

### ***PowerUp your Microscope:***

la tecnologia WEB per un nuovo approccio in microscopia tridimensionale.

Paola Bonetto\*, Mirko Davolio\*, Mattia Epifani\*, Marco Scarito\*,  
Patrizia Boccacci\*, Alberto Diaspro^

\*INFN, DISI Università di Genova, Via Dodecaneso 35, 16146, Genova.

^INFN, DIFI Università di Genova, Via Dodecaneso 33, 16146, Genova.

## INTRODUZIONE

I recenti sviluppi delle tecnologie informatiche offrono ricchi e innovativi spunti di progresso in svariati settori scientifici. Uno tra i maggiori contributi è dato dall'evoluzione dei sistemi basati su reti di calcolatori e conseguente distribuzione spaziale del carico di lavoro. I risvolti di tale evoluzione sono di duplice natura e riguardano rispettivamente il "front end" e il "back end" dei sistemi informatici: da una parte, il rapido avvento delle architetture distribuite su larga scala geografica rappresenta un vero e proprio stravolgimento dei modelli classici di calcolo e dell'elaborazione dei dati. Dall'altra, l'utente viene proiettato da un mondo di lavoro ristretto ai mezzi offerti dalla sua locale realtà ad nuovo ambiente operativo, dal quale ha accesso ad un'intera rete di informazioni e di risorse hardware e software. Nello sviluppo del nostro progetto abbiamo considerato che la capillare diffusione della tecnologia WEB e la crescente domanda, dal mondo della ricerca, di analisi quantitative di immagini microscopiche tridimensionali ci poneva in un contesto tecnologicamente e culturalmente favorevole.

In questo articolo descriviamo il progetto *PowerUp Your Microscope*, un sistema orientato all'elaborazione di immagini tridimensionali acquisite da microscopio ottico, che sfrutta le tecnologie WEB oggi così diffuse dal cosiddetto mondo Internet.

A seguito di una parte riguardante la problematica generale di partenza, in cui vengono evidenziate le motivazioni che portano ad un'interazione multidisciplinare nelle aree dell'informatica e della biofisica cellulare e molecolare, ci soffermeremo sui tre principali moduli di cui consta il progetto: l'analisi del sistema di formazione delle immagini, il processo di elaborazione di quest'ultime e l'interfaccia utente. L'implementazione dei primi due costituisce la parte esecutiva, ovvero il cuore del programma da noi sviluppato, mentre l'interfaccia utente ne forma la cornice, il contesto moderno entro cui operare potendosi concentrare sulla comprensione dell'immagine tridimensionale più che sull'acquisizione di competenze e oneri informatico computazionali. L'interfaccia utente, sviluppata in modo originale proprio come tecnologia WEB, nel fornire i mezzi per poggiare l'esecuzione su un'architettura client-server, arricchisce il pacchetto di tutti i vantaggi offerti dall'accesso al mondo Internet.

### **Problematica generale di partenza.**

Una problematica cruciale in biofisica, biologia e medicina nell'utilizzo di strumenti di misura ad alta precisione come i microscopi riguarda il fatto di poter analizzare e capire quali sono i legami strutturali che sottendono alle funzioni esplicate dal campione in esame, ovvero, di ottenere dal campione analizzato informazioni il più possibile complete ed accurate sulla sua struttura, nel contesto, appunto, della comprensione del delicato e complesso rapporto struttura-funzione. Questo risulta di particolare rilievo nel caso in cui il campione sia di natura biologica. Infatti, sebbene la funzione da questo esplicita sia generalmente nota, il modo in cui essa viene svolta è spesso fortemente legato alla sua struttura e ai relativi cambiamenti; basti pensare ad esempio alla differenza tra una cellula neuronale in condizioni di normalità ed una relativa ad un soggetto affetto dal morbo di Alzheimer o alla transizione di una cellula normale verso un'attività tumorale. La conoscenza della struttura e l'analisi dei suoi cambiamenti al progredire di una certa funzione

esplicita può inoltre permettere al fruitore dell'immagine di valutare e prevedere quale funzione l'oggetto in esame andrà a svolgere nella sua evoluzione, ovvero di effettuare un'analisi preventiva. Ad esempio, cambiamenti strutturali nell'organizzazione della cromatina possono essere premonitori di degenerazioni funzionali delle cellule ospiti? Il problema biologico appare sufficientemente complesso e focalizzato, tanto da non permettere allo studioso di distrarsi verso altre competenze che tuttavia concorrono a mettere nuovi tasselli per la comprensione dei fenomeni. I problemi che un utente deve affrontare nello studio di questa classe di fenomeni derivano in larga parte dal fatto che gli strumenti di misura, ad esempio il microscopio ottico, non sono in grado di rappresentare la realtà in modo assolutamente fedele: le immagini prodotte da un microscopio risultano essere solo un'approssimazione dell'oggetto di partenza, in quanto degradate da rumore, nonché affette da errori legati alla geometria del sistema ottico, figura 1. L'obiettivo dell'elaborazione di immagini in questo settore è quindi di ridurre il più possibile gli artefatti introdotti dallo strumento durante l'acquisizione e rendere accessibile l'informazione in modo quantitativo. Se si suddivide il processo che porta il microscopista ad ottenere le informazioni desiderate in tre principali fasi – ovvero, preparazione del campione, acquisizione dei dati e analisi dell'immagine - l'elaborazione di immagini si inserisce tra il secondo e il terzo passo. Qui si colloca dunque PowerUp your Microscope.

In commercio esistono vari pacchetti software in grado di fornire servizi di elaborazione di immagini per il recupero di informazioni quantitative tridimensionali. La scelta del particolare prodotto è dettata dal compromesso tra qualità del risultato e difficoltà di utilizzo del software. Infatti, nonostante la maggior parte delle alternative risulti sufficientemente affidabile dal punto di vista della qualità dell'elaborazione, per ottenere i risultati migliori è necessario orientarsi verso pacchetti progettati per la soluzione computazionale di problemi specifici. Ad esempio, per il recupero di informazioni tridimensionali complete da insiemi di immagini generalmente acquisite con sezionamento ottico o fisico del campione in modalità di contrasto di trasmissione o fluorescenza. Tali pacchetti presentano le maggiori difficoltà di utilizzo perché richiedono all'utente conoscenze approfondite non solo nel campo della microscopia, ma anche nei settori informatico e matematico, e in particolare dell'elaborazione di immagini. Quello che succede è che generalmente l'utente che acquista un prodotto così specifico in poco tempo ne abbandona l'uso perché dovrebbe gestire classi di problemi non familiari e per le quali spesso non ha risorse umane da assegnare.

In risposta a tali problemi viene qui proposto un pacchetto software, denominato Power Up your Microscope, dotato di un'interfaccia che guida l'utente in modo semplice e chiaro attraverso l'unico percorso possibile per raggiungere il suo obiettivo: l'accesso ad un servizio di elaborazione immagini efficiente e computazionalmente affidabile senza doversi preoccupare dei parametri e delle problematiche relative alla risoluzione computazionale di problemi inversi per l'elaborazione dei dati raccolti dall'apparecchio ottico. Le uniche informazioni richieste sono l'insieme tridimensionale di immagini da analizzare e i dati caratteristici del sistema di formazione dell'immagine. L'unica abilità informatica richiesta è quella di essere in grado di navigare in Internet ad un livello assolutamente elementare.

Proprietà fondamentale dell'interfaccia è che essa nasconde all'utente l'architettura client-server per cui il pacchetto è disegnato: il modulo di elaborazione dei dati risiede su una macchina server a cui l'utente accede nella veste di client attraverso l'interfaccia, collegandosi ad un sito web. Riteniamo che molteplici siano i vantaggi di questo approccio, per ora unico nel panorama della microscopia computazionale.

I vantaggi possono essere sintetizzati attraverso i seguenti punti:

1. **Aggiornamento Software continuo ed automatico:** un'architettura client-server come quella da noi realizzata permette di avere un unico codice eseguibile, situato sulla macchina server. Installazione, manutenzione, risoluzione di eventuali errori e aggiornamenti del software sono a carico del fornitore del servizio, che possiede le competenze tecniche necessarie per mantenere il sistema di elaborazione al massimo dell'efficienza. Modifiche e aggiornamenti sono effettuati

in modo trasparente all'utilizzatore, che continua ad accedere al servizio tramite un comune browser, venendo alleviato da qualunque onere relativo a mantenimento e ottimizzazione del software.

2. **Aggiornamento Hardware continuo ed automatico:** anche l'aggiornamento dell'hardware è gestito dal lato server da personale specializzato e l'utente non deve preoccuparsi di aggiornare il proprio sistema. Questo aspetto in alcuni casi è molto oneroso per un utente che scelga di aggiornare un software specialistico. La potenza di calcolo che può essere raggiunta nella sede centrale, ovvero dal fornitore del servizio, è spesso molto maggiore di quella che sarebbe sensato proporre ad un utente singolo, ad esempio grazie all'utilizzo di sistemi multiprocessore o distribuiti.
3. **Natura multiplatforma:** un ulteriore vantaggio della scelta di offrire accesso al software attraverso il web risiede nell'essere intrinsecamente multiplatforma. Infatti, le uniche informazioni condivise tra fruitore e fornitore del servizio sono le immagini e le pagine HTML relative all'interfaccia. Per le prime i formati sono consolidati e compatibili tra le diverse architetture hardware e software, per le ultime si agisce entro uno standard consolidato. Il tipo di piattaforma client non affligge in alcun modo l'esecuzione del software di ricostruzione, progettato specificamente per essere eseguito su una particolare architettura server.
4. **Accesso sicuro e protetto:** l'utente accede al servizio tramite l'inserimento di una *Login* e una *Password* e viene guidato in un sistema personalizzato che gestisce in modo sicuro alcuni aspetti organizzativi; per esempio carica in automatico gli ultimi dati inseriti allo scopo facilitare l'utilizzo del programma e permette di avere uno storico dei lavori effettuati. Inoltre, la replicazione dei dati su diversi supporti e la divisione dei files relativi ad utenti diversi impedisce cancellazioni o sovrascritture accidentali e previene la diffusione involontaria di informazioni spesso confidenziali.
5. **Minimizzazione del rischio di pirateria informatica:** la caratteristica distintiva del software Power Up your Microscope di non venire distribuito, ma piuttosto di essere utilizzato in remoto tramite un collegamento internet e per mezzo di un accesso protetto, garantisce l'impossibilità di effettuare copie illegali del pacchetto.

Al giorno d'oggi, pochi sono i laboratori di analisi e ricerca che non hanno familiarità con l'accesso al web, mentre, in generale, esistono difficoltà ad avere strumenti di calcolo potenti e veloci, gestiti da personale tecnico preparato per la configurazione e la manutenzione di software specifico. Pertanto, il momento pare, come già si accennava nell'introduzione, culturalmente maturo per sviluppare un servizio come quello realizzato nel progetto *PowerUp Your Microscope*.

## Il sistema di formazione delle immagini

In microscopia ottica un'immagine tridimensionale viene costruita a partire dall'insieme di immagini bidimensionali registrate dall'apparecchio, generalmente ottenute attuando un sezionamento ottico. Il sezionamento ottico consiste semplicemente nella raccolta di immagini ottenute a diverse posizioni del fuoco geometrico dell'obiettivo, ovvero spostando l'osservazione lungo l'asse ottico o asse z del microscopio. Un comune microscopio fornirà immagini più o meno confuse mentre un microscopio confocale o uno ad eccitazione a due fotoni forniranno immagini abbastanza leggibili piano per piano. Comunque sia, per poter conseguire una ricostruzione tridimensionale delle caratteristiche evidenziate nel campione (ad esempio per marcatura fluorescente o per colorazione in assorbimento) è necessario conoscere le proprietà del sistema formatore di immagini: queste sono descritte da una funzione caratteristica, riconducibile sotto ragionevoli ipotesi modellistiche alla cosiddetta risposta all'impulso del sistema. Nel caso di sistemi ottici tale funzione, chiamata anche Point Spread Function (PSF), è riconducibile all'immagine di un'ideale sorgente di luce puntiforme di dimensioni infinitesime, cioè il più fedele possibile all'approssimazione fisica di un impulso luminoso.

Le due strade più comuni per la determinazione della PSF di un sistema di formazione di immagini sono rispettivamente di tipo sperimentale e di tipo teorico: la prima prevede l'acquisizione dell'immagine di una sferetta dalle dimensioni di qualche decina di nanometro, approssimante un impulso luminoso; la seconda consiste nella creazione di un modello matematico che definisce la PSF sotto determinate condizioni di lavoro, come ad esempio l'assenza di aberrazioni ottiche e la stazionarietà del sistema<sup>1</sup>. Questo secondo approccio è quello utilizzato nel progetto *PowerUp Your Microscope*, perché soddisfa i maggiori requisiti che ci siamo proposti di soddisfare:

- semplicità di utilizzo del sistema: non è necessaria alcuna rilevazione preliminare dei dati relativi ad una sorgente puntiforme sperimentale.
- Accuratezza del modello: la PSF generata è priva di rumore, ovvero presenta un elevato rapporto segnale-rumore.
- Ridotti costi temporali: il calcolo teorico richiede un minor investimento di tempo di quello necessario per un'acquisizione sperimentale. Addirittura il risultato è disponibile in tempo reale, permettendo di proporre all'utente un preview dell'elaborazione complessiva.

La PSF sperimentale presenta il vantaggio di essere una fedele impronta digitale del sistema formatore di immagini ma non è semplicemente misurabile dalla maggior parte degli utenti di un microscopio ottico.

Per il calcolo teorico della PSF, e quindi per modellare matematicamente l'apparecchio di acquisizione, sono necessari alcuni dati che descrivono la geometria del sistema: una parte di questi sono fondamentali e rappresentano la quasi totalità delle informazioni richieste all'utente - informazioni che sono generalmente note al microscopista. I rimanenti possono essere ricavati dal set iniziale e vengono calcolati dal sistema, alleviando l'utente dal compito di fornirli. La modellazione teorica della PSF è proposta per tre particolari microscopi: a campo largo, confocale e a due fotoni. La formulazione è generata sulla base delle informazioni raccolte, utilizzando i modelli proposti in letteratura.

Figura 1, Figura 2 e Figura 3 illustrano alcune immagini di PSF calcolate con il nostro software rispettivamente per i tre microscopi considerati e utilizzando i seguenti parametri: campo di vista (FOV, field of view) di 4 micron, apertura numerica (NA, numerical aperture) 1.3, indice di rifrazione del mezzo tra l'obiettivo e il campione 1.518 (immersione in olio), lunghezza d'onda di emissione 0.52 micron (verde), lunghezza d'onda di eccitazione 0.488 micron (campo largo e confocale; blu), 0.9 micron (due fotoni; vicino infrarosso), numero pixel in cui è rappresentato il

<sup>1</sup> A variazioni della posizione della sorgente puntiforme sul piano dell'immagine non corrisponde alcuna variazione della forma della PSF (ma solo una variazione della sua posizione).

FOV 512 x 512, numero piani lungo l'asse ottico 128, distanza fra i piani 0.03 micron (solo per avere un dettagliato calcolo teorico, generalmente la spaziatura minima tra le immagini e' di circa 0,1 micron). Per ognuno dei tre casi sono stati riportate le tre proiezioni ortogonali dei piani centrali.

In virtù del fatto che la risposta all'impulso caratterizza pienamente un sistema di formazione di immagini, si può sfruttare la PSF come un utile strumento per confrontare le prestazioni e le caratteristiche di diversi apparecchi: per esempio, tra i parametri fondamentali di un microscopio, la risoluzione assiale e laterale<sup>2</sup> è strettamente legata all'estensione assiale e laterale rispettivamente della PSF. Figura 4 mette a confronto i profili assiali delle PSF mostrate nelle figure precedenti: il microscopio confocale presenta la PSF più stretta (di fatto in entrambe le direzioni), cosa che spiega il vantaggio di questa tecnologia in termini di risoluzione rispetto a quella convenzionale.

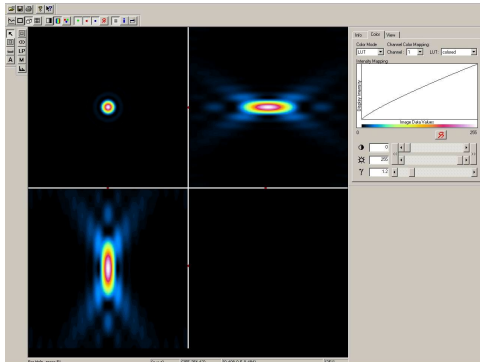


Figura 1: PSF del microscopio a campo largo

<sup>2</sup> La risoluzione è definita come la distanza minima fra due sorgenti puntiformi, affinché queste possano essere sufficientemente distinte.

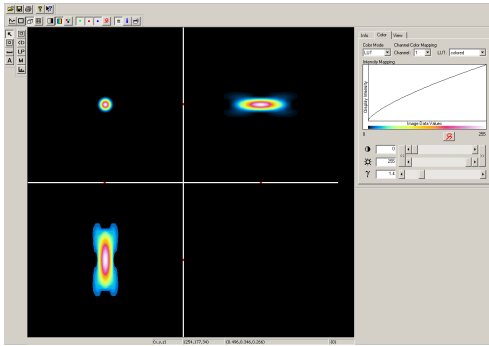


Figura 2: PSF del microscopio confocale

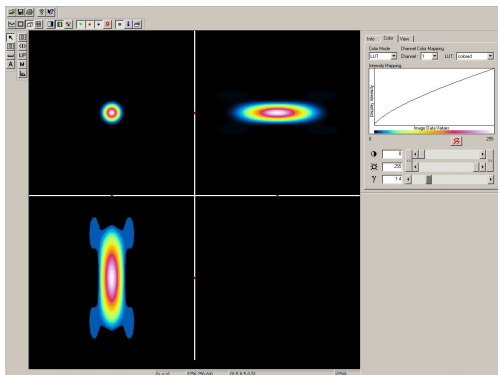


Figura 3: PSF del microscopio a due-fotoni

Confronto fra i profili assiali delle PSF calcolate

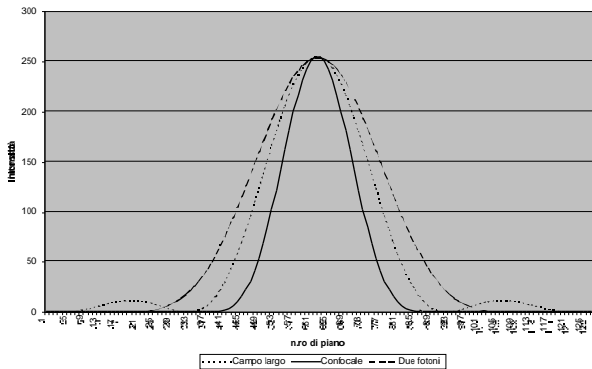


Figura 4: Confronto tra i profili assiali delle PSF calcolate

## Il processo di elaborazione di immagini

Nell'ambito delle tecniche di ricostruzione 3D di un oggetto a partire da immagini 2D, sta assumendo crescente importanza quella che si avvale di acquisizioni dell'oggetto a diversi piani di fuoco grazie ad un opportuno sistema ottico. Questo metodo è particolarmente utile per studiare cellule ed organi cellulari, poiché permette di analizzare i campioni biologici senza danneggiarne la struttura e le funzioni.

L'idea di base è che, quando un microscopio è focalizzato su un particolare piano dell'oggetto, l'immagine che si acquisisce risulta formata dalla sovrapposizione del piano a fuoco e dei piani fuori fuoco. Ciascuno di questi contributi è più o meno influente, a seconda della sua distanza dal piano a fuoco. Inoltre, i pesi relativi ai vari contributi aumentano quanto più il piano a fuoco si scosta dal piano a miglior contrasto. Per quanto affette da rumore e da contributi fuori fuoco, le immagini forniscono informazioni riguardo alla struttura 3D del campione nel suo insieme, modificata dal sistema ottico in modo deterministico. Pertanto, fatte le opportune ipotesi di linearità e di stazionarietà, la conoscenza della risposta all'impulso del sistema e l'utilizzo di un insieme completo di immagini acquisite per un dato oggetto permettono di ricostruire un'ottima stima del campione in esame.

Da un punto di vista matematico, l'oggetto iniziale  $f(x, y, z)$  e la PSF  $h(x, y, z)$  sono legati da un prodotto di convoluzione: i dati registrati da un microscopio - ottenuti mettendo a fuoco l'oggetto a diverse quote lungo l'asse ottico  $z$  - in assenza di rumore e in condizioni di linearità e stazionarietà, sono descritti da

$$g(x, y, z) = f(x, y, z) * h(x, y, z) \quad (1-1)$$

e dipendono da  $z$  a seconda dei diversi piani di fuoco dell'oggetto. L'effetto dell'operazione di convoluzione è uno sfuocamento (blurring) del campione. Tale effetto è tanto più pronunciato quanto più ampia è l'ampiezza a mezza altezza (*full-width at half-maximum*, FWHM) della PSF, come nel caso del microscopio a campo largo. Nei casi pratici, i dati registrati sono degradati da due ulteriori componenti: la presenza di background dovuta all'autofluorescenza e di noise dovuto al conteggio dei fotoni.

L'obiettivo dell'elaborazione di immagini è di ottenere una stima ottima di  $f(x, y, z)$ , ovvero ragionevolmente accurata secondo un qualche criterio, riducendo l'effetto del blurring e, possibilmente, del background. Ciò significa affrontare un problema inverso: problema, che può essere risolto ad esempio applicando un algoritmo di deconvoluzione.

Power Up your Microscope implementa tre particolari metodi di deconvoluzione: il filtro di Tikhonov-Miller come metodo lineare, il metodo di Landweber proiettato, come approccio iterativo di regolarizzazione e l'algoritmo di Expectation-Maximization come tecnica di massima verosimiglianza.

Un confronto della bontà dei diversi schemi deve considerare due fattori: la qualità della ricostruzione e il costo computazionale, quest'ultimo sia in termini spaziali che temporali. Le Figure 5-8 riportano alcuni esempi dei metodi di deconvoluzione: si tratta di viste volumetriche rispetto a vari piani di un campione acquisito con microscopio confocale, di volume 256x256x64. In particolare, Figura 5 è l'immagine come ottenuta direttamente dallo strumento e rappresenta l'incrocio di due teste di spermatozoo maturo di *Eledone cirrhosa*. Le tre figure successive illustrano un'elaborazione con ognuno dei tre metodi rispettivamente. Da una semplice analisi visiva è possibile notare come l'immagine originale appaia molto sfuocata, rendendo difficile identificare la struttura del campione. Nelle immagini elaborate la struttura elicoidale del campione è più evidente ed è inoltre possibile cogliere maggiori dettagli all'interno dello stesso. L'elaborazione con il metodo di Tikhonov-Miller dà luogo ad un effetto di ringing ai bordi del campione, la cui intensità varia in funzione di un parametro proprio del metodo ed è inversamente proporzionale all'intensità del blurring. Pertanto risulta fondamentale trovare un valore di tale parametro che produca un accettabile compromesso tra ringing e blurring. Le elaborazioni ottenute

con metodi iterativi forniscono invece risultati migliori dal punto di vista qualitativo, ma, come vedremo, al prezzo di maggiori costi computazionali. Anche questi metodi richiedono la stima di un parametro che in questo caso è il numero di iterazioni. Al fine di alleviare l'utente da tale scelta, che si rivela fondamentale per ottenere ricostruzione di qualità accettabile, *PowerUp Your Microscope* stabilisce internamente dei valori che producono un risultato accettabile in una gamma di condizioni sufficientemente ampia.

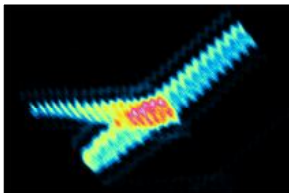


Figura 5: Immagine acquisita

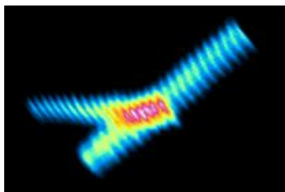


Figura 6: Immagine elaborata con Tikhonov

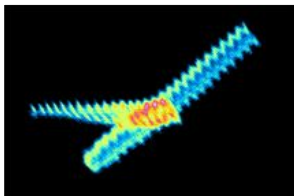


Figura 7: Immagine elaborata con Landweber

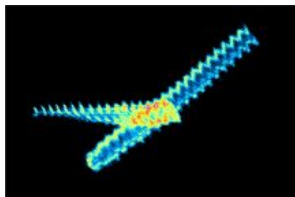


Figura 8: Immagine elaborata con EM

Lo studio dei costi temporali viene effettuato in funzione della dimensione del set da analizzare e, per i due metodi iterativi, del numero di iterazioni effettuate.

Il metodo che richiede minor tempo di esecuzione è il filtro di Tikhonov – Miller, dal momento che non segue uno schema iterativo e la deconvoluzione è realizzata in un passo unico. Tale metodo sembra quindi il più indicato per fornire all'utente un preview dei risultati ottenuti, lasciando a questo la scelta di ricercare una soluzione più accurata utilizzando uno dei metodi iterativi, che, come abbiamo visto, forniscono risultati migliori in termini di qualità. Un confronto più dettagliato dei costi temporali per i tre metodi è riassunto dal grafo riportato sotto sulla sinistra.

La stima dei costi spaziali serve per individuare le caratteristiche che deve possedere il server su cui risiede l'applicazione. Se la memoria richiesta dall'algoritmo supera la RAM disponibile sul calcolatore, i dati sono paginati su disco e ciò provoca un rallentamento nell'esecuzione degli algoritmi, già comunque onerosi temporalmente nel caso iterativo. Un confronto più dettagliato dei costi spaziali per i tre metodi è riassunto dal grafo riportato sotto sulla sinistra.

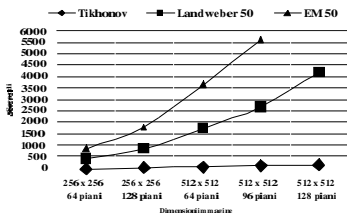


Figura 9: La complessità temporale

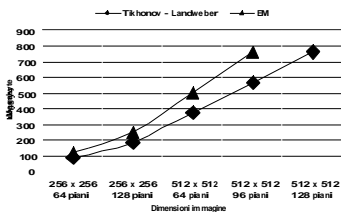


Figura 10: La complessità spaziale

## L'interfaccia utente e il ruolo della tecnologia WEB.

Lo scopo principale dell'interfaccia è di fornire all'utente accesso al servizio di elaborazione immagini. Dietro questo compito si nasconde il ruolo di "regista" dei vari moduli di cui è composto il pacchetto, descritti nelle sezioni precedenti, nonché di alcune utilities che completano il tutto: queste includono per esempio la gestione di un database per organizzare i dati relativi agli utenti e le informazioni riguardanti gli apparecchi di acquisizione; il trasferimento dei dati tra le macchine client e server; un modulo di compressione e rispettiva decompressione dei file per accelerarne l'upload e il download.

I dettagli implementativi di tali aspetti esulano dallo scopo di questa pubblicazione, in quanto di natura puramente informatica. Ci limitiamo in questa sede ad illustrare l'interfaccia web dal punto di vista di un utente virtuale che accede al sito: a seconda del suo particolare contesto egli viene guidato lungo uno fra vari percorsi possibili, che lo conduce al risultato finale. L'insieme dei possibili percorsi è rappresentato dal grafo di e le tre principali situazioni sono descritte di seguito.

1. **Nuovo utente:** in questo caso, la condizione necessaria per poter proseguire è effettuare la registrazione. Come illustrato in questo prevede l'inserimento di alcuni dati, che vengono registrati nel database. Parte sono relativi all'utente stesso, come i dati anagrafici, i recapiti e la password, altri sono riferiti al tipo di microscopio. L'utente procede accedendo al sistema come utente registrato, come descritto al passo seguente.
2. **Effettuare una deconvoluzione:** Questa è la situazione in cui si trova un utente già registrato, che vuole sottoporre un set di immagini da elaborare. Dopo il login, di nuovo gli vengono richieste una serie di informazioni () di cui viene presa nota nel database. Si tratta dei dati relativi al microscopio e al set di immagini, necessari per la determinazione della PSF. I parametri relativi alla ricostruzione sono invece interamente gestiti dal sistema e all'utente viene chiesto solo di scegliere uno fra due metodi di elaborazione descritti come "slow and powerful" e "fast but inaccurate" rispettivamente. Il terzo metodo (Tikhonov, "immediate but rough") è sfruttato per il preview dei risultati.

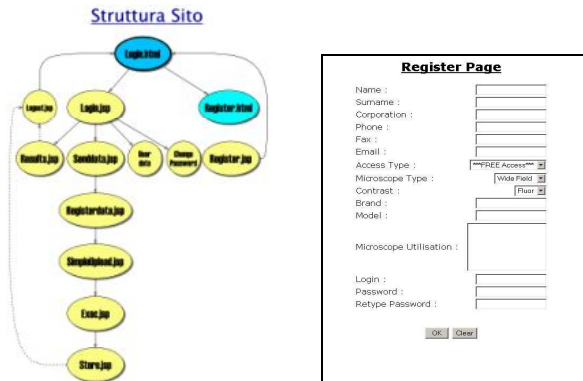


Figura 11: L'organizzazione del sito

Figura 12: La pagina di registrazione, da compilarsi per ogni nuovo utente

**Send Data Page**

---

**Microscope Parameters**

Numerical Aperture :   
Immersion Medium Refractive Index :   
Emission WaveLength :   
Excitation WaveLength :

---

**Image Parameters**

X Axis Pixels :   
Y Axis Pixels :   
Planes Number :   
Field of View (micron):   
Slice Spacing (micron):   
Image Format :

---

**Image Reconstruction Type**

Type :

[Logout](#)

Figura 13: Dati necessari per l'elaborazione

**Results Page**

Welcome Alberto Diaspro

Below the List of your Results ready to Download

Download File	Date and Time of Creation	Reconstruction Type
<a href="#">incroci03.zip</a>	2002-04-15 02:32:48	fast

[Logout](#)

Figura 14: Pagina dei risultati

Dopo aver fornito questi dati si deve inviare al sistema il set di immagini acquisite, che deve preventivamente essere inserito in uno dei più diffusi tipi di archivio compressi, il formato *ZIP*, per velocizzare i tempi di trasferimento. Dalla pagina **SimpleUpload.jsp**, tramite un opportuno browser, si può navigare sul disco rigido locale per scegliere l'archivio da inviare. Il pacchetto prosegue creando la PSF del sistema di acquisizione, per mezzo della quale il modulo di deconvoluzione si occupa del miglioramento delle immagini. Al termine di tale processo l'utente viene avvisato tramite l'invio di una E-mail automatizzata che lo informa della presenza dei risultati che attendono di essere scaricati: egli accede nuovamente al sistema nella veste di utente registrato,

3. **in attesa dei risultati** effettuato un nuovo login, viene condotto alla pagina **Results.jsp** () dove sono riassunte alcune informazioni del lavoro eseguito e da cui si possono scaricare i risultati.

## Conclusioni

Abbiamo presentato un nuovo approccio alla ricostruzione di immagini tridimensionali da sezioni ottiche realizzate con tecniche di microscopia convenzionale, confocale e a due fotoni. Si tratta di una vera e propria nuova filosofia di lavoro che vorrebbe accrescere l'uso di algoritmi e programmi adeguati per il recupero di informazioni tridimensionali da sistemi biologici.

La nostra esperienza nei settori della programmazione, della microscopia e dell'elaborazione di immagini e la oltre che ventennale collaborazione con ricercatori provenienti da aree diverse ci ha permesso di individuare una problematica non strettamente scientifica ma di ordine pratico riguardante l'uso delle tecniche microscopiche. La necessità di disporre di immagini tridimensionali da campioni biologici ottenute in condizioni quasi fisiologiche è un dato di fatto. Anche l'importanza dell'estrazione di dati quantitativi è assolutamente rilevante. Questo andare "oltre" rispetto all'acquisizione di un insieme di immagini tridimensionali richiede l'utilizzo di programmi complessi e delicati che utilizzano calcolatori o sistemi operativi dedicati. Il ricercatore che ne individua la rilevanza e la necessità fa un primo passo verso l'acquisizione di software adeguato ma dopo pochissimo tempo abbandona l'uso di tale software perché sposta l'asse dei suoi interessi verso un terreno dove non può o non vuole cimentarsi. Inoltre il software specialistico chiede all'utente un impegno anche in termini di manutenzione e di investimento in calcolatori. Generalmente l'utente è già sufficientemente coinvolto dalla problematica biofisica, medica o biologica e non può distrarre risorse altrove pur ritenendo indispensabile l'utilizzo di nuovi strumenti per arricchire la propria indagine. Qui si inserisce la nuova filosofia di lavoro cui si accennava. In questo contesto abbiamo operato e riversato la nostra esperienza non solo in quanto progettatori/ici e realizzatori/ici di software o di microscopisti/e ma anche in quanto utilizzatori/ici. La tecnologia WEB, ormai sempre più utilizzata nel quotidiano ci permette di poter proporre questo approccio in ogni laboratorio ove sia presente un microscopio per la ricerca o per l'analisi. La tecnologia WEB offre la possibilità di realizzare strumenti avvalendosi di quella che viene definita architettura client-server.

In effetti, i vantaggi dell'architettura client-server influenzano proprio la "nuova filosofia di lavoro", ma non incidono in termini di efficienza computazionale. In altre parole, il cuore del programma, cioè l'elaborazione delle immagini e la modellizzazione del processo di formazione delle immagini tramite la definizione della PSF del sistema, mantiene una struttura tradizionale, e non si avvantaggia in alcun modo dei benefici offerti dalla rete, come per esempio un'eventuale parallelizzazione del codice per sfruttare un'architettura distribuita o parallela. Questo aspetto, tuttavia, rappresenta certamente una possibile estensione futura.

Gli utenti interessati a ricevere l'indirizzo del sito dove e' operativo Power Up your Microscope in versione di rodaggio e gratuita possono inviare un e-mail a [diaspro@fisica.unige.it](mailto:diaspro@fisica.unige.it) specificando nel soggetto "Power Up your Microscope – richiesta di accesso".

### **Bibliografia utile**

**(prevalentemente da articoli apparsi su Biologi Italiani, dove e' possibile trovare un riferimento bibliografico esteso ed approfondito)**

- 1) M. Bertero, P. Boccacci, Introduction to inverse problems in imaging, Institute of Physics Publishing, Bristol and Philadelphia (1998)
- 2) K.R. Castleman Digital image processing. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ (1996)
- 3) A.Diaspro (ed.), Confocal and Two-photon microscopy: Foundations, Applications and Advances, Wiley-Liss, New York (2002)
- 4) A.Diaspro (ed.) Immagini dal microcosmo. Quaderni de Le Scienze, n.123, Dicembre2001.
- 5) A.Diaspro, Eidologia Informatica, in "Multimedialita', comunicazione e formazione" (G.Peirone, curatore), Compagnia dei Librai (Genova), pp.41-72, 1994.
- 6) F.Beltrame, A.Diaspro, M.Fato, S.Schiappacasse, I.Sobel, Analisi tridimensionale di oggetti biologici con tecniche di microscopia a campo largo e confocale, Biologi Italiani, XXV(2), pp.26-37, 1995
- 7) A.Diaspro, Introduzione alla Eidologia Informatica, Biologi italiani, XXVII(1), pp.11-17, 1997.
- 8) A.Palmeri, A.Diaspro, Elaborazione di immagini: compressione dati e formati file, Lettere GIC, vol.6(1), pp.28-32, 1997.
- 9) A.Diaspro, S.Annunziata, C.Amico, Microscopia a scansione laser con singola apertura e accoppiamento in fibra ottica, Biologi italiani, XXVIII(5), pp. 23-27, 1998.
- 10) A.Diaspro, S.Annunziata, M.Raimondo, C.Amico, M.Corusu, M.Fazio, P.Ramoino, Microscopia confocale a scansione con eccitazione della fluorescenza a due fotoni, Biologi Italiani, XXIX(2), pp.12-18, 1999.
- 11) L.Gallus, A.Diaspro, M.Fato, F.Beltrame, G.Tagliaferro, Ricostruzione tridimensionale da immagini microscopiche, Biologi Italiani, 2001.
- 12) P.Capiluppi (ed.) Reti Informatiche, Quaderni de Le Scienze, n.95, Aprile 1997.
- 13) W.L Oellerman Jr., Architecturing WEB services, Apress ([www.amazon.com](http://www.amazon.com)), 2001.