



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE

FACOLTA' DI INGEGNERIA

Corso di Laurea triennale in Ingegneria Biomedica

Tecniche ottiche per la valutazione dell'età di contusioni

Optical techniques for the evaluation of bruise age

RELATORE:

Prof.ssa Martarelli Milena

Tesi di laurea di:

Valeria Uccella

CORRELATORE:

Dott.ssa Discepolo Silvia

A.A. 2023/2024

*Ai miei nonni,
i miei angeli custodi
Dalla mia parte di terra
alla vostra parte di cielo*

Sommario

Lista delle Figure	vii
Lista delle Tabelle	ix
Introduzione	1
Stato dell'arte	2
Capitolo 1 Spettrofotometria di Riflettanza	4
1.1 Introduzione	4
1.2 Identificazione di lividi mediante lo spettro	4
1.2.1 Analisi delle misurazioni spettrofotometriche e valutazione dei valori CIEL*a*b ...	6
1.2.2 Valutazioni delle misurazioni spettrofotometriche e CIEL*a*b con misure specifiche di giallo	8
1.3 Discussione degli studi.....	12
1.4 Ulteriori campi di applicazione	13
Capitolo 2 Immagine Chimica Iperspettrale	15
2.1 Introduzione	15
2.2 Identificazione dei lividi mediante l'immagine iperspettrale	15
2.2.1 Confronto tra spettrofotometria e immagine iperspettrale per l'analisi delle contusioni i.....	17
2.2.2 Confronto tra immagine iperspettrale e metodo fotografico per la valutazione delle contusioni ion i.....	20
2.2.3 Applicazione dell'immagine iperspettrale per la caratterizzazione delle contusioni in modelli animali e umani	23
2.3 Discussione degli studi.....	28
2.4 Ulteriori campi di applicazione	29
Capitolo 3 Radiometria Fototermica Pulsata	30
3.1 Introduzione	30
3.2 Identificazione dei lividi mediante azione combinata di DRS e PPTR	30
3.2.1 Valutazione dell'approccio combinato DRS-PPTR per la stima dell'età del livido: analisi dei parametri ottici e modelli numerici	32
3.2.2 Analisi dell'efficacia dell'approccio DRS-PPTR nella determinazione dell'età di un livido: confronto tra simulazione analitica e metodo inverso	38
3.3 Discussione degli studi.....	44
3.4 Ulteriori campi di applicazione	44
Conclusioni	46
Sviluppi futuri	46
Appendice A	47

Appendice B	48
Bibliografia.....	50
RINGRAZIAMENTI	52

Lista delle Figure

Figura 1.1 – Schema dei processi chimici/fisiologici. Figura presa da [3]	2
Figura 1.1 – Schema del setup di una sonda in fibra ottica Cary. Figura presa da [1]	5
Figura 1.2 – Assorbanza degli spettri per lividi a diverse lunghezze d'onda.....	7
Figura 1.3 – Prima derivata dell'assorbanza degli spettri per lividi.....	7
Figura 1.4 – Correlazione tra i valori colorimetrici "b" e le prime derivate a 490 nm. Figura presa da [1]	8
Figura 1.5 – Frequenza dei soggetti e delle scansioni effettuate per categorie di costituzione fisica, dimensione del livido e grado di trauma, sito del livido e profondità del livido. Figura presa da [2]	10
Figura 1.6 – Andamenti temporali della prima derivata a 490 nm (a sinistra) e della tonalità di giallo ASTM E313 (a destra). Figura presa da [2]	11
Figura 1.7 – La giallezza ASTM E313 divisa per la prima derivata a 490 nm rispetto al tempo. Figura presa da [2]	11
Figura 2.1 – Diverse immagini a lunghezze d'onda selezionate e lo spettro del pixel. Figura presa da [10]	16
Figura 2.2 – Risultati ottenuti dalla Nikon 8400 registrando le immagini in formato tiff. Figura presa da [7]	18
Figura 2.3 – Risultati dei calcoli della prima derivata dell'immagine iperspettrale (in alto) e della spettrofotometria di riflettanza (in basso). Figura presa da [7].....	19
Figura 2.4 – (A) Immagine RGB del primo livido. (B) Spettro dei pixel (punti) e adattamento spettrale (linea). Figura presa da [8]	20
Figura 2.5 – Punti: aree misurate di emoglobina e bilirubina. Linee: aree simulate di emoglobina e bilirubina. Figura presa da [8].....	21
Figura 2.6 – Punti: Aree misurate di emoglobina e bilirubina del primo livido. Linee: Aree simulate di emoglobina e bilirubina del primo livido. Figura presa da [8]	22
Figura 2.7 – Punti: Aree misurate di emoglobina e bilirubina. Linee: aree simulate di emoglobina e bilirubina. (A) Secondo livido, (B) Terzo livido. Figura presa da [8]	23
Figura 2.8 – Classificazione delle lesioni da paintball 2 ore dopo l'infortunio. Pannello sinistro: immagine RGB. Pannello centrale: classificazione SAM della lesione. Pannello destro: spettri degli endmember. Figura presa da [9].	25
Figura 2.9 – Classificazione delle lesioni da paintball 43 ore dopo l'infortunio. Figura presa da [9]	25
Figura 2.10 – Immagine a sinistra: 2 ore. Immagine a destra: 43 ore. Figura presa da [9]	26
Figura 2.11 – Pannello superiore: 2 ore, classe 2, parte centrale del livido. Pannello inferiore: 43 ore, classe 3, parte centrale del livido. Figura presa da [9].....	27
Figura 3.1 – Schema della geometria e dei processi coinvolti nell'evoluzione di un livido. Figura presa da [14]	31
Figura 3.2 – Fotografia del livido del soggetto A in tempi diversi dopo l'infortunio. Figura presa da [13]	33
Figura 3.3 – (a) Spettro di riflettanza diffusa (DRS) e (b) segnale di radiometria fototermica pulsata (PPTR) del soggetto A. In (a) le frecce verticali grigie indicano le lunghezze d'onda incluse nell'analisi IMC dei dati DRS. Figura presa da [13].....	34
Figura 3.4 – (a) Spettri DRS e (b) segnali PPTR ottenuti dal sito di pelle intatta (linee grigie e rosa) rispetto al sito del livido nel soggetto A in momenti diversi dopo l'infortunio. Figura presa da [13]	35

Figura 3.5 – (a) Frazioni di volume di sangue nel derma papillare e reticolare, e concentrazione di bilirubina; (b) livelli di ossigenazione del sangue in entrambi gli strati dermici. Figura presa da [13]	35
Figura 3.6 – (a) Segnali DRS e (b) segnali PPTR acquisiti dal livido del soggetto A 119 ore dopo l'infortunio (linee arancioni). Figura presa da [13].....	36
Figura 3.7 – Discrepanza relativa tra i valori di riflettanza diffusa misurati e quelli previsti dal modello nelle analisi IMC dei lividi nei tre soggetti a diversi intervalli di tempo dopo l'infortunio. Figura presa da [13]	37
Figura 3.8 – Confronto dell'evoluzione temporale valutata del coefficiente di scattering dermico a_{der} nei tre soggetti inclusi. Figura presa da [13]	37
Figura 3.9 – (a) Soluzione analitica DA; (b) approccio inverso MC. Figura presa da [14]	39
Figura 3.10 – Segnali radiometrici risultanti. Figura presa da [14].....	40
Figura 3.11 – Profili di temperatura ottenuti dalla simulazione numerica della deposizione di energia laser nella misurazione PPTR. Figura presa da [14]	41
Figura 3.12 – Confronto delle norme residue di DRS e PPTR nella pelle sana per per diversi approcci di fitting. DA analitico (arancione), MC inverso (rosso), PPTR (viola) e fitting combinato (blu). Figura presa da [14]	42
Figura 3.13 – Confronto del DRS generato da MC nella pelle contusa 72 ore dopo l'infortunio (linea continua) e i migliori spettri simulati di fitting (tratteggiati) ottenuti utilizzando (a) la soluzione analitica DA e (b) l'approccio MC inverso. Figura presa da [14]	42
Figura 3.14 – Confronto del segnale PPTR generato da MC nella pelle contusa 72 ore dopo l'infortunio (grigio, linea continua) e il miglior segnale simulato (rosso, linea tratteggiata). Figura presa da [14].....	43
Figura 3.15 – Confronto di (a) norme residue e (b) diffusività di massa dell'emoglobina (D) ottenuta per diversi approcci di fitting nell'analisi degli spettri DRS e del segnale PPTR nella pelle contusa: DA analitico (arancione), MC inverso (rosso), PPTR (viola) e fitting combinato (blu). Figura presa da [14]	43

Lista delle Tabelle

Tabella 3.1 – Informazioni base sui soggetti inclusi e i lividi. Tabella presa da [13] 32

Introduzione

La valutazione dell'età di un livido è un importante problema nella medicina forense. Attualmente, la colorimetria e l'ispezione visiva sono le tecniche più utilizzate. Attraverso l'ispezione visiva è possibile determinare se un livido è recente o vecchio (più di 18 ore dalla formazione), in base alla presenza o all'assenza del colore giallo. Tuttavia, tali osservazioni si basano sull'esperienza dell'esaminatore, quindi sono per loro stessa natura soggettive e potrebbero essere non affidabili. Nel presente elaborato si descriveranno tre diverse tecniche: la spettroscopia di riflettanza, l'immagine chimica iperspettrale e l'azione combinata di radiometria e spettrofotometria. L'obiettivo è determinare se tali tecniche possono essere considerate dei metodi oggettivi, non invasivi e scientificamente validi per la determinazione dell'età di un livido. L'elaborato è strutturato in tre capitoli, ognuno dedicato a una delle tecniche. All'interno di ogni capitolo, facendo riferimento a diversi studi, verranno esaminati i vantaggi e gli svantaggi delle tecniche analizzate. Inoltre, in ogni capitolo sarà presente una sintesi dei risultati ottenuti dagli studi e saranno specificati ulteriori campi di applicazione per ogni tecnica.

Stato dell'arte

In questa sezione viene illustrato il processo di formazione del livido, la cui età sarà valutata utilizzando le tre tecniche descritte nel documento. Dallo studio effettuato in [3], si può affermare che un livido rappresenta il rilascio di sangue nei tessuti in seguito ad una lesione da forza contundente che non causa una rottura sulla superficie della pelle stessa. Nelle prime fasi, i vasi sanguigni vengono strappati e il sangue fuoriesce nell'area lesionata. Questo sanguinamento può continuare per un breve periodo dopo l'impatto, e il livido inizia a formarsi nelle prime 24-48 ore. Sebbene il colore del sangue sia rosso a causa dell'emoglobina, l'aspetto del sangue stravasato nella pelle varia a seconda della sua ossigenazione e della profondità della sua posizione sotto la superficie. La Figura 1.1 rappresenta lo schema del processo di formazione di un livido. Dopo il rilascio di sangue nei tessuti, si verifica una reazione infiammatoria. Inizialmente, il sangue è prevalentemente sotto forma di ossiemoglobina, che cede ossigeno ai tessuti trasformandosi principalmente in deossiemoglobina. Successivamente, i macrofagi vengono reclutati dal sistema vascolare nell'area lesionata, dove assorbono i globuli rossi e metabolizzano l'emoglobina in biliverdina, che viene poi convertita in bilirubina. Il colore di un livido, quindi, dipende dall'emoglobina e dai suoi prodotti di degradazione. La presenza di bilirubina è da associare al colore giallo che si osserva durante le fasi di guarigione del livido. Durante questo processo, emoglobina e bilirubina coesistono, e la misurazione delle loro concentrazioni in soggetti viventi può rappresentare un metodo per determinare l'età del livido.

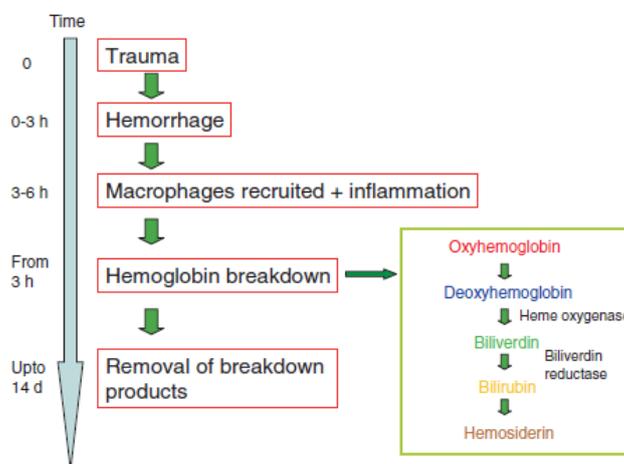


Figura 1.1 – Schema dei processi chimici/fisiologici. Figura presa da [3]

È importante ricordare che le caratteristiche ottiche della pelle influenzano la percezione del colore del livido, che può variare notevolmente tra gli osservatori. Questo perché, l'occhio umano percepisce i colori attraverso i coni presenti nella macula della retina, i quali contengono pigmenti che reagiscono a specifiche lunghezze d'onda della luce (rosso, verde e blu). Inoltre, i lividi superficiali appaiono più rossastri, mentre quelli localizzati negli strati più profondi tendono ad avere un aspetto più bluastrò. Questo fenomeno si spiega attraverso la dispersione di Rayleigh nel derma: le lunghezze d'onda della luce blu sono disperse e riflesse più di quelle rosse, motivo per cui i lividi sottocutanei appaiono blu. Uno studio sui lividi post mortem [4] ha permesso di classificare i lividi in tre categorie: sottocutanei, intracutanei e misti, in base allo strato di tessuto coinvolto. I lividi sottocutanei si formano direttamente nel sito d'impatto o indirettamente a causa dell'espansione locale dell'emorragia dagli strati più profondi, diventando visibili dopo alcuni giorni. La loro dimensione può variare da 0.5 a 14 cm sulla superficie della pelle. Nei soggetti viventi, questi lividi subiscono un cambiamento di colore da blu a verde e poi a giallo durante il processo di riassorbimento. I lividi intracutanei, invece, sono più piccoli, puntiformi e ben definiti rispetto ai lividi sottocutanei. Anche questi lividi cambiano colore, forma e prominenza nel tempo, in seguito della degradazione dell'emoglobina. Infine, i lividi misti coinvolgono sia la pelle che il sottocute e presentano una variazione di colore meno uniforme, quindi risultano essere un gruppo eterogeneo. La valutazione del colore di un livido è cruciale non solo per stimarne l'età, ma anche per localizzare l'origine del sanguinamento. È importante precisare che più un livido fresco appare rosso, più è localizzato superficialmente nel tessuto; al contrario, un colore blu indica una emorragia situata negli strati di tessuto più profondi.

Capitolo 1

Spettrofotometria di Riflettanza

1.1 Introduzione

Nel seguente capitolo si analizza la spettrofotometria di riflettanza, prendendo in considerazione gli studi descritti in vari articoli [1]–[2], per determinare se tale tecnica può rappresentare un metodo oggettivo e non invasivo per stimare l'età dei lividi. Il principio di funzionamento della tecnica si basa sulla variazione dell'intensità della luce a diverse lunghezze d'onda dopo l'interazione con il campione, che in questo caso è la pelle contusa. Il metodo, quindi, si basa sulla misurazione della luce riflessa dalla pelle non contusa (area di controllo) e dalle aree contuse, analizzando i cambiamenti cromatici e le caratteristiche spettrali che si verificano durante il processo di guarigione del livido.

1.2 Identificazione di lividi mediante lo spettro

Si vuole descrivere un metodo per ottenere spettri di riflettanza superficiale di alta qualità e riproducibili dei lividi sulla pelle di un volontario umano vivo. Le misurazioni sono state prese dal livido e da un'area di controllo (pelle non contusa), tenendo conto delle variabili ottiche della pelle. Come ci si aspetterebbe, c'è una differenza tra le diverse aree all'interno di un ematoma e tale variabilità complica il confronto tra lividi e potrebbe mascherare la presenza di prodotti di degradazione dell'emoglobina. Questo problema può essere superato ottenendo le derivate prime delle scansioni. In particolare, le curve di assorbanza di bilirubina ed ossiemoglobina mostrano una considerevole sovrapposizione che rende difficile valutare la concentrazione di bilirubina in presenza di emoglobina. Per tale motivo, le scansioni di riflettanza vengono trasformate, attraverso il metodo della prima derivata, in spettri che consentono di identificare i prodotti di degradazione dell'emoglobina per distinguere i lividi recenti da quelli vecchi. Questo perché, il calcolo della prima derivata consente di separare l'assorbimento attribuito alla degradazione dell'emoglobina (principalmente alla bilirubina, ma anche all'emosiderina) dall'assorbimento da parte

dell'emoglobina stessa. In particolare, la derivata (pendenza) è una funzione sensibile a rapidi cambiamenti nelle curve e amplificherà tali regioni mentre smorzerà le porzioni di curve che cambiano lentamente [5]. La derivata prima di una linea che sale rapidamente è un valore positivo elevato, per una linea che scende lentamente è un valore negativo basso, e quella di una linea piatta è zero. Nei due studi che si andranno a considerare si utilizza lo stesso strumento, lo Spettrofotometro Cary 100 Bio con una sonda a fibra ottica, mostrato in Figura 1.1. La sonda comprende un accoppiatore in fibra ottica per sostituire il portacuvette, un cavo in fibra ottica lungo 2 m e una sonda di riflettanza (diametro di circa 5 mm), montata all'interno di un supporto metallico (diametro di circa 30 mm). L'uso del cavo a fibra ottica offre la flessibilità necessaria per accedere ai lividi nei punti difficili da raggiungere. Va notato che la sonda registra solo la riflessione superficiale e catturerà solo i risultati dei processi biologici vicino alla superficie della pelle. La potenziale contaminazione della sonda, da parte di organismi presenti sulla pelle, è evitata inserendo un foglio di acetato trasparente per proiezione tra la superficie della pelle e il supporto. Un contorno, chiamato "bersaglio", che rappresenta il supporto, è copiato su un quadrato di acetato da 40 × 40 mm. Il centro dell'acetato è forato per consentire un percorso di luce senza ostacoli verso il campione ed evitare che il riflesso dell'acetato interferisca con gli spettri raccolti. Per ottenere la misurazione, il supporto è separato dalla pelle contusa dallo strato di acetato. Poiché la sonda è all'interno del supporto, non ha contatto con la superficie della pelle. Tuttavia, è necessario oscurare la stanza o schermare la sonda da illuminazioni incidentali, per evitare che la luce della stanza, canalizzata attraverso l'acetato, venga registrata dalla sonda. Il movimento della sonda e del cavo in fibra ottica deve essere minimizzato durante la cattura dello spettro perché qualsiasi movimento può creare rumore di fondo, compromettendo la riproducibilità del sistema.

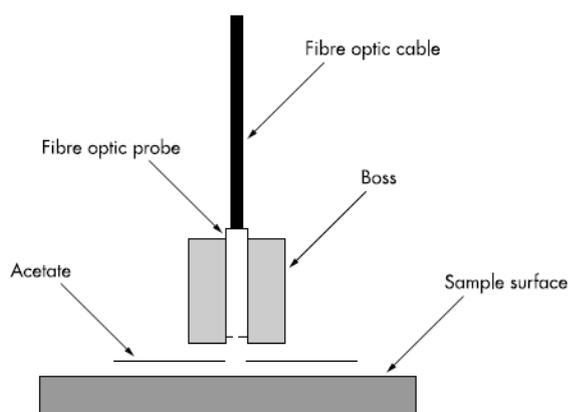


Figura 1.1 – Schema del setup di una sonda in fibra ottica Cary. Figura presa da [1]

1.2.1 Analisi delle misurazioni spettrofotometriche e valutazione dei valori CIEL*a*b

Nella seguente sezione verrà analizzato lo studio effettuato in [1], paragonando i dati ottenuti attraverso la spettrofotometria con i valori CIEL*a*b, con l'obiettivo di verificare l'affidabilità della tecnica. La spettrofotometria di riflettanza è stata precedentemente utilizzata per studiare i pigmenti e il colore della pelle umana vivente. Ad esempio, questo metodo è stato utilizzato per stimare la densità di melanina in individui bianchi per determinare la suscettibilità di un individuo ai tumori epidermici. Per ottenere gli spettri è stato utilizzato un spettrofotometro Cary 100 Bio UV-visibile dotato di un accoppiatore in fibra ottica Cary e una sonda di riflettanza in fibra ottica Cary. Sono state applicate correzioni dello zero e della linea di base. La sonda è stata posizionata sullo standard con uno strato interposto di acetato con la modalità di zero/linea di base selezionata. L'altezza ottimale della sonda all'interno del supporto è stata determinata trovando il punto di massima trasmissione della luce. Successivamente, è stata registrata la linea di base di riflettanza al 100%. Per impostare la linea di base dello 0%, il supporto è stato posizionato su un contenitore nero chiuso in cui un foro permette alla luce proveniente dalla sonda di entrare nel contenitore senza riflessione. Una volta che la sonda era in posizione, è stato ottenuto lo spettro di assorbimento del livido nel range compreso tra 780–380 nm. Una serie di misurazioni è stata effettuata nel sito di un livido fresco e, dopo tre giorni, il livido è stato nuovamente scansionato. Tutte le scansioni sono state eseguite dallo stesso operatore. La prima derivata di ogni scansione è stata calcolata utilizzando il calcolatore spettrale del software CaryWin UV. Sono state acquisite 50 scansioni di lividi da volontari umani vivi (con approvazione del comitato etico per la ricerca umana), in particolare sono state ottenute da 27 lividi prelevati da 25 volontari. L'età dei soggetti variava dai 22 ai 63 anni (media, 37,5; mediana, 36). Tutti i lividi sono stati acquisiti nelle normali attività quotidiane e sono stati studiati solo lividi su braccia o gambe. L'età del livido è stata accertata chiedendo al volontario e sono stati utilizzati solo i lividi per i quali il volontario poteva indicare con precisione il momento dell'infortunio. In Figura 1.2 sono mostrate le scansioni effettuate su diverse aree del livido fresco e sulle stesse aree del livido 3 giorni dopo, mostrando variazioni tra le diverse aree campionate. Tuttavia, in Figura 1.3 si è mostrato che quando vengono calcolate le derivate

¹ CIE: Commissione Internazionale per l'Illuminazione

prime di queste scansioni, la variabilità della linea di base viene eliminata e le curve sono approssimativamente confluenti nell'intervallo 510-470 nm. Notiamo inoltre che i picchi di assorbimento causati dall'emoglobina sono ancora presenti, ma sono ridotti in intensità e che non c'è alcun picco di assorbimento percepibile nell'intervallo 660-620 nm. Quindi, le derivate prime non mostrano alcuna evidenza di assorbimento come risultato della biliverdina.

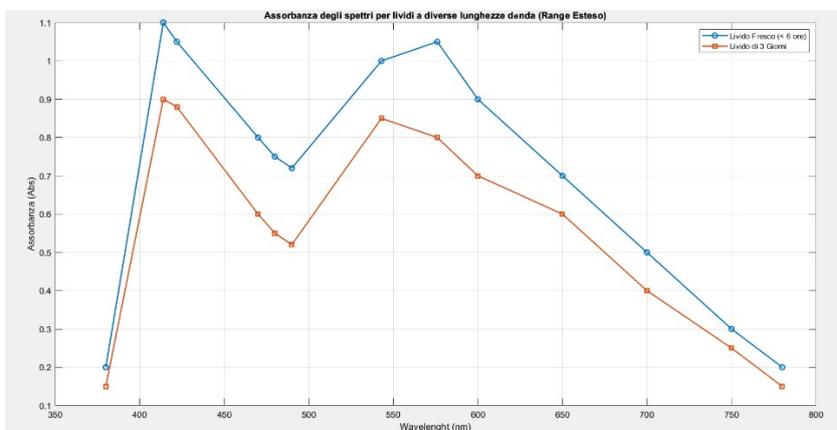


Figura 1.2 – Assorbanza degli spettri per lividi a diverse lunghezze d'onda

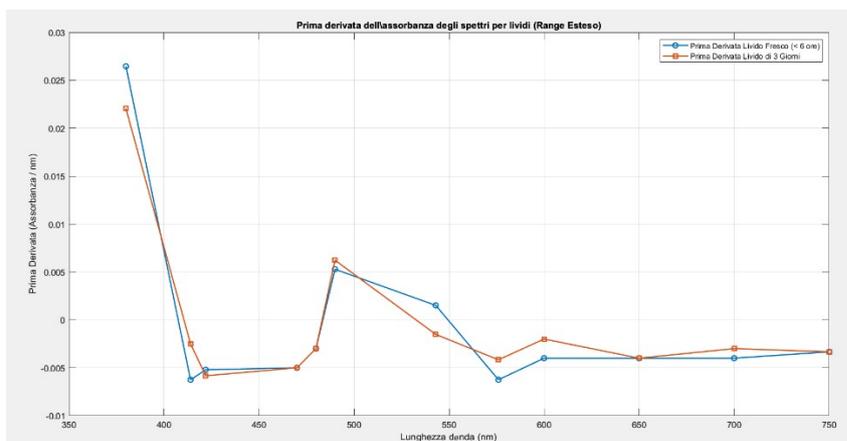


Figura 1.3 – Prima derivata dell'assorbanza degli spettri per lividi

I valori $CIE L^*a^*b^2$ sono stati calcolati sempre nel range compreso tra 780–380 nm utilizzando un intervallo di dati di 1 nm. La correzione è stata effettuata utilizzando gli zeri e le linee di base delle scansioni e da ciò si è determinato che un valore negativo di b^* indicava maggiore giallezza. Il valore colorimetrico "b" di 50 lividi, che variavano da 1 a

² Sistema di colori, dove il valore "b" è la coordinata giallo-blu, un valore positivo di b^* definisce la qualità del colore giallo, mentre un suo valore negativo definisce la qualità del colore blu, il valore "a" è la coordinata verde-rosso, una valore positivo di a^* definisce la qualità del colore rosso, mentre un valore negativo definisce la qualità del colore verde e il valore "L" è la luminosità del campione che va da totalmente nero ($L^*=0$) a totalmente bianco ($L^*=100$)

378 ore di età (mediana, 95), variava da 23,73 a 20,77 (mediana, 21,3). I valori della derivata prima a 490 nm variavano da 20,06 a 20,0002 Abs/nm (mediana, 20,001), e i valori della derivata prima a 480 nm variavano da 20,07 a 20,0002 Abs/nm (mediana, 20,002). Un'analisi di correlazione, mostrata in Figura 1.4, ha rivelato che un valore crescente negativo della derivata prima a 490 nm corrispondeva a un valore "b" più negativo (coefficiente di correlazione² = 0,78). La correlazione del valore della derivata prima a 480 nm non era altrettanto buona (coefficiente di correlazione² = 0,72). Il coefficiente di correlazione era migliore a 490 nm rispetto a quelli a 480 nm, suggerendo che la derivata prima a 490 nm è più utile nella determinazione dell'età di un livido.

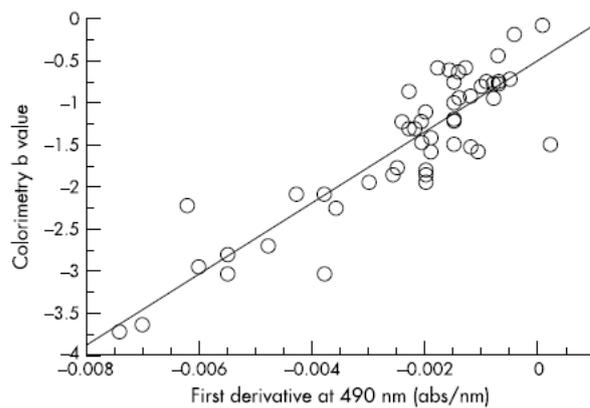


Figura 1.4 – Correlazione tra i valori colorimetrici "b" e le prime derivate a 490 nm. Figura presa da [1]

1.2.2 Valutazioni delle misurazioni spettrofotometriche e CIEL*a*b con misure specifiche di giallo

Nella seguente sezione verrà analizzato lo studio effettuato in [2], paragonando i dati ottenuti attraverso la spettrofotometria con i valori CIEL*a*b, con il fine di verificare l'affidabilità della tecnica. Si farà riferimento a misure specifiche di giallo E313 e D1925. Gli spettri di riflettanza sono stati raccolti dalla pelle normale e dai lividi utilizzando uno spettrofotometro Cary 100 Bio UV-visibile dotato di un accoppiatore in fibra ottica Cary e di una sonda di riflettanza in fibra ottica Cary. Un totale di 147 soggetti sono stati reclutati per questo studio, comprendendo 28 maschi e 119 femmine con età comprese tra i 18 e i 72 anni (media = 35,88, mediana = 32,00, SD = ±11,47). Sono state ottenute un totale di 240 scansioni, di cui 233 di qualità sufficiente per consentire l'analisi. L'età degli ematomi

variava da 0,5 a 231,5 ore (media = 76,39 ore, mediana = 72,00 ore, SD = $\pm 48,56$ ore). Per essere idonei a partecipare a questo studio, i soggetti dovevano conoscere l'età e la causa del livido da esaminare, essere in buona salute ed essere in grado di fornire un consenso scritto. Tutti i soggetti avevano 18 anni o più e non sono stati esaminati più di una volta in un periodo di 24 ore. (Il permesso etico è stato ottenuto sia dal Comitato Etico per la Ricerca Umana dell'Area di Sydney Occidentale sia dal Comitato Etico per la Ricerca Umana dell'Università di Sydney prima che i soggetti fossero reclutati). Tutte le misurazioni sono state effettuate nella regione centrale del livido ed è stata misurata anche un'area di pelle non contusa da utilizzare come area di controllo. Ai soggetti è stato chiesto di tenere la sonda delicatamente e completamente perpendicolare alla pelle per evitare che la luce entrasse nella sonda o che la pressione influenzasse le misurazioni ottenute. Per evitare cambiamenti nel colore della pelle dovuti a un contatto eccessivo o attrito con le testine della sonda, è stata effettuata una sola misurazione sul sito di prova. La posizione del livido è stata codificata in una delle quattro categorie: arto superiore, mano, arto inferiore, piede. Sono stati utilizzati solo i lividi su gambe e braccia che erano facili da raggiungere mentre il soggetto era vestito. I soggetti sono stati misurati in posizione seduta e gli è stato chiesto di rimanere immobili per 5 minuti prima di prendere qualsiasi lettura. Sono stati esclusi i soggetti con tagli o abrasioni sulla superficie o vicino al livido, per prevenire potenziali contaminazioni della ferita o della sonda. Tutti i volontari reclutati per lo studio avevano lividi che erano stati acquisiti da attività ricreative o normali attività quotidiane e per ogni volontario sono stati registrati età, sesso, colore della pelle e dimensione approssimativa del corpo. Per ogni soggetto sono stati registrati anche l'entità del trauma, l'età del livido e il sito del livido. Effettuando una valutazione visiva, i soggetti sono stati classificati in tre classi di dimensioni corporee: 'Sottopeso': contenuto di grasso molto basso, ossa e muscoli prominenti; 'Peso normale': grasso normale per la dimensione del corpo; 'Sovrappeso': aumento del grasso per la dimensione del corpo. Misurata la dimensione del livido, esso è stato classificato come (1) un piccolo livido causato da un trauma minore, (2) un grande livido causato da un trauma minore, (3) un piccolo livido causato da un trauma maggiore, (4) o un grande livido causato da un trauma maggiore. Il trauma minore è stato definito come il tipo di trauma che una persona sperimenterebbe se camminasse contro un oggetto, ad esempio un tavolino. Il trauma maggiore è stato definito come il tipo di trauma subito se colpiti da un'auto. Il livido è stato considerato 'piccolo' se aveva un diametro inferiore a 5 cm e 'grande' se era di 5 cm o più. Il tono della pelle di ogni soggetto è stato determinato misurando il valore "b*" CIEL*a*b* di un'area di pelle di controllo adiacente ed è stato classificato come: b*

compreso tra 0.10 e 0.5 'Chiara', b^* tra -0.51 e -1.50 'Media', b^* tra -1.51 e -3.0 'Oliva a Scura'. I lividi sono stati esaminati da un patologo forense che li ha classificati come intradermici, profondi (sottocutanei) o misti utilizzando i criteri di Bohnert [4].

	Number of subjects	Number of scans
<i>Frequency of body build of volunteers</i>		
Build		
Slender	9	16
Average	92	141
Large	46	76
Total	147	233
<i>Frequency of bruise size and trauma sustained</i>		
Bruise size/trauma		
Small bruise/minor trauma	111	177
Large bruise/minor trauma	22	32
Small bruise/major trauma	12	19
Large bruise/major trauma	2	5
Total	147	233
<i>Frequency of site of bruise</i>		
Site		
Arm	60	98
Hand	22	28
Leg	58	97
Foot	7	10
Total	147	233
<i>Frequency of depth of bruise</i>		
Depth		
Deep	114	178
Intra-dermal	5	7
Mixed	28	48
Total	147	233
<i>Number of volunteer in each skin tone category</i>		
Skin tone		
Fair	67	121
Medium	60	85
Olive/dark	20	27
Total	147	233

Figura 1.5 – Frequenza dei soggetti e delle scansioni effettuate per categorie di costituzione fisica, dimensione del livido e grado di trauma, sito del livido e profondità del livido. Figura presa da [2]

Lo strumento è stato calibrato prima di ogni serie di misurazioni utilizzando correzioni dello zero e della linea di base come descritto nella Sezione 1.3. Lo spettro di assorbimento del livido è stato ottenuto nel range 830–360 nm. L'ossigenazione dell'emoglobina all'interno del livido è stata calcolata sottraendo l'assorbimento a un punto isosbestic³ (805 nm) e a un punto non isosbestic (660 nm). La prima derivata è stata calcolata utilizzando il software matematico fornito con lo spettrofotometro Cary Win UV. I valori ottenuti a 480 e 490 nm nel valore di controllo sono stati sottratti dal valore ottenuto a 480 e 490 nm nella scansione del livido. Le scansioni sono state convertite in valori CIEL*a*b* utilizzando l'applicazione colore Cary Win UV. I valori CIEL*a*b* sono stati calcolati su un intervallo di scansione di 830–360 nm utilizzando un intervallo di dati di 1 nm. Le misurazioni del giallo (utilizzando b^* , E313 e D1925) così come i valori dei calcoli delle derivate prime (a 480 e 490 nm) sono stati tracciati rispetto all'età nota del livido. I grafici presenti nella Figura 1.7

³ In spettroscopia il punto isobestico corrisponde ad una specifica lunghezza d'onda o frequenza a cui l'assorbanza totale della specie non cambia durante una reazione chimica o un fenomeno fisico

mostrano che la miglior curva di adattamento era una semplice parabola, che mostrava un aumento fino a circa 7 giorni e poi un declino.

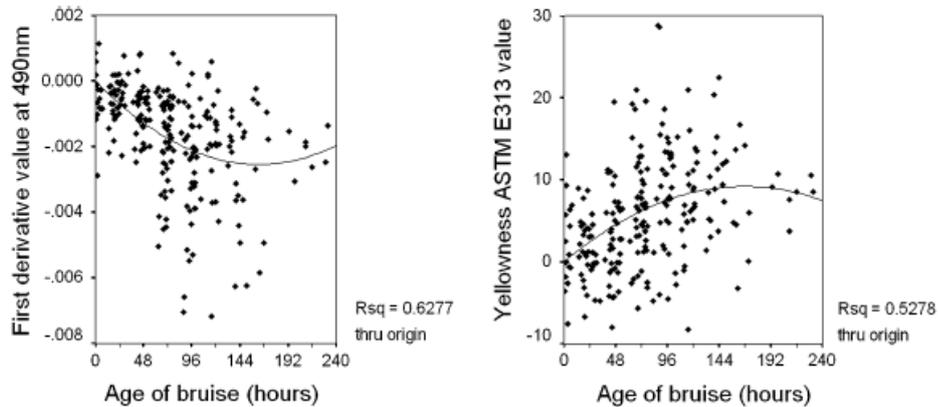


Figura 1.6 – Andamenti temporali della prima derivata a 490 nm (a sinistra) e della tonalità di giallo ASTM E313 (a destra). Figura presa da [2]

La derivata prima a 490 nm misura la quantità di bilirubina ed emosiderina, mentre il numero di colore ASTM E313 misura la quantità di giallo. La correlazione tra i due valori risulta essere forte con un valore del coefficiente di correlazione quadrato (r^2) di 0,789. La maggior parte dei punti tracciati si allineava lungo una linea retta e orizzontale. Tuttavia, c'era un certo grado di dispersione che indicava che il colore giallo misurato non sempre era correlato alla presenza di prodotti di degradazione dell'emoglobina.

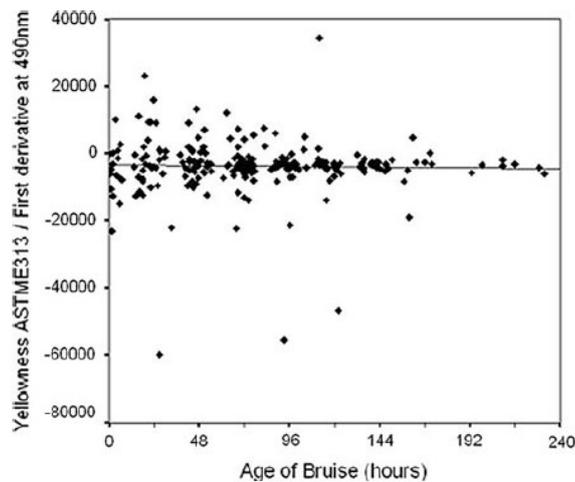


Figura 1.7 – La giallezza ASTM E313 divisa per la prima derivata a 490 nm rispetto al tempo. Figura presa da [2]

1.3 Discussione degli studi

Lo studio ha dimostrato che è possibile utilizzare lo spettrofotometro e il software per derivare le derivate prime delle scansioni e distinguere tra ematomi recenti e più vecchi. In particolare, si è osservato che un livido di 3 giorni presenta un valore più negativo della derivata prima a 480 e 490 nm rispetto a uno fresco. Tuttavia, la derivata prima a 490 nm è risultata più sensibile, mostrando una maggiore variazione rispetto a quella a 480 nm, permettendo di discriminare meglio l'età degli ematomi. Il secondo studio ha confermato che la derivata prima a 490 nm contribuisce per il 18% alla stima dell'età di un livido, rispetto al 14% della derivata a 480 nm. Un modello lineare generale ha mostrato che fattori aggiuntivi, come il genere del soggetto, la profondità del livido e la proporzione di emoglobina ossigenata, miglioravano la capacità predittiva, con la derivata a 490 nm che arrivava a spiegare il 31% della variazione nell'età del livido. L'analisi spettroscopica non ha rilevato picchi nell'intervallo 660–620 nm negli ematomi di 3 giorni, a conferma della breve durata della biliverdina, che viene rapidamente metabolizzata in bilirubina. Almeno parte del colore giallo di un livido è attribuibile alla formazione locale di emosiderina, sebbene sia impossibile distinguere il suo assorbimento da quello della bilirubina. Di conseguenza, l'assorbimento a 480 o 490 nm è principalmente attribuibile alla bilirubina, poiché in quel range mostra un tasso di cambiamento maggiore. L'analisi del modello lineare generale ha anche indicato che la misurazione del colore giallo mediante colorimetria rappresentava solo circa il 12% dell'età prevista dell'ematoma, con un lieve miglioramento (fino al 13%) utilizzando specifiche misure colorimetriche. L'uso del valore ASTM E313 combinato con fattori aggiuntivi, come la profondità del livido, la proporzione di emoglobina ossigenata e il tono della pelle, ha portato la previsione dell'età al 32%. Tuttavia, il colore sottostante della pelle interferiva con la colorimetria, mentre la misurazione delle derivate prime non era influenzata da questo fattore. Un risultato inaspettato è stato l'effetto del genere del soggetto: le femmine hanno mostrato una maggiore degradazione dell'emoglobina a parità di età dell'ematoma rispetto ai maschi, anche se il numero ridotto di soggetti maschili solleva dubbi sulla validità di questo dato. Anche la profondità del livido è risultata significativa: gli ematomi di profondità mista mostravano una maggiore degradazione dell'emoglobina rispetto a quelli puramente intradermici, ma la scarsità di questi ultimi rende la conclusione incerta. Infine, il ritardo nell'apparizione del colore giallo in un livido è attribuibile al tempo necessario affinché i macrofagi accumulino e metabolizzino l'emoglobina, confermando che

il giallo si sviluppa solo dopo che i prodotti di degradazione dell'emoglobina hanno superato il colore di fondo della pelle. In conclusione, sebbene la relazione tra i prodotti di degradazione dell'emoglobina e l'età di un livido sia confermata, essa rimane debole e influenzata da numerosi fattori aggiuntivi.

1.4 Ulteriori campi di applicazione

Oltre al suo utilizzo nella stima dell'età dei lividi in ambito forense, nel [3] si evince che la spettroscopia di riflettanza diffusa (DRS) è utile anche nella valutazione del danno tissutale e nel monitoraggio della guarigione delle ferite. Essa può essere utilizzata nei contesti chirurgici e riabilitativi per monitorare il processo di guarigione delle lesioni. L'analisi delle variazioni dei cromofori durante la rigenerazione tissutale permette di individuare eventuali complicazioni o ritardi nella guarigione [3], rendendo questa tecnica preziosa per ottimizzare il trattamento delle ferite post-chirurgiche e traumatiche. Un altro importante campo di applicazione della DRS è trattato nel [6] ed è l'analisi dei cromofori nei tessuti biologici, con particolare attenzione alle applicazioni cliniche, soprattutto in oncologia. Questa tecnica sfrutta l'interazione della luce con i tessuti per ottenere informazioni sulla loro composizione biochimica attraverso la riflettanza, consentendo di identificare e quantificare cromofori come emoglobina, acqua, lipidi e altri componenti tissutali. Poiché ogni cromoforo assorbe e riflette la luce in modo caratteristico, la DRS risulta particolarmente utile nella diagnosi precoce dei tumori. In ambito oncologico, i tumori sono caratterizzati da una vascolarizzazione anomala, e la DRS è in grado di rilevare variazioni nei livelli di emoglobina ossigenata e deossigenata, fornendo indicazioni sulla presenza di neoplasie [6]. Questa capacità di analizzare la distribuzione e la concentrazione dei cromofori costituisce un prezioso strumento per la diagnosi precoce e il monitoraggio del tumore. Uno degli aspetti centrali dell'utilizzo clinico della DRS è la modellizzazione matematica applicata ai dati spettrali. Poiché la luce interagisce con i tessuti in modo complesso, è necessario impiegare modelli avanzati per separare i contributi dei diversi cromofori e stimarne accuratamente le concentrazioni. Questo processo richiede l'applicazione di algoritmi che tengano conto di fattori come l'assorbimento, la dispersione e la geometria della luce all'interno del tessuto. Un altro vantaggio significativo della DRS è la possibilità di utilizzarla in tempo reale durante le procedure mediche, rendendola

particolarmente utile in ambito chirurgico. La capacità di guidare i chirurghi nella rimozione dei tessuti tumorali migliora l'accuratezza degli interventi, riducendo il rischio di lasciare residui tumorali o di rimuovere tessuti sani. Inoltre, la DRS può monitorare la risposta dei tumori ai trattamenti terapeutici, fornendo informazioni in tempo reale sulle variazioni della composizione tissutale. Oltre all'oncologia, la DRS trova applicazioni in altri ambiti clinici. Un esempio è il monitoraggio dell'ittero neonatale, dove la DRS permette di misurare con precisione i livelli di bilirubina nella pelle dei neonati, consentendo interventi terapeutici tempestivi e riducendo il rischio di complicazioni. In prospettiva, l'integrazione della DRS con altre tecnologie di imaging, come la risonanza magnetica o l'ecografia, potrebbe fornire una visione ancora più dettagliata dello stato dei tessuti, aprendo nuove frontiere per la diagnosi e il trattamento di numerose patologie.

Capitolo 2

Immagine Chimica Iperspettrale

2.1 Introduzione

Di seguito si analizza l'immagine chimica iperspettrale, riprendendo gli studi descritti in [7]-[8]-[9], per determinare se tale tecnica rappresenta un metodo oggettivo e non invasivo per stimare l'età dei lividi. L'immagine chimica iperspettrale è una tecnica che combina le funzionalità di una fotocamera con quelle di uno spettrofotometro integrando dati spettroscopici in un formato spaziale bidimensionale [7]. La tecnologia fornisce una visione dettagliata delle proprietà ottiche dei campioni, utile per visualizzare strutture profonde come i vasi sanguigni e stimare la profondità degli accumuli di sangue nella pelle, poiché, come già osservato nel precedente capitolo, strutture come le vene o le contusioni appaiono blu nonostante il sangue sia rosso. Inoltre, l'analisi statistica delle immagini e i modelli di diffusione permettono di stimare la profondità delle lesioni cutanee, offrendo un metodo non invasivo per valutare la gravità e l'evoluzione delle contusioni.

2.2 Identificazione dei lividi mediante l'immagine iperspettrale

Lo scopo di questa sezione è di valutare il potenziale impiego dell'immagine chimica iperspettrale per la determinazione dell'età dei lividi, confrontando la tecnica con la spettrofotometria a riflettanza con sonda e la fotografia digitale. L'immagine chimica combina essenzialmente la spettroscopia molecolare e l'immagine digitale, non richiede contatto tra l'oggetto e il sensore e permette di raccogliere grandi quantità di dati in un breve periodo di tempo. La tecnologia è stata originariamente sviluppata per il telerilevamento e le applicazioni militari [10]. Negli ultimi anni, sono emerse diverse applicazioni mediche, man mano che la tecnologia è diventata più accessibile, ad esempio per il monitoraggio dell'ipossia tumorale [12]. L'applicazione biomedica dell'immagine iperspettrale è attualmente un'area di ricerca in rapido sviluppo, supportata dai recenti progressi tecnici

nello sviluppo degli strumenti e dalla significativa riduzione dei costi. Nella pratica attuale, i vari colori dei lividi vengono descritti in tabelle che collegano i colori all'età del livido. Tuttavia, la variazione nella descrizione dei colori tra i medici rende impossibile determinare accuratamente l'età di un livido utilizzando queste tabelle. Anche l'uso della spettroscopia di riflettanza per migliorare la valutazione dei colori [1]-[3] non riesce ad ottenere la precisione richiesta, poiché la progressione del colore dipende dalla dimensione, forma, profondità e posizione del livido, così come dall'età della persona, dallo spessore e dal tipo di pelle [2]-[4]. Nella seguente sezione si propone un cambiamento fondamentale nel modo di osservare i lividi. L'ipotesi è che le informazioni sull'età di un livido siano contenute nell'area e nella distribuzione delle concentrazioni di emoglobina e bilirubina e in come queste cambino nel tempo in modo differente. I lividi diventano disomogenei durante il processo di guarigione; una piccola area centrale rosso-blu, causata dall'emoglobina, è circondata da un'area più grande di colore giallo, causata dalla bilirubina. Queste due aree si sviluppano a velocità diverse e, di conseguenza, forniscono informazioni sull'età del livido [8]. Dagli studi effettuati nel Capitolo 1 si evince che un vantaggio delle misurazioni spettroscopiche è la possibilità di una maggiore manipolazione e analisi grazie alla maggiore quantità di dati. Un sistema di immagine chimica iperspettrale può essere considerato come una fotocamera collegata a uno spettrofotometro. Utilizzando un filtro sintonizzabile a cristalli liquidi variabile, raccoglie dati spettrali a intervalli in tutto l'intervallo visibile in ciascun punto (pixel) del rivelatore di immagine. Così, registra sia informazioni spaziali (immagine bidimensionale) sia informazioni spettrali. L'intensità della luce viene rilevata in funzione della lunghezza d'onda, come nella spettrofotometria, e in funzione della posizione dei pixel, come nell'imaging, per formare un set di dati piuttosto che solo i tre valori di rosso, verde e blu registrati dalle fotocamere digitali convenzionali. La Figura 2.1 mostra il dataset risultante come un cubo immagine tridimensionale (cioè immagine iperspettrale), in cui c'è un'immagine completa a ciascuna lunghezza d'onda e uno spettro completo a ciascun pixel.

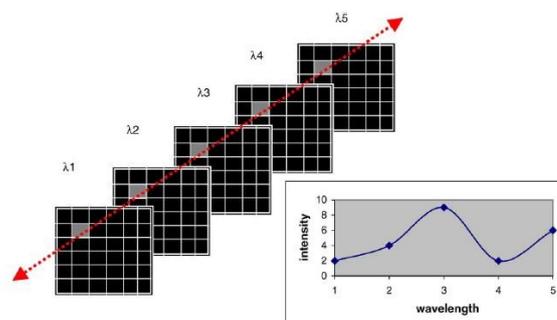


Figura 2.1 – Diverse immagini a lunghezze d'onda selezionate e lo spettro del pixel. Figura presa da [10]

Un vantaggio rispetto alla spettrofotometria a riflettanza basata su sonda [1] è che gli spettri possono essere ottenuti su ampie aree e le regioni possono essere selezionate dai dati raccolti in base all'aspetto o ad altri criteri richiesti. Le aree di interesse possono essere facilmente selezionate e gli spettri dei pixel nell'area scelta mediati per formare uno spettro che poi può essere trasformato matematicamente nella prima derivata. La connessione tra i segnali iperspettrali e le proprietà ottiche dei campioni rende possibile ottenere informazioni sulla profondità da tali immagini. Inoltre, gli spettri osservati sulla superficie della pelle subiscono uno spostamento dovuto alla dispersione e alla concentrazione dei cromofori nei tessuti sovrastanti. L'ipotesi principale è che questo fenomeno fisico causi piccoli spostamenti spettrali che possono essere utilizzati per visualizzare strutture come i vasi sanguigni e anche fornire una stima approssimativa della profondità di accumuli più grandi, come il sangue nella pelle. È importante precisare che il contrasto ottenuto nell'immagine dipenderà fortemente dalla profondità. Infatti, le strutture più profonde appariranno più sfocate rispetto a quelle superficiali. Dunque, l'immagine chimica iperspettrale e l'analisi statistica delle immagini consentono di visualizzare i cambiamenti nelle strutture vascolari durante la formazione di un livido, e aumentano la comprensione della sua progressione [9].

2.2.1 Confronto tra spettrofotometria e immagine iperspettrale per l'analisi delle contusioni

Nella sezione seguente verrà analizzato lo studio effettuato in [7], concentrandosi sul confronto tra due tecniche di analisi: la spettrofotometria di riflettanza a sonda e l'immagine chimica iperspettrale. Si analizzeranno i dati ottenuti da entrambe le tecniche per valutare quale delle due risulta essere più accurata. Il sangue è stato depositato su un tessuto di cotone bianco o iniettato per via sottocutanea nella pelle di un suino per simulare un "livido fresco", mentre una miscela in parti uguali (1:1) di sangue e bile è stata utilizzata per simulare i "lividi vecchi", questo perché gli spettri di assorbimento dei lividi vecchi mostrano lo spettro di assorbimento della bilirubina sovrapposto a quello dell'emoglobina [1]. Per tale motivo, i lividi "vecchi" sono stati simulati aggiungendo bilirubina (derivata dalla bile) al sangue. Per creare campioni distinti, le soluzioni sono state diluite in 4 serie. I lividi sono stati fotografati con diverse tipologie di fotocamere (Nikon F70 a pellicola, Nikon D70 digitale, Nikon 8400 e Nikon 995 Coolpix), e le immagini ottenute sono state analizzate utilizzando Adobe

Photoshop versione 8 per rimuovere variazioni casuali tra i pixel. Le immagini sono state convertite in modalità CIE $L^*a^*b^*$ per facilitare l'analisi colorimetrica. Le scansioni spettrofotometriche sono state ottenute utilizzando il metodo precedentemente descritto per i lividi sulla pelle umana [1]. Le immagini iperspettrali nell'intervallo 410-550 nm sono state acquisite a intervalli di 5 nm utilizzando un sistema di imaging chimico NIR/VIS Condor e una sorgente di luce Rofin Polilight PL500 impostata su illuminazione a luce bianca. Una volta selezionate le regioni di interesse, i set di dati sono stati trattati con e senza divisione del fondo prima di calcolare la prima derivata e i risultati sono stati esaminati con e senza un fattore di smoothing di 3. I dati spettrali (spettrofotometrici) sono stati successivamente importati in Microsoft Excel per l'inversione dei dati di riflettanza. In Figura 2.2 si nota che tutti i metodi fotografici hanno separato chiaramente i due gruppi di solo sangue e sangue più bile sia sul panno di cotone bianco che sulla pelle del suino, evidenziando una chiara distinzione tra i campioni.

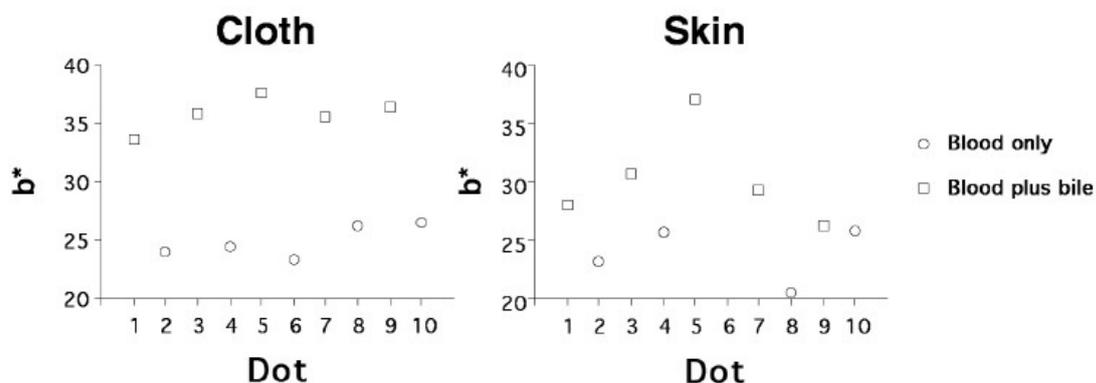


Figura 2.2 – Risultati ottenuti dalla Nikon 8400 registrando le immagini in formato tiff. Figura presa da [7]

In particolare, l'analisi iperspettrale ha mostrato una buona separazione alla lunghezza d'onda di 490 nm e i migliori risultati del sistema sono stati ottenuti utilizzando la divisione del fondo e un fattore di levigatura (smoothing) di 3. Nella Figura 2.3 si mostra come il sistema iperspettrale ha separato correttamente il sangue dalle miscele di sangue e bile anche nelle 4 serie di diluizione, mentre nella spettrofotometria le diluizioni 3 e 4 si sono mescolate al valore della prima derivata a 490 nm.

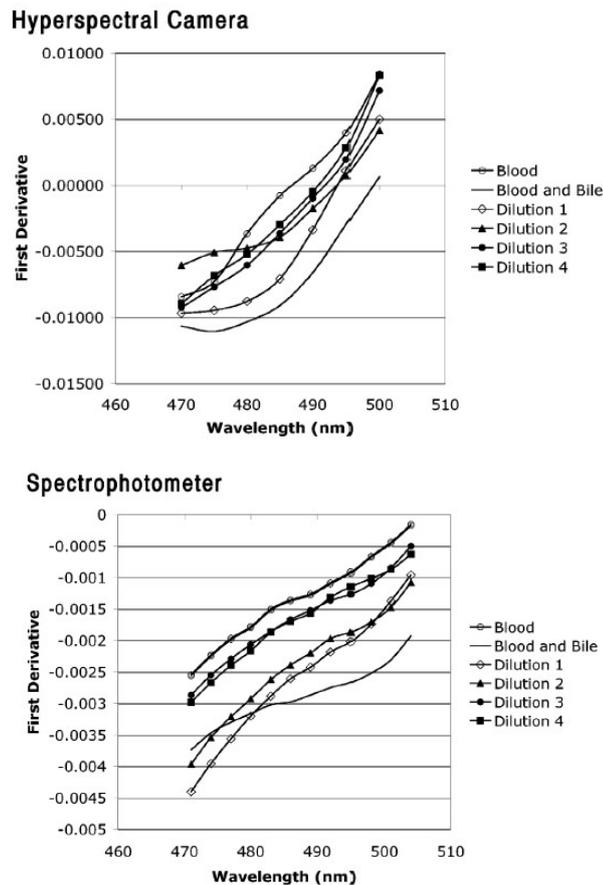


Figura 2.3 – Risultati dei calcoli della prima derivata dell'immagine iperspettrale (in alto) e della spettrofotometria di riflettanza (in basso). Figura presa da [7]

I risultati del lavoro esaminato non devono essere interpretati come un'indicazione che la fotografia sia inaffidabile, ma che la fotografia e la misurazione dei valori b^* non offrono alcun vantaggio rispetto all'osservazione a occhio nudo. Utilizzando il metodo della prima derivata [1], sia il sistema di immagine chimica iperspettrale che la spettrofotometria sono stati in grado di differenziare il solo sangue dal sangue con bile. Tuttavia, la separazione delle diluizioni successive tramite il sistema è risultata leggermente superiore rispetto alla spettrofotometria di riflettanza. Inoltre, si è dimostrata l'importanza dell'analisi matematica dei dati delle immagini dal fatto che i migliori risultati sono stati ottenuti effettuando una divisione del fondo prima di calcolare la prima derivata e utilizzando un fattore di levigatura (smoothing) di 3. È importante precisare che la capacità del sistema iperspettrale di mediare centinaia di spettri da tutta l'area di interesse (la macchia di sangue o di sangue con bilirubina) rappresenta un vantaggio importante rispetto alla spettrofotometria di riflettanza, che raccoglie dati su un punto piccolo (circa 3 mm di diametro). Inoltre, il fatto che il sistema di imaging non entri in contatto con la superficie dell'oggetto studiato può rappresentare un ulteriore vantaggio nello studio dei lividi.

2.2.2 Confronto tra immagine iperspettrale e metodo fotografico per la valutazione delle contusioni

In questa sezione verrà analizzato lo studio effettuato in [8], valutando i dati ottenuti dall'applicazione del sistema di imaging iperspettrale per determinare se può rappresentare una valida soluzione per la valutazione dell'età del livido. Il primo livido si trovava lateralmente nella parte superiore del braccio, il secondo, era situato nello stesso punto ed entrambi sono stati misurati per due settimane. Il terzo livido si trovava sulla parte laterale della coscia ed è stato misurato solo 4 volte. Inoltre, il secondo livido era stato analizzato precedentemente attraverso la fotografia ed è incluso per confrontare la misurazione delle aree di emoglobina e bilirubina ottenuta con un metodo fotografico rispetto all'imaging iperspettrale. È stato ottenuto il consenso da tutti i soggetti coinvolti. Tutti i lividi sono stati misurati con un sistema di imaging iperspettrale composto da un filtro sintonizzabile a cristalli liquidi (LCTF VariSpec), un obiettivo e una fotocamera CCD. L'illuminazione è stata effettuata utilizzando un anello di LED bianchi, blu e ciano sviluppato internamente, montato sull'LCTF. Le immagini del livido sono state acquisite ogni 2 nm nell'intervallo 440–700 nm, ottenendo un totale di 131 immagini, con un tempo di acquisizione di circa 90 secondi. Una pila di carta bianca è stata utilizzata come misurazione di riferimento per l'illuminazione. Per correggere il movimento delle immagini, è stata definita una regione di interesse (ROI) per l'allineamento, e le immagini sono state spostate per far coincidere la regione ROI in tutte le 131 immagini. Successivamente, sono state applicate due correzioni per l'illuminazione non omogenea dell'anello di LED e per la curvatura del braccio, normalizzando l'intensità delle immagini lungo la curvatura. Le immagini acquisite sono state utilizzate per generare un cubo di dati spettrali che includeva le dimensioni spaziali (x, y) e la lunghezza d'onda (λ), da cui sono stati estratti gli assorbimenti per ciascun pixel. In Figura 2.4 è mostrato lo spettro dei pixel e l'immagine del primo livido.

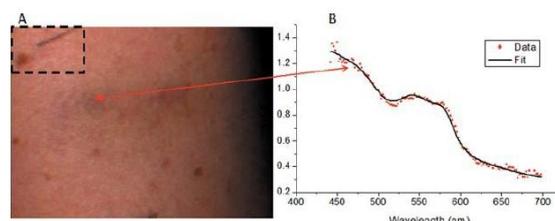


Figura 2.4 – (A) Immagine RGB del primo livido. (B) Spettro dei pixel (punti) e adattamento spettrale (linea). Figura presa da [8]

Ogni spettro è stato adattato per calcolare cinque coefficienti di assorbimento relativi ai cinque cromofori (ossiemoglobina, deossiemoglobina, bilirubina, albumina, melanina), creando così mappe di concentrazione in scala di grigi per ogni cromoforo. Per determinare le aree di emoglobina e bilirubina nel livido, quadrati e punti mostrati in Figura 2.5, sono state create immagini binarie utilizzando una tecnica di sogliatura locale (metodo di soglia locale Niblack), in cui tutti i valori superiori alla media dell'intorno più 0,5 volte la varianza sono stati assegnati al valore 1, mentre agli altri pixel è stato assegnato il valore 0. Successivamente, variando la diffusività, la concentrazione dell'enzima e il tempo di clearance della bilirubina si è giunti alla combinazione di parametri per cui le aree simulate corrispondevano maggiormente alle aree misurate, vedi linee Figura 2.5.

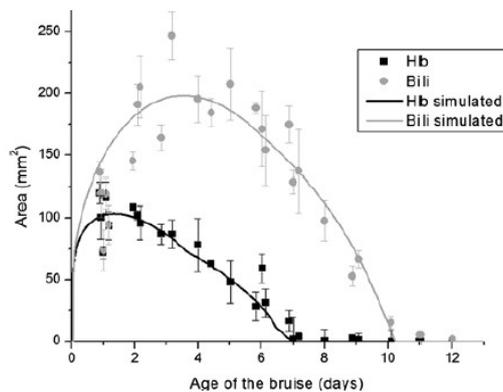


Figura 2.5 – Punti: aree misurate di emoglobina e bilirubina. Linee: aree simulate di emoglobina e bilirubina.

Figura presa da [8]

Il livello di soglia locale è stato regolato manualmente fino a quando, attraverso l'ispezione visiva, le aree nell'immagine binaria corrispondevano più da vicino alle aree reali nell'immagine RGB⁴. Poiché la bilirubina viene prodotta solo quando l'emoglobina è presente, l'area della bilirubina è stata calcolata come la somma dei pixel positivi per l'emoglobina e la bilirubina. Infine, le dimensioni finali delle aree di emoglobina e bilirubina sono state determinate moltiplicando il numero di pixel positivi per la dimensione del pixel. Il modello utilizzato nello studio per l'analisi è composto da tre strati: uno strato sottocutaneo, uno strato inferiore del derma, entrambi con uno spessore variabile a seconda della posizione del corpo, e uno strato superiore del derma, con uno spessore fisso di 400 μm . Sebbene il modello calcoli la distribuzione spaziale dei cromofori su tutto il volume,

⁴ RGB è un modello di colori di tipo additivo: somma dei tre colori red (R), green (G) e blu (B)

solo la distribuzione nello strato superiore del derma è stata utilizzata come funzione del tempo per determinare le dimensioni delle aree di emoglobina e bilirubina. L'età del livido è stata determinata trovando lo spostamento dell'asse del tempo che minimizzava il valore di χ^2 rispetto al momento della presentazione. Infine, per confrontare la precisione del metodo fotografico rispetto a quello dell'imaging iperspettrale è stata utilizzata l'area dell'emoglobina misurata in una fotografia a 74,5 h come input per creare un altro database di simulazioni. Utilizzando questo database, l'età del livido è stata determinata dalle aree misurate in tutte le foto successive a 74,5 h. Nel presente studio, a partire da una misurazione di 120,5 ore, l'età del primo livido è stata determinata con una stima finale di 129,7 ore e una deviazione di 9,2 ore (8%), come mostrato in Figura 2.6.

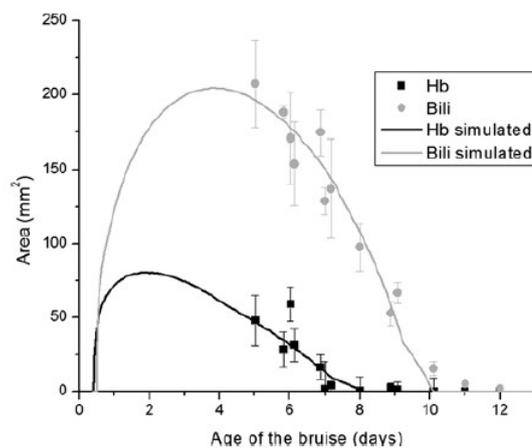


Figura 2.6 – Punti: Aree misurate di emoglobina e bilirubina del primo livido. Linee: Aree simulate di emoglobina e bilirubina del primo livido. Figura presa da [8]

Per il secondo e terzo livido, le aree di emoglobina e bilirubina sono state determinate dalle immagini binarie Figura 2.7 (quadrati e punti) e confrontate con le aree simulate (linee in Figura 2.7). L'età del secondo livido, con una prima misurazione a 74,5 ore, è stata stimata in 76,8 ore con una deviazione di 2,3 ore, (3%). Per il terzo livido, la prima misurazione a 50,8 ore ha portato una valutazione di 62,8 ore, con una deviazione più grande di 12 ore (24%), attribuibile al numero limitato di misurazioni disponibili.

⁵ χ^2 è un criterio per scegliere l'età del livido che spiega la distribuzione di emoglobina e bilirubina osservata nelle immagini, riducendo al minimo l'errore tra il modello e i dati.

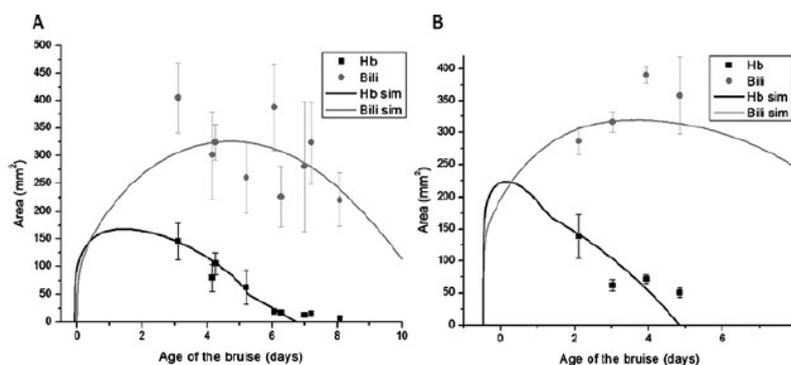


Figura 2.7 – Punt: Aree misurate di emoglobina e bilirubina. Linee: aree simulate di emoglobina e bilirubina. (A) Secondo livido, (B) Terzo livido. Figura presa da [8]

Per il secondo livido, le aree di emoglobina sono state anche analizzate con il metodo fotografico, con risultati comparabili a quelli ottenuti dalle immagini iperspettrali. Tuttavia, la determinazione delle aree di bilirubina è risultata più complessa con il metodo fotografico rispetto all'uso dell'imaging iperspettrale, che ha il vantaggio di non essere influenzato dal colore della pelle durante il rilevamento dei cromofori, andando così a migliorare la precisione della segmentazione. La segmentazione delle immagini è stata effettuata mediante sogliatura locale, una tecnica che si adatta meglio a condizioni di illuminazione non uniforme, generando una soglia specifica per ogni pixel.

2.2.3 Applicazione dell'immagine iperspettrale per la caratterizzazione delle contusioni in modelli animali e umani

In quest'ultima sezione verranno valutati i dati dello studio [9], prendendo in considerazione sia la pelle suina che quella umana. Gli esperimenti condotti, approvati dall'autorità nazionale per la ricerca sugli animali, hanno coinvolto quattro suini anestetizzati e intubati, con un peso compreso tra 25-40 kg. Il trauma locale è stato indotto nelle regioni delle spalle e delle anche su entrambi i lati degli animali, utilizzando due metodi diversi. Il primo metodo ha prodotto un trauma contusivo utilizzando un dispositivo a pendolo con un peso attaccato, mentre il secondo metodo ha causato lesioni sfruttando gli strumenti per il paintball, sparando da una distanza di 0,5 m. Oltre agli esperimenti sugli animali, i dati iperspettrali sono stati raccolti anche da due serie di misurazioni su volontari umani. La

prima serie ha coinvolto 15 volontari sani, non fumatori, con età compresa tra 26 e 71 anni, mentre la seconda serie è stata raccolta da 8 volontari (età 23-26 anni), includendo 50 immagini di lividi, seguiti fino alla risoluzione. Quest'ultimi sono stati causati durante l'allenamento di paintball. Le immagini iperspettrali sono state raccolte utilizzando una telecamera iperspettrale push-broom VNIR 1600, che opera nell'intervallo di lunghezza d'onda di 400–1000 nm con una risoluzione spettrale di 3,7 nm. La distanza media tra la telecamera e la superficie della pelle era di 1 m. I dati della pelle umana sono stati raccolti utilizzando una piattaforma traslazionale, con l'illuminazione fornita da due lampade alogene a banda larga con una potenza combinata di 700 W. Per ridurre la riflessione speculare, la superficie di vetro che copriva le lampade è stata sabbiata su entrambi i lati. I dati raccolti sono stati analizzati utilizzando Matlab 2008b ed ENVI 4.6. Come riferimento del bianco utilizzato per garantire la correttezza della conversione in riflettanza, è stata usata una tessera Spectralon. I dati grezzi della risposta spettrale misurata sui campioni sono stati rapportati a quelli della risposta dello Spectralon al fine di avere la riflettanza normalizzata. Le immagini sono state filtrate dal rumore prima dell'analisi e mediate su una griglia di 5×5 pixel per evitare la classificazione errata di singoli pixel. Successivamente, i dati sono stati classificati utilizzando il mapping dell'angolo spettrale (SAM). Gli autovettori o "endmember" utilizzati nell'analisi sono stati derivati tramite un algoritmo di raccolta automatica degli endmember implementato in ENVI, che identifica i pixel "puri" rappresentativi dei costituenti principali della pelle. L'analisi delle immagini si basa sulla classificazione dei pixel in base alla varianza statistica delle caratteristiche spettrali. Per migliorare le caratteristiche spettrali e ridurre i dati, è stata impiegata l'analisi delle componenti principali (PCA), che identifica le direzioni di massima varianza e proietta i dati lungo questi assi principali. In questo modo, i livelli di rumore possono essere scartati e il set di dati viene ridotto. Inoltre, è stata utilizzata l'analisi delle componenti indipendenti (IC) per migliorare l'identificazione delle strutture vascolari nelle immagini. Questa tecnica scompone le immagini in componenti mutuamente indipendenti, migliorando la visibilità dei vasi sanguigni. Il mapping dell'angolo spettrale (SAM) è stato utilizzato per classificare i dati in base alla somiglianza tra i pixel e gli autovettori derivati, che rappresentano gli spettri caratteristici della pelle. Questi spettri possono essere ottenuti dal set di dati o forniti all'algoritmo tramite spettri noti, come quello dell'emoglobina. La riflettanza della pelle è stata simulata utilizzando un modello di trasporto fotonico a tre strati. Il primo strato simula l'epidermide, che contiene melanina e una piccola quantità di sangue, mentre il secondo e il terzo strato contengono emoglobina come cromoforo principale. Nelle simulazioni, lo

spessore dell'epidermide è stato fissato a 80 micron, mentre i lividi e i vasi sanguigni, con diametri piuttosto grandi, sono stati approssimati aumentando il contenuto di sangue nel terzo strato e regolando lo spessore del secondo strato. L'anestesia profonda ha causato una ridotta perfusione nella pelle a causa della bassa pressione sanguigna, portando a una ridotta ossigenazione della pelle normale (fino al 10% in alcune regioni). Le aree lesionate mostravano un'ossigenazione ancora più bassa una volta che i vasi sanguigni rotti cessavano di sanguinare e l'ematoma raggiungeva una fase stabile (circa 20 minuti dopo la lesione da paintball). Gli spettri degli "endmember" derivati dalle lesioni suine indicavano un calo intorno ai 610 nm, probabilmente dovuto ad un errore di calibrazione radiometrica o a influenze della luce ambientale (non riscontrate nei dati umani), e un riflesso maggiore di uno per lunghezze d'onda superiori a circa 600 nm. La Figura 2.8 mostra la classificazione di un livido fresco e gli spettri delle relative classi: quelli della zona blu indicano una bassa ossigenazione, mentre le zone centrali mostrano un'ossigenazione leggermente più alta. Lo spettro del bordo blu (classe gialla) è inferiore rispetto agli altri, indicando un aumento del contenuto di sangue in questa regione.

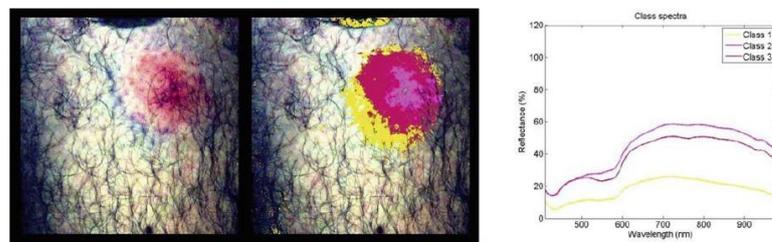


Figura 2.8 – Classificazione delle lesioni da paintball 2 ore dopo l'infortunio. Pannello sinistro: immagine RGB. Pannello centrale: classificazione SAM della lesione. Pannello destro: spettri degli endmember. Figura presa da [9].

La Figura 2.9 rappresenta la stessa lesione 43 ore dopo l'infortunio. La struttura circolare del livido è ancora visibile, con il centro rosso e il bordo circostante blu. Gli spettri rilevano una riduzione del contenuto di sangue e un aumento dell'ossigenazione rispetto alla prima misurazione.

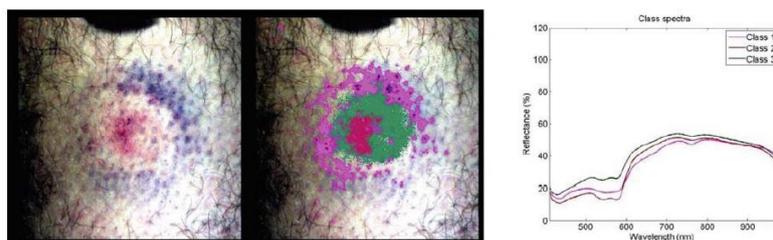


Figura 2.9 – Classificazione delle lesioni da paintball 43 ore dopo l'infortunio. Figura presa da [9]

Risultava difficile visualizzare le strutture vascolari nelle aree contuse dei volontari umani, soprattutto nei soggetti maschi con una crescita significativa di peli nella zona esaminata. La Figura 2.10 mostra il cambiamento della densità del sangue nell'area lesionata a 2 e 43 ore dall'infortunio, evidenziando, attraverso la trasformata IC, una riduzione dell'11% nel numero di pixel che rappresentano la zona lesionata.

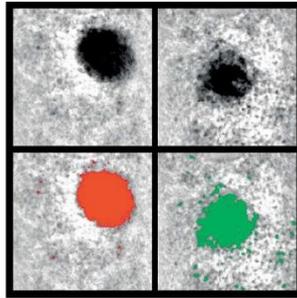
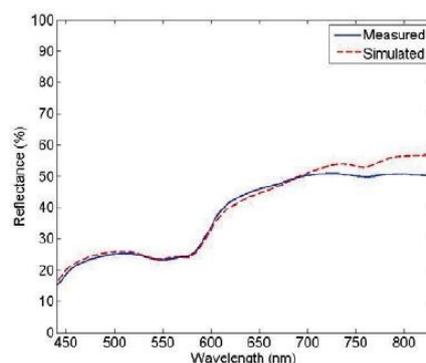


Figura 2.10 – Immagine a sinistra: 2 ore. Immagine a destra: 43 ore. Figura presa da [9]

La Figura 2.11 presenta spettri simulati dal livido da paintball delle Figure 2.8 e 2.9. Nel pannello superiore, lo spettro della classe 2 (Figura 2.8) è stato simulato aggiungendo una quantità extra di sangue agli strati dermici per ottenere un adattamento accurato. In generale, le lesioni fresche richiedevano questo approccio per raggiungere una buona corrispondenza spettrale. Il pannello inferiore della Figura 2.11 mostra lo spettro rilevato 43 ore dopo l'infortunio, che presenta caratteristiche diverse rispetto a quelle delle prime 2 ore. La pelle appariva di colore normale rispetto al bordo del livido. Non è stato possibile adattare uno spettro simulato per il livido a 43 ore, ma è stato trovato un adattamento utilizzando un modello di pelle normale con un aumento del volume sanguigno nello strato dermico profondo. L'assorbimento della bilirubina era evidente nello spettro come un appiattimento della curva nelle lunghezze d'onda blu e verde.



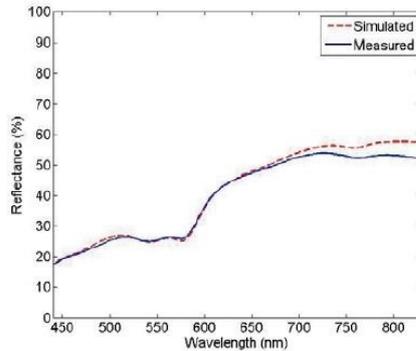


Figura 2.11 – Pannello superiore: 2 ore, classe 2, parte centrale del livido. Pannello inferiore: 43 ore, classe 3, parte centrale del livido. Figura presa da [9]

Questo studio ha fornito dati iperspettrali su modelli sia suini che umani, utilizzando l'analisi statistica delle immagini per derivare spettri caratteristici degli "endmember" e classificare le lesioni, oltre a visualizzare le strutture vascolari e studiare l'effetto del trauma su quest'ultime. Prima di applicare gli algoritmi di analisi, i dati sono stati filtrati usando una trasformata MNF (Minimum Noise Fraction), seguita da un'inversa per rimuovere le bande incoerenti, riducendo così il rumore e migliorando gli spettri "endmember" per le successive analisi. Le immagini sono state raccolte a una distanza focale di 1 metro per garantire la compatibilità tra le misurazioni suine e umane. Questa risoluzione delle immagini ha permesso di distinguere strutture grandi come vene e lividi, mentre una distanza focale più breve (ad esempio 10 o 30 cm) avrebbe potuto rilevare caratteristiche più piccole, come la microvascolarizzazione. Le figure 2.8 e 2.9 mostrano i risultati della classificazione, ottenuti attraverso una serie di passaggi: dopo la riduzione del rumore, le immagini sono state ulteriormente elaborate con una seconda trasformata MNF, seguita dall'identificazione automatica degli "endmember" utilizzando l'indice di purezza dei pixel. Questi "endmember" sono stati poi utilizzati per la classificazione tramite SAM (Spectral Angle Mapper), rivelando una buona corrispondenza con le strutture di interesse. Sono state applicate due diverse trasformate, MNF e IC (Independent Component), per visualizzare meglio le densità dei cromofori e le strutture vascolari. La trasformata MNF si è dimostrata adatta per identificare strutture più grandi, mentre la trasformata IC ha fornito le immagini più dettagliate della vascolarizzazione attorno alle lesioni, con un forte contrasto tra l'ematoma e il tessuto circostante. Gli strati iniziali della trasformata IC mostrano vasi chiaramente visibili con un buon contrasto, mentre gli strati successivi mostrano strutture vascolari più sfocate, probabilmente provenienti da strati più profondi della pelle. La diffusione della luce attraverso il tessuto sovrastante i vasi è responsabile di questa sfocatura,

supportando l'ipotesi che il segnale derivi da strati più profondi. Il modello di ematoma applicato per simulare i lividi umani si è dimostrato valido per stimare l'età delle lesioni profonde originate nel derma o alla giunzione con il sottocute [3]. Tuttavia, i risultati mostrati nella Figura 2.11 confermano che esso non è adatto per modellare le lesioni da paintball, per le quali è stato necessario aggiungere una quantità aggiuntiva di sangue agli strati dermici. Nonostante ciò, il modello di diffusione ha fornito stime utili sulla profondità delle lesioni esaminate, suggerendo che una maggiore integrazione tra i vari metodi potrebbe migliorarne l'applicabilità.

2.3 Discussione degli studi

La valutazione degli studi [7] e [8] dimostra che il sistema di imaging iperspettrale fornisce informazioni spaziali che non sono disponibili con la spettrofotometria a sonda o a sfera integratrice [3]. Entrambe le tecniche risultano essere superiori rispetto alla fotografia digitale e su pellicola nel rilevamento della bilirubina su sfondo di pelle. Un potenziale vantaggio significativo, osservato nello studio [8], dell'uso dell'imaging chimica iperspettrale rispetto alla spettrofotometria è la capacità di produrre un'immagine bidimensionale della regione studiata, permettendo di selezionare regioni di interesse da cui possono essere mediati centinaia di spettri. Un confronto con le valutazioni effettuate in [3] evidenzia che, mentre in [3] si utilizzava una soluzione monodimensionale delle equazioni di diffusione dell'emoglobina, il modello descritto in [8] impiega una soluzione numerica tridimensionale. Questo approccio è particolarmente utile per trattare forme non circolari, come i lividi ellittici, più comuni nei casi reali, in cui la diffusione dell'emoglobina avviene più lentamente rispetto a quella della bilirubina. Sebbene siano necessari ulteriori studi sulla fisiopatologia dei lividi, i risultati dello studio [9] dimostrano che una combinazione di imaging iperspettrale, analisi statistica delle immagini e modellazione della diffusione può fornire informazioni utili non solo sulla profondità e la struttura degli ematomi, ma anche rappresentare un metodo significativo nella valutazione dell'età dei lividi.

2.4 Ulteriori campi di applicazione

L'imaging iperspettrale ha dimostrato una notevole versatilità, trovando applicazioni in diversi campi al di fuori della valutazione dell'età dei lividi. Nel contesto forense, lo studio [10] analizza l'uso dell'imaging chimico per l'analisi di materiali come vernici, nastri adesivi, inchiostri e propellenti per armi da fuoco. Uno dei vantaggi principali di questa tecnica è la capacità di combinare spettroscopia molecolare e imaging digitale, permettendo un'analisi che riduce la necessità di preparazione del campione e riduce il rischio di contaminazione. Grazie alla possibilità di sovrapporre immagini visive e spettrali, l'imaging chimico facilita la valutazione dei risultati. In particolare, strumenti come il VIS Condor Macroscopic Chemical Imaging System e il CI-Trace hanno mostrato un'elevata capacità selettiva nell'analisi di vernici e inchiostri, identificando componenti non rilevabili con le tecniche tradizionali. Lo studio [12] dimostra l'applicazione dell'imaging iperspettrale nel campo della biologia tumorale, in particolare per la mappatura della saturazione dell'emoglobina e il monitoraggio dell'ipossia nel microcircolo tumorale. Utilizzando un sistema basato su un microscopio, questa tecnica ha permesso di visualizzare le zone ben ossigenate e quelle ipossiche nei tumori, fornendo importanti informazioni per migliorare trattamenti come la radioterapia e la chemioterapia. Gli esperimenti hanno usato marker fluorescenti per identificare le cellule tumorali e le aree con basso livello di ossigeno, mentre il sistema di imaging ha formato mappe in pseudo colori dettagliate della saturazione dell'emoglobina. L'imaging iperspettrale si è dimostrata una tecnica non invasiva e in grado di migliorare la comprensione dell'ambiente tumorale, con applicazioni nella diagnosi e nel monitoraggio della malattia. Sostanzialmente, l'imaging iperspettrale rappresenta uno strumento valido in diversi campi e i risultati ottenuti in [10] e [12] indicano che la tecnica può avere un impatto significativo sia nelle scienze forensi che in oncologia, offrendo nuove possibilità per l'analisi e il trattamento di casi più complessi.

Capitolo 3

Radiometria Fototermica Pulsata

3.1 Introduzione

In quest'ultimo capitolo, riprendendo gli studi trattati in [13]-[14]-[15], si valuterà l'efficacia dell'approccio combinato di spettroscopia di riflettanza diffusa (DRS) e radiometria fototermica pulsata (PPTR), che consente una valutazione simultanea della struttura e della composizione della pelle umana in vivo. Questo metodo non invasivo offre una valutazione quantitativa della frazione volumetrica di sangue dermico, della saturazione di ossigeno e del contenuto di bilirubina, informazioni essenziali per monitorare la guarigione dei lividi traumatici. L'utilizzo di queste due tecniche, grazie alla complementarità dei dati ottici (DRS) e termici (PPTR) forniti, migliora la robustezza e la precisione della descrizione, consentendo di differenziare con più affidabilità i vari stadi della sua evoluzione.

3.2 Identificazione dei lividi mediante azione combinata di DRS e PPTR

L'approccio combinato della spettroscopia di riflettanza diffusa (DRS) nell'intervallo spettrale visibile e della radiometria fototermica pulsata (PPTR) rappresenta un buon metodo per il monitoraggio e la caratterizzazione dei lividi. Rispetto alle tecniche osservate nei precedenti capitoli, questo approccio introduce nuovi elementi, tra cui l'inclusione di un cromoforo aggiuntivo, il β -carotene, una regolazione individuale dello spessore del derma papillare e un'analisi della zona contusa utilizzando come riferimento la pelle intatta vicina al livido. L'approccio più comune si basa sui cambiamenti temporali nel colore della pelle, dovuti alla presenza di emoglobina extravasata e dai suoi prodotti di decomposizione. Per sviluppare un metodo più accurato per la determinazione dell'età dei lividi, sono state testate varie tecniche ottiche, tra cui colorimetria, DRS [1]-[3], fotografia digitale, e imaging iperspettrale [8]-[9]. La DRS è una tecnica particolarmente diffusa nella ricerca biomedica,

in quanto consente di rilevare la presenza di diversi cromofori cutanei, inclusa la bilirubina [6]. Tuttavia, poiché gli spettri DRS rappresentano una somma della luce diffusa e assorbita a diverse profondità della pelle, per una valutazione quantitativa dei cromofori è necessaria una conoscenza più ampia della loro distribuzione in profondità [14]. In questo contesto, la PPTR rappresenta una valida opzione, poiché consente di ottenere informazioni sulla distribuzione in profondità dei cromofori cutanei, come mostrato in Figura 3.1, misurando le variazioni nell'emissione di raggi infrarossi medi dalla superficie del campione dopo l'esposizione a un breve impulso luminoso, permettendo di ricostruire i profili di profondità dei cromofori, come melanina ed emoglobina [15].

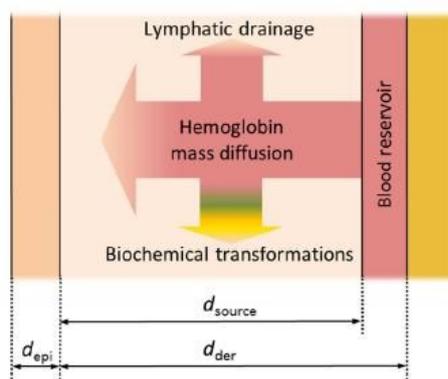


Figura 3.1 – Schema della geometria e dei processi coinvolti nell'evoluzione di un livido. Figura presa da [14]

Tuttavia, la PPTR da sola non è in grado di determinare con precisione la quantità di ogni cromoforo presente [14]-[15]. Per superare questo limite, è stata introdotta la combinazione di DRS e PPTR, che consente una valutazione simultanea della struttura e della composizione della pelle. Questa combinazione sfrutta un modello numerico che simula gli spettri DRS e i segnali PPTR, fornendo una rappresentazione dettagliata dell'interazione tra luce e tessuto. La DRS fornisce informazioni su un ampio intervallo di lunghezze d'onda, mentre la PPTR consente di ottenere profili dettagliati di distribuzione in profondità e concentrazione di specifici assorbitori come melanina ed emoglobina. Combinando la PPTR con simulazioni numeriche della deposizione di energia laser nella pelle contusa, si possono caratterizzare i processi chiave dell'evoluzione dell'ematoma, come la diffusione di massa e la decomposizione biochimica dell'emoglobina. L'analisi simultanea dei segnali PPTR ottenuti in vari momenti dopo l'infortunio permette di osservare le variazioni di questi parametri durante il processo di guarigione, rappresentando un passo importante nello sviluppo di una tecnica oggettiva per la determinazione dell'età dei lividi. Attualmente,

l'ispezione visiva dell'ematoma è il metodo più utilizzato, ma poiché si basa sulle differenze tra gli spettri di assorbimento della pelle intatta, dell'emoglobina extravasata e dei prodotti della sua decomposizione, presenta evidenti limitazioni. Recentemente, sono state proposte misurazioni tramite spettroscopia di riflettanza diffusa (DRS) nel campo visibile per superare tali limiti [1]-[3]-[4]. Tuttavia, l'analisi inversa di questi spettri richiede una conoscenza precisa della geometria della lesione, come lo spessore dell'epidermide e la profondità della lesione vascolare, informazioni spesso non disponibili. La radiometria fototermica pulsata (PPTR) rappresenta una tecnica valida per ottenere tali dati mancanti. Essa si basa su misurazioni delle variazioni transitorie nell'emissione infrarossa (IR) in seguito ad un'irradiazione laser pulsata, consente di ricostruire i profili di temperatura in profondità immediatamente dopo l'esposizione al laser. Oltre a fornire una valutazione di base, la PPTR consente anche una valutazione quantitativa della dinamica dell'emoglobina, risultando un metodo complementare alla DRS per l'analisi dell'evoluzione dell'ematoma. Applicando una metodologia più semplice, in cui i segnali PPTR simulati sono direttamente adattati a quelli sperimentali, è possibile ridurre significativamente la complessità computazionale ed estrarre in modo affidabile i parametri rilevanti del modello di evoluzione dell'ematoma, migliorando così la precisione della caratterizzazione del processo di guarigione.

3.2.1 Valutazione dell'approccio combinato DRS-PPTR per la stima dell'età del livido: analisi dei parametri ottici e modelli numerici

In questo paragrafo verrà valutato lo studio [13], che tratta l'approccio combinato di DRS e PPTR, per determinare se quest'ultimo può essere un metodo efficace per la stima dell'età di un livido. Lo studio ha coinvolto 3 volontari umani (29-30 anni) con pelle chiara, che presentano lividi minori o moderati, con un tempo noto di comparsa dell'infortunio. Tutti i lividi sono avvenuti casualmente, a seguito di attività sportive o piccoli incidenti e le misurazioni sono state eseguite in 7 sessioni tra 13 e 376 ore dopo l'infortunio, come riportato nella Tabella 3.1.

Code	Subject: Gender	Age	Anatomic Location	Cause of Trauma	Measurement Times
<i>a</i>	female	29 y	thigh, bellow the hip	hit into a table	48-359 h
<i>b</i>	male	30 y	outer side of the thigh	off-piste skiing	45-376 h
<i>c</i>	female	29 y	upper forearm	roller derby	13-349 h

Tabella 3.1 – Informazioni base sui soggetti inclusi e i lividi. Tabella presa da [13]

In Figura 3.2 sono riportate le fotografie digitali scattate prima di ogni misurazione dell'area contusa per poter correlare i risultati con l'impressione visiva dello scolorimento.



Figura 3.2 – Fotografia del livido del soggetto A in tempi diversi dopo l'infortunio. Figura presa da [13]

Le aree di test selezionate sono state rasate delicatamente e lo strato più superficiale di cellule epiteliali secche è stato rimosso tramite uno strappo con nastro adesivo per garantire una diffusione del calore senza ostacoli nelle misurazioni PPTR. Sono stati acquisiti spettri di riflettanza diffusa nell'intervallo spettrale 400–700 nm dall'area contusa e da una zona intatta vicina, utilizzando una sfera integratrice con sorgente luminosa interna e un'apertura di campione di 10,3 mm (ISP-REF). La risposta spettrale dello spettrometro (USB4000, Ocean Optics) è stata calibrata con uno standard bianco (Spectralon© di Labsphere). Successivamente, i siti contusi e intatti sono stati irradiati separatamente con un impulso laser di 1 ms emesso da un laser KTP di grado medicale (DualisVP di Fotona), con una lunghezza d'onda di 532 nm. L'emissione infrarossa (intervallo di lunghezze d'onda 3,5–5,1 μm) dalla superficie del tessuto è stata registrata con una telecamera a infrarossi (FLIR SC7500) per 5 secondi ad una velocità di 1000 fotogrammi al secondo. Per ogni sito di test, 3-5 segnali sono stati filtrati per migliorare il rapporto segnale/rumore (SNR) e ridurre potenziali artefatti dovuti a processi fisiologici non controllabili, come il battito cardiaco o la termoregolazione. È stato impiegato un modello ottico a quattro strati della pelle umana, costituito da epidermide, derma papillare, derma reticolare e tessuto sottocutaneo. Gli spessori dei primi tre strati (d_{epi} , d_{pap} e d_{ret}) sono stati ottimizzati singolarmente, mentre lo strato sottocutaneo è stato modellato come semi-infinito. L'intervallo spettrale 475–525 nm è stato incluso per considerare l'assorbimento della bilirubina, anche se essa non dovrebbe essere presente nella pelle di adulti sani. Per il sito intatto, è stato incluso anche l'assorbimento del β -carotene, che si trova comunemente nel derma. Nel modello ottico del livido, i parametri variabili rispetto alla pelle intatta includono il contenuto di emoglobina vascolare ed extravasata, e i livelli di ossigenazione. A differenza del modello della pelle intatta, questo modello consente la presenza di bilirubina (con concentrazione ϕ_{ili}). Si noti che, mentre l'emoglobina rilasciata nel sito dell'emorragia può diffondere in tutte le direzioni,

sia la DRS che la PPTR sono misurazioni in singoli punti. Di conseguenza si possono applicare solo modelli ottici monodimensionali della pelle con strati laterali uniformi. Per questo motivo, le misurazioni sono state limitate al centro della macchia di scolorimento visivamente omogenea, per ridurre al minimo i gradienti laterali e la diffusione di massa. In tal modo, l'approccio è sensibile solo alla distribuzione in profondità dell'assorbimento e dello scattering ottico, a differenza delle tecniche di imaging ad ampio campo, come la fotografia digitale o l'imaging iperspettrale, che forniscono informazioni laterali, ma non sensibili alla profondità. Il trasporto della luce e la deposizione di energia nella pelle sono stati simulati utilizzando la tecnica Monte Carlo multistrato a fotoni ponderati (MCML). Il confronto tra gli spettri DRS e i segnali PPTR con le previsioni del modello numerico è stato svolto attraverso un processo di ottimizzazione iterativa multidimensionale, utilizzando l'algoritmo dei minimi quadrati non lineari ("lsqnonlin" in MATLAB). La zona di pelle intatta è stata analizzata ottimizzando 14 parametri liberi, tra cui gli spessori dell'epidermide e del derma (d_{epi} , d_{pap} e d_{ret}), il contenuto di melanina (m), i contenuti ematici papillari e reticolari (b_{pap} e b_{ret}) e i loro livelli di ossigenazione (S_{pap} e S_{ret}), la concentrazione di β -carotene (c_b), i parametri di scattering nell'epidermide e nel derma (a_{epi} , p_{epi} , a_{der} e p_{der}) e l'ampiezza di scattering del sottocute (a). Nei siti con lividi, la maggior parte di questi parametri è stata mantenuta costante, mentre quelli influenzati dal livido (emoglobina, livelli di ossigenazione, bilirubina) sono stati valutati per ogni punto temporale. Le ottimizzazioni simultanee dei dati DRS e PPTR sono state eseguite per 16 lunghezze d'onda selezionate, riducendo il carico computazionale. La Figura 3.3 presenta uno spettro DRS e un segnale PPTR ottenuti dal sito di pelle intatta nel soggetto A.

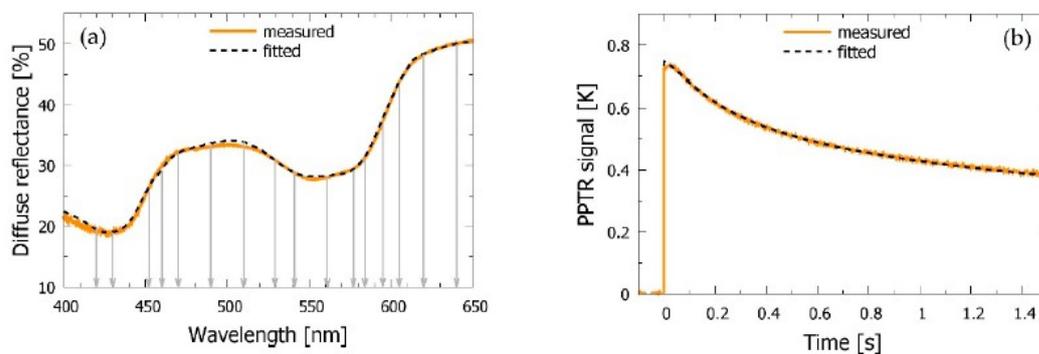


Figura 3.3 – (a) Spettro di riflettanza diffusa (DRS) e (b) segnale di radiometria fototermica pulsata (PPTR) del soggetto A. In (a) le frecce verticali grigie indicano le lunghezze d'onda incluse nell'analisi IMC dei dati

DRS. Figura presa da [13]

Anche se sono state osservate alcune variazioni nei segnali misurati, probabilmente dovute a cambiamenti nella circolazione sanguigna e nei livelli di ossigenazione ed un esempio di queste variazioni può essere osservato nella Figura 3.4 (linee grigie e rosa), i valori dei parametri della pelle ottenuti attraverso un adattamento simultaneo di 2-3 misurazioni risultano consistenti.

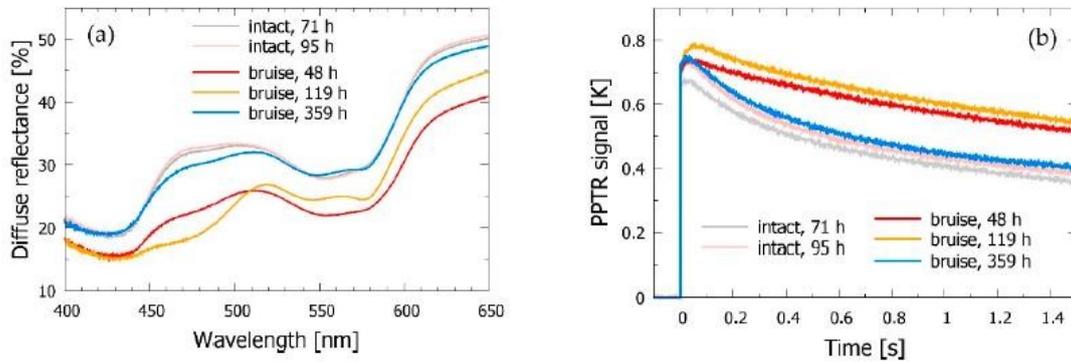


Figura 3.4 – (a) Spettri DRS e (b) segnali PPTR ottenuti dal sito di pelle intatta (linee grigie e rosa) rispetto al sito del livido nel soggetto A in momenti diversi dopo l'infortunio. Figura presa da [13]

Tutti i valori valutati rientrano nei range fisiologici noti per la pelle umana. Ad esempio, lo spessore totale della pelle nel soggetto a è pari a 1,0 mm, che rientra perfettamente nel range di $1,1 \pm 0,2$ mm. In Figura 3.4 è evidente che sia gli spettri DRS che i segnali PPTR ottenuti dalla zona contusa mostrano grandi differenze rispetto alla zona intatta, con notevoli variazioni nei giorni successivi all'infortunio. Le tendenze generali osservate negli spettri DRS della pelle contusa, Figura 3.4 (a) corrispondono a quelle riportate negli studi valutati nei capitoli precedenti [3]; ad esempio, si nota un'importante diminuzione della riflettanza diffusa sull'intero intervallo spettrale, principalmente dovuta al maggiore contenuto di sangue nel derma. Ciò è supportato dalle caratteristiche principali dei corrispondenti segnali PPTR che si osservano nella Figura 3.5 (b).

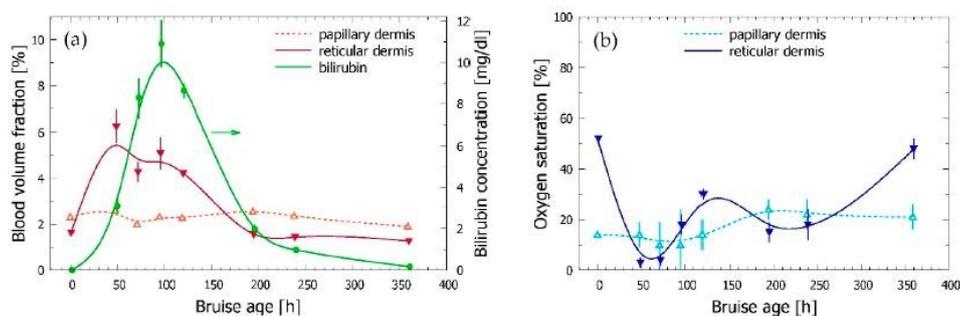


Figura 3.5 – (a) Frazioni di volume di sangue nel derma papillare e reticolare, e concentrazione di bilirubina; (b) livelli di ossigenazione del sangue in entrambi gli strati dermici. Figura presa da [13]

Inoltre, i dati DRS indicano un assorbimento notevolmente migliorato della luce blu/verde ($\lambda = 450\text{--}520\text{ nm}$) 3-4 giorni dopo l'infortunio (vedi linea gialla, $t=119\text{ h}$), il che indica la presenza della bilirubina. È importante notare che, come mostrato in Figura 3.4 (a) e (b), 15 giorni dopo l'infortunio, quando il livido è quasi completamente scomparso, sia gli spettri DRS che i segnali PPTR ritornano verso i dati ottenuti dal sito di pelle intatta (linee blu, $t=359\text{ h}$). Analizzando i dati acquisiti in momenti diversi, si osserva l'evoluzione temporale dei parametri del modello ottico nella zona contusa. Nei primi giorni dopo l'infortunio, come si può vedere nella Figura 3.5 (a), i risultati mostrano un aumento significativo del contenuto di sangue nel derma reticolare (triangolo rosso solido) rispetto al valore ottenuto per il sito intatto (plottato a $t=0$), accompagnato ad una drastica riduzione nell'ossigenazione, che passa dal 50-55% a pochi punti percentuali, evidenziato nella Figura 3.5 (b) (linea blu). Uno o due settimane dopo, sia il contenuto di sangue che l'ossigenazione tornano ai valori iniziali, triangoli rossi e ciano aperti in Figura 3.5 (a) e (b), mentre la concentrazione di bilirubina (cerchi verdi pieni) continua ad aumentare fino a raggiungere un picco al quarto giorno, a seguito della degradazione dell'emoglobina. Nel modello ottico utilizzato per l'analisi descritta, la bilirubina era confinata agli strati dermici [3]. Tuttavia, è stato notato in Figura 3.6 (a) che questo approccio spesso forniva una scarsa corrispondenza con gli spettri DRS sperimentali, specialmente nei siti di test con un'epidermide relativamente spessa.

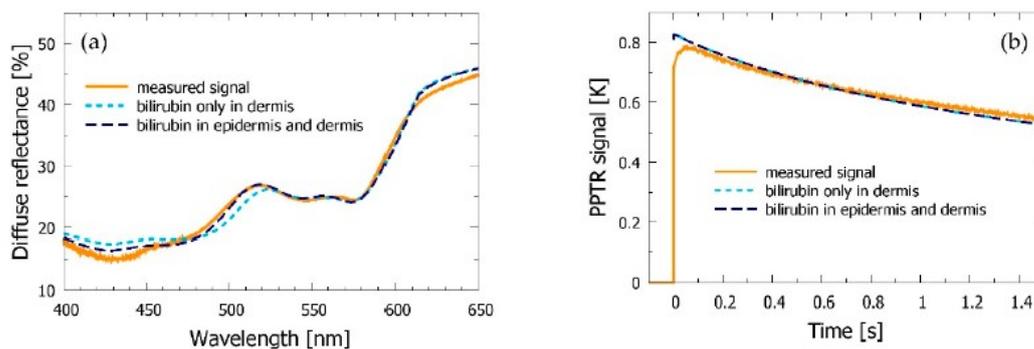


Figura 3.6 – (a) Segnali DRS e (b) segnali PPTR acquisiti dal livido del soggetto A 119 ore dopo l'infortunio (linee arancioni). Figura presa da [13]

Perciò, è stata esplorato anche l'opzione opposta, consentendo la presenza di bilirubina nello strato epidermico. Tale modifica ha permesso un miglioramento della corrispondenza con gli spettri DRS misurati in molti casi, in particolare nel range di assorbimento della bilirubina (cioè, 475–525 nm). Nel frattempo, la corrispondenza ottenuta per i segnali PPTR, osservata in Figura 3.6 (b) non è stata influenzata. Questo può essere attribuito al fatto che la luce laser a 532 nm utilizzata nelle misurazioni PPTR viene solo debolmente assorbita dalla bilirubina. L'inclusione della bilirubina sia nell'epidermide che negli strati dermici, ha permesso di

migliorare notevolmente la corrispondenza tra i modelli ottici e i dati sperimentali, in particolare nell'intervallo di assorbimento della bilirubina (475-525 nm). Come mostrato in Figura 3.7, la discrepanza tra i dati sperimentali e il modello DRS non supera il 4% e i valori di R^2 , coefficiente di correlazione, sono compresi tra 0.981 e 0.998 per la parte DRS e tra 0.952 e 0.995 per la parte PPTR.

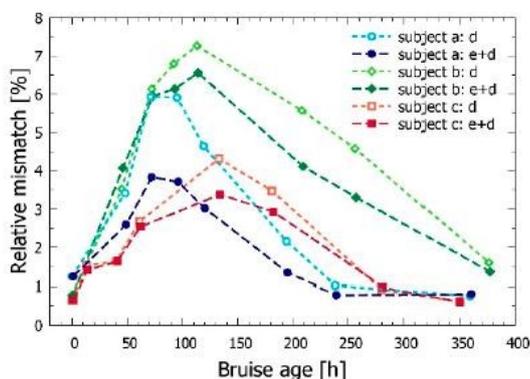


Figura 3.7 – Discrepanza relativa tra i valori di riflettanza diffusa misurati e quelli previsti dal modello nelle analisi IMC dei lividi nei tre soggetti a diversi intervalli di tempo dopo l'infortunio. Figura presa da [13]

Questa modifica ha ridotto i valori di concentrazione della bilirubina rispetto ai risultati preliminari, poiché i cromofori vicini alla superficie cutanea influenzano maggiormente gli spettri DRS. Nel presente studio, è stato utilizzato un approccio ampliato che combina le misurazioni DRS e PPTR con la modellazione numerica del trasporto della luce in un modello cutaneo a quattro strati. Le modifiche prevedono l'inclusione del β -carotene nella pelle intatta e della bilirubina nella pelle contusa, oltre all'adattamento individuale dello spessore dello strato dermico papillare per una maggiore flessibilità del modello. Nella Figura 3.8 è possibile vedere che la maggior parte dei parametri del modello del livido ha mostrato cambiamenti gradualmente, seguiti da un ritorno ai loro valori iniziali, indicando la solidità dell'approccio.

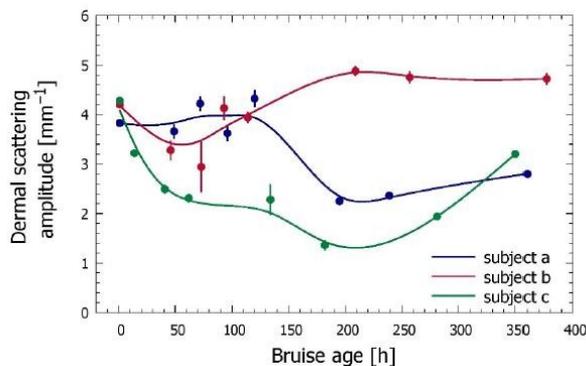


Figura 3.8 – Confronto dell'evoluzione temporale valutata del coefficiente di scattering dermico a_{der} nei tre soggetti inclusi. Figura presa da [13]

Si sono osservate grandi variazioni individuali nei tempi necessari per raggiungere i valori di picco, variando da 1–2 a 2–3 giorni nei soggetti A e C a 6–8 giorni nel soggetto B. Tale variabilità potrebbe essere attribuita a fattori come la gravità della forza d'impatto e le dinamiche di rimozione dell'emoglobina. Durante la fase più avanzata del livido, il contenuto ematico nel derma papillare (b_{ret}) supera quello nel derma reticolare (b_{pap}), confermando la diffusione dell'emoglobina dal sito di emorragia verso la superficie cutanea. La concentrazione di bilirubina aumenta gradualmente dal valore iniziale di 0 nella pelle intatta fino a raggiungere la concentrazione massima dopo 3-4 giorni nel soggetto A, 5-6 giorni nel soggetto C, e 8-9 giorni nel soggetto B. È importante notare che il suo picco si verifica sempre dopo quello del contenuto ematico (di circa 1-4 giorni), poiché la bilirubina deriva dalla degradazione dell'emoglobina. Tutti i soggetti mostrano una successiva rimozione graduale della bilirubina: nei soggetti A e C, la bilirubina non è più rilevabile 12-14 giorni dopo l'infortunio, mentre nel soggetto B è ancora presente dopo 16 giorni, indicando che il livido non si è completamente risolto. Il tasso di rimozione della bilirubina dalla pelle contusa varia tra i tre soggetti, suggerendo differenze individuali nella risposta del sistema immunitario e nella dinamica di rimozione dell'emoglobina. Per migliorare la versatilità delle analisi, si potrebbero considerare altri cromofori legati alle contusioni, come l'emosiderina o la metemoglobina, che possono essere responsabili della decolorazione marrone in alcune contusioni [3]. Tuttavia, ciò richiederebbe l'inclusione di lunghezze d'onda più lunghe nelle misurazioni DRS e nell'analisi del modello.

3.2.2 Analisi dell'efficacia dell'approccio DRS-PPTR nella determinazione dell'età di un livido: confronto tra simulazione analitica e metodo inverso

In questa sezione verranno analizzati insieme gli studi [14] e [15], poiché utilizzano tecniche e ottengono risultati estremamente simili, con l'obiettivo di valutare l'efficacia dell'approccio combinato DRS e PPTR nel determinare l'età di un livido. La spettroscopia di riflettanza diffusa (DRS) è una tecnica utile per ottenere informazioni sulle proprietà dei tessuti. Gli spettri di riflettanza diffusa vengono misurati utilizzando una sfera di integrazione (IS), che permette di illuminare il campione in modo diffuso attraverso una sorgente luminosa interna. La luce retro diffusa dal tessuto viene poi raccolta attraverso una

fibra ottica e analizzata utilizzando uno spettrometro. Questo approccio consente di misurare l'interazione della luce con i vari componenti presenti nella pelle, come l'emoglobina e la melanina. Per simulare la deposizione di energia laser nella pelle, vengono utilizzati due approcci: la simulazione analitica e la simulazione basata sulla tecnica Monte Carlo. La simulazione analitica utilizza delle equazioni matematiche per descrivere l'interazione della luce con la pelle, sfruttando delle proprietà ottiche, come la diffusione e l'assorbimento. Generalmente è un approccio più rapido rispetto alla simulazione Monte Carlo, poiché non simula singolarmente le interazioni dei fotoni, tuttavia con strutture più complesse presenta diverse limitazioni. Invece, la simulazione Monte Carlo si basa su un approccio probabilistico, dove i fotoni vengono tracciati singolarmente durante il loro percorso attraverso i vari strati della pelle. Questo approccio è più preciso rispetto al precedente, poiché può modellare ambienti complessi e non omogenei. Tuttavia, richiede risorse computazionali più complesse e tempi di calcolo più lunghi rispetto all'approccio analitico. Le simulazioni sono effettuate utilizzando 500.000 fotoni per ogni lunghezza d'onda tra 400 e 650 nm, con un intervallo di 1 nm, per ottenere gli spettri DRS. Per ridurre il carico computazionale, gli spettri vengono adattati a 14 lunghezze d'onda selezionate, corrispondenti ai picchi di assorbimento di ossiemoglobina, deossiemoglobina e bilirubina, come mostrato in Figura 3.9 (a). È stato eseguito un adattamento multidimensionale degli spettri DRS generati con l'approccio MC (Monte Carlo inverso) per la pelle e confrontati con i risultati ottenuti usando l'approccio analitico che simula la diffusione (DA). La Figura 3.9 mostra i migliori adattamenti ottenuti con i due approcci, con le lunghezze d'onda selezionate indicate dalle frecce. Sebbene entrambi gli approcci forniscano buoni risultati, l'adattamento ottenuto utilizzando l'approccio DA si discosta per lunghezze d'onda superiori a 600 nm, vedi Figura 3.9 (a), fenomeno noto come "perdita nel rosso".

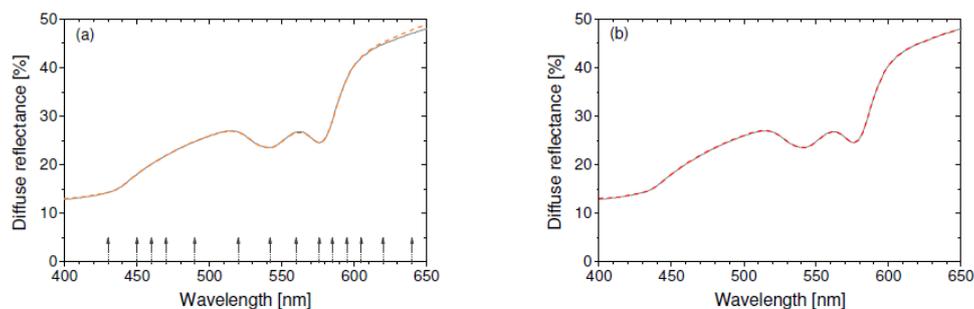


Figura 3.9 – (a) Soluzione analitica DA; (b) approccio inverso MC. Figura presa da [14]

Inoltre, il fitting dei dati simulati viene effettuato, come nella sezione precedente, attraverso il metodo dei minimi quadrati non lineari utilizzando la funzione `lsqnonlin` di MATLAB. La radiometria fototermica pulsata (PPTR) è una tecnica non invasiva che permette di misurare i profili di temperatura in profondità nei tessuti biologici dopo un breve impulso laser. Il cambiamento transitorio dell'emissione infrarossa (IR) viene rilevato utilizzando un sistema radiometrico dedicato, e da tale segnale è possibile ricostruire la distribuzione della temperatura in profondità, risolvendo l'equazione inversa della diffusione del calore combinata con il modello di emissione del corpo nero [4]. Nel setup scelto, i test vengono effettuati irradiando i siti di interesse con impulsi laser di 1 ms ad una lunghezza d'onda di 532 nm, ben assorbita dalla melanina epidermica e dall'emoglobina intravascolare, così come dall'emoglobina extravasata nel derma. Il laser ha un diametro di circa 5 mm, con un'esposizione radiante di circa 0,5 J/cm². L'emissione IR viene registrata dalla superficie del tessuto con una telecamera infrarossa ad alta velocità (FLIR SC7500) che opera nella banda spettrale compresa tra 3,5 e 5,1 μm, acquisendo immagini ad una velocità di 1000 fotogrammi al secondo. Le ampiezze del segnale vengono poi convertite in valori di temperatura radiometrica utilizzando un sistema di calibrazione fornito dal produttore (Hypercal™). Inoltre, i segnali PPTR registrati, mostrati in Figura 3.10, rappresentano l'evoluzione temporale dell'aumento di temperatura negli strati superficiali della pelle, in aggiunta ad una funzione che tiene conto dell'assorbimento parziale dei contributi di emissione IR provenienti dagli strati tissutali sotto superficiali.

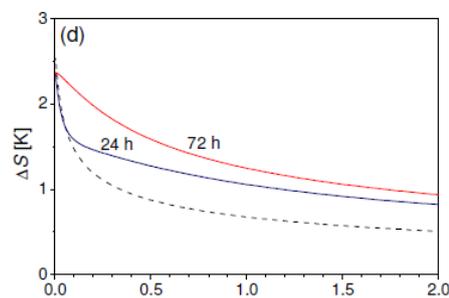


Figura 3.10 – Segnali radiometrici risultanti. Figura presa da [14]

Questo permette di ottenere informazioni dettagliate sulla dinamica termica nei tessuti. Il modello utilizzato per simulare le misurazioni DRS e PPTR considera la struttura della pelle composta da tre strati: epidermide, derma e sottocute. Nel caso della DRS, il derma è ulteriormente suddiviso in 50 sotto-strati, per modellare accuratamente la distribuzione in profondità di emoglobina e bilirubina. Le simulazioni MCML (Monte Carlo multilayer)

vengono utilizzate per modellare il trasporto della luce e la deposizione energetica del laser, convertendo i profili di energia simulati nei corrispondenti profili di temperatura, vedi Figura 3.11.

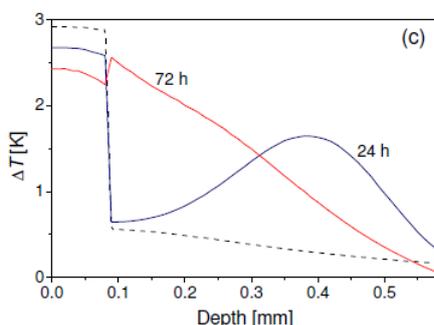


Figura 3.11 – Profili di temperatura ottenuti dalla simulazione numerica della deposizione di energia laser nella misurazione PPTR. Figura presa da [14]

Questo approccio consente di prevedere con precisione gli spettri DRS e i segnali PPTR per diverse situazioni. Nella prima fase dell'analisi, vengono esaminate le misurazioni simulate per la pelle sana, che viene modellata come composta da tre strati: epidermide, derma e sottocute semi-infinito. Nella successiva analisi della pelle contusa, i valori dei parametri della pelle sana vengono utilizzati come costanti, mentre la differenza principale è dovuta alla presenza di emoglobina extravasata e bilirubina. Nel caso della pelle contusa, ad ognuno dei 50 sotto-strati del derma viene assegnata una quantità media di emoglobina e bilirubina. Inoltre, si considera un primo strato rappresentante l'epidermide, un secondo strato rappresentate il derma superiore (corrispondente al 20% della profondità totale del derma) e un terzo strato semi-infinito per la parte restante del derma. Nell'analisi delle simulazioni PPTR, è possibile estrarre la distribuzione in profondità dei costituenti che assorbono alla lunghezza d'onda di irradiazione del laser ($\lambda = 532 \text{ nm}$). Poiché la bilirubina non assorbe a queste lunghezze d'onda, il suo contributo sarà trascurabile nell'analisi, e il segnale PPTR verrà attribuito principalmente alla presenza di emoglobina extravasata. Variando i parametri dell'evoluzione del livido, come la diffusività di massa dell'emoglobina, il tempo di decomposizione τ_h , la profondità della sorgente d_{source} e la durata della sorgente, è possibile ottenere una buona corrispondenza tra i segnali PPTR simulati e quelli misurati, permettendo di caratterizzare la dinamica della guarigione dei lividi. Per evitare problemi legati a questo effetto, nel calcolo della norma ϵ_{DRS} , sono state considerate solo le lunghezze d'onda comprese tra 400 e 600 nm. Sia l'approccio DA che l'approccio MC mostrano risultati simili in termini di stabilità matematica e accuratezza dei parametri ottenuti. Tuttavia, la tecnica

PPTR consente di estrarre la distribuzione in profondità degli assorbenti nella pelle, anche se richiede di assumere un valore per la saturazione di ossigeno nel sangue, che può introdurre un piccolo errore nella frazione di volume del sangue. I parametri valutati, come lo spessore epidermico (d_{epi}) e la frazione di volume della melanina (f_{mel}), risultano essere comunque accurati e non influenzati dal livello di saturazione dell'ossigeno (S_{bl}) assunto. L'approccio combinato di DRS e PPTR migliora la stabilità dell'adattamento e l'accuratezza dei parametri. Poiché l'approccio MC si dimostra superiore rispetto a quello DA, si utilizza solo il primo nell'approccio combinato, evitando così le limitazioni dell'approccio DA relative alla "perdita di rosso". Nella Figura 3.12 viene mostrato il confronto tra la norma residua dell'adattamento DRS e quella dell'adattamento PPTR per la pelle sana.

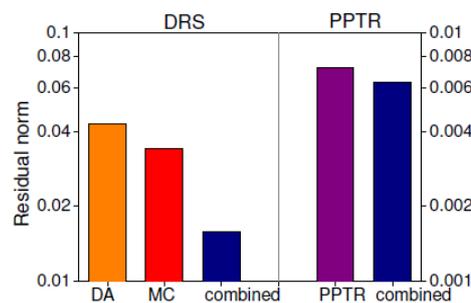


Figura 3.12 – Confronto delle norme residue di DRS e PPTR nella pelle sana per per diversi approcci di fitting. DA analitico (arancione), MC inverso (rosso), PPTR (viola) e fitting combinato (blu). Figura presa da [14]

In entrambi i casi, l'adattamento combinato migliora la qualità complessiva, con un effetto più evidente sugli spettri DRS. Analogamente alla pelle sana, anche nella pelle contusa sono state confrontate l'analisi inversa degli spettri DRS utilizzando l'approccio DA e la tecnica inversa MC. La Figura 3.13 mostra il confronto tra i migliori adattamenti ottenuti con entrambi gli approcci, e anche in questo caso l'approccio MC offre risultati migliori rispetto al DA, in particolare con una norma residua inferiore.

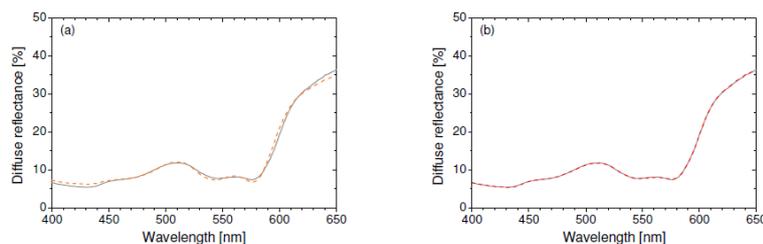


Figura 3.13 – Confronto del DRS generato da MC nella pelle contusa 72 ore dopo l'infortunio (linea continua) e i migliori spettri simulati di fitting (tratteggiati) ottenuti utilizzando (a) la soluzione analitica DA e (b) l'approccio MC inverso. Figura presa da [14]

Successivamente, è stata applicata la tecnica PPTR per stimare la dinamica dell'emoglobina. La precisione dei parametri ottenuti con la PPTR è paragonabile a quella ottenuta con l'analisi degli spettri DRS utilizzando la tecnica MC. La Figura 3.14 mostra il confronto tra il segnale PPTR simulato e l'adattamento ottenuto per la pelle contusa 72 ore dopo l'infortunio.

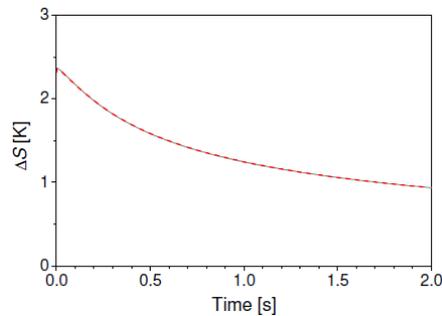


Figura 3.14 – Confronto del segnale PPTR generato da MC nella pelle contusa 72 ore dopo l'infortunio (grigio, linea continua) e il miglior segnale simulato (rosso, linea tratteggiata). Figura presa da [14]

Anche qui, l'adattamento combinato di DRS e PPTR fornisce risultati migliori rispetto all'uso delle singole tecniche. Poiché per la lunghezza d'onda utilizzata nel setup PPTR (i.e. $\lambda=532$ nm) la bilirubina non contribuisce al segnale, l'adattamento si basa solo sui parametri dell'emoglobina. Nella Figura 3.15 (a) viene mostrato il confronto tra la norma residua dell'adattamento DRS e quella dell'adattamento PPTR per la pelle contusa 72 ore dopo l'infortunio. La Figura 3.15 (b) mostra un confronto dei valori della diffusività di massa dell'emoglobina (D) ottenuti con i diversi approcci di adattamento.

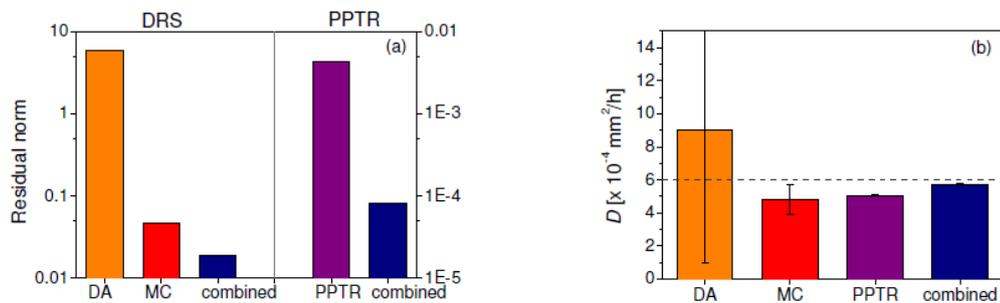


Figura 3.15 – Confronto di (a) norme residue e (b) diffusività di massa dell'emoglobina (D) ottenuta per diversi approcci di fitting nell'analisi degli spettri DRS e del segnale PPTR nella pelle contusa: DA analitico (arancione), MC inverso (rosso), PPTR (viola) e fitting combinato (blu). Figura presa da [14]

3.3 Discussione degli studi

Le analisi dei lividi traumatici condotte su tre volontari per un periodo di 16 giorni, hanno mostrato un graduale aumento del contenuto di sangue nel derma e una riduzione dei livelli di ossigenazione nei primi giorni dopo l'infortunio. Successivamente, è stata osservata la comparsa della bilirubina, con un progressivo ritorno di tutti i parametri ai valori normali circa due settimane dopo l'infortunio [13]. I risultati hanno anche indicato che la diffusività dell'emoglobina nella pelle è significativamente inferiore rispetto ai valori valutati in studi precedenti basati su DRS. La metodologia utilizzata, che combina DRS e PPTR con l'analisi inversa MC, basata su un modello a quattro strati della pelle, consente una caratterizzazione non invasiva e oggettiva dei cromofori nei lividi traumatici e del loro cambiamento nel tempo [13]. Questo approccio si è rivelato particolarmente utile rispetto alle tecniche tradizionali, in quanto consente una valutazione più precisa e dettagliata delle variazioni dei cromofori, come emoglobina e melanina, in relazione alla lunghezza d'onda utilizzata per l'irradiazione. Inoltre, l'approccio combinato DRS-PPTR ha dimostrato di avere una maggiore robustezza e accuratezza nell'analisi rispetto all'utilizzo delle singole tecniche, migliorando così l'affidabilità dei risultati ottenuti [14]-[15]. Tali risultati suggeriscono che l'approccio è una valida opzione per la valutazione dell'età dei lividi e fornisce un importante contributo nell'ambito della diagnostica non invasiva.

3.4 Ulteriori campi di applicazione

L'approccio combinato di DRS e PPTR rappresenta un metodo oggettivo e non invasivo, il cui uso non è limitato solo alla valutazione dell'età dei lividi, ma può essere applicato anche nella dermatologia e nella ricerca biomedica. Facendo riferimento agli articoli [16] e [17], è possibile approfondire come questa metodologia venga applicata in diversi ambiti che vanno dalla caratterizzazione delle lesioni vascolari alla rimozione non invasiva dei tatuaggi. Nell'articolo [16] è descritto l'uso della tecnica PPTR per misurare la profondità dei vasi sanguigni in pazienti con macchie di vino di porto (Port Wine Stains, PWS). L'approccio prevede l'uso della fotometria termica pulsata per descrivere le strutture cromofore sotto la pelle, identificando la distribuzione e la profondità dei vasi sanguigni

senza danneggiare l'integrità dell'epidermide. Questo è particolarmente utile per migliorare l'efficacia dei trattamenti laser, permettendo una regolazione più precisa dei parametri in base alle caratteristiche specifiche del paziente. La tecnica DRS, combinata con la PPTR, aggiunge un'ulteriore informazione al processo, andando a quantificare le proprietà ottiche della pelle e valutando il contenuto dei cromofori presenti in essa, come l'emoglobina e la melanina, rendendo l'approccio adatto a diversi casi clinici. L'articolo [17], invece, mostra come questo approccio può essere adattato per monitorare la rimozione dei tatuaggi attraverso trattamenti laser. In questo contesto, la combinazione di DRS e PPTR viene utilizzata per valutare la profondità e la distribuzione delle particelle d'inchiostro all'interno della pelle, rendendo il trattamento più efficace e sicuro. Attraverso l'utilizzo di un modello a più strati che simula la struttura della pelle tatuata, il metodo permette di monitorare in tempo reale la diminuzione dell'inchiostro e la variazione della profondità del tatuaggio, in base al numero e all'intensità delle sessioni con il laser. Questa capacità di descrivere in modo non invasivo le modifiche dei tatuaggi rappresenta un vantaggio importante rispetto alle tecniche tradizionali, come l'analisi istologica, che non possono essere applicate in modo ripetuto o su aree esteticamente sensibili. Inoltre, l'utilizzo di DRS e PPTR non si limita solo alle applicazioni estetiche e dermatologiche, ma ha potenziali implicazioni in altre aree della medicina, come ad esempio il monitoraggio della cicatrizzazione delle ferite e l'analisi della vascolarizzazione di tessuti patologici. In conclusione, la capacità dell'approccio combinato DRS e PPTR di fornire dati oggettivi e non invasivi introduce nuove possibilità in ambito clinico, superando la valutazione dell'età del livido per includere l'analisi di lesioni vascolari, la gestione di trattamenti estetici complessi e, potenzialmente, il miglioramento di altre procedure mediche.

Conclusioni

Nell'elaborato sono stati analizzati diversi metodi per la valutazione oggettiva dell'età del livido, focalizzandosi sulla spettrofotometria di riflettanza (DRS), sull'immagine chimica iperspettrale e sulla radiometria fototermica pulsata (PPTR). Gli studi osservati hanno confermato che l'osservazione del colore giallo o la misurazione della presenza di prodotti di degradazione dell'emoglobina, in particolare la bilirubina, forniscono importanti informazioni per stimare l'età del livido. I risultati ottenuti hanno evidenziato che la DRS è fortemente influenzata da alcuni fattori, in particolare il sesso del soggetto e la profondità della lesione, mentre altri fattori, come la zona del livido o la costituzione e l'età del soggetto, non sono determinanti. L'immagine chimica iperspettrale, se combinata con un buon modello matematico per la procedura inversa, è in grado di fornire un'analisi tridimensionale della struttura dei lividi e consente di determinare in maniera oggettiva e non invasiva l'età di essi. Infine, tra le tre tecniche osservate, è possibile affermare che l'approccio combinato DRS-PPTR ad oggi rappresenta la migliore tecnica a disposizione. Questo perché, combinando la spettroscopia ottica e l'analisi termica, permette di misurare con precisione la profondità e la superficie del livido, offrendo una valutazione completa e tridimensionale.

Sviluppi futuri

Considerando i risultati ottenuti, in futuro la ricerca potrebbe concentrarsi maggiormente sull'ottimizzazione dell'approccio combinato DRS-PPTR, per ridurre l'impatto delle variabili individuali. Un'altra possibilità potrebbe essere l'integrazione di algoritmi di intelligenza artificiale per migliorare l'analisi dei dati raccolti attraverso l'immagine chimica iperspettrale. Inoltre, sarebbe utile applicare queste tecniche su un campione più ampio e diversificato di soggetti, per testare l'efficacia delle tecniche in condizioni reali. Infine, l'approccio combinato DRS-PPTR potrebbe essere utilizzato anche in altri tipi di lesioni cutanee, come le ferite chirurgiche, e per la valutazione di altre patologie cutanee.

Appendice A

Di seguito è illustrata la procedura relativa alla visualizzazione degli spettri di assorbanza dei vari campioni a diverse lunghezze d'onda, realizzata attraverso il software MATLAB. Utilizziamo le lunghezze d'onda dove sono presenti picchi di assorbanza e le aree in cui si osservano variazioni (414, 422, 470, 480, 490, 543, 576 nm). Infine, si tracciano le curve di assorbanza per entrambe le condizioni (livido fresco e livido di 3 giorni) usando i dati forniti.

```
% Pulizia dell'ambiente di lavoro
close all; % Chiude tutte le figure aperte
clear; % Cancella le variabili dalla memoria

% Lunghezze d'onda (in nm) per l'assorbanza di interesse in un range esteso
lunghezze_d_onda = [380, 414, 422, 470, 480, 490, 543, 576, 600, 650, 700, 750, 780]; % Range esteso da 380 a 780 nm

% Dati per l'assorbanza degli spettri per un livido fresco (<6 ore) dal PDF
assorbanza_fresco = [0.2, 1.1, 1.05, 0.8, 0.75, 0.72, 1.0, 1.05, 0.9, 0.7, 0.5, 0.3, 0.2];

% Dati per l'assorbanza degli spettri per un livido di 3 giorni dal PDF
assorbanza_tre_giorni = [0.15, 0.9, 0.88, 0.6, 0.55, 0.52, 0.85, 0.8, 0.7, 0.6, 0.4, 0.25, 0.15];

% Assicurati che i dati abbiano la stessa lunghezza
if length(lunghezze_d_onda) == length(assorbanza_fresco) &&
length(lunghezze_d_onda) == length(assorbanza_tre_giorni)
    % Crea il grafico
    figure;

    % Plot dei dati di assorbanza per lividi freschi
    plot(lunghezze_d_onda, assorbanza_fresco, '-o', 'LineWidth', 1.5,
'DisplayName', 'Livido Fresco (< 6 ore)');
    hold on;

    % Plot dei dati di assorbanza per lividi di 3 giorni
    plot(lunghezze_d_onda, assorbanza_tre_giorni, '-s', 'LineWidth', 1.5,
'DisplayName', 'Livido di 3 Giorni');

    xlabel('Wavelength (nm)');
    ylabel('Assorbanza (Abs)');
    title('Assorbanza degli spettri per lividi a diverse lunghezze d\onda
(Range Esteso)');
    legend('show');
    grid on;
else
    disp('Errore: Le lunghezze dei vettori non corrispondono. Controlla i
dati. ');
end

hold off; % Assicurati che il comando hold off venga eseguito correttamente
```

Appendice B

Di seguito è illustrata la procedura relativa alla visualizzazione degli spettri della prima derivata dei vari campioni a diverse lunghezze d'onda, realizzata attraverso il software MATLAB. Per il calcolo della prima derivata dell'assorbanza rispetto alla lunghezza d'onda usiamo:

$$\text{Prima Derivata} = \frac{\Delta \text{Assorbanza}}{\Delta \text{Lunghezza d'onda}}$$

Facendo riferimento al comando diff di MATLAB.

```
% Pulizia dell'ambiente di lavoro
close all; % Chiude tutte le figure aperte
clear; % Cancella le variabili dalla memoria

% Lunghezze d'onda (in nm) per l'assorbanza di interesse in un range esteso
lunghezze_d_onda = [380, 414, 422, 470, 480, 490, 543, 576, 600, 650, 700, 750,
780]; % Range esteso da 380 a 780 nm

% Dati per l'assorbanza degli spettri per un livido fresco (<6 ore) dal PDF
assorbanza_fresco = [0.2, 1.1, 1.05, 0.8, 0.75, 0.72, 1.0, 1.05, 0.9, 0.7, 0.5,
0.3, 0.2];

% Dati per l'assorbanza degli spettri per un livido di 3 giorni dal PDF
assorbanza_tre_giorni = [0.15, 0.9, 0.88, 0.6, 0.55, 0.52, 0.85, 0.8, 0.7, 0.6,
0.4, 0.25, 0.15];

% Calcolo della prima derivata per i lividi freschi
prima_derivata_fresco = diff(assorbanza_fresco) ./ diff(lunghezze_d_onda);

% Calcolo della prima derivata per i lividi di 3 giorni
prima_derivata_tre_giorni = diff(assorbanza_tre_giorni) ./
diff(lunghezze_d_onda);

% Lunghezze d'onda per il grafico delle derivate (escludendo l'ultimo punto)
lunghezze_d_onda_derivata = lunghezze_d_onda(1:end-1);

% Crea il grafico
figure;

% Plot dei dati della prima derivata per lividi freschi
plot(lunghezze_d_onda_derivata, prima_derivata_fresco, '-o', 'LineWidth', 1.5,
'DisplayName', 'Prima Derivata Livido Fresco (< 6 ore)');
hold on;

% Plot dei dati della prima derivata per lividi di 3 giorni
plot(lunghezze_d_onda_derivata, prima_derivata_tre_giorni, '-s', 'LineWidth',
1.5, 'DisplayName', 'Prima Derivata Livido di 3 Giorni');

% Aggiungi etichette agli assi
xlabel('Lunghezza d\onda (nm)');
ylabel('Prima Derivata (Assorbanza / nm)');
```

```
% Aggiungi titolo e legenda
title('Prima derivata dell\assorbanza degli spettri per lividi (Range
Esteso)');
legend('show');

% Migliora la visualizzazione della griglia
grid on;

hold off; % Assicurati che il comando hold off venga eseguito correttamente
```

Bibliografia

- [1] V. K. Hughes, P. S. Ellis, T. Burt and N. E. I. Langlois, “The practical application of reflectance spectrophotometry for the demonstration of haemoglobin and its degradation in bruises,” *J.Clin.Pathol.*, 57(4), 355-359, 2004.
[DOI: [10.1136/jcp.2003.011445](https://doi.org/10.1136/jcp.2003.011445)]
- [2] V. K. Hughes and N. E. I. Langlois, “Use of reflectance spectrophotometry and colorimetry in a general linear model for the determination of the age of bruises,” *Forensic Sci Med Pathol* (2010), 6, 275–281. [DOI: [10.1007/s12024-010-9171-z](https://doi.org/10.1007/s12024-010-9171-z)]
- [3] L. L. Randeberg, O. A. Haugen, R. Haaverstad and L. O. Svaasand, “A Novel Approach to Age Determination of Traumatic Injuries by Reflectance Spectroscopy,” *Lasers in Surgery and Medicine* 38(4), 277–289 (2006)
- [4] M. Bohnert, R. Baumgartner and S. Pollak, “Spectrophotometric evaluation of the colour of intra- and subcutaneous bruises,” *Int J Legal Med* (2000) 113(6), 343–348.
[Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/12228372>
- [5] K. Amazon, F. Soloni and A. M. Rywlin, “Separation of Bilirubin from Hemoglobin by Recording Derivative Spectrophotometry,” *A. J. Clin. Pathol.* 75: 519-523, 1981.
[Online]. Available: <https://academic.oup.com/ajcp/article/75/4/519/1793268>
- [6] T. M. Bydlon, R. Nachabé, N. Ramanujam, H. J. C. M. Sterenberg and B. H. W. Hendriks, “Chromophore based analyses of steady-state diffuse reflectance spectroscopy: current status and perspectives for clinical adoption,” *J. Biophotonics* 8, No. 1–2, 9–24 (2015). [DOI: [10.1002/jbio.201300198](https://doi.org/10.1002/jbio.201300198)]
- [7] G. Payne, N. Langlois, C. Lennard and C. Roux, “Applying visible hyperspectral (chemical) imaging to estimate the age of bruises,” *Med. Sci. Law* (2007) Vol. 47, No. 3, 225-232. [Online]. Available: <http://msl.sagepub.com>
- [8] B. Stam, M. J. C. Van Gemert, T. G. Van Leeuwen, A. H. Teeuw, A. C. Van Der Wal and M. C. G. Aalders, “Can color inhomogeneity of bruises be used to establish their age?,” *J. Biophotonics* 4, No. 10, 759–767 (2011). [DOI: [10.1002/jbio.201100021](https://doi.org/10.1002/jbio.201100021)]
- [9] L. L. Randeberg, E. L. Larsen, and L. O. Svaasand, “Characterization of vascular structures and skin bruises using hyperspectral imaging, image analysis and diffusion theory,” *J. Biophoton.* No. 1–2, 3, 53–65 (2010).
[DOI: [10.1002/jbio.200910059](https://doi.org/10.1002/jbio.200910059)]
- [10] G. Payne, C. Wallace, B. Reedy, C. Lennard, R. Schuler, D. Exline and C. Rouxa, “Visible and near-infrared chemical imaging methods for the analysis of selected Forensic samples,” *Talanta* 67 (2005) 334–344. [Online].
Available: <https://www.elsevier.com/locate/talanta>

- [11] E. Zherebtsov, V. Dremin, A. Popov, A. Dororin, D. Kurakina, M. Kirillin, I. Meglinski, and A. Bykov¹, “Hyperspectral imaging of human skin aided by artificial neural networks,” *Biomedical Optics Express* Vol. 10, No. 7, 1 July 2019 [Online]. Available: <https://doi.org/10.1364/BOE.10.003545>
- [12] B. S. Sorg, B. J. Moeller, O. Donovan, Y. Cao and M. W. Dewhirst, “Hyperspectral imaging of hemoglobin saturation in tumor microvasculature and tumor hypoxia development,” *Journal of Biomedical Optics* Vol.10(4), July/August 2005
- [13] A. Marin, N. Verdel, M. Milanić and B. Majaron, “Noninvasive Monitoring of Dynamical Processes in Bruised Human Skin Using Diffuse Reflectance Spectroscopy and Pulsed Photothermal Radiometry,” *Sensors* 2021, 21, 302 [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/journal/sensors>
- [14] L. Vidovic, M. Milanic, L. L. Randeberg and B. Majaron, “Quantitative characterization of traumatic bruises by combined pulsed photothermal radiometry and diffuse reflectance spectroscopy”. Presented at Photonic Therapeutics and Diagnostics XI. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/274070450>
- [15] L. Vidovic, M. Milanic, and B. Majaron, “Objective characterization of bruise evolution using photothermal depth profiling and Monte Carlo modeling,” *Journal of Biomedical Optics* 20(1), January 2015. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/270287931>
- [16] B. Li, B. Majaron, J. A. Viator, T. E. Milner, Z. Chen Y, Zhao, H. Ren and J. S. Nelson, “Accurate measurement of blood vessel depth in port wine stained human skin in vivo using pulsed photothermal radiometry,” *Journal of Biomedical Optics* 9(5), 961–966 (September/October 2004). [DOI: [10.1117/1.1784470](https://doi.org/10.1117/1.1784470)]
- [17] N. G. Zima, N. Verdel, M. Lukač and B. Majaron, “Objective monitoring of laser tattoo removal in human volunteers using an innovative optical technique: A proof of principle,” *Lasers Surg Med.* 2023;55:724–733. [Online]. Available: [wileyonlinelibrary.com/journal/lsm](https://www.wileyonlinelibrary.com/journal/lsm)

RINGRAZIAMENTI

Ci tengo a ringraziare la Professoressa Milena Martarelli per l'estrema disponibilità e l'aiuto che mi ha offerto nel corso di questi mesi. Desidero ringraziare i miei genitori, che mi hanno sempre sostenuta e incoraggiata in questo lungo percorso, non facendomi mai sentire sola nonostante la grande distanza, vi sarò per sempre grata. Ringrazio le mie due sorelle, Francesca ed Emma, colonne portanti della mia vita, per voi ci sarò sempre. Ed infine ringrazio tutte le persone che mi hanno accompagnato e sostenuto, anche solo con un piccolo gesto e momento, nel raggiungimento di questo importante traguardo.