

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA



Corso di laurea triennale in Ingegneria Biomedica

**Estrazione di caratteristiche
topologiche in immagini di
endotelio corneale**

Laureanda: Cibir Federica

Relatore: Ruggeri Alfredo

Correlatore: Poletti Enea

Anno accademico 2012/2013, Padova

25 Luglio 2013

Alla mia famiglia
Ad Alberto e Ylenia

Abstract

This thesis deals with the automatic segmentation of corneal endothelium images and belongs to a wider research projects headed by Prof. Alfredo Ruggeri. The aim of the project is to develop an algorithm for the automatic analysis of corneal images for estimation of parameters of clinical interest. Clinicians will employ these clinical indexes to a faster and more accurate diagnosis for specific diseases that affect the patient. On a set of 30 images of endothelium, acquired with a specular microscopy, three particular features have been extracted using spatial matched filtering technique. Eventually, the filtered images have been analyzed using R.O.C. curves to evaluate the filters' goodness.

Indice

Introduzione

Capitolo 1

L'endotelio corneale

- 1.1 La cornea
 - 1.1.1 Il ruolo della cornea
 - 1.1.2 L'anatomia della cornea
- 1.2 L'endotelio corneale
 - 1.2.1 La struttura dell'endotelio
 - 1.2.2 Lo stato di salute dell'endotelio
- 1.3 Acquisizione delle immagini
 - 1.3.1 Microscopia endoteliale speculare
 - 1.3.2 Problemi con l'acquisizione delle immagini

Capitolo 2

Algoritmo per l'analisi dell'endotelio

- 2.1 Selezione automatica della ROI
- 2.2 Filtraggio di un immagine
 - 2.2.1 L'operazione di convoluzione
 - 2.2.2 I principali filtri convolutivi
 - 2.2.3 I filtri non convolutivi
- 2.3 I filtri utilizzati dall'algoritmo
 - 2.3.1 Riconoscimento dei corpi cellulari
 - 2.3.2 Riconoscimento dei contorni cellulari
 - 2.3.3 Riconoscimento delle triforcazioni cellulari

Capitolo 3

Analisi della curva R.O.C.

- 3.1 Curva R.O.C.

- 3.2 Parametri di una curva R.O.C.
 - 3.2.1 Il valore di cut-off
 - 3.2.2 Veri Positivi, Veri Negativi, Falsi Positivi e Falsi Negativi
 - 3.2.3 Sensibilità, specificità e accuratezza
- 3.3 Il principio di base delle curve R.O.C.
- 3.4 L'area sottesa ad una curva R.O.C.
- 3.5 Scelta del valore soglia ottimale

Capitolo 4

Analisi R.O.C. applicata alle immagini filtrate di endotelio corneale

- 4.1 Il *ground truth*
- 4.2 Analisi per ogni singola immagine
- 4.3 Media aritmetica di tutte le soglie
- 4.4 Analisi delle immagini con la soglia mediata
 - 4.4.1 Nuovi parametri dopo l'applicazione della nuova soglia
 - 4.4.2 Curve R.O.C. finali

Conclusioni

Indice delle figure e delle tabelle

Capitolo 1

- Figura 1.1: La cornea umana
- Figura 1.2: Gli strati della cornea
- Figura 1.3: Le cinque componenti della cornea
- Figura 1.4: Endotelio corneale e membrana di Descemet
- Figura 1.5: Rapporto tra polimorfismo e polimegatismo
- Figura 1.6: Microscopio speculare non a contatto Topcon SP-3000P
- Figura 1.7: "Dark boundary" (DB) e "bright boundary" (BB)

Capitolo 2

- Figura 2.1: Esempio di funzione gaussiana
- Figura 2.2: Grafico di un Laplaciano di Gaussiana bidimensionale
- Figura 2.3: Mosaico endoteliale corneale acquisito mediante microscopio speculare Topcon SP-3000P
- Figura 2.4: Laplaciano di Gaussiana (LoG)
- Figura 2.5: Corpi cellulari dell'endotelio corneale dopo l'operazione di filtraggio
- Figura 2.6: Matrici per la convoluzione nel filtraggio dei contorni cellulari
- Figura 2.7: Contorni cellulari dell'endotelio corneale dopo l'operazione di filtraggio
- Figura 2.8: Filtro finale per l'individuazione delle triforcazioni
- Figura 2.9: Triforcazioni dell'endotelio corneale dopo l'operazione di filtraggio

Capitolo 3

- Figura 3.1: cut-off ideale che separa pazienti sani da pazienti malati
- Figura 3.2: cut-off reale che separa pazienti sani da pazienti malati
- Figura 3.3: Tabella di contingenza
- Figura 3.4: Curva spezzata prima dello "smoothing"
- Figura 3.5: Curva R.O.C prima e dopo interpolazione ("smoothing")
- Figura 3.6: Le due curve limite
- Figura 3.7: Curve R.O.C. in tre differenti casi di test
- Figura 3.8: Sensibilità e specificità rispetto al valore di criterio

Capitolo 4

- Figura 4.1: "Ground Truth" di un mosaico endoteliale corneale acquisito mediante microscopio speculare Topcon SP-3000P
- Figura 4.2: "Ground Truth" di un mosaico endoteliale corneale relativo alle triforcazioni e dettaglio
- Figura 4.3: "Ground Truth" di un mosaico endoteliale corneale relativo ai contorni cellulari e dettaglio

Figura 4.4: “Ground Truth” di un mosaico endoteliale corneale relativo ai corpi cellulari e dettaglio

Tabella 4.5: Parametri ottenuti e soglia migliore per ogni immagine filtrata, dopo il rilevamento dei corpi cellulari, al confronto con il corrispondente ground truth

Tabella 4.6: Parametri ottenuti e soglia migliore per ogni immagine filtrata, dopo il rilevamento dei contorni cellulari, al confronto con il corrispondente ground truth

Tabella 4.7: Parametri ottenuti e soglia migliore per ogni immagine filtrata, dopo il rilevamento delle triforcazioni cellulari, al confronto con il corrispondente ground truth

Tabella 4.8: Parametri ottenuti dopo l’applicazione della soglia mediata alle immagini filtrate dei centri cellulari

Tabella 4.9: Parametri ottenuti dopo l’applicazione della soglia mediata alle immagini filtrate dei contorni cellulari

Tabella 4.10: Parametri ottenuti dopo l’applicazione della soglia mediata alle immagini filtrate delle triforcazioni cellulari

Figura 4.11: analisi finale tramite curva R.O.C. per i centri cellulari

Figura 4.12: analisi finale tramite curva R.O.C. per i contorni cellulari

Figura 4.13: analisi finale tramite curva R.O.C. per le triforcazioni cellulari

Introduzione

Il lavoro di cui tratta questa tesi fa parte di un progetto di ricerca guidato dal professore Alfredo Ruggeri che ha lo scopo di elaborare immagini dell'endotelio della cornea in modo da stimare alcuni importanti parametri clinici utilizzati dal medico per condurre una diagnosi più veloce e accurata dell'eventuale patologia presentata dal paziente.

L'endotelio è il più interno dei tessuti costituenti la cornea ed è formato da un unico strato di cellule con aree per lo più identiche e di forma prevalentemente esagonale. Le cellule endoteliali non sono in grado di riprodursi, pertanto, in caso di morte cellulare per malattia o per lesione, le cellule adiacenti alle cellule morte vanno ad occupare lo spazio lasciato vuoto da queste ultime, migrando ed espandendosi; ciò comporta una loro variazione nella forma e nelle dimensioni. In particolare si assiste alla diminuzione del numero di cellule esagonali, con la contemporanea comparsa di cellule di varia forma anche non regolare, all'aumento della varianza dell'area delle cellule e ad una diminuzione della densità cellulare. La visualizzazione delle cellule endoteliali avviene in particolare mediante microscopia speculare endoteliale. Essa permette di acquisire immagini dell'endotelio in vivo, rapidamente e senza essere invasivo per il paziente e di effettuare analisi morfologiche e statistiche relative all'area, alla variazione media della forma e dell'esagonabilità cellulare. L'esame valuta quindi sia quantitativamente sia qualitativamente le cellule dell'endotelio. Lo strumento che è stato utilizzato per l'acquisizione delle immagini prende il nome di "microscopio endoteliale Konan", un microscopio non a contatto. Questo sofisticato strumento consente l'osservazione dell'endotelio ed è capace di effettuare la diagnosi precoce di molte patologie degenerative e infiammatorie della cornea, dovute per esempio all'invecchiamento, alla presenza di patologie, all'uso prolungato di lenti a contatto, agli interventi chirurgici o ai trapianti di cornea.

In questo progetto sono state adoperate 30 immagini di endotelio corneale, messe a disposizione da Topcon® USA e rilevate tramite microscopia. Di tutte le immagini sono stati rilevati i bordi cellulari mediante filtraggio spaziale in modo da evidenziare quelli che possono essere considerati gli aspetti principali del pattern endoteliale. Per questo motivo sono stati costruiti tre diversi filtri per il riconoscimento dei contorni cellulari e delle triforcazioni, che costituiscono il bordo della cellula, e infine dei corpi cellulari, cioè la porzione di spazio interna alla cellula. L'obiettivo sostanziale di questa tesi è quella di valutare l'efficacia dei filtri sviluppati attraverso l'analisi della curva R.O.C. (acronimo per "Receiver Operating Characteristic"). Inizialmente è stato effettuato il confronto tra la risposta di ciascun filtro e l'immagine dell'endotelio ricavata manualmente, il cosiddetto "ground truth", applicando 50 diverse soglie di livelli di grigio. Di tutti i parametri ricavati dall'analisi, si sono presi in considerazione solamente quelli corrispondenti alla soglia

migliore, cioè quella associata al miglior compromesso tra sensibilità e specificità, due parametri fondamentali della curva R.O.C.. E' stata calcolata la media di tutte ed effettuato nuovamente il confronto, questa volta utilizzando solamente la soglia mediata. L'analisi tramite curva R.O.C. è una tecnica ampiamente utilizzata per valutare il comportamento di un test. Infatti, nel nostro caso specifico, attraverso la costruzione della curva e del calcolo dell'area sottesa ad essa (AUC), è possibile valutare la bontà dei filtri progettati. Perciò al termine di questo progetto potrà essere sostenuta o meno la validità di tali filtri.

Capitolo 1

L'endotelio corneale

1.1 La cornea

La cornea è quella membrana trasparente situata nella parte anteriore del bulbo oculare. Di tutta la superficie esterna dell'occhio, essa ne occupa circa un sesto mentre i restanti cinque sesti sono rivestiti da una membrana opaca detta sclera. Cornea e sclera sono separati tra loro dalla giunzione sclero-corneale, chiamata anche limbo, ma possedendo la cornea un raggio di curvatura inferiore rispetto alla sclera, appare leggermente sporgente in avanti.

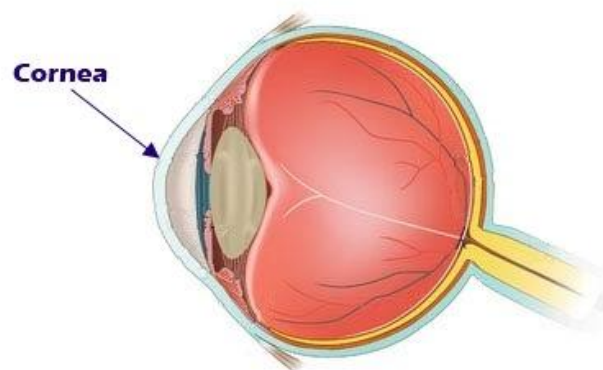
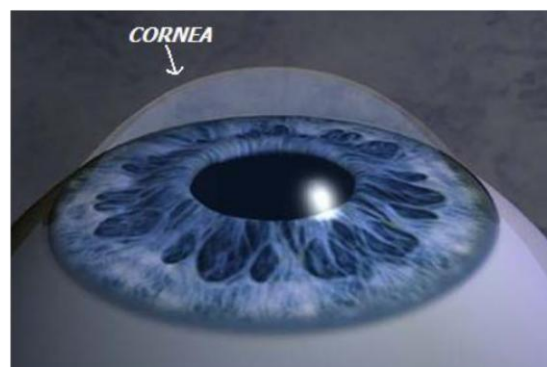


Figura 1.1: La cornea umana

L'assoluta trasparenza, dovuta alla mancanza di vasi sanguinei, è sicuramente la sua caratteristica più importante. Inoltre, non essendo vascolarizzata, la cornea riceve le sostanze nutritive tramite diffusione dal liquido lacrimale esternamente, dall'umor acqueo internamente mentre le fibre nervose che la innervano le forniscono le proteine. Anche i vasi linfatici non sono presenti. Sono invece presenti spazi interstiziali, comunicanti tra di loro e delimitati dalle lamelle corneali; questi spazi comunicano con i corrispondenti spazi interstiziali della sclera e con i vasi linfatici della congiuntiva bulbare. È inoltre l'unica parte del corpo umano che riceve ossigeno direttamente dall'aria.

1.1.1 Il ruolo della cornea

L'occhio è esposto a traumi e infezioni e per questo la cornea svolge la funzione fondamentale di barriera fisica per proteggerlo da agenti esterni e filtra i raggi ultravioletti della luce solare più dannosi, che altrimenti danneggerebbero il cristallino e la retina. La cornea ha inoltre la funzione di imprimere alle radiazioni luminose che raggiungono l'occhio la convergenza necessaria ad essere deviate sul cristallino e messe a fuoco successivamente sulla retina. Ha un indice di rifrazione di 1.37, un potere rifrattivo intorno alle 45 diottrie e costituisce circa due terzi del potere ottico totale. La particolare forma convessa e l'assoluta trasparenza sono responsabili del potere rifrattivo dell'occhio e quindi della trasmissione dell'immagine sulla retina. La presenza di imperfezioni o irregolarità su di essa comporterebbe una distorsione dell'immagine visualizzata in quanto la luce verrebbe rifratta in modo diseguale.

1.1.2 L'anatomia della cornea

La cornea è costituita da cinque componenti, tre strati sovrapposti e due membrane che li separano. Come si nota dalla figura 1.2, procedendo dall'esterno verso l'interno si incontrano:

- Epitelio
- Membrana elastica anteriore di Bowman
- Stroma
- Membrana di Descemet
- Endotelio

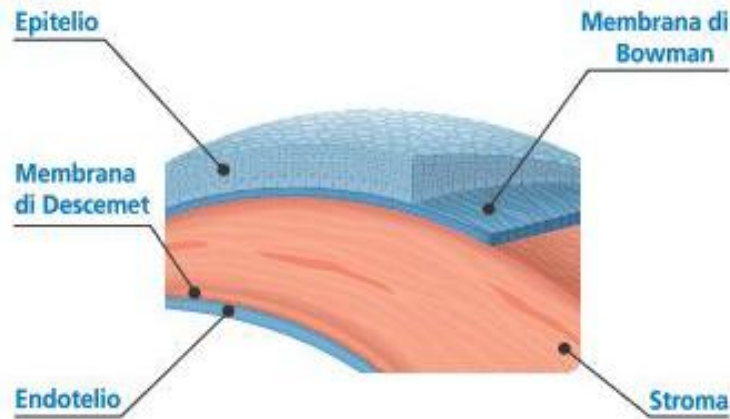


Figura 1.2: *Gli strati della cornea*

Analizziamone ora le principali caratteristiche.

L'epitelio corneale ricopre la superficie anteriore della cornea e ha uno spessore di circa 50 – 60 μm . È di tipo pavimentoso ed è formato da numerosi strati cellulari (da 5 a 7 strati), che si rigenerano velocemente in caso di lesione. Nel suo ambito si distinguono fondamentalmente tre tipi di cellule che rappresentano differenti stadi maturativi di una stessa unità cellulare: basali, intermedie o poligonali e superficiali. Le cellule basali sono piccole, hanno nuclei non distinguibili, contorni ben definiti e luminosi. Le cellule superficiali, invece, hanno forma poligonale, contorni ben definiti, nuclei ben visibili e sono omogenee in termini di densità. Le cellule poligonali, infine, presentano caratteristiche intermedie tra le altre due.

Proprio sotto l'epitelio giace la membrana di Bowman, una lamina basale con uno spessore di circa 12 μm . È costituita da fibre di collagene disposte irregolarmente e rare cellule di Schwann appartenenti alle fibre nervose sensitive che la perforano per dirigersi alle cellule epiteliali. Ha sostanzialmente la funzione di proteggere lo stroma che costituisce da solo il 90% dello spessore corneale.

Lo stroma ha uno spessore di 500 μm ed è formato da lamelle immerse in una sostanza fondamentale e da cheratociti. Le lamelle, disposte parallelamente tra loro, sono formate da fibrille di collagene di uguale diametro, parallele ed equidistanti tra loro. La sostanza fondamentale cementante, nella quale sono immerse, è costituita da mucopolisaccaridi. I cheratociti sono invece una varietà di fibroblasti che appaiono come cellule appiattite, disposte parallelamente alla superficie corneale, e unite tra loro da ponti citoplasmatici filiformi.

La membrana di Descemet ha uno spessore analogo a quello della Bowman (circa 10-12 μm) ed aumenta progressivamente durante la vita. È uno strato sottile acellulare, in quanto formata solo da fibrille collagene che si trova tra lo stroma e l'endotelio. È dotata

di elevata elasticità, anche se non presenta fibre elastiche. Sia la sua superficie anteriore che quella posteriore sono scarsamente aderenti rispettivamente allo stroma e all'endotelio.

L'endotelio è lo strato più interno della cornea e verrà analizzato nel prossimo paragrafo.

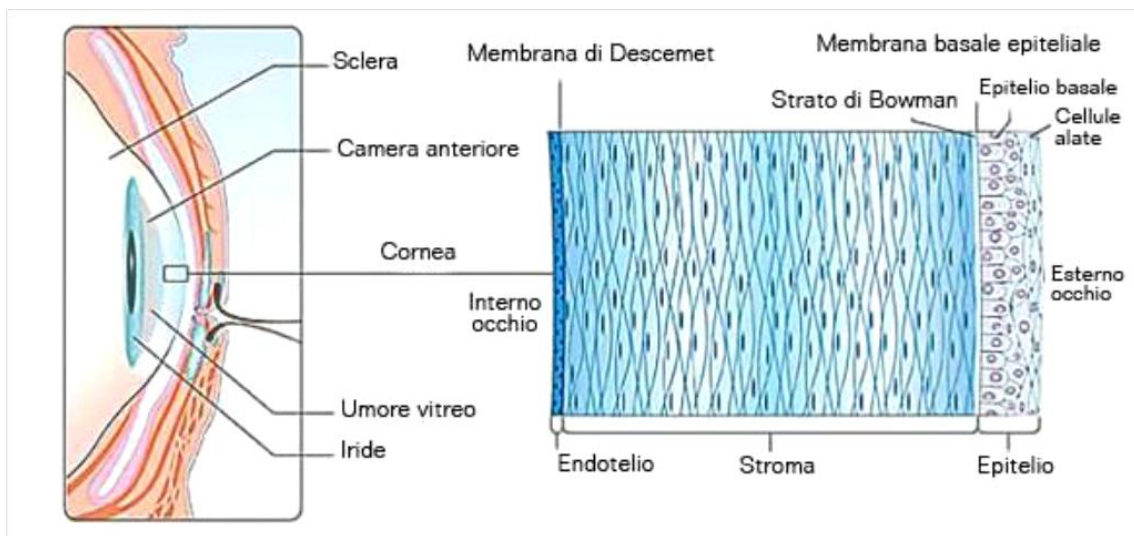


Figura 1.3: Le cinque componenti della cornea

1.2 L'endotelio corneale

Di seguito viene fornita una descrizione dettagliata dell'endotelio corneale, di fatto elemento principale di questo lavoro di tesi.

1.2.1 La struttura dell'endotelio

L'endotelio corneale è costituito da un unico strato di cellule caratterizzate da un diametro di circa $22 \mu\text{m}$ e da un'area di $250 \mu\text{m}^2$. Le cellule, ricche di mitocondri, sono appiattite e poligonali: nell'insieme appaiono come un mosaico. L'endotelio si trova a contatto da un lato con la membrana di Descemet (Figura 1.4), alla quale è unito attraverso degli emidesmosomi, particolari punti di ancoraggio tra cellule e matrice extracellulare, e dall'altro lato con l'umore acqueo. Mentre tra loro le cellule sono collegate da desmosomi e da zonule occludenti, particolari addensamenti citoplasmatici ed intercellulari che ne garantiscono una perfetta adesione e che pertanto rivestono un ruolo importante nella funzione della barriera endoteliale.

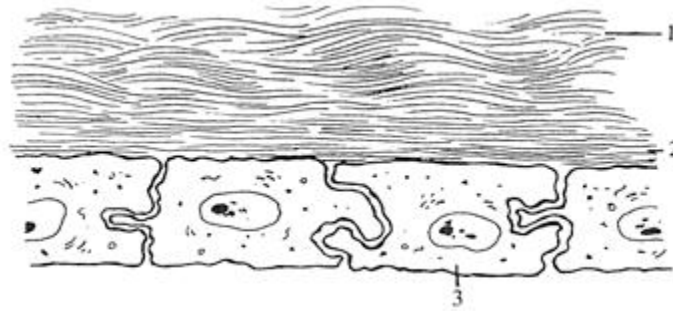


Figura 1.4: Endotelio corneale e membrana di Descemet. 1) Lamelle stromali 2) Fibrille di collagene 3) Cellule endoteliali.

Il numero delle cellule che costituiscono l'endotelio corneale è programmato fin dalla nascita (500-600mila). Nei bambini e nei giovani l'endotelio corneale appare costituito da cellule di dimensioni omogenee, di forma prevalentemente esagonale regolare (pari al 60% nei soggetti normali non portatori di lenti a contatto) e in minor misura pentagonale ed eptagonale (circa un 40% dell'intera popolazione). Ogni anno circa lo 0,6% delle cellule presenti muoiono. Se l'endotelio viene poi colpito da delle patologie, lo strato viene ulteriormente danneggiato permanentemente: le cellule perdono la loro perfetta forma geometrica, aumentando la loro superficie cellulare essenzialmente a carico del citoplasma. Le cellule dell'endotelio non si possono riprodurre e di conseguenza la morte di alcune cellule viene compensata dall'espansione e della migrazione delle cellule vicine, che cambiano così la loro forma inizialmente esagonale regolare. La distribuzione delle perdite cellulari e l'aumento della loro superficie assumono caratteri differenti se dovuti all'invecchiamento oppure a condizioni patologiche. La ridistribuzione cellulare dovuta all'età è maggiormente omogenea, quasi mimetizzata nella molteplicità della sconfinata pavimentazione esagonale, mentre quella dovuta a cause patologiche è meno omogenea, con la comparsa di grandi cellule con una superficie pari a molte volte quella originaria.

1.2.2 Lo stato di salute dell'endotelio

Le variazioni morfologiche delle cellule endoteliali corneali forniscono delle informazioni sullo stato di salute e qualità della cornea. La deviazione dalla forma esagonale è quindi un indicatore di un danno della cornea. Durante l'infanzia tutte le cellule dell'endotelio hanno forma esagonale e dimensione omogenea, con una densità generalmente più alta rispetto a quella di soggetti più anziani. A causa dell'invecchiamento e di eventuali patologie vi sono variazioni morfologiche e questa configurazione regolare viene persa. La variazione della forma e dimensione e una riduzione della densità cellulare forniscono quindi informazioni sullo stato della cornea.

Fondamentali per l'analisi sono i seguenti parametri:

- Polimegatismo (distribuzione della dimensione delle cellule)
- Polimorfismo (distribuzione del numero di lati delle cellule)

Polimegatismo e polimorfismo vanno sempre di pari passo; trovare alterati questi due parametri vuol dire, in linea di massima, una cellularità non pienamente fisiologica. Per polimegatismo si intende l'aumento numerico di cellule con area di dimensioni diverse l'una dall'altra; si esprime in termine di Coefficiente di Variazione dell'area cellulare CV, cioè il rapporto tra la Deviazione Standard SD dell'area cellulare e la superficie cellulare media AVG: $CV = SD/AVG$. La perdita della forma originale esagonale delle cellule è invece nota come polimorfismo o pleomorfismo ed è individuato da HEX, grado di Esagonalità o Coefficiente di Forma o di Figura.

Nel grafico è riportato il rapporto diretto tra polimorfismo e polimegatismo.

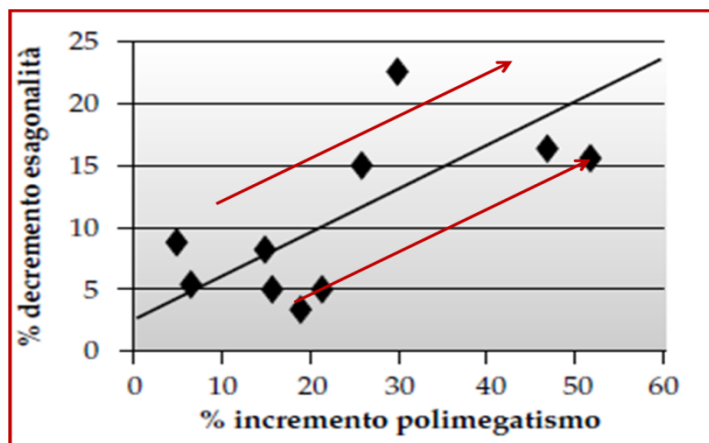


Figura 1.5: Rapporto tra polimorfismo e polimegatismo

Le cause patologiche, che agiscono sull'endotelio, possono essere di varia natura: distrofiche, degenerative, flogistiche, traumatiche, tossiche. Diventa molto importante quindi riuscire a diagnosticare la presenza di qualsivoglia anomalia su questo tessuto al fine di poter curare stati degenerativi che potrebbero portare con il passare del tempo ad una perdita della capacità visiva parziale, o nei casi più gravi totale, del soggetto.

1.3 Acquisizione delle immagini

1.3.1 Microscopia endoteliale speculare

Il primo passo per l'analisi della cornea è l'acquisizione delle immagini dell'endotelio. Per fare ciò viene impiegata la tecnica di microscopia speculare. Tale tecnica venne messa a punto nel 1968 da David Maurice, che riuscì a ricavare un'immagine ad alta risoluzione dell'endotelio corneale di un coniglio, tramite un microscopio speculare a contatto. Da questa scoperta seguirono varie ricerche sulla microscopia fino ad arrivare a quella dei giorni nostri. Sono state apportate delle modifiche, soprattutto per praticare ai pazienti un esame non invasivo, assicurando a loro il migliore comfort possibile. In figura 1.6 è mostrato un microscopio endoteliale speculare di ultima generazione, il Topcon SP-3000P.



Figura 1.6: *Microscopio speculare non a contatto Topcon SP-3000P.*

In realtà una prima testimonianza strutturale dell'endotelio corneale risale a cinquant'anni prima con Alfred Vogt che già aveva descritto alcuni suoi aspetti utilizzando una lampada a fessura modificata per lo scopo. I suoi disegni schematici sono riportati nel suo Atlante di Biomicroscopia.

L'esame attuale, non invasivo per il paziente, consente di visualizzare ampie aree dell'endotelio corneale che appaiono come un grande mosaico di cellule poligonali, per lo più esagonali. Il corpo cellulare appare chiaro mentre le giunzioni intracellulari appaiono più scure. Il microscopio speculare consente poi di individuare alterazioni del riflesso endoteliale sostenute dalla presenza di materiale patologico. Le strutture anomale vengono classificate in due gruppi: "dark structure" e "bright structures". Le "dark structure" riflettono la luce in modo non speculare, in direzione differente da quella del

resto del pattern endoteliale. Le “bright structures”, invece, comprendono cellule o materiale con un indice di rifrazione più alto rispetto alle cellule endoteliali. Per comprendere meglio basta osservare la figura 1.7 che segue.

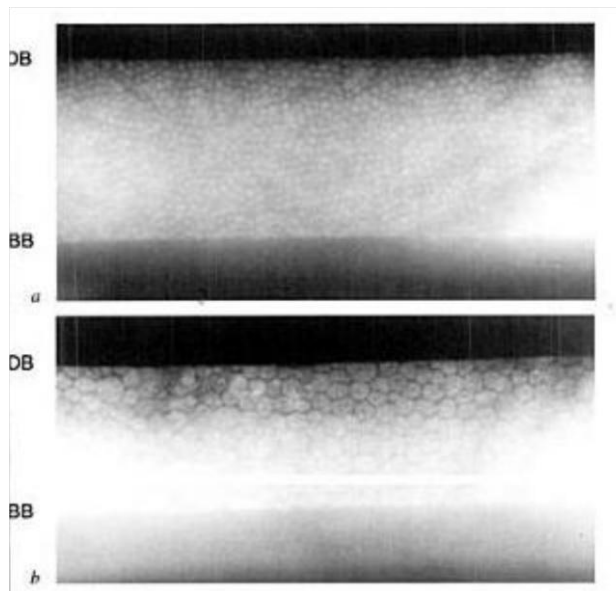


Figura 1.7: “Dark boundary” (DB) e “bright boundary” (BB): ben visibile su un campione endoteliale normale (a) e di endotelio patologico (b)

Dall’osservazione dell’immagine ricavata dalla microscopia il medico può dare una prima valutazione riguardo l’aspetto dell’endotelio corneale al fine di indicare patologie possibili o di avanzare l’ipotesi di una successiva terapia. È ovviamente necessario effettuare anche un’analisi quantitativa dell’immagine, prelevando in maniera oggettiva e ripetitiva alcuni parametri di interesse clinico in modo da ricavare una diagnosi corretta. Il parametro più comunemente impiegato nella valutazione del pattern endoteliale è rappresentato dalla densità cellulare media (cellule/mm²). I clinici utilizzano diversi metodi manuali o semi-manuali per determinare questo parametro.

1.3.2 Problemi con l’acquisizione delle immagini

Purtroppo un aspetto da tener presente nella visualizzazione dell’immagine endoteliale è la sua scarsa qualità: si ha a che fare con la scarsa e non uniforme luminosità, il basso contrasto e la bassa definizione dei contorni. Riuscire ad individuare i corretti contorni cellulari risulta molto complicato perfino per un esperto nel campo. Nel caso in cui si abbia a che fare con un paziente patologico, tutto risulta ancora più complicato. Le immagini del suo endotelio infatti avranno numerose irregolarità sia per quanto riguarda le dimensioni delle cellule sia per la loro forma, per non parlare poi della diversa luminosità in varie zone dell’immagine causata appunto dalla presenza di una patologia e che non permette il più

delle volte il riconoscimento cellulare. Tuttavia, un algoritmo in grado di riconoscere i contorni cellulari correttamente ed in modo completamente automatico sia su soggetti sani che patologici, ed in grado di stimare accuratamente i parametri clinici risulta essere uno strumento essenziale per una analisi quantitativa ed oggettiva dell'endotelio corneale.

Capitolo 2

Algoritmo per l'analisi dell'endotelio

Il gruppo di ricerca del prof. Alfredo Ruggeri ha sviluppato un algoritmo capace innanzitutto di acquisire in input un certo numero di immagini di endotelio corneale ottenute tramite microscopia speculare per poi fornire in output, attraverso un'operazione di filtraggio spaziale, le stesse immagini con evidenziate le tre caratteristiche che possono essere considerate come le descrittive della morfologia dell'endotelio, cioè i corpi cellulari, i contorni e le triforcazioni delle diverse cellule. L'algoritmo è stato implementato utilizzando il programma Matlab[®]. Le 30 immagini analizzate sono state acquisite in vivo, in maniera non invasiva, da pazienti affetti da delle patologie, per questo motivo presentano un diverso aspetto dell'endotelio rispetto a quello visibile in un individuo sano. Le immagini sono state digitalizzate come immagini a livello di grigio a otto bit e hanno dimensione pari a 276x477 pixel.

2.1 Selezione automatica della ROI

Le immagini dell'endotelio corneale acquisite mediante microscopio speculare sono spesso di bassa qualità e presentano regioni sfuocate o scure, situate soprattutto vicino al bordo. In queste aree, anche migliorando la messa a fuoco, è impossibile identificare i contorni delle cellule ed è perciò inutile considerarle per l'analisi successiva. Per questo motivo, in ogni immagine, per prima cosa, viene individuata la Region of Interest (ROI), ovvero la regione in cui le cellule sono a fuoco ed hanno contorni facilmente individuabili. Attualmente la ROI viene selezionata manualmente in ogni immagine richiedendo quindi un notevole dispendio di tempo ed attenzione da parte dell'operatore. L'algoritmo presentato in questa tesi, al contrario, seleziona la ROI in modo automatico usando una procedura basata su una combinazione di entropia e densità spettrale di potenza.

2.2 Filtraggio di un'immagine

Due sono i modi possibili per elaborare un'immagine: l'utilizzo di metodi nel dominio spaziale oppure nel dominio della frequenza. Nel primo caso si tratta di tecniche basate sulla manipolazione diretta dei pixel dell'immagine mentre il secondo è basato sulla

trasformata di Fourier. Nel nostro caso in particolare si farà riferimento solo ai primi. Certi operatori sono in grado di trasformare un'immagine $f(x, y)$ in un'altra $g(x, y)$ in modo che il valore di ogni pixel di g sia determinato da un intorno S_{xy} del corrispondente pixel di f . Questo processo può essere denotato con l'espressione $g(x, y) = T[f(x, y)]$ dove appunto $f(x, y)$ è l'immagine di partenza, $g(x, y)$ è l'immagine elaborata e T è la trasformazione che opera su uno, più o tutti i pixel. Gli operatori utilizzati per ottenere ciò vengono chiamati filtri di convoluzione.

2.2.1 L'operazione di convoluzione

Lavorando con un software di elaborazione delle immagini è quasi impossibile non imbattersi in certe operazioni quali miglioramento, sfocatura, rilevamento contorni. Ma queste sono solo alcune delle possibili operazioni realizzabili con dei filtri di convoluzione. La progettazione dei filtri è però strettamente connessa allo studio di segnali e sistemi. Per capire meglio come i filtri vengono progettati è necessario affrontare i concetti base di questa materia. Un segnale è la variazione di una grandezza d'interesse, solitamente nel tempo. Essi vengono classificati fra continui e discreti a seconda che possano assumere tutti i valori in un intervallo o che assumano un numero finito di valori (consideriamo ad esempio i bit, questi possono assumere valore 0 o 1). Nel nostro caso la grandezza da studiare è la quantità di colore di ogni pixel ed il segnale è bidimensionale discreto, ma soprattutto la nostra variabile non è il tempo ma lo spazio: siamo infatti interessati alle variazioni spaziali dei livelli di grigio. Un sistema è invece un dispositivo che, dato un segnale in ingresso lo elabora e ne fornisce il risultato in uscita. In genere è una modellazione matematica di un fenomeno fisico. I sistemi vengono descritti, ad esempio, tramite la loro risposta impulsiva, cioè indicando il modo in cui rispondono all'impulso di Dirac in ingresso. Sapendo la risposta impulsiva di un sistema e conoscendo l'espressione del segnale in ingresso, l'uscita del sistema può essere calcolata tramite l'operazione di convoluzione. Essa può essere definita in sostanza come un'operazione tra due funzioni che genera una terza funzione vista come la versione modificata di una delle due di partenza.

Si considerino due funzioni $u(t)$ e $h(t)$ definite nei reali. Si definisce convoluzione continua di $u(t)$ e $h(t)$ la funzione definita nel seguente modo:

$$v(t) = u(t) * h(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} u(t)h(t - \tau) = \int_{-\infty}^{+\infty} u(t - \tau)h(t)$$

Si definisce invece convoluzione discreta di $u(t)$ e $h(t)$ la funzione:

$$v(t) = u(t) * h(t) = \sum_{-\infty}^{+\infty} u(t)h(t - \tau) = \sum_{-\infty}^{+\infty} u(t - \tau)h(t)$$

Operando con un segnale discreto e bidimensionale, l'immagine in uscita viene calcolata con la seguente operazione:

$$v(x, y) = u(x, y) * h(x, y) = \sum_{m=0}^{M-1} \sum_{n=0}^{N-1} u(m, n)h(x - m, y - n)$$

dove M e N sono rispettivamente larghezza e altezza dell'immagine.

Il sistema nel nostro caso è il filtro che vogliamo applicare. Il filtro è un sistema che viene utilizzato solitamente per selezionare le frequenze a cui siamo interessati. In un'immagine la frequenza è data dal numero di variazioni di colore per unità spaziale. Come possiamo immaginare, sia il segnale che il sistema sono in realtà delle matrici bidimensionali, quindi l'operazione che stiamo per eseguire è una convoluzione fra matrici. La matrice che identifica il sistema è detta matrice o maschera di convoluzione o kernel. La convoluzione fra matrici mira a calcolare il nuovo valore di ogni pixel sovrapponendo ad ognuno di essi la matrice kernel (con il centro sul punto in questione) ed eseguendo la sommatoria dei prodotti fra ogni pixel ed il corrispettivo elemento nella matrice di convoluzione. Il principio di funzionamento dell'operazione di convoluzione è di seguito meglio illustrato. Consideriamo la matrice A che rappresenta la matrice contenente i valori di grigio di tutti i pixel dell'immagine originale e la matrice B che rappresenta la matrice kernel. Sovrapponiamo la matrice B alla matrice A in modo che il centro della matrice B sia in corrispondenza del pixel della matrice A da elaborare. Il valore di ciascun pixel della matrice A oggetto di elaborazione viene ricalcolato come la somma dei prodotti di ciascun elemento della matrice kernel con il corrispondente pixel della matrice A sottostante. Possiamo definire quello della convoluzione come un algoritmo spaziale, destinato cioè a lavorare su più pixel contemporaneamente seguendo una precisa relazione geometrica.

2.2.2 I principali filtri convolutivi

I filtri che si possono ottenere con le matrici di convoluzione sono innumerevoli, ma i più utilizzati possono essere classificati fra le cinque seguenti categorie:

- Filtri di Edge Detection
- Filtri di Rilievo / Basso Rilievo
- Filtri di Sharpening
- Filtri di Blurring / Smoothing
- Filtri di Shifting

FILTRI DI EDGE DETECTION

I filtri di Edge Detection vengono utilizzati per il rilevamento dei bordi. Possono essere ottenuti con diversi operatori matematici e conseguentemente diverse maschere. La maggior parte di essi però si basa sullo studio della derivata della funzione intensità dell'immagine e quindi fa uso dell'operatore gradiente che è definito come:

$$\nabla f(x, y) = \left(\frac{\partial f(x, y)}{\partial x}, \frac{\partial f(x, y)}{\partial y} \right)$$

Gli operatori più conosciuti e usati sono: Roberts, Prewitt, Sobel, Kirsch e Laplaciano.

L'operatore crociato di Roberts si basa sul gradiente e l'approssimazione applicata è la seguente:

$$f_x(i, j) = f(i, j) - f(i + 1, j + 1)$$
$$f_y(i, j) = f(i + 1, j) - f(i, j + 1)$$

Da cui si ricavano le matrici:

$$\begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \\ 0 & -1 & 0 \end{bmatrix}$$

Matrice di Roberts orizzontale

$$\begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{bmatrix}$$

Matrice di Roberts verticale

Le matrici individuate dalla precedente approssimazione agiscono lungo le diagonali. Tale operatore presenta però un difetto: il valore finale di ogni pixel è calcolato su un basso numero di pixel vicini offrendo dunque un'accuratezza minore ed un'elevata sensibilità al rumore. Infatti le matrici proposte da Roberts sono in fin dei conti delle matrici 2x2 e per aumentare la precisione nel rilevamento dei bordi basterebbe aumentare il numero di elementi coinvolti nello studio della derivata. Prewitt fa proprio questo, proponendo un metodo di approssimazione del gradiente diverso da quello di Roberts e definito da differenze simmetriche:

$$f_x(i, j) = \frac{1}{2} [f(i, j) - f(i + 1, j + 1)]$$
$$f_y(i, j) = \frac{1}{2} [f(i + 1, j) - f(i, j + 1)]$$

Dalle precedenti formule ricaviamo le due matrici di convoluzione direzionali che hanno effetto rispettivamente sui bordi orizzontali e su quelli verticali.

$$\begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -1 & 0 & 1 \\ -1 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

$$\begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 0 & 0 & 0 \\ -1 & -1 & -1 \end{bmatrix}$$

Da una qualunque di queste due matrici possiamo ottenere le altre possibili tramite operazioni di rotazione di 90°; ogni matrice e' sensibile ad un'orientazione degli assi fino a 45°. Invertendo le direzioni di crescita dei due gradienti otteniamo:

$$\begin{bmatrix} 1 & 0 & -1 \\ 1 & 0 & -1 \\ 1 & 0 & -1 \end{bmatrix} \qquad \begin{bmatrix} -1 & -1 & -1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 1 \end{bmatrix}$$

Alle maschere di Prewitt per il rilevamento dei bordi orizzontali e verticali si aggiungono le maschere che operano con direzioni del gradiente di 45°, 135°, 225°, 315°.

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

Le maschere di Prewitt hanno somma nulla su ogni asse e producono immagini molto scure, questo dipende dal fatto che la somma dei coefficienti e' minore di 1 e ciò altera il livello di luminosità verso il basso. Si può notare che l'applicazione del filtro di Prewitt e' limitata a 8 possibili orientazioni, tuttavia nella realtà, considerando orientazioni più simili a quella reale non si noterebbero grosse differenze. L'operatore di edge detection appena analizzato non viene applicato soltanto a maschere 3x3, ma può essere applicato anche a maschere 5x5. Il loro utilizzo è anzi incoraggiato per aumentare l'accuratezza del risultato.

Un altro possibile operatore è quello di Sobel che opera in maniera analoga al filtro di Prewitt, ma con una importante differenza: effettua una media locale direzionale pesata in funzione della distanza, cioè ai pixel più vicini a quello di applicazione viene attribuito un peso maggiore. In Prewitt questo coefficienti ha peso 1 mentre con Sobel ha peso 2. Le matrici da applicare risultano quindi:

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

Anche con Sobel e' possibile applicare maschere diagonali:

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

I bordi delle immagini ottenute dopo l'applicazione del filtro di Sobel sono nettamente più nitidi.

L'operatore di Kirsch, meno conosciuto rispetto ai precedenti, non calcola esplicitamente il gradiente, ma le derivate prime in direzioni specifiche e approssimando quella con il risultato maggiore si ottiene l'orientazione del gradiente. L'approssimazione proposta da Kirsch e' esprimibile come: $G(j,k) = \text{Max}_{i=0}^7 [|5S_i - 3T_i|]$

dove $S_i = A_i + A_{i+1} + A_{i+2}$ e $T_i = A_i + A_{i+1} + A_{i+2} + A_{i+3} + A_{i+4} + A_{i+5}$
 Ogni elemento A_i è un elemento del vicinato dell'immagine. L'argomento del massimo porta ad ottenere le seguenti matrici:

$$\begin{bmatrix} -3 & -3 & -3 \\ -3 & 0 & -3 \\ 5 & 5 & 5 \end{bmatrix} \quad \begin{bmatrix} 5 & 5 & 5 \\ -3 & 0 & -3 \\ -3 & -3 & -3 \end{bmatrix} \quad \begin{bmatrix} -3 & -3 & 5 \\ -3 & 0 & 5 \\ -3 & -3 & 5 \end{bmatrix} \quad \begin{bmatrix} 5 & -3 & -3 \\ 5 & 0 & -3 \\ 5 & -3 & -3 \end{bmatrix}$$

$$\begin{bmatrix} -3 & -3 & -3 \\ -3 & 0 & 5 \\ -3 & 5 & 5 \end{bmatrix} \quad \begin{bmatrix} -3 & 5 & 5 \\ -3 & 0 & 5 \\ -3 & -3 & -3 \end{bmatrix} \quad \begin{bmatrix} -3 & -3 & -3 \\ 5 & 0 & -3 \\ 5 & 5 & -3 \end{bmatrix} \quad \begin{bmatrix} 5 & 5 & -3 \\ 5 & 0 & -3 \\ -3 & -3 & -3 \end{bmatrix}$$

Il filtro di Kirsch è superiore a quello di Sobel e conseguentemente a quello di Prewit e di Roberts per il rilevamento dei contorni: aumenta la quantità di bordi rilevati, ma con essi anche il rumore catturato.

I filtri analizzati fino a questo momento hanno due caratteristiche:

- sono direzionali e per questo non invarianti, questo vuol dire che la loro applicazione su un'immagine avrà effetti diversi a seconda di come l'immagine viene ruotata;
- hanno somma dei coefficienti pari a 0, e questo è il motivo del loro aspetto prevalentemente nero.

Il filtro che vedremo ora è invece invariante e questo significa che l'effetto prodotto dalla sua applicazione è lo stesso qualunque rotazione venga effettuata sull'immagine. Ciò dipende dalla simmetria della matrice. Si tratta del filtro che fa uso del Laplaciano, operatore definito da:

$$\nabla^2 f(x, y) = \frac{\partial^2 f(x, y)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 f(x, y)}{\partial y^2}$$

Un'approssimazione molto utilizzata è la seguente:

$$a(i, j + 1) + a(i, j - 1) + a(i + 1, j) + a(i - 1, j) - 4a(i, j)$$

la cui matrice associata è

$$\begin{bmatrix} 0 & 1 & 0 \\ 1 & -4 & 1 \\ 0 & 1 & 0 \end{bmatrix}$$

Il Laplaciano agisce in ogni direzione allo stesso modo.

FILTRI DI RILIEVO / BASSORILIEVO

Gli effetti di rilievo e bassorilievo si ottengono con la sovrapposizione di matrici di rilevamento dei contorni ad una matrice kernel neutra.

FILTRI DI BLURRING / SMOOTHING

I filtri di Blurring / Smoothing consentono di sfuocare un'immagine. Applicare un tale filtro consiste nell'utilizzare un filtro passa-basso che tagli le alte frequenze spaziali di variazione del colore. I filtri passa-basso vengono anche spesso usati anche per la riduzione del rumore ma si rilevano poco efficaci nel caso del rumore bianco o di rumore sale e pepe. Esistono comunque vari metodi per sfocare un'immagine. Il più intuitivo è dato dal filtro N-Box. Esso viene realizzato calcolando una media del valore di tutti i pixel nel vicinato del punto di applicazione e volendo anche il pixel centrale. A questo corrisponde il seguente procedimento:

$$g(x, y) = \frac{1}{MN} \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N f(x_i, y_j)$$

da cui ricaviamo la seguente matrice: $\begin{bmatrix} 1/9 & 1/9 & 1/9 \\ 1/9 & 1/9 & 1/9 \\ 1/9 & 1/9 & 1/9 \end{bmatrix}$

E' ovvio che maggiore è il numero di pixel, maggiore sarà la sfocatura.

Più elaborato del filtro N-Box è il filtro Gaussiano che sfrutta la funzione gaussiana definita da:

$$g(x, y) = c * e^{-\frac{x^2+y^2}{2\sigma^2}}$$

dove $\sigma > 0$ è una variabile che regola l'area di azione della funzione e c è un coefficiente che solitamente si trova posto a 1. La funzione gaussiana assegna un peso tanto maggiore quanto più il pixel è vicino all'origine. Un esempio è il seguente:

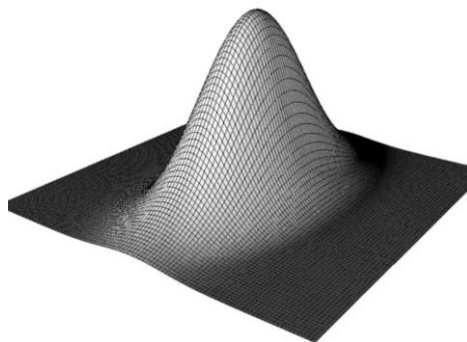


Figura 2.1: Esempio di funzione gaussiana bidimensionale

Aumentare c aumenta il tasso di sfocatura mentre incrementare σ vuol dire aumentare la larghezza della campana e di conseguenza aumentare il peso dato ai pixel circostanti. Possiamo concludere dicendo che il filtro gaussiano permette innanzitutto di avere una serie di anelli sui quali i pixel assumeranno valori via via più bassi man mano che ci si sposta verso l'esterno e quindi di dare un peso maggiore ai pixel più vicini a quello di

applicazione, ma il filtro gaussiano permette anche di specificare in che modo distribuire i pesi.

FILTRI DI SHIFTING

I filtri di shifting sono i più semplici ed intuitivi. Come dice il termine servono a shiftare, spostare dunque l'immagine. Generalmente ha quest'aspetto:

$$\begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

FILTRI DI SHARPENING

Lo sharpening è l'operazione che ci consente di migliorare la qualità dell'immagine. Quest'operazione, anche detta edge crispensing, agisce come un filtro passa-alto che fa passare soltanto le alte frequenze spaziali di variazione del colore. Abbiamo a disposizione vari metodi tra cui:

- Unsharp masking
- Laplaciano
- Laplaciano di Gaussiana

Da quanto appreso in segnali e sistemi sappiamo che lo stesso risultato di un filtro passa - alto si può ottenere sottraendo all'immagine originale, opportunamente amplificata, una sua versione filtrata con un filtro passa – basso.

In generale la tecnica di “Unsharp Masking” si può esprimere con:

$$g(x, y) = a * f(x, y) - b * f_L(x, y)$$

dove f_L indica una versione sfocata dell'immagine tramite un qualsiasi filtro passa-basso mentre a e b sono due pesi che possono essere attribuiti all'immagine, essi sono arbitrari e la loro scelta va effettuata valutando l'effetto che si vuole ottenere.

Lo Sharpening con Laplaciano sfrutta invece la derivata seconda per rendere l'andamento dei contorni più simile a quello ideale e diverso da quello reale. L'applicazione di questo filtro non elimina il rumore anzi, alcune volte lo accentua.

Avendo visto in che cosa consistono la Gaussiana e il Laplaciano, possiamo ora introdurre il cosiddetto Laplaciano di Gaussiana (LoG), filtro che fa uso del Laplaciano applicato alla gaussiana della funzione:

$$g(x, y) = \nabla^2\{h(x, y) * f(x, y)\}$$

La sua azione consiste nell'evidenziare le regioni dell'immagine caratterizzate da rapidi cambi di intensità e quindi viene spesso utilizzato per evidenziare i contorni. La convoluzione del Laplaciano per l'operatore gaussiano può essere calcolato analiticamente (calcolando la derivata seconda della distribuzione di Gauss):

$$LoG(x, y) = -\frac{1}{\pi\sigma^4} \left[1 - \frac{x^2 + y^2}{2\sigma^2} \right] e^{-\frac{x^2+y^2}{2\sigma^2}}$$

Trattandosi di un filtro passa-alto attenua il rumore ma contemporaneamente accentua le alte frequenze, per la presenza del laplaciano, migliorando i bordi.

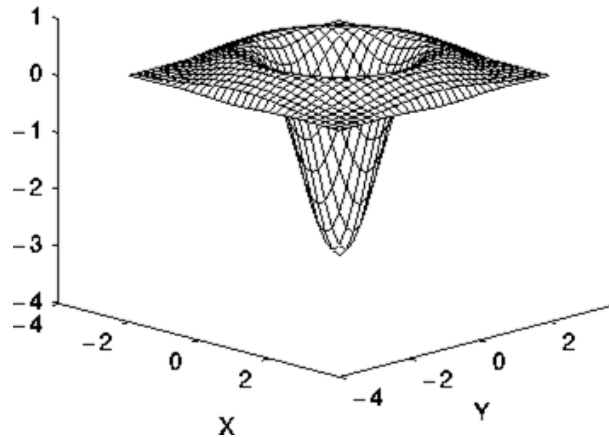


Figura 2.2: Grafico di un Laplaciano di Gaussiana

2.2.3 I filtri non convolutivi

I filtri convolutivi sono speciali filtri “locali” o “di intorno” che sfruttano le informazioni in un vicinato del pixel per calcolare la propria risposta. Sebbene questi tipi di filtri permettano di realizzare un numero quasi infinito di effetti, non sono gli unici che esistono. Un esempio è dato dai filtri non lineari, come ad esempio quelli usati per ottenere effetti quali erosione, dilatazione, noise clearing, etc. Nonostante si basino su maschere, il procedimento adoperato è ben diverso da quello utilizzato nella convoluzione spaziale. Un esempio fra tutti è il filtro mediano. Esso è efficiente per ottenere l’eliminazione del rumore puntiforme ad altissime frequenze, come il rumore sale e pepe che si manifesta nel momento in cui una buona dose di pixel è saturata e l’altra è assente. Il filtro mediano ordina i valori dei pixel in una finestra, li ordina in maniera crescente e prende quello posizionato in mezzo. Ad ogni pixel verrà poi sostituito quel valore. Si perdono così le informazioni spaziali. Ogni pixel potrà avere valori molto diversi da quello di partenza e questo consente di eliminare i bad pixel anche detti spike. Il filtro può essere usato più volte per eliminare eventuali residui. Al contrario della media che crea nuove gradazioni di colore attenuando in maniera discriminata tutte le frequenze spaziali e causando di conseguenza sfocature e perdite di dettagli, il filtro mediano non deteriora l’immagine ma elimina semplicemente i picchi. Anche il filtro di erosione rientra tra i filtri non convolutivi ma anziché calcolare la media dei valori di un vicinato, calcola il massimo fra di essi. Al contrario il filtro di dilatazione calcola il minimo fra tutti i valori.

2.3 I filtri utilizzati dall'algoritmo

In figura 2.3 è riportato un esempio della struttura a mosaico di un endotelio corneale patologico. Le cellule che lo compongono hanno forme e dimensioni assai differenti tra loro. Questo avviene a causa di modificazioni chimico-fisiche e strutturali che alterano le sue proprietà morfologiche e fisiologiche. La dimensione delle cellule non è più prevalentemente esagonale ma spiccano numerose cellule con altre estensioni. Inoltre le loro dimensioni non sono più omogenee tra loro ma questo è inevitabile poiché la morte di alcune di esse comporta l'espansione di quelle adiacenti.

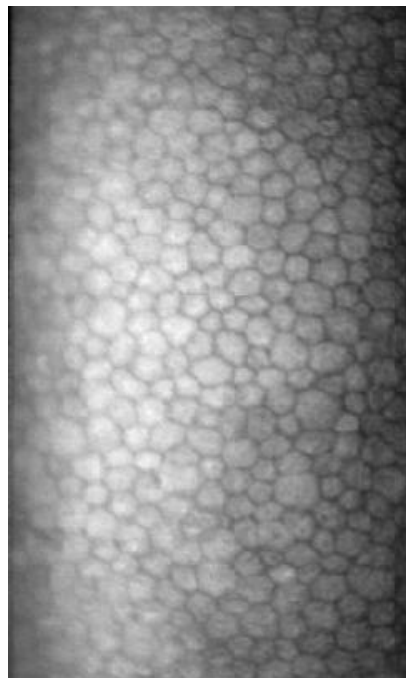


Figura 2.3: Mosaico endoteliale corneale acquisito mediante microscopio speculare Topcon SP-3000P

Di seguito verranno analizzati brevemente i filtri costruiti appositamente per il progetto e utilizzati sull'immagine acquisita tramite microscopia. In sostanza si otterranno tre nuove immagini con raffigurati i lati delle cellule, il loro corpo cellulare e le triforcazioni che costituiscono assieme il mosaico endoteliale completo.

2.3.1 Riconoscimento dei corpi cellulari

I corpi cellulari altro non sono che quella parte di cellula che non è definita come bordo o membrana. Per la loro identificazione non è stato necessario costruire un filtro apposito ma è stato utilizzato uno dei filtri speciali descritti precedentemente, il filtro Laplacian of Gaussian (LoG). Dato che la sua azione consiste nell'individuare regioni dove avvengono

rapidi cambi di intensità, si capisce il motivo della sua scelta per questo particolare aspetto: il passaggio dal bordo della cellula alla sua porzione interna è caratterizzato infatti da una rapida alterazione di livelli di grigio. Modificando poi la larghezza della campana della curva è possibile variare il peso dato ai pixel circostanti al pixel di applicazione, che ha peso maggiore rispetto agli altri intorno.

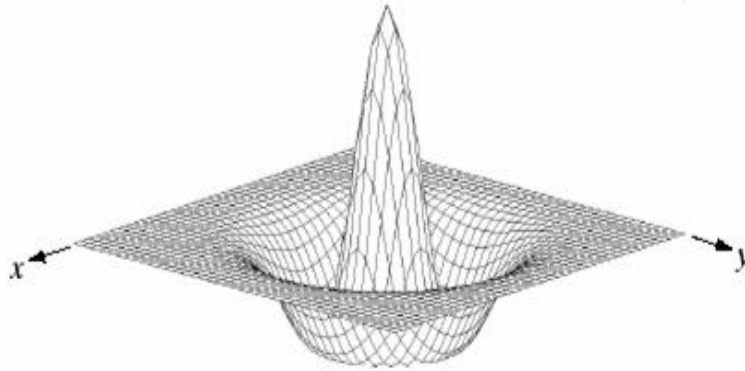


Figura 2.4: *Laplaciano di Gaussiana (LoG)*

La figura 2.5 rappresenta un particolare del risultato della convoluzione tra il filtro appena descritto e l'immagine originale di endotelio. L'immagine ricavata ha comunque la stessa dimensione dell'immagine originale.

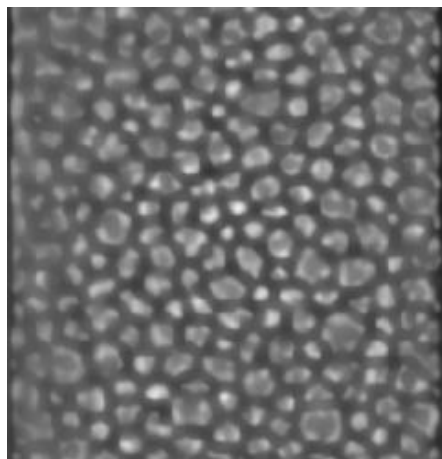


Figura 2.5: *Corpi cellulari dell'endotelio corneale dopo l'operazione di filtraggio*

2.3.2 Riconoscimento dei contorni cellulari

L'identificazione dei contorni delle cellule nell'immagine è un passo fondamentale per la determinazione dei parametri necessari per un'analisi accurata del pattern endoteliale. Attualmente il contorno viene determinato in modo manuale o semi-automatico. Anche se

L'operatore potrebbe essere in grado di riconoscere abbastanza facilmente le cellule sfruttando anche informazioni sulla loro forma e dimensione, tali tecniche diventano impraticabili quando si ha a che fare con un numero elevato di cellule e le immagini da analizzare sono molte: sarebbe richiesto un notevole dispendio di tempo. Inoltre questi metodi forniscono risultati soggettivi e per questo non del tutto affidabili. L'algoritmo è stato sviluppato appunto per cercare di ricavare in maniera del tutto automatica i parametri di interesse limitando così il più possibile gli errori umani e il tempo necessario alla diagnosi.

Per individuare i bordi sono state utilizzate 12 matrici quadrate di dimensione 9x9, dimensione che può essere variata dall'operatore. Queste matrici sono costituite dai numeri binari 0 e 1 e la posizione degli 1 cambia ogni volta in base all'operatore di linea che si voglia rappresentare. Alcuni esempi di matrici sono qui di seguito riportate (considerando che siano matrici 5x5 per motivi di spazio). La prima serve per individuare le linee orizzontali mentre la seconda le linee oblique inclinate di 45°.

$$\begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \qquad \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

Il numero delle matrici altro non rappresenta che il numero di rotazioni da far effettuare alla linea; si tratta di rotazioni di $\frac{\pi}{12}$.

In dettaglio la matrici costruite sono queste sotto riportate.



Figura 2.6: Matrici per la convoluzione nel filtraggio dei contorni cellulari

La prima è per l'individuazione dei lati orizzontali e corrisponde al primo esempio di matrice fatto precedentemente. Procedendo verso destra troviamo il riferimento di 15°,30° e 45°; nella seconda riga di 60°,75°,90° e 105° mentre l'ultima riguarda linee ruotate di 120°,135°,150° e 175°.

Successivamente queste matrici vengono convolute con l'immagine di partenza ed il risultato che si ottiene è quello raffigurato nella figura 2.7.

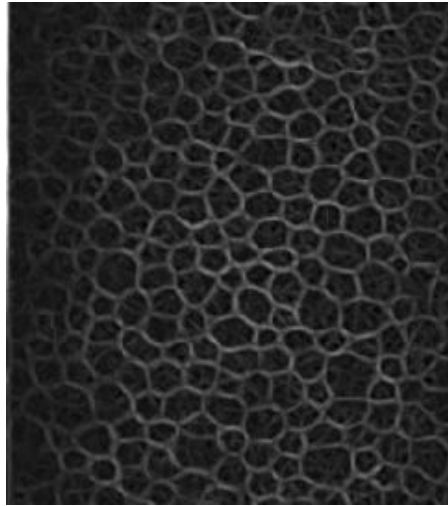


Figura 2.7: Contorni cellulari dell'endotelio corneale dopo l'operazione di filtraggio

2.3.3 Riconoscimento delle triforcazioni cellulari

Una triforcazione può essere definita semplicemente come l'incontro di tre linee in un unico punto. Per la loro individuazione all'interno dell'immagine dell'endotelio sono state utilizzate 4 gaussiane unite tra di loro che vanno a studiare pixel per pixel la figura originale. Generalmente una funzione gaussiana in due dimensioni ha la seguente formula:

$$f(x, y) = c * e^{-\frac{(x-x_c)^2}{2\sigma_x^2} - \frac{(y-y_c)^2}{2\sigma_y^2}}$$

dove c è un coefficiente quasi sempre pari a 1, x_c e y_c sono le coordinate del punto di applicazione della curva mentre σ_x e σ_y sono variabili che regolano l'area di azione.

La gaussiana principale $g(x_0, y_0)$ è quella centrata nell'origine, per cui i valori di x_c e y_c sono pari a 0. Le altre tre funzioni $n(x_i, y_i)$ con $i = 1,2,3$ sono il risultato di tre gaussiane sommate tra loro che vanno a formare i tre rami che partono dalla gaussiana principale e terminano ad una distanza pari a $\sqrt{\sigma}$. Le quattro curve sono state poi unite assieme

mediante la formula $2 * g(x_0, y_0) - n(x_i, y_i)$ con $i = 1, 2, 3$ in modo tale da ottenere la seguente curva finale:

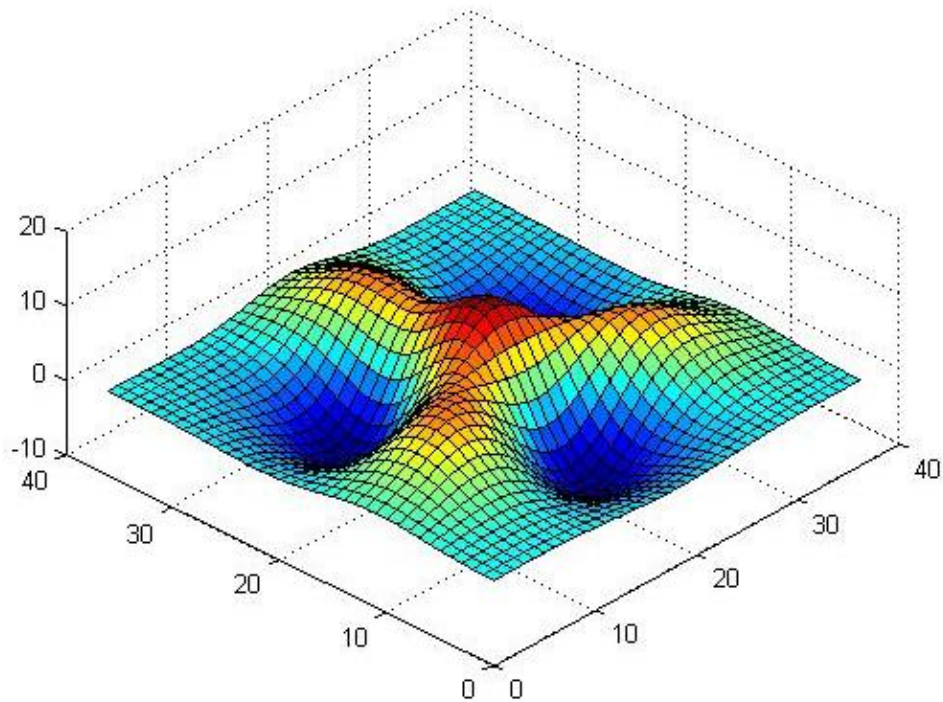


Figura 2.8: *Filtro finale per l'individuazione delle triforcazioni*

Alla gaussiana centrale, che ha un'altezza doppia rispetto a quella iniziale per definire meglio il picco, sono state tolte le altre tre funzioni in modo tale da formare lungo le bisettrici tra un ramo e l'altro tre valli. L'immagine risultante è la figura 2.9.

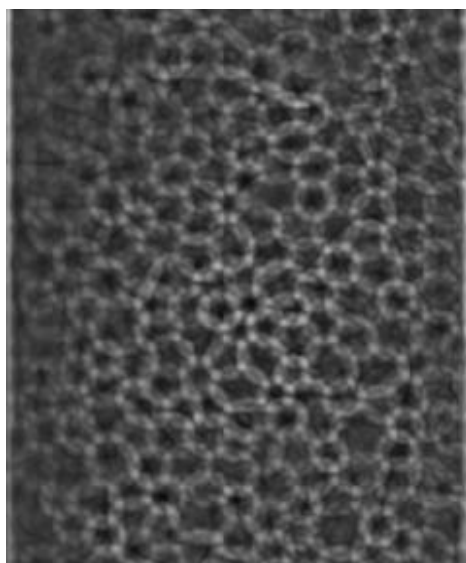


Figura 2.9: *Triforcazioni dell'endotelio corneale dopo l'operazione di filtraggio*

Capitolo 3

Analisi della curva R.O.C.

Dopo aver applicato ad ogni immagine a disposizione i tre filtri sopra descritti si può procedere analizzando le varie risposte ottenute con l'analisi R.O.C. (acronimo dei termini inglesi *Receiver Operating Characteristic*).

Tale tecnica trae origine nell'ambito della rilevazione del segnale. Si tratta di una metodologia che è stata utilizzata per la prima volta da alcuni ingegneri elettrici durante la seconda guerra mondiale, per l'analisi delle immagini radar e lo studio del rapporto segnale/disturbo. Il problema era quello di riconoscere il segnale causato dalla presenza di oggetti nemici su campi di battaglia, distinguendolo dal rumore di fondo presenti nei segnali radar. Più tardi, tra il 1970 e il 1980, diventò evidente l'importanza dell'utilizzo di questa tecnica nella valutazione dei test diagnostici, in campi quali la radiologia, cardiologia, chimica clinica ed epidemiologia. La curva R.O.C. trovò quindi un ampio raggio di applicazioni in campo medico, inizialmente allo scopo di qualificare l'attendibilità dei responsi di immagini radiografiche interpretate da operatori diversi. Ultimamente l'utilizzo delle curve R.O.C. si è fatto relativamente comune per la valutazione non solo delle immagini, ma anche dei più svariati test sia nel settore medico che, in minor misura, in quello veterinario. L'uso così estensivo di questa tecnica può essere spiegato grazie alla sua relativa semplicità di costruzione e per la sua facile applicazione come tecnica di valutazione della bontà dei test.

3.1 Curva R.O.C.

I test utilizzati in campi come l'epidemiologia e la medicina clinica forniscono responsi che possono essere classificati in due categorie. Alla prima appartengono i test "*qualitativi*" in quanto restituiscono un output dicotomico (positivo/negativo, vero/falso) mentre la seconda comprende i test di tipo "*quantitativo*", ossia che producono risultati sotto forma di variabili numeriche discrete o continue. Per quest'ultimi occorre inoltre individuare un valore soglia (cut-off) che discrimini i risultati da dichiarare "positivi" da quelli "negativi", cioè quel valore assunto dalla variabile misurata nel test al di sopra del quale il soggetto viene dichiarato positivo e al di sotto del quale viene definito negativo.

3.2 Parametri di una curva R.O.C.

3.2.1 Il valore di cut-off

Prendendo come esempio un test medico in realtà accade che, quando si sottopone un campione ad una procedura diagnostica, per un determinato valore di cut-off, non tutti i soggetti malati risulteranno positivi al test, così come non tutti i soggetti sani risulteranno negativi. Questo genera incertezza nell'interpretazione del test perché, nella maggioranza dei casi, esiste una zona di sovrapposizione dei risultati del test applicato a pazienti sani e a pazienti malati. In particolare si possono ottenere queste tre situazioni:

1. il test ideale dovrebbe consentire di discriminare completamente tra pazienti sani e malati come mostrato nella Figura 3.1. In questo caso è immediato individuare sull'asse delle ascisse il valore di cut-off che permette di discriminare, in questo caso e solo in questo con precisione assoluta, tra pazienti sani e pazienti malati;

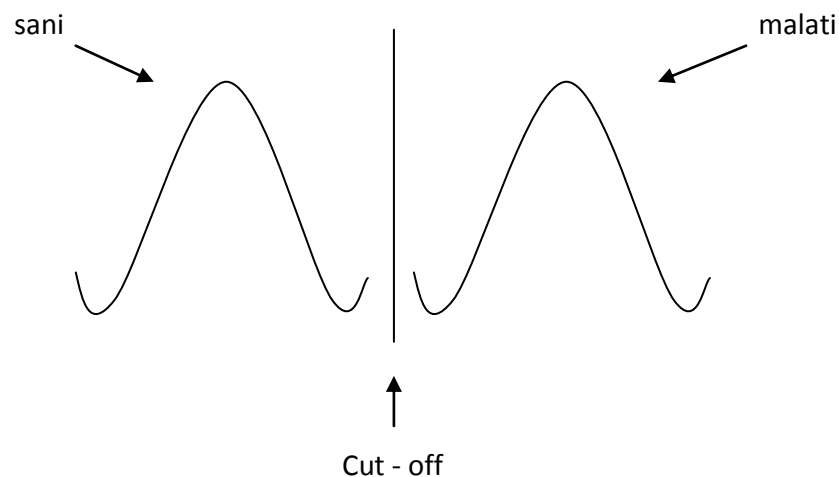


Figura 3.1: *Cut-off ideale che separa pazienti sani da pazienti malati*

2. il caso opposto è quando i risultati non si possono interpretare e non si riesce ad attribuire il paziente al gruppo dei sani o al gruppo dei malati. Si dice che il test non ha potere diagnostico (o di classificazione);
3. nella pratica si verifica sempre una sovrapposizione più o meno ampia delle due distribuzioni, come mostrato nella Figura 3.2. Si avrà sempre un certo numero di soggetti sani che risulteranno positivi al test ed un certo numero di soggetti malati che erroneamente verranno classificati come sani. Dunque nella realtà è

impossibile individuare sull'asse delle ascisse un valore di cut-off che consenta una classificazione perfetta, ossia da azzerare i falsi positivi e i falsi negativi.

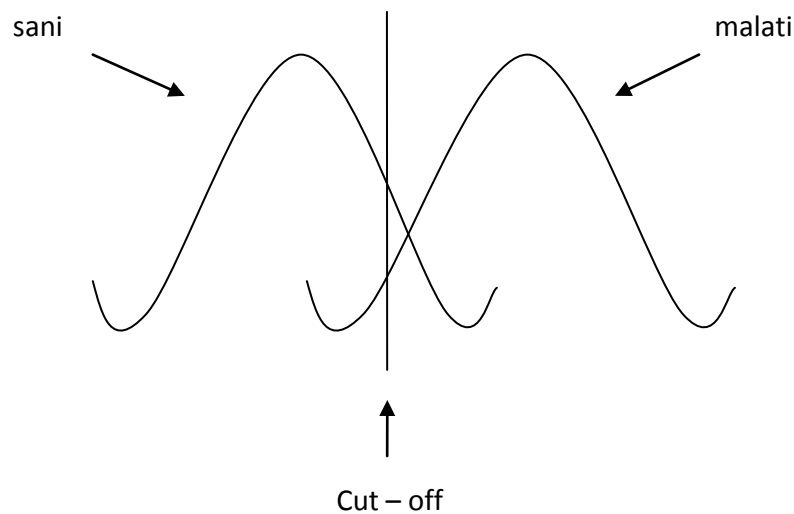


Figura 3.2: Cut-off reale che separa pazienti sani da pazienti malati

3.2.2 Veri Positivi, Veri Negativi, Falsi Positivi e Falsi Negativi

Consideriamo un problema di predizione a 2 classi (classificatore binario). L'insieme dei dati da classificare è suddiviso in due classi che possiamo indicare convenzionalmente in positivi "P" e negativi "N". Gli esiti predetti dal classificatore binario li indicheremo invece con positivi "p" e negativi "n" rispettivamente.

Sono possibili quattro risultati a seconda della posizione del valore di cut-off:

- se il risultato della predizione è positivo e il valore vero è anch'esso positivo, si parla di *Vero Positivo* (TP);
- se invece il valore vero è negativo mentre quello predetto è positivo si tratta di un *Falso Positivo* (FP);
- contrariamente, un *Vero Negativo* (TN) si verifica quando entrambi, il risultato e il valore vero, sono negativi;
- un *Falso Negativo* (FN) invece è quando il risultato è negativo e il valore vero è positivo.

È possibile rappresentare questo tipo di situazione anche andando a utilizzare una tabella di contingenza di tipo 2x2. Un risultato qualitativo del test potrebbe essere quello di

andare a valutare il numero di falsi positivi e negativi, meno ve ne saranno e tanto il test sarà maggiormente valido.

		valori veri		totale
		<i>P</i>	<i>N</i>	
valori predetti	<i>p</i>	Vero Positivo	Falso Positivo	TP
	<i>n</i>	Falso Negativo	Vero Negativo	FP
totale		FN	TN	

Figura 3.3: Tabella di contingenza

I numeri sulla diagonale della matrice di contingenza rappresentano le unità statistiche correttamente classificate, gli altri sono gli errori.

3.2.3 Sensibilità, specificità e accuratezza

Il confronto fra il risultato dell'esame e l'effettivo valore vero permette di stimare due importanti parametri: la *sensibilità* e la *specificità*. La sensibilità, o i Veri Positivi (TP), misura la proporzione di positivi classificati correttamente mentre la specificità, o i Veri Negativi (TN), misura la percentuale di negativi correttamente classificati. In formule possono essere espresse nel modo seguente:

$$\text{Sensibilità} = Se = \frac{TP}{(TP+TN)}$$

$$\text{Specificità} = Sp = \frac{TN}{(TN+TP)}$$

La sensibilità è condizionata negativamente dalla quota di falsi negativi, pertanto un test molto sensibile dovrà associarsi ad una quota molto bassa di falsi negativi. La specificità è invece influenzata dalla quota di falsi positivi, ovvero un test sarà tanto più specifico quanto più bassa risulterà la quota di falsi positivi. Sensibilità e specificità sono fra loro inversamente correlate in rapporto alla scelta del valore di cut-off. Infatti, modificando quest'ultimo si può ottenere uno dei seguenti effetti: aumento della sensibilità e diminuzione della specificità oppure diminuzione della sensibilità ed aumento della specificità.

Un altro importante parametro da considerare è l'*accuratezza* per la valutazione di un test. Con tale termine si intende la capacità di un esame di fornire valori corrispondenti a quelli veri. Innanzitutto occorre disporre di un esame di riferimento a "gold standard" che fornisca appunto i valori veri. L'accuratezza del test è definita come:

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

3.3 Il principio di base delle curve R.O.C.

Le curve R.O.C. permettono di analizzare la correlazione tra sensibilità e specificità per una gamma di differenti valori di cut-off, cioè di un valore soglia. La relazione tra questi due parametri può venire raffigurata attraverso una linea che si ottiene riportando, in un sistema di assi cartesiani e per ogni possibile valore di cut-off, la proporzione di Veri Positivi (sensibilità) in ordinata e la proporzione di Falsi Negativi (1-specificità) in ascissa.

L'unione dei punti ottenuti riportando nel piano cartesiano ciascuna coppia (Se) e (1-Sp), per ogni valore di soglia, genera una curva spezzata con andamento a scaletta (Figura 3.4). Per interpolazione, è possibile eliminare la scalettatura (smoothing) ed ottenere una curva (R.O.C. curve) che rappresenta una stima basata sui parametri del data set sperimentale. Ciò che si ottiene è raffigurato in Figura 3.5.

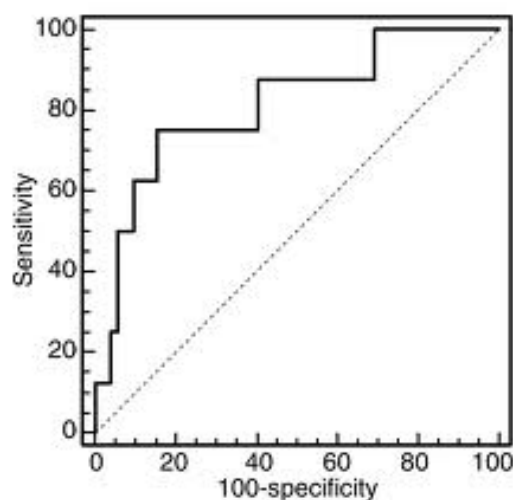


Figura 3.4: Curva spezzata prima dello "smoothing" (R.O.C. plot)

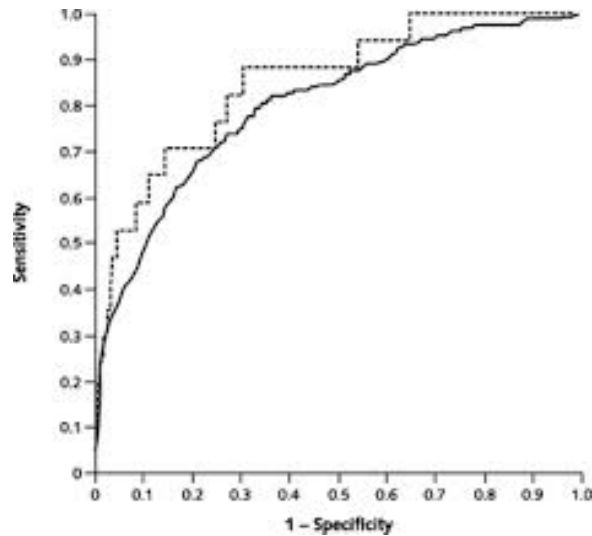


Figura 3.5: Curva R.O.C prima e dopo interpolazione (“smoothing”)

3.4 L’area sottesa di una curva R.O.C.

I test che si effettuano attraverso l’analisi delle curve R.O.C. hanno la capacità di discernere, ad esempio, tra un insieme di popolazione sana e malata, andando ad analizzare l’area sottesa dalla curva ROC (Area Under Curve, AUC). Ciò equivale alla probabilità che il risultato del test effettuato su un individuo estratto a caso dal gruppo dei malati sia superiore a quello estratto a caso dal gruppo dei sani.

Solitamente si ha che le curve R.O.C. passano per i punti (0,0) e (1,1), avendo inoltre due condizioni che rappresentano due curve limite:

- nel caso di un test perfetto, ossia che non restituisce alcun falso positivo né falso negativo (capacità discriminante = 100%), la AUC passa attraverso le coordinate {0;1} ed il suo valore corrisponde all’area dell’intero quadrato delimitato dai punti di coordinate (0,0), (0,1), (1,0) (1,1), che assume valore 1 corrispondendo ad una probabilità del 100% di una corretta classificazione.
- la R.O.C. per un test assolutamente privo di valore informativo è rappresentata dalla diagonale (“chance line”) che passa per l’origine, con AUC=0.5.

Nella figura 3.6 si possono osservare questi due casi. A destra abbiamo un test perfetto mentre a sinistra un test completamente inutile perché privo di alcuna informazione.

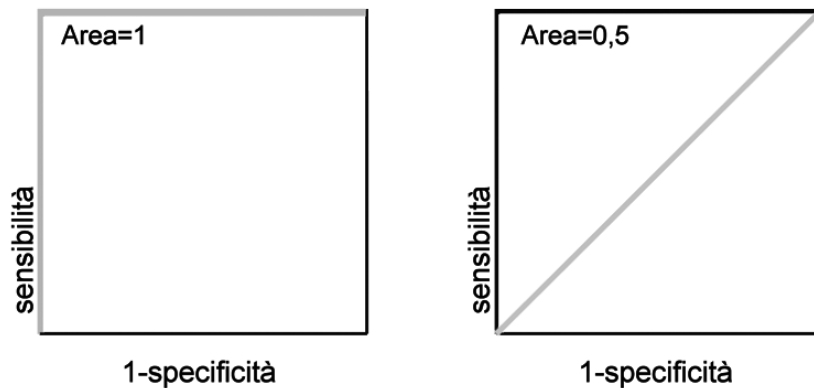


Figura 3.6: Le due curve limite, a destra un test perfettamente discriminante e a sinistra un test completamente inutile.

In una curva R.O.C. esistono in genere due segmenti di scarsa o nulla importanza ai fini della valutazione dell'attitudine discriminante del test in esame. Essi sono rappresentati dalle frazioni di curva sovrapposte rispettivamente all'asse delle ascisse ed all'asse delle ordinate. Infatti, i corrispondenti valori possono essere scartati in quanto esistono altri valori di cut-off che forniscono una migliore specificità senza perdita di sensibilità o, viceversa, una migliore sensibilità senza perdita di specificità. Si può affermare che il punto sulla curva ROC più vicino all'angolo superiore sinistro rappresenta il miglior compromesso fra sensibilità e specificità.

L'area sottesa ad una curva R.O.C. rappresenta un parametro fondamentale per la valutazione della performance di un test, in quanto costituisce una misura di accuratezza non dipendente dalla prevalenza ("pure accuracy"). Solitamente il suo valore è compreso tra 0 e 1.0.

Il calcolo dell'AUC per una curva empirica può venire effettuato semplicemente connettendo i diversi punti del R.O.C. plot all'asse delle ascisse con segmenti verticali e sommando le aree dei risultanti poligoni generati nella zona sottostante. Questa tecnica però, detta "regola trapezoidale", può fornire risultati sistematicamente distorti per difetto. Per avere una stima il più possibile vera dell'AUC è necessario ricorrere a calcolatori in grado di eseguire questo tipo di operazione.

Per quanto riguarda l'interpretazione del valore di AUC, si può tenere presente la classificazione della capacità discriminante di un test proposta da Swets (1998). Essa è basata su criteri largamente soggettivi ed avviene secondo lo schema seguente.

- $AUC=0.5$ test non informativo
- $0.5 < AUC < 0.7$ test poco accurato
- $0.7 < AUC < 0.9$ test moderatamente accurato

- $0.9 < AUC < 1.0$ test altamente accurato
- $AUC = 1$ test perfetto

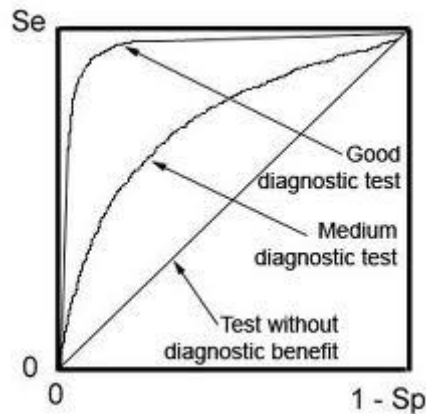


Figura 3.7: Curve R.O.C. in tre differenti casi di test

3.5 Scelta del valore soglia ottimale

Il problema che si riscontra è valutare in modo corretto il valore soglia. Pur essendo il valore di cut-off critico ai fini decisionali, non esiste un cut-off ottimale, infatti ogni variazione del valore adottato coincide con una variazione della sensibilità e della specificità del test. Purtroppo le suddette variazioni si verificano contemporaneamente in direzioni opposte, nel senso che ad un incremento della sensibilità corrisponde un decremento della specificità e viceversa. Inoltre, a seconda del valore della soglia, si potranno commettere diversi tipi di errore: mancato riconoscimento (Falsi Negativi, FN) se la soglia è troppo alta, falsi riconoscimenti (Falsi Positivi, FP) se la soglia è troppo bassa.

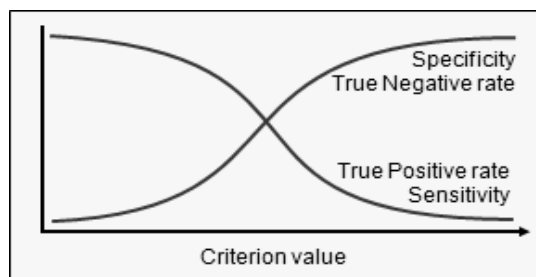


Figura 3.8: Sensibilità e specificità rispetto al valore di criterio

Capitolo 4

Analisi R.O.C. applicata alle immagini filtrate di endotelio corneale

A seguito dell'operazione di filtraggio, dalle 30 immagini di endotelio corneale, messe a disposizione da *Topcon® USA*, sono state ricavate per ciascuna di esse tre immagini sulle quali appaiono evidenziati i tre principali aspetti che costituiscono il pattern endoteliale, ovvero i contorni cellulari, i corpi cellulari e le triforcazioni. Le immagini ottenute verranno successivamente confrontate con il cosiddetto "ground truth" relativo, in modo da calcolarne i parametri più importanti necessari all'analisi dei tre filtri progettati.

4.1 Confronto delle immagini con il *ground truth*

Un esempio di *ground truth* è illustrato dall'immagine 4.1 ottenuto dal mosaico endoteliale acquisito tramite microscopia speculare endoteliale di figura 2.3 con la successiva selezione automatica della regione di interesse ROI.

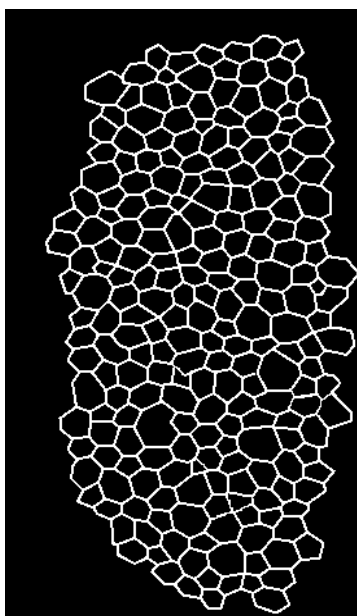


Figura 4.1: "Ground Truth" di un mosaico endoteliale corneale acquisito mediante microscopia speculare *Topcon SP-3000P*

L'aspetto che differenzia sostanzialmente l'immagine rilevata dalla microscopia speculare endoteliale al "ground truth" è la maggior precisione che quest'ultima possiede. I bordi delle cellule vengono infatti disegnati da un esperto, attraverso uno specifico programma informatico oppure a mano, guardando semplicemente la riproduzione del tessuto corneale cercando di rispettarne la forma, la dimensione ma soprattutto lo spessore dei bordi cellulari. Alla classe corpo cellulare è stato assegnato il colore nero (livello di grigio 0) mentre alla classe bordo cellulare il colore bianco (livello di grigio 255), ottenendo così una classificazione binaria dell'immagine. I contorni e le triforcazioni sono quindi visualizzati come bianchi mentre i corpi cellulari come neri. Ovviamente la riproduzione non è del tutto fedele alla realtà in quanto la difficoltà aumenta al crescere del numero di cellule endoteliali o a causa della loro deformazione.

4.1.1 Ground truth relativo alle triforcazioni

Il passo iniziale dell'algoritmo per ricavare il ground truth corrispondente alle triforcazioni è stato la riduzione dei bordi dell'immagine originale per consentire all'operatore di individuare la maggior parte degli elementi presenti; se i bordi fossero stati più spessi il metodo utilizzato nell'algoritmo non avrebbe avuto lo stesso successo. È stata poi inizializzata una matrice della stessa dimensione dell'immagine all'interno della quale vengono riportate man mano le triforcazioni individuate. L'algoritmo lavora lungo tutti i pixel dell'immagine e l'obiettivo è quello di individuare il numero più alto possibile di pixel che possono essere indicati come triforcazione. Innanzitutto, considerando un intorno 3x3, si possono accertare come tali le seguenti configurazioni:

$$\begin{array}{ccc} 1 & 0 & 1 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \end{array} \quad \begin{array}{ccc} 1 & 0 & 1 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{array} \quad \begin{array}{ccc} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 1 \\ 0 & 1 & 0 \end{array}$$

Ognuna di esse contiene altre quattro configurazioni, attraverso rotazioni di $\frac{\pi}{2}$.

Si prenda ora un generico intorno di un pixel uguale a 1:

$$\begin{array}{ccc} a & b & c \\ d & 1 & e \\ f & g & h \end{array}$$

E si definiscano per mezzo degli operatori logici:

$$1^\circ \text{ adiacenza} = a \text{ AND } (\text{NOT } (b \text{ OR } d))$$

$$2^\circ \text{ adiacenza} = f \text{ AND } (\text{NOT } (d \text{ OR } g))$$

$$3^\circ \text{ adiacenza} = h \text{ AND } (\text{NOT } (g \text{ OR } e))$$

$$4^\circ \text{ adiacenza} = c \text{ AND } (\text{NOT } (b \text{ OR } e))$$

Infine si fissi:

$$\text{Adiacenza totale} = 1^\circ\text{adiacenza} + 2^\circ\text{adiacenza} + 3^\circ\text{adiacenza} + 4^\circ\text{adicensa} + \\ + (b + d + g + e)$$

Ci si trova di fronte ad un intorno che può essere considerato triforcazione solo se ciò che precedentemente è stato definito come "*adiacenza totale*" è maggiore o uguale a 3. Una volta analizzata tutta l'immagine, gli intorni classificati come triforcazione vengono dilatati. La matrice restituita alla fine della funzione avrà perciò evidenziati i punti che risultano triforcazioni dall'analisi. Con riferimento all'immagine 2.3 di endotelio, qui sotto viene riportato il ground truth relativo alle triforcazioni con la solita selezione automatica della regione d'interesse ROI.

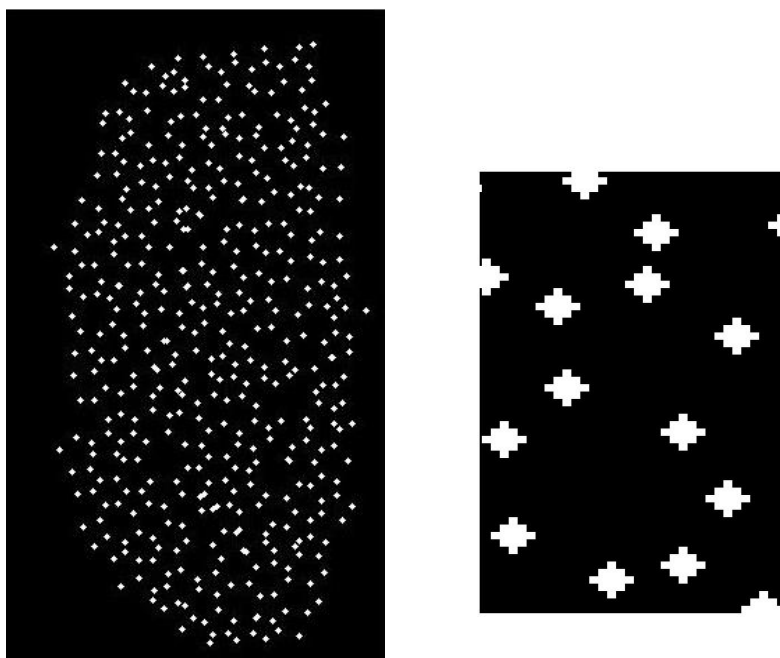


Figura 4.2: "Ground Truth" di un mosaico endoteliale corneale relativo alle triforcazioni e dettaglio

4.1.2 Ground truth relativo ai contorni cellulari

Il procedimento per l'individuazione dei pixel nell'immagine originale corrispondenti ai lati delle cellule è sostanzialmente ricavato da quello attuato per la localizzazione delle triforcazioni. Basterà infatti, dopo la riduzione dei bordi allo spessore di un pixel del ground truth dell'endotelio corneale, togliere il ground truth relativo alle triforcazioni da quello completo di figura 4.1. Per visualizzare meglio il risultato ottenuto, per ogni triforcazione trovata, è stata eliminata dall'immagine una matrice 5x5 centrata sul pixel corrispondente all'effettivo centro della triforcazione. Infine sono stati allargati i bordi

ricavati in modo da renderli più visibili. Sotto sono riportati il ground truth relativo ai bordi e a destra un dettaglio per far notare meglio ciò che si acquisisce.

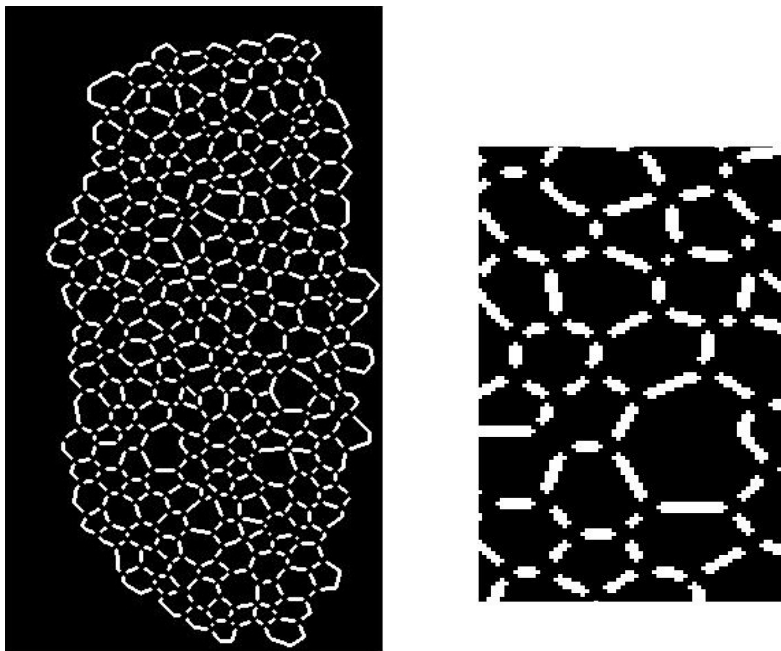


Figura 4.3: "Ground Truth" di un mosaico endoteliale corneale relativo ai contorni cellulari e dettaglio

4.1.3 Ground truth relativo ai centri cellulari

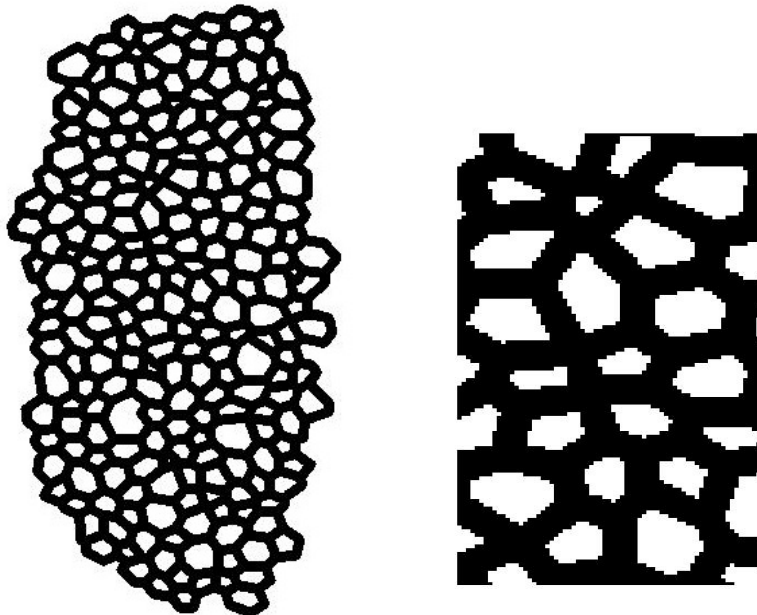


Figura 4.4: "Ground Truth" di un mosaico endoteliale corneale relativo ai centri cellulari e dettaglio

Per ottenere l'immagine 4.4 raffigurata nella pagina precedente è sufficiente invertire i colori del ground truth completo in modo da avere i bordi delle cellule nere e i corpi cellulari bianchi. Quindi viene assegnato il livello di grigio 0 ai bordi e il livello di grigio 225 all'interno della cellula. Dopodiché i centri sono stati ridotti ad un intorno 3x3 dal pixel centrale, allargando di conseguenza i contorni cellulari.

4.2 Analisi per ogni singola immagine

È stata già descritta l'importanza dell'aver un valore di soglia per quanto riguarda test di questo genere, cioè test di tipo "quantitativo". È praticamente impossibile individuare un valore soglia che consenta una classificazione perfetta, ossia tale da azzerare sia i Falsi Positivi che i Falsi Negativi ma è possibile trovare la migliore, ossia quella capace di ottimizzare la sensibilità e la specificità. Per questo motivo, nello svolgimento di questo progetto sono state utilizzate ben 50 soglie diverse di livello di grigio via via crescenti. Ogni singola immagine filtrata è stata analizzata confrontandola con il corrispondente "ground truth". All'epilogo di questo processo si sono ottenuti i diversi parametri di accuratezza, di sensibilità, di specificità e dell'area sottesa alla curva R.O.C. ma di essi si sono presi in considerazione solo quelli corrispondenti alla soglia migliore.

La prima tabella ricavata è quella riferita ai corpi cellulari.

N° immagine	accuratezza	sensibilità	specificità	AUC	soglia migliore
1	0,8143	0,8274	0,8083	0,885	0,48
2	0,8341	0,8503	0,8248	0,9036	0,34
3	0,8336	0,8763	0,8091	0,9044	0,42
4	0,8507	0,8784	0,835	0,9189	0,48
5	0,8364	0,8532	0,8272	0,9018	0,42
6	0,7923	0,8602	0,7467	0,8649	0,22
7	0,8011	0,8506	0,7757	0,8767	0,44
8	0,8344	0,9079	0,7962	0,9139	0,34
9	0,8346	0,81	0,8474	0,8947	0,24
10	0,8357	0,8491	0,8282	0,9017	0,48
11	0,8153	0,8313	0,8073	0,8818	0,4
12	0,8266	0,8383	0,8212	0,8954	0,42
13	0,8467	0,8841	0,796	0,8928	0,4
14	0,8075	0,8077	0,8075	0,874	0,54
15	0,8403	0,8566	0,8289	0,8993	0,38
16	0,7038	0,7016	0,708	0,7617	0,4
17	0,8334	0,8687	0,8183	0,9035	0,46
18	0,7871	0,7724	0,798	0,8483	0,42
19	0,7998	0,7929	0,8075	0,8532	0,22

20	0,8173	0,8149	0,8226	0,8658	0,28
21	0,8255	0,851	0,8089	0,8947	0,52
22	0,8133	0,8347	0,8044	0,8801	0,48
23	0,7948	0,841	0,7662	0,867	0,36
24	0,8368	0,8905	0,8062	0,9126	0,38
25	0,802	0,8225	0,7918	0,8707	0,5
26	0,8033	0,8751	0,7653	0,8852	0,38
27	0,8179	0,8202	0,8165	0,8814	0,42
28	0,859	0,8825	0,8409	0,9154	0,36
29	0,8052	0,8819	0,7662	0,8855	0,16
30	0,804	0,7937	0,8101	0,8656	0,48

Tabella 4.2: Parametri ottenuti e soglia migliore per ogni immagine filtrata, dopo il rilevamento dei corpi cellulari, al confronto con il corrispondente ground truth

Si nota come i valori delle soglie migliori per ognuna delle 30 immagini variano da un minimo di 0,16 ad un massimo di 0,54. I parametri di accuratezza, di sensibilità e di specificità rimangono attorno a valori abbastanza buoni, nell'ordine medio di 0,8. L'unica immagine che si discosta dalle altre per i valori ottenuti è la numero 16. Più specificamente la percentuale dei Veri Positivi classificati correttamente è mediamente intorno allo 0,84 mentre quella dei Veri Negativi classificati in maniera esatta è dello 0,803. Osservando poi i valori dell'accuratezza per le 30 diverse immagini possiamo affermare che il test effettuato è in grado di fornire valori effettivamente molto simili ai parametri veri. Infine l'area sottesa alla curva di R.O.C., ovvero l'AUC, si avvicina molto al valore 1, raggiunto il quale equivarrebbe ad avere un test perfetto. Tenendo poi presente della classificazione della capacità discriminante di un test proposta da Swets possiamo classificare il test effettuato come moderatamente o altamente accurato poiché $0.7 < AUC < 0.9$ e $0.9 < AUC < 1.0$.

La seconda tabella contiene invece i parametri per quanto riguarda i contorni cellulari.

N° immagine	accuratezza	sensibilità	specificità	AUC	soglia migliore
1	0,6963	0,7669	0,6603	0,7739	0,12
2	0,7153	0,7878	0,6806	0,7972	0,14
3	0,7622	0,7011	0,7915	0,8042	0,18
4	0,7566	0,7492	0,7601	0,8107	0,2
5	0,7459	0,7054	0,7653	0,7916	0,3
6	0,7103	0,6951	0,7171	0,76	0,38
7	0,7178	0,7634	0,6957	0,7885	0,16
8	0,7474	0,7779	0,7325	0,8087	0,12
9	0,7608	0,6166	0,8338	0,7882	0,1

10	0,7629	0,7144	0,7862	0,807	0,14
11	0,7118	0,761	0,687	0,7795	0,18
12	0,7273	0,7325	0,7246	0,7811	0,14
13	0,8097	0,6919	0,847	0,829	0,22
14	0,7307	0,6597	0,7664	0,7688	0,16
15	0,7615	0,7145	0,7824	0,8104	0,14
16	0,7159	0,5773	0,7491	0,7106	0,24
17	0,7529	0,7209	0,7701	0,8002	0,18
18	0,7381	0,6608	0,7714	0,773	0,16
19	0,7913	0,7228	0,8158	0,8322	0,26
20	0,7933	0,6387	0,8274	0,7884	0,16
21	0,7493	0,6811	0,7802	0,794	0,16
22	0,7087	0,7221	0,7017	0,7731	0,18
23	0,7614	0,6367	0,8212	0,7898	0,14
24	0,7428	0,7956	0,7177	0,816	0,16
25	0,731	0,6624	0,7649	0,7704	0,16
26	0,7181	0,7681	0,6935	0,7878	0,14
27	0,7339	0,7364	0,7328	0,7918	0,18
28	0,7787	0,7496	0,7909	0,8272	0,2
29	0,7489	0,6058	0,8198	0,7682	0,14
30	0,7372	0,6988	0,7551	0,7841	0,26

Tabella 4.3: : Parametri ottenuti e soglia migliore per ogni immagine filtrata, dopo il rilevamento dei contorni cellulari, al confronto con il corrispondente ground truth

In questo secondo caso le soglie migliori ricavate hanno valori per lo più inferiori rispetto a quelli trovati nel caso precedente dei corpi cellulari; il parametro più basso corrisponde a 0,1 per l'immagine numero 9 mentre il più elevato è 0,38 per l'immagine numero 6, anche se esso differenzia di ben 8 centesimi rispetto al valore di soglia subito inferiore, cioè 0,3. Sensibilità e specificità hanno una percentuale media rispettivamente del 70% e del 76% mentre l'accuratezza non supera l'80% con l'immagine numero 13, e possiede una media dello 0,7439. L'AUC invece non supera mai il valore di 0,9 per cui il test eseguito può essere valutato solo come moderatamente accurato.

Terzo ed ultimo caso riguarda le triforcazioni cellulari e la tabella che ne descrive i parametri è la seguente:

N° immagine	accuratezza	sensibilità	specificità	AUC	soglia migliore
1	0,7431	0,8029	0,7373	0,8569	0,4
2	0,7799	0,8063	0,7779	0,8746	0,42
3	0,7719	0,8038	0,7694	0,8756	0,46

4	0,8037	0,7948	0,8044	0,8894	0,44
5	0,7691	0,7884	0,7675	0,8691	0,44
6	0,7379	0,7846	0,7349	0,8364	0,52
7	0,7745	0,776	0,7743	0,8628	0,48
8	0,8007	0,7905	0,8016	0,8829	0,48
9	0,6763	0,89	0,6581	0,8611	0,44
10	0,7878	0,8137	0,7858	0,8868	0,46
11	0,7586	0,7642	0,7582	0,8485	0,44
12	0,7334	0,82	0,725	0,8627	0,5
13	0,7671	0,8676	0,7645	0,9008	0,44
14	0,741	0,8022	0,735	0,855	0,42
15	0,7741	0,8032	0,7723	0,8673	0,44
16	0,7473	0,7749	0,7469	0,8338	0,44
17	0,7679	0,7983	0,7648	0,871	0,48
18	0,7757	0,7512	0,7771	0,8508	0,42
19	0,8086	0,8123	0,8085	0,8873	0,42
20	0,7341	0,8672	0,7327	0,8566	0,34
21	0,8029	0,7789	0,8045	0,8749	0,44
22	0,7437	0,7895	0,7389	0,8496	0,38
23	0,7662	0,8046	0,7636	0,8679	0,48
24	0,781	0,8356	0,7767	0,8917	0,42
25	0,7858	0,7655	0,7876	0,8631	0,44
26	0,7963	0,7648	0,799	0,8653	0,5
27	0,7956	0,7593	0,7982	0,8677	0,42
28	0,7901	0,8107	0,7889	0,8913	0,42
29	0,6519	0,8916	0,6309	0,8415	0,44
30	0,7836	0,7936	0,7829	0,8738	0,42

Tabella 4.4: *Parametri ottenuti e soglia migliore per ogni immagine filtrata, dopo il rilevamento delle triforcazioni cellulari, al confronto con il corrispondente ground truth*

Le soglie migliori ricavate in questo terzo caso sono apparentemente più alte rispetto a quelle degli altri due; vanno da un minimo di 0,38 ad un massimo di 0,52. Il test è in grado di fornire valori corrispondenti a quelli veri con una percentuale media dell'76%. Per i risultati degli altri parametri, sensibilità e specificità possiamo riportare le stesse considerazioni fatte in precedenza per il primo caso anche se i valori ottenuti sono leggermente inferiori. La sensibilità media corrisponde a 0,803 mentre la specificità media è intorno allo 0,76. L'area sottesa la curva supera il valore di 0,9 solamente per la figura numero 13, ma comunque di pochissimo. Perciò anche in questo caso il test può essere classificato come moderatamente accurato e non può essere considerato un test perfetto.

4.3 Media aritmetica di tutte le soglie

Il passo successivo è il calcolo della media tra tutte le soglie ricavate fin'ora. È un'operazione alquanto facile, si tratta di una media aritmetica. Essa viene usata per riassumere con un solo numero un insieme di dati su un fenomeno misurabile e viene calcolata sommando i diversi valori a disposizione, i quali vengono divisi per il loro numero complessivo. La formula della media aritmetica semplice per n elementi è:

$$M_a = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Nel nostro specifico caso $n = 30$ e x sono le diverse soglie elencate nell'ultima colonna delle tre tabelle visualizzate precedentemente. Rispettivamente si ottengono:

- soglia media = 0,394 per i corpi cellulari;
- soglia media = 0,18 per i contorni cellulari;
- soglia media = 0,441 per le triforcazioni cellulari;

Questo dato verrà applicato in seguito alle 30 immagini a nostra disposizione che possiamo considerare come rappresentative di quello che è l'universo di tutte le possibili immagini ricavabili attraverso microscopia speculare.

4.4 Analisi delle immagini con la soglia mediata

Ci possono essere vari metodi di analisi dell'algoritmo. Quelli proposti di seguito sono però più avanzati rispetto a quello utilizzato da noi in questo lavoro.

1. Una prima possibilità è quella di prendere il data set delle immagini, dividerlo in due e lavorare inizialmente con la prima metà. Per ognuna di queste immagini si trova la soglia migliore e si calcola la media per ottenere un compromesso. Tale soglia mediata viene applicata poi alla seconda metà delle immagini che era stata lasciata da parte. In questo modo si calcola la vera accuratezza su dati sconosciuti. Concluso questo primo passo si procede con il contrario, cioè si considera la seconda metà di immagini per ottenere la soglia mediata da applicare all'altra porzione del data set. Alla fine si avranno ben due misure di soglia da poter confrontare.
2. Un altro modo è quello di considerare innanzitutto $n-1$ immagini, trovare per ognuna di esse la soglia migliore e calcolarne la soglia mediata. Quest'ultima poi verrà testata sull'ennesima immagine non ancora utilizzata precedentemente per

vederne il comportamento. Lo stesso procedimento viene ripetuto per tutte le n immagini scartando ogni volta un'immagine diversa da prima. Una volta concluso ciò, si procede con il calcolo della media dei risultati su tutte le n volte.

3. Un'ultima alternativa è quella di trovare la soglia migliore per un'unica immagine e poi applicare questa a tutte le altre immagini a disposizione. Lo stesso procedimento va ripetuto per tutte le figure.

La nostra analisi invece farà riferimento ad un altro metodo, descritto nel prossimo paragrafo.

4.4.1 Nuovi parametri dopo l'applicazione della nuova soglia

Una volta ricavato il valore che rappresenta la media tra tutte le soglie migliori ottenute nella prima parte dell'analisi dell'algoritmo, questo viene applicato nuovamente a tutte le immagini a disposizione. Confrontandole poi ancora una volta con il rispettivo "ground truth" si ottengono nuovi parametri di accuratezza, sensibilità e specificità che descrivono il loro comportamento. I risultati ottenuti vengono poi catalogati nelle tre diverse tabelle seguenti, suddivise per i tre diversi casi.

Per i centri cellulari:

N° immagine	accuratezza	sensibilità	specificità
1	0,4497	0,9927	0,204
2	0,8176	0,6299	0,9262
3	0,7989	0,9283	0,7247
4	0,6013	0,9897	0,3812
5	0,8034	0,9185	0,7401
6	0,6392	0,1199	0,9875
7	0,6762	0,9475	0,5367
8	0,8368	0,6776	0,9197
9	0,6626	0,0182	0,9994
10	0,6212	0,979	0,4192
11	0,8103	0,8484	0,7913
12	0,797	0,8981	0,7506
13	0,8488	0,9059	0,7715
14	0,3266	1	0,0075
15	0,8377	0,8016	0,863
16	0,7194	0,7382	0,6815
17	0,6659	0,9638	0,5384
18	0,7665	0,8605	0,6963
19	0,4722	0,0016	1
20	0,4236	0,1853	0,9708
21	0,4268	0,9994	0,0554

22	0,477	0,9816	0,2654
23	0,8017	0,7157	0,8549
24	0,8448	0,8541	0,8395
25	0,3861	0,9961	0,0827
26	0,8203	0,825	0,8178
27	0,7998	0,8885	0,7446
28	0,8341	0,7515	0,8977
29	0,6628	0	1
30	0,572	0,967	0,3407

Tabella 4.5: Parametri ottenuti dopo l'applicazione della soglia mediata alle immagini filtrate dei centri cellulari

Per i contorni cellulari:

N° immagine	accuratezza	sensibilità	specificità
1	0,7331	0,3761	0,9153
2	0,7612	0,541	0,8667
3	0,7622	0,7011	0,7915
4	0,7217	0,8096	0,6799
5	0,4458	0,9556	0,2013
6	0,3117	0,9998	0,0005
7	0,7453	0,6693	0,7823
8	0,7242	0,2125	0,9732
9	0,6649	0,0024	1
10	0,7635	0,4868	0,8965
11	0,7118	0,761	0,687
12	0,7342	0,4034	0,8985
13	0,7106	0,812	0,6786
14	0,7399	0,5444	0,838
15	0,7804	0,4796	0,9141
16	0,4204	0,8632	0,3145
17	0,7529	0,7209	0,7701
18	0,7583	0,5594	0,8439
19	0,5562	0,9102	0,4294
20	0,8298	0,5558	0,8904
21	0,7619	0,5648	0,8511
22	0,7087	0,7221	0,7017
23	0,7398	0,2969	0,9521
24	0,7726	0,6972	0,8085
25	0,7447	0,5503	0,8406
26	0,7469	0,3968	0,9196
27	0,7339	0,7364	0,7328

28	0,741	0,8119	0,7112
29	0,6848	0,0631	0,9926
30	0,558	0,9034	0,397

Tabella 4.6: Parametri ottenuti dopo l'applicazione della soglia mediata alle immagini filtrate dei contorni cellulari

Per le triforcazioni cellulari:

N° immagine	accuratezza	sensibilità	specificità
1	0,8645	0,6099	0,8891
2	0,8374	0,6989	0,848
3	0,7187	0,8638	0,7075
4	0,8078	0,7894	0,8093
5	0,7725	0,7858	0,7714
6	0,4076	0,9726	0,3718
7	0,6467	0,8983	0,6246
8	0,5315	0,97	0,4939
9	0,6918	0,8793	0,6758
10	0,7344	0,8657	0,7242
11	0,7634	0,7579	0,7639
12	0,3883	0,9881	0,3304
13	0,7711	0,8619	0,7688
14	0,8164	0,6962	0,828
15	0,7799	0,7959	0,7789
16	0,7547	0,7679	0,7545
17	0,5904	0,9397	0,5549
18	0,8468	0,6389	0,8587
19	0,9269	0,5908	0,9379
20	0,9637	0,2957	0,9705
21	0,8064	0,7748	0,8086
22	0,8857	0,4659	0,9299
23	0,5549	0,938	0,5289
24	0,8479	0,7369	0,8566
25	0,79	0,7583	0,7928
26	0,338	0,9917	0,2831
27	0,8516	0,664	0,8651
28	0,8477	0,7349	0,854
29	0,6702	0,8764	0,6521
30	0,8422	0,7107	0,8524

Tabella 4.7: Parametri ottenuti dopo l'applicazione della soglia mediata alle immagini filtrate delle triforcazioni cellulari

In tutti tre i casi, i valori di accuratezza, sensibilità e specificità sono molto diversi tra loro. Ciò è giustificato dal fatto che la soglia mediata in alcuni casi si discostava anche di molto dal valore della soglia che rispondeva nel migliore dei modi sull'immagine.

4.4.2 Curve R.O.C. finali

Utilizzando i diversi dati di sensibilità e specificità di tutte le immagini è stato possibile costruire tre differenti curve R.O.C., ognuna per le tre caratteristiche principali evidenziate nel pattern endoteliale. Solitamente una curva R.O.C. permette di trovare la correlazione tra sensibilità e specificità a seconda di differenti valori di cut-off, ma nel nostro caso si ha a disposizione solamente il valore di soglia mediata. Il nostro interesse era quello di rappresentare il nesso esistente tra la sensibilità e la specificità di ciascuna immagine all'applicazione dell'unico valore di soglia ricavato. I grafici per questo non raffigurano una curva R.O.C. vera e propria, ma sarà data una successione di asterischi, ognuno dei quali definisce il rapporto che vogliamo considerare per la nostra analisi.

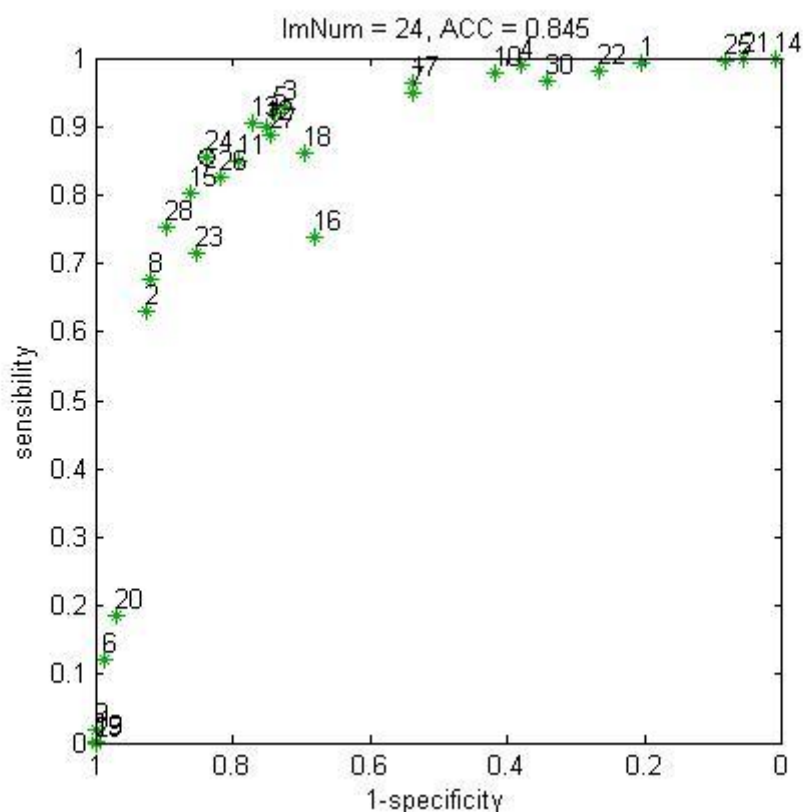


Figura 4.8: analisi finale tramite curva R.O.C. per i centri cellulari

In figura 4.8 è riportata l'analisi finale per i centri cellulari. Ogni asterisco, come già detto, rappresenta la correlazione tra sensibilità e specificità di ciascuna immagine, e per rendere

l'illustrazione più chiara è stato riportato vicino ad ognuno di essi il numero corrispondente all'immagine. Si può osservare come alcune delle 30 immagini rispondano in maniera del tutto negativa all'applicazione della soglia ricavata dalla media di tutti le soglie migliori, in questo caso pari a 0,394. Dalla figura, ma ancor meglio dalla tabella 4.5 corrispondente, si nota come le immagini numero 19 e 29 abbiano una sensibilità quasi nulla (0,001 la prima e 0 la seconda), e una specificità pari a 1. Al contrario l'immagine numero 14 presenta una sensibilità uguale ad 1 e una specificità dello 0,0075. Per questo i loro valori non hanno molta importanza sulla valutazione del test e possono essere anche scartati. La figura mette anche in evidenza il fatto che la maggior parte delle immagini abbia una sensibilità per lo più elevata, infatti una buona parte degli asterischi sono posizionati nella parte superiore del grafico. Un'alta sensibilità corrisponde ad un tasso molto basso di falsi negativi. Infine, l'immagine che ha risposto meglio al test è stata la numero 24 con un'accuratezza dello 0,845, una sensibilità dello 0,8541 e una specificità dello 0,8395. Infatti l'asterisco corrispondente, proprio per questo motivo cerchiato, è quello più vicino all'angolo superiore sinistro del grafico.

Per i contorni cellulari si ha invece la curva di figura 4.9.

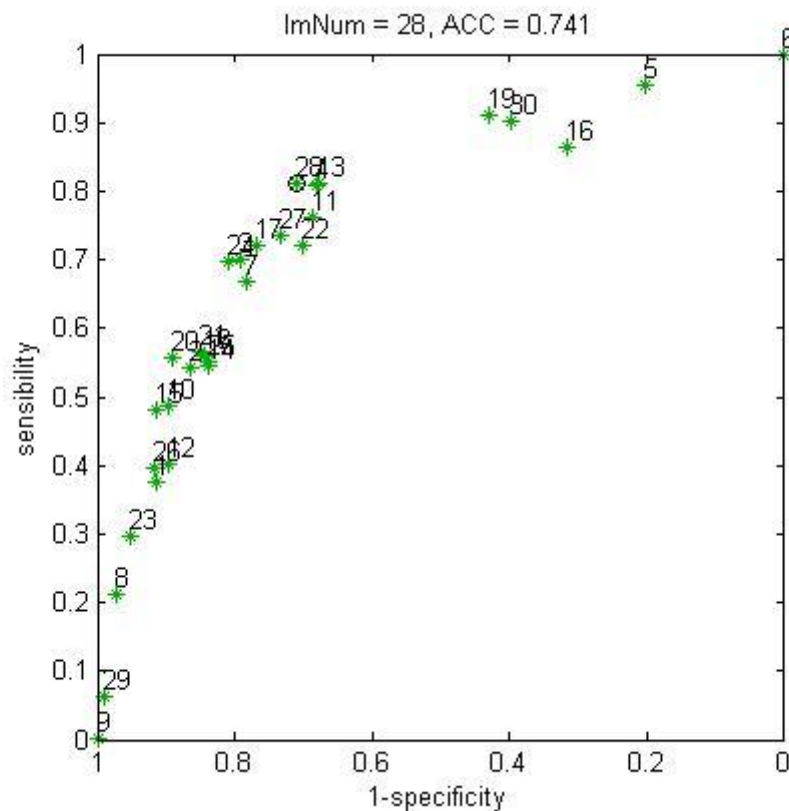


Figura 4.9: analisi finale tramite curva R.O.C. per i contorni cellulari

L'immagine numero 29 anche in questo caso ha un valore basso di sensibilità e, di conseguenza, alto di specificità e per questo non risponde bene con la soglia scelta da applicare. Ma l'immagine che possiede il valore più basso di sensibilità, 0,0024, è senz'altro la numero 9; infatti l'asterisco corrispondente si trova nel punto d'incontro dei due assi. L'immagine numero 6 è caratterizzata invece da una specificità dello 0,0005 e quindi da una sensibilità elevata quasi unitaria, precisamente 0,9998. La migliore a rispondere all'analisi è l'immagine 28 che presenta un'accuratezza dello 0,741. A differenza della figura 4.8, qui i parametri risultanti delle immagini sono abbastanza sparsi nello spazio e non sono concentrati in un unico blocco come succede per il caso dei centri cellulari. Questo non è però sinonimo di un successo dell'analisi: per definizione di sensibilità e specificità, la quantità di falsi negativi e di falsi positivi è rilevante per poter affermare la non accuratezza generale del filtro.

L'ultima curva R.O.C. da analizzare è quella riguardante le triforcazioni cellulari, rappresentata in figura 4.10.

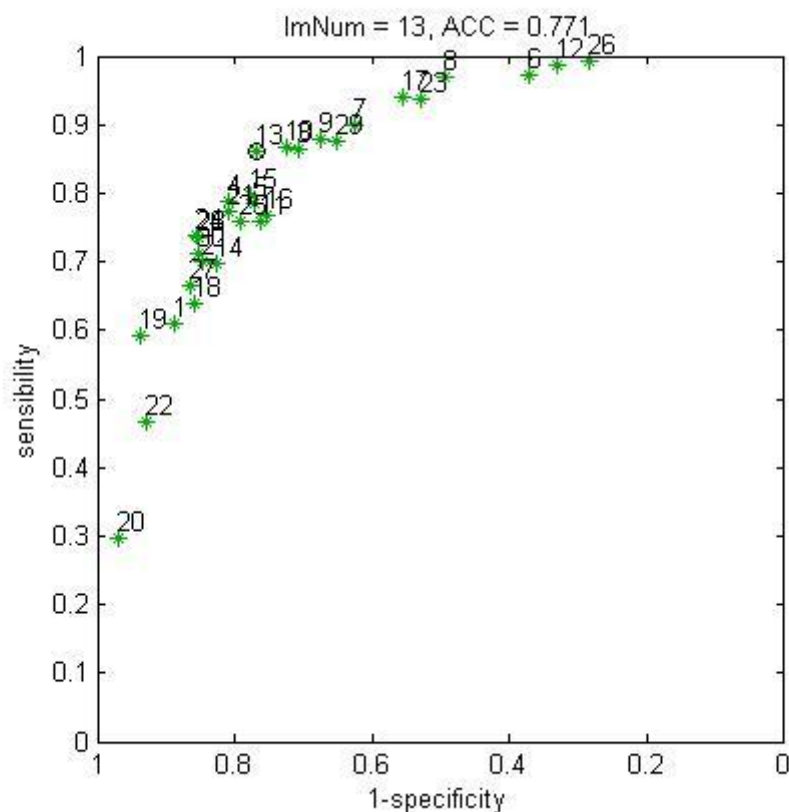


Figura 4.10: analisi finale tramite curva R.O.C. per le triforcazioni

Si nota subito dal grafico che nessuna immagine ha valori discriminanti né per la sensibilità né per la specificità, infatti è presente principalmente un blocco sulla parte superiore a destra. L'immagine con la sensibilità più bassa è la numero 20 con 0,2957 mentre la numero 26 è quella con il valore più inferiore di specificità, cioè 0,2831. Tra tutte le rimanenti, quella che risponde nel modo migliore alla soglia mediata è la numero 13. I suoi parametri sono: 0,7711 di accuratezza, 0,8619 di sensibilità e 0,7688 di specificità.

Conclusioni

Lo scopo di questa tesi è valutare la validità dei filtri progettati da un gruppo di ricercatori, guidati dal professore Alfredo Ruggeri, pensati originariamente per elaborare le immagini di endotelio corneale acquisite tramite microscopia speculare. L'analisi delle immagini di microscopia speculare è fondamentale per valutare lo stato di salute della cornea. In campo medico, l'interesse è volto a determinare parametri clinici utilizzabili come indicatori nella valutazione delle patologie corneali. Attualmente, l'analisi dell'endotelio corneale e la stima di questi indicatori è basata su metodi manuali o semi-automatici, soggettivi e quindi non affidabili. E' evidente quindi l'importanza di uno strumento che permetta di ricavare parametri clinici in modo completamente automatico ed oggettivo e che possa quindi fornire un valido supporto alla diagnosi e alle decisioni cliniche. Su un campione di 30 immagini di endotelio corneale è stato possibile compiere un'attenta analisi degli algoritmi presentati dai ricercatori. Essi sono in grado di visualizzare in output le immagini relative ai tre aspetti caratteristici del mosaico endoteliale: i bordi cellulari composti dai lati e dalle triforcazioni che uniscono le varie cellule e i corpi cellulari, cioè tutto quello che sta all'interno dei bordi. Per l'analisi è stato utilizzato un metodo relativamente semplice per la sua costruzione e facile per la sua applicazione, la curva R.O.C.. Innanzitutto si sono dovuti ricavare i tre diversi "ground truth" relativi ai tre principali elementi costitutivi dell'endotelio a partire da quello originale. L'immagine manuale originale è stata ottenuta tracciando manualmente i contorni cellulari cercando di rispettare il più possibile la morfologia reale. Ad ogni pixel dell'immagine è stato assegnato il valore 0 se corrispondente al corpo cellulare, 1 altrimenti. Confrontando poi i tre diversi risultati dei filtri con il corrispondente ground truth si sono potuti ricavare i parametri di sensibilità, specificità e accuratezza relativi alla soglia applicata. Tali parametri sono fondamentali per dare un'idea del comportamento di ciascun filtro sull'universo di immagini proposte. Di tutti i parametri si sono considerati solo quelli corrispondenti alla soglia migliore, ne abbiamo usate per questo motivo 50 di diverse. Fatta la media di tutte, la nuova soglia mediata è stata riapplicata per un confronto finale delle immagini. Di tutti i filtri, quello che risponde meglio sulla maggior parte delle immagini date in input è sicuramente quello relativo alle triforcazioni. Non si hanno infatti parametri relativamente bassi né per quanto riguarda la sensibilità né per la specificità. Non è possibile fare la stessa considerazione per i filtri relativi al riconoscimento dei contorni e dei centri cellulari: alcune immagini hanno valori pressoché nulli di specificità o di sensibilità. Dopotutto, in tutti e tre i casi si sono ottenuti valori che ci permettono di considerare i test sufficientemente accurati per cui, al momento, gli algoritmi presentati si possono considerare come una base per future implementazioni in modo da ricavare dei validi strumenti da utilizzare in ambito clinico per la valutazione dei parametri utili per una diagnosi di qualsivoglia patologia della cornea.

Bibliografia

- 1) "Compendio di Anatomia umana" - A. Bairati
- 2) "Elementi di fisiologia umana"- Guyton A.C.
- 3) "Clinical application of corneal confocal microscopy"- Tavakoli M., Hossain P., A Malik R.
- 4) "Clinical Corneal Confocal Microscopy"- Auguste G.-Y.C., Kaufman S.C., Kaufman H.E., Beuerman R.W.
- 5) "Clinical Specular Microscopy - Laing R.A., Sandstrom M.M.
- 6) "Specular microscopy of human corneal endothelium in vivo" - Bourne W.M., Kaufman H.E.
- 7) "Contact and noncontact specular microscopy" - Price N.C., Cheng H.
- 8) "La cornea" - Scuderi G.
- 9) "Changes in the corneal endothelium as a function of age" - Laing R.A., Sandstrom M.M., Berrospi A.R., Leibowitz H.M.
- 10) "Age-related modifications of the corneal endothelium in adults" . Roskowska A.M., Colosi P., D'Angelo P., Ferreri G.
- 11) "Use specular microscopy to diagnose corneal disease" - Craig T.
- 12) "Automatic analysis of confocal images of the cornea" - Scarpa F.
- 13) "Automated morphometric analysis of corneal endothelial cells" - Lester J.M., McFarland J.L., Bursell S.E.
- 14) "Clinical in-vivo confocal microscopy of the human cornea in health and disease" - Niederer R.L., McGhee C.N.J.,
- 15) "Elaborazione delle immagini digitali" - G. Meini
- 16) "Elaborazione delle immagini digitali" - E. Ardizzone
- 17) "Elaborazione delle immagini" - S. Magni, H. Shahzad
- 18) "Operatori locali su immagini digitali" - F. Tortorella
- 19) "Segmentazione automatica di cellule endoteliali in immagini della cornea da microscopia speculare" - Giudiceandrea A., *Tesi di laurea magistrale*
- 20) "Sviluppo di un algoritmo per la segmentazione di cellule di endotelio corneale in soggetti patologici" - Pretto G., *Tesi di laurea magistrale*
- 21) "Receiver Operating Characteristic (ROC) plots: a fundamental evolution tool in medicine" - Zweig H.H., Campbell G. (1993)
- 22) "Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests" - Greiner M., Pfeiffer D., Smith R.D. (2000)
- 23) "The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve" - Hanley J., McNeil B.J. (1982)
- 24) "Constructing a cut-off point for a quantitative diagnostic test" - Schäfer H. (1989)
- 25) "Measuring the accuracy of diagnostic systems" - Swets J.A. (1998)

- 26) "Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach" - DeLong, ER, DeLong, DM, Clarke-Pearson, DL.
- 27) "A simple generalization of the area under the ROC curve to multiple class classification problems" - Hand, D.J., Till, R.J., 2001
- 28) "Detection Theory and ROC Analysis" - James Egan. Signal