγνωση.

Η ανάλυση εικόνας καθορίζεται σε σημαντικό βαθμό από διάφορες φάσεις της πειραματικής διαδικασίας: από την προετοιμασία του βιολογικού δείγματος, την οπτική του σάρωση, την ψηφιοποίηση και καταγραφή της εικόνας του μικροσκοπίου, την αποθήκευση της στον υπολογιστή, και την μετέπειτα επεξεργασία της. Οι αντλούμενες ποσοτικές πληροφορίες αναλύονται με την βοήθεια πολυμεταβλητών στατιστικών μεθόδων.

Η εφαρμογή της ανάλυσης εικόνας παρέχει επίσης νέα διαγνωστικά στοιχεία:

Μπορούν να εντοπιστούν μικρές αλλαγές στα χαρακτηριστικά πολυμεταβλητών στατιστικών κατανομών σε πληθυσμούς κυττάρων, ενώ με την οπτική παρατήρηση μεμονομένων κυττάρων, αυτό δεν μπορεί να επιτευχθεί.

Οι ήδη υπάρχουσες μεθοδολογίες κυτταροπαθολογικών και ιστολογικών αναλύσεων σταδιακά δίνουν τη θέση τους στις νέες τεχνικές που παρέχει η ανάλυση και επεξεργασία εικόνας με την βοήθεια H/Y . Οι τελευταίες συνδιάζουν αντικειμενικότητα και ακριβή προσδιορισμό ποσοτικών μεγεθών της εικόνας, που δεν είναι δυνατόν να καταγραφούν με τη χρήση μόνο οπτικού μικροσκοπίου.

5. Περιγραφή Πειραματικής Διαδικασίας-Ερωτήσεις

1. Εξοικειωθείτε με το εικονικό μικροσκόπιο αναγνωρίζοντας τα κύρια μέρη από τα οποία αποτελείται.
2. Επιλέξετε δείγμα, αλλάξτε αντικειμενικό φακό και σημειώστε πόσο αλλάζει κάθε φορά η μεγέθυνση. Καθώς αυξάνει η μεγέθυνση πως αλλάζει το οπτικό πεδίο παρατήρησης; Για να μπορέσετε να επιτύχετε ικανοποιητική αντίθεση στην παρατηρούμενη εικόνα τι επίσης πρέπει να μεταβάλλετε και πως;
3. Με το πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνας Image Tool και σύμφωνα με τις οδηγίες οι οποίες θα σας δοθούν κατά τη διάρκεια της εργαστηριακής άσκησης επεξεργαστείτε τις εικόνες κυττάρων. Η τοποθεσία των εικόνων θα σας υποδειχθεί κατά τη διάρκεια της άσκησης. Στις εικόνες απεικονίζονται κύτταρα νεκρά, και έχουν ληφθεί μέσω συστήματος απεικονιστικής μικροσκοπίας, χρησιμοποιώντας δυο διαφορετικούς αντικειμενικούς φακούς, 20x και 40x. Επεξεργαστείτε την κάθε εικόνα ώστε να απομονώσετε τα κύτταρα που βρίσκονται στην κάθε μια και να προσδιορίσετε τα γεωμετρικά τους χαρακτηριστικά: Εμβαδό, Περίμετρο, Καμπυλότητα, Μήκος μεγάλου άξονα.
4. Καταγράψτε τις αντίστοιχες τιμές στον πίνακα στο φυλλάδιο το οποίο θα σας δοθεί κατά τη διάρκεια της άσκησης
5. Απαντήστε στις ερωτήσεις του φυλλαδίου.