

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZE
FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI
TESI DI LAUREA TRIENNALE
INDAGINE SPETTROSCOPICA COMBINATA FLUORESCENZA-RAMAN SU
CAMPIONI DI TESSUTO CEREBRALE
CANDIDATA: SIMONA CHECCUCCI
RELATORE: PROF. FRANCESCO SAVERIO PAVONE
(E-MAIL: francesco.pavone@unifi.it)
ANNO ACCADEMICO 2008/2009

Questo lavoro di tesi consiste in un'indagine spettroscopica combinata di fluorescenza e Raman su campioni *ex vivo* di tessuto cerebrale tumorale e displastico, escissi da pazienti in età pediatrica. Sono state fatte indagini spettroscopiche di lesioni cerebrali con diverse sorgenti laser operanti nel range spettrale del visibile e del vicino IR al fine di sondare le caratteristiche spettroscopiche del tessuto in esame tramite un'analisi multiparametrica. In particolare sono state usate come sorgenti per l'eccitazione di luce fluorescente due diodi laser a 378 nm e a 445 nm, viceversa come sorgente per l'eccitazione della radiazione Raman è stato usato un diodo a 785 nm. Ogni campione analizzato in laboratorio è stato sottoposto in seguito ad analisi istologiche. Tali esami istologici hanno presentato diagnosi che differiscono da campione a campione, pertanto è stato deciso suddividere l'insieme in due sottogruppi: *displasie* e *tumori*, e di farne un confronto diretto. Per ogni campione analizzato sono stati raccolti circa dieci spettri; tali immagini si presentano come un file dati su due colonne: la prima esprime il numero di pixel longitudinali della CCD (che è stato poi riconvertito in lunghezze d'onda tramite il procedimento di calibrazione) ed è uguale per ogni spettro, la seconda conteggia il numero di fotoni rivelati (cioè l'intensità della radiazione). Un unico spettro significativo è stato estratto tramite la tecnica PCA (*Principal Component Analysis*), con cui si è calcolata la base più significativa con cui re-esprimere il set di dati affetti da segnale spurio, ottenendo una nuova base in grado di filtrare il rumore e rivelare il segnale di interesse. Per i campioni eccitati in fluorescenza, lo spettro uscente dalla PCA è già lo spettro rappresentativo del segnale di emissione fluorescente; per l'emissione Raman invece, è necessario procedere alla rimozione del segnale di *background*. A questo scopo è stato utilizzato il metodo del *fit polinomiale*, che consiste nell'approssimazione del segnale di *background* ad una funzione polinomiale, che viene poi sottratta alla totalità del segnale raccolto, per rendere soltanto lo spettro Raman. Dunque l'insieme di spettri risultanti è stato suddiviso per tipologia (fluorescenza a 378 nm e a 445 nm e diffusione Raman a 785 nm), e per classe di lesione (displasia o tumore): da ciascun sottogruppo è stato estratto un unico spettro significativo, sempre attraverso la PCA. È stata inoltre calcolata la varianza di tale spettro, il cui ampio contributo è conseguenza della variabilità biologica, che rende le misure sui campioni biologici, più delle misure di altre grandezze fisiche, soggette a inevitabili variazioni. Infine sono stati confrontati direttamente gli spettri di displasie e tumori e sono state sottolineate le differenze, tentando di darvi un'interpretazione. Dal confronto tra gli spettri appartenenti a lesioni diverse è emersa la possibilità di discriminare displasie da tumori, sia attraverso l'emissione di fluorescenza che attraverso la diffusione Raman; tuttavia è stato osservato che, a causa della disomogeneità dei campioni analizzati, i risultati ottenuti non possono essere considerati definitivi e presentano ancora ampi margini di miglioramento.

La stesura dell'elaborato di tesi si articola in una parte introduttiva, nella quale sono delineati i fondamenti teorici alla base delle procedure sperimentali, con particolare attenzione nella descrizione del fenomeno di emissione di fluorescenza e di diffusione Raman. In seguito sono fornite le specifiche tecniche dell'apparato sperimentale con cui sono state effettuate le misure sui campioni e la descrizione dei metodi utilizzati nell'analisi dei dati. Il capitolo conclusivo illustra il contributo personale che ho fornito al progetto: la taratura dell'apparato sperimentale e l'analisi delle misure svolte. Infine vengono presentate le conclusioni cui questo studio ha condotto.