

UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI INGEGNERIA

Identificazione di tracce ematiche sottoposte a lavaggio mediante tecnologia iperspettrale

Identification of blood traces subjected to washing by hyperspectral technology

Relatrice:

Milena Martarelli

Correlatore:

Paolo Castellini

Laureanda:

Lavinia Giglioni

Anno accademico 2022/2023

Alla mia famiglia e
ai miei angeli custodi

Abstract

Le macchie di sangue o i residui di sangue presenti su oggetti sono di fondamentale importanza nelle indagini forensi. L'età delle macchie di sangue può essere dedotta dalla loro composizione chimica, fornendo indicazioni sulla cronologia degli eventi. Metodi di elaborazione delle immagini digitali possono essere utilizzati per estrarre oggettivamente le caratteristiche dei pattern delle macchie di sangue, fornendo informazioni sulla posizione e sui movimenti di persone e oggetti in una scena del crimine . Una corretta analisi della scena, combinata con selezioni accurate di test chimici, può rivelare la presenza di macchie di sangue mantenendo intatte le informazioni del DNA, facilitando l'identificazione dei partecipanti successivamente. Date le informazioni significative derivabili dai residui di sangue, la loro rilevazione è cruciale per un'indagine efficace. Normalmente, il sangue viene identificato attraverso test chimici; tuttavia l'applicazione locale di queste sostanze chimiche nell'area delle macchie di sangue può portare alla perdita di prove o interferire con altre procedure. Un metodo di rilevamento senza contatto, applicabile su vaste aree della scena e automatizzabile, risulta fondamentale nella raccolta delle prove. L'Imaging iperspettrale (HSI), conosciuto anche come Spettroscopia d'Immagine (IS), rappresenta un approccio di visione artificiale che può essere efficacemente utilizzato in questo contesto. Attraverso l'analisi della risposta di riflettanza su tutto lo spettro elettromagnetico nel visibile e nel vicino infrarosso (VNIR), l'HSI può dedurre la presenza e le proprietà dei componenti del sangue, in particolare i derivati dell'emoglobina. Le sfide nell'impiego dell'HSI per il rilevamento del sangue sono molteplici, tra cui l'effetto della mescolanza spettrale delle macchie con la superficie sottostante, la variazione temporale degli spettri del sangue, discrepanze tra i riferimenti e gli spettri target, variazioni nelle apparecchiature di acquisizione, la complessità dell'ambiente di scena e dell'illuminazione. In questo scenario complesso, l'analisi multivariata dei dati attraverso l'elaborazione del segnale o l'uso di metodi di apprendimento automatico è essenziale per estrarre informazioni significative dagli spettri. Lo sviluppo di tali metodi richiede la considerazione di entrambi gli elementi presenti nella scena, inclusi potenziali fonti di errore come sostanze simili al sangue, e la valutazione delle prestazioni in condizioni simulate o mock-up , per testare l'affidabilità nelle situazioni di imaging reali. Questo set di dati comprende una serie di immagini iperspettrali di scenari simulati. Le scene sono state riprese in giorni diversi per catturare le variazioni temporali negli spettri del sangue. L'obiettivo di questo set di dati è rappresentare la diversità e la complessità dei casi di rilevamento del sangue.

INDICE

Lista delle Figure 7
Lista delle Tabelle 10

Introduzione 11

Capitolo 1 Indagini scientifiche sulla scena del crimine 13

Capitolo 2 Sangue 18
2.1 Anatomia e Fisiologia del sangue 18
2.2 Plasma 22
2.3 Eritrociti 24
2.3.1 Forma e Funzione 24
2.3.2 Ciclo vitale 28
2.3.3 Gruppi sanguigni 30
2.4 Leucociti 31
2.4.1 Forma e Funzione 31
2.4.2 Tipi di leucociti 32
2.4.3 Ciclo vitale 36
2.5 Piastrine 37
2.5.1 Forma e Funzione 37
2.5.2 Produzione delle piastrine 39
2.5.3 Emostasi 40
2.6 Prospettive cliniche 41
2.6.1 Malattie degli eritrociti 42
2.6.2 Malattie dei leucociti 43
2.6.3 Malattie delle piastrine 44

Capitolo 3 Metodologia di estrazione delle tracce ematiche 45
3.1 PCA per identificazione di macchie di sangue 46
3.2 Traccia campione 47
3.3 Identificazione delle tracce su PCA 48

Capitolo 4 Procedura di acquisizione delle tracce ematiche mediante telecamera iperspettrale 49
4.1 Banco di prova 53
4.2 Impostazione della misurazione dell'immagine iperspettrale 58
4.3 Acquisizione dell'immagine 60
4.4 Elaborazione delle immagini 62
4.5 Preparazione tracce e raccolta dati 63

Capitolo 5 Lo Spettrofotometro 81

Capitolo 6 Risultati 83

Lista degli Acronimi e dei Simboli 92
Bibliografia 94
Sitografia 98

Ringraziamenti

Lista delle Figure

Figura 1-Rappresentazione grafica dell'esame di campioni biologici attraverso nuove tecniche analitiche

Figura 2.1.1- Elementi figurati del sangue

Figura 2.1.2- Separazione del plasma e degli elementi figurati del sangue

Figura 2.3.1.1- Struttura dell'emoglobina

Figura 2.3.1.2-Dimensione e forma di un eritrocita

Figura 2.3.1.3- Microscopio elettronico a scansione

Figura 2.3.1.4- Microfotografia al microscopio elettronico a trasmissione di eritrociti in un capillare sanguigno

Figura 2.3.2.1-Eritropoiesi

Figura 2.3.3.1- Basi chimiche dei gruppi sanguigni AB0

Figura 2.4.2.1- Neutrofilo

Figura 2.4.2.2- Eosinofilo

Figura 2.4.2.3-Basofilo

Figura 2.4.2.4-Monocita

Figura 2.4.2.5- Linfocita

Figura 2.4.3.1-Leucopoiesi

Figura 2.5.1.1- Piastrine

Figura 2.5.3.1- Coagulo ematico (MES)

Figura 3.3.1-Rappresentazione schematica della PCA applicata ad un ipercubo

Figura 4.1-Schema dei percorsi di diffusione della luce sulla macchia di sangue su un substrato

Figura 4.2-L'interazione della luce con un campione

Figura 4.1 .1- Schema di configurazione dell'acquisizione di immagini iperspettrali

Figura 4.1 .2- Ipercubo di una macchia di sangue, con due dimensioni spaziali (x , y) e una lunghezza d'onda (λ)

Figura 4.1.3- Metodi per l'acquisizione di ipercubi tridimensionali

Figura 4.1.4- Schema che mostra i componenti di un sistema HSI

Figura 4.1.5- Sistema di imaging iperspettrale su una scena del crimine simulata

Figura 4.2.1-Allestimento sperimentale con l'HSI

Figura 4.5.1- Spettro di riferimento del sangue(a sinistra)e della candeggina (a destra)

Figura 4.5.2- Spettro del sangue(rosso) e della candeggina (blu)

Figura 4.5. 3-Tre campioni di cotone bianco

Figura 4.5.4 -Camera iperspettrale

Figura 4.5.5-Tre campioni con tre gocce di sangue prima del lavaggio con candeggina

Figura 4.5.6-Piano di lavoro

Figura 4.5.7-Immagine del campione di sangue asciutto dopo 15 minuti acquisito

Figura 4.5.8-Clusterizzazione iperspettrale del campione di sangue asciutto dopo 15 minuti

Figura 4.5.9- Clusterizzazione iperspettrale del campione di sangue lavato con candeggina e acqua

Figura 4.5.10- Clusterizzazione iperspettrale del campione di sangue lavato con candeggina e acqua dopo 48 ore

Figura 4.5.11- Clusterizzazione iperspettrale del campione di sangue lavato con candeggina e acqua dopo 8 giorni

Figura 4.5.12- Rappresentazione della composizione della soluzione

Figura 4.5.13- Visione dall’alto della seconda foto di Figura 4.5.12

Figura 4.5.14-Visione frontale dei dieci campioni immersi nella miscela

Figura 4.5.15- Visione dell’alto dei dieci campioni immersi nella miscela

Figura 4.5.16-Prova 1 campione con sangue

Figura 4.5.17- Prova 2 campione con sangue

Figura 4.5.18- Prova 3 campione con sangue

Figura 4.5.19- Prova 1 di candeggina

Figura 4.5.20- Prova 2 di candeggina

Figura 4.5.21- Prova 3 di candeggina

Figura 4.5.22-Piano di acquisizione mediante HSI

Figura 4.5.23- Tre campioni di sangue come riferimento del primo giorno

Figura 4.5.24- Tre campioni di candeggina come riferimento del primo giorno

Figura 4.5.25- Tre campioni di sangue lavato mediante candeggina del primo giorno

Figura 5.1-Spettrofotometro

Figura 6 .1-Spettro del sangue (rosso), della candeggina(blu) e del sapone(magenta) misurati con lo spettrofotometro

Figura 6.2 -Spettro del sangue (rosso), del sangue lavato con sapone(magenta) e del sangue lavato con candeggina(blu) misurati con lo spettrofotometro

Figura 6 .3-Immagine campione di sangue lavato con poca candeggina e acqua

Figura 6.4- Immagine estratta del campione di sangue lavato con poca candeggina e acqua

Figura 6 .5-Insieme degli spettri del sangue, del cotone, della candeggina e del sangue lavato con candeggina

Figura 6.6- Insieme degli spettri del sangue, del cotone, della candeggina e del sangue lavato con candeggina per il secondo giorno

Figura 6.7-Evoluzione temporale in PCA

Figura 6.8-Campioni di sapone del primo giorno

Figura 6 .9-Campioni di sapone del secondo giorno

Figura 6.10- Spettri del cotone (grigio scuro e grigio chiaro), del sangue (rosso) e della candeggina (blu)

Lista delle Tabelle

Tabella 2.1.1-Proprietà generali del sangue

Tabella 2.2.1- Composizione del plasma ematico

Tabella 2.2.2- Principali proteine del plasma ematico

Introduzione

La scienza forense svolge un ruolo cruciale nell'ambito legale, coinvolgendo varie discipline scientifiche nella risoluzione di questioni giuridiche. Secondo il National Institute of Standards and Technology Organization of Scientific Area Committees (OSAC), la scienza forense è definita come l'applicazione di principi e tecniche scientifiche per la raccolta, l'esame e l'analisi di prove fisiche legate alle questioni di giustizia penale.

Un aspetto fondamentale nella scienza forense è l'analisi delle prove, che può essere complessa data la vasta gamma di materiali presenti nelle scene del crimine. Gli scienziati forensi devono selezionare con attenzione test chimici, metodi analitici e tecniche per elaborare le prove senza alterarle, in modo da ottenere risultati affidabili per esami successivi e per i procedimenti legali.

In quest'ottica, l'imaging iperspettrale (HSI) è emerso come uno strumento eccezionale nella scienza forense. HSI integra l'imaging convenzionale con la spettroscopia, fornendo informazioni spaziali e spettrali da ogni punto dell'immagine del campione. Questa tecnica permette di misurare molte regioni spettrali con alta risoluzione, creando un dataset 3D chiamato ipercubo spettrale. I dati raccolti sono complessi e numerosi, quindi l'utilizzo di potenti trattamenti matematici è essenziale per estrarre informazioni rilevanti.

HSI è versatile poiché copre un'ampia gamma dello spettro elettromagnetico, consentendo la caratterizzazione dei materiali attraverso l'interazione luce-campione. La tecnologia è non invasiva e offre tempi rapidi di acquisizione dei dati, misurando più campioni contemporaneamente senza la necessità di preparazione del campione.

Tutto ciò ha fatto sì che l'HSI rappresenti un promettente strumento applicabile nella scienza forense, trovando potenziali applicazioni in diverse aree come la caratterizzazione delle tracce di sangue, la contraffazione di documenti e l'identificazione delle impronte digitali. Con il continuo sviluppo tecnologico, HSI potrebbe avere un ruolo sempre più centrale nelle indagini forensi, offrendo un approccio preciso, affidabile e privo di sostanze chimiche per la scoperta e l'analisi delle prove nei casi reali. [3-12].

L'Imaging Iperspettrale (HSI) è una tecnica di imaging sofisticata che unisce le funzionalità di una fotocamera digitale, catturando immagini bidimensionali di scena, e di uno spettroscopio, che registra la luce incidente in una serie di lunghezze d'onda strette. Questa combinazione di dati spaziali e spettrali offre una descrizione dettagliata delle scene,

consentendo l'identificazione delle sostanze presenti e l'osservazione delle loro caratteristiche, come il deterioramento nel tempo. L'HSI trova ampio impiego in diversi settori, tra cui l'agricoltura di precisione per il monitoraggio delle colture e la previsione del loro rendimento, l'ispezione non invasiva della qualità degli alimenti e l'identificazione dei pigmenti nell'ambito della conservazione artistica .

Nel contesto della scienza forense, l'HSI riveste un ruolo significativo nell'analisi di impronte digitali e tracce contaminate, nel rilevamento di residui di esplosivi o di colpi di arma da fuoco e nell'individuazione di alterazioni del suolo per la localizzazione di tombe o nella rivelazione di frammenti contraffatti in documenti.

Un'applicazione altamente rilevante dell'HSI è l'identificazione e l'analisi delle macchie di sangue, sfruttando le caratteristiche spettrali dei componenti.

Capitolo 1 Indagini scientifiche sulla scena del crimine

Secondo l'Uniform Crime Reporting Program del Federal Bureau of Investigation, nel 2015 sono stati segnalati a livello nazionale 1.197.704 crimini violenti. Questi crimini comprendono omicidi, omicidi colposi, stupri, rapine e aggressioni aggravate. Per determinare la colpevolezza o l'innocenza di una persona, la raccolta, la conservazione e l'analisi forense delle prove svolgono un ruolo fondamentale.

L'esame forense è cruciale sia per le forze dell'ordine che per l'ambiente medico, poiché consente di effettuare un'indagine medico-legale completa sulla scena del crimine, che spesso coincide con il corpo della vittima. Durante l'esame, le prove devono essere individuate, raccolte, imballate, protette e conservate correttamente, per poi essere trasferite alle forze dell'ordine seguendo rigide regole di custodia. Questo permette un'analisi adeguata e l'utilizzo delle prove nei procedimenti legali.

Durante la raccolta delle prove, l'esaminatore deve indossare sempre i guanti e cambiarli frequentemente utilizzando la tecnica pulita. Queste precauzioni sono essenziali per evitare contaminazioni incrociate o degradazione del DNA, che potrebbero compromettere l'affidabilità delle prove.

Una corretta gestione delle prove è di fondamentale importanza per garantire l'integrità delle indagini e assicurare che la verità emerga nei procedimenti giudiziari. Il corretto utilizzo delle tecniche forensi contribuisce a garantire giustizia per le vittime e per le persone coinvolte nei casi di crimine violento. [1][2].

Le indagini scientifiche sulla scena del crimine sono un ambito estremamente delicato. Negli ultimi anni, grazie agli sviluppi tecnologici e al lavoro della comunità scientifica, l'approccio e il lavoro sulla scena del crimine hanno subito cambiamenti significativi rispetto al passato.

Questi cambiamenti sono stati possibili grazie all'adozione di specifici protocolli da parte della comunità scientifica e al progresso tecnologico. Le attività investigative, come quelle di tipo biologico, balistico o dattiloscopico, iniziano proprio dalla scena del crimine, ovvero il luogo in cui si è verificato un reato.

La fase iniziale di queste attività è cruciale e consiste nella documentazione e nella conservazione della scena del crimine. Questo passo è fondamentale per raccogliere elementi

oggettivi e utilizzabili nel contesto forense. Successivamente, viene effettuata la repertazione, che consiste nell'acquisizione materiale di uno o più oggetti (reperti) ritenuti di interesse investigativo-forense, i quali verranno sottoposti a successive analisi di laboratorio.

In base alla normativa vigente in materia di accertamenti sul luogo dei fatti, anche in situazioni urgenti, la Polizia Giudiziaria è tenuta a recarsi immediatamente sul posto del crimine e a preservare il luogo dell'evento. Questo comporta il divieto di accesso all'area per conservare lo stato attuale della scena del crimine.

Questi metodi rigorosi e scientifici di indagine garantiscono l'integrità delle prove e assicurano che le informazioni raccolte siano affidabili e utilizzabili per stabilire la verità nei procedimenti giudiziari. La costante evoluzione delle tecniche investigative e il rispetto dei protocolli forensi sono fondamentali per la corretta amministrazione della giustizia e per la risoluzione dei casi di reato.

Dopo aver compiuto queste operazioni, di solito, la Polizia Giudiziaria, informando il PM (autorità giudiziaria competente) o agendo di propria iniziativa, procede a documentare in modo dettagliato lo stato del luogo del crimine utilizzando verbali e producendo documentazione fotografica e video.

Tuttavia, a volte, sia le difese degli imputati che i magistrati giudicanti, se consultati in merito, hanno lamentato che questa documentazione iniziale del luogo del crimine sia approssimativa o carente in alcuni aspetti, rendendo difficile ottenere una visione completa della situazione iniziale della scena del delitto. È importante specificare che questa situazione non è causata da imperizia o negligenza degli operatori di Polizia Giudiziaria, ma piuttosto da limitazioni tecniche nel processo di creazione di una documentazione completa.

In diverse occasioni, si è constatato che la documentazione composta da verbali, fotografie e video non era sufficiente per fornire una visione completa dello stato iniziale della scena del crimine. Queste limitazioni possono essere dovute a diversi fattori, come ad esempio la disponibilità di risorse tecniche o il tempo limitato per raccogliere prove e documentare accuratamente il luogo del reato.

L'importanza di una documentazione dettagliata e completa della scena del crimine è fondamentale per garantire un'indagine accurata e affidabile. Pertanto, è necessario continuare a investire nelle tecnologie e nelle risorse a disposizione della Polizia Giudiziaria per migliorare la qualità della documentazione e assicurarsi di avere tutte le informazioni necessarie per una corretta analisi forense e per l'amministrazione della giustizia.

L'analisi delle prove in campo forense è una sfida complessa. I materiali raccolti dalla scena del crimine sono diversi e a volte di natura sconosciuta, ma la scienza forense offre applicazioni critiche per il loro esame. I test chimici, i metodi analitici e le tecniche per l'elaborazione delle prove devono essere attentamente selezionati dagli scienziati forensi. L'obiettivo ideale è quello di interpretare, analizzare e giudicare le prove nel contesto originale della scena del crimine.

L'analisi forense è una disciplina specializzata il cui scopo principale è raccogliere, esaminare e interpretare le prove e le tracce trovate sulla scena del crimine o in qualsiasi contesto investigativo. Questo processo ha lo scopo di fornire informazioni oggettive e scientifiche che possono essere utilizzate per scoprire la verità e supportare le indagini legali.

Gli esperti hanno condotto approfondite analisi dei dati provenienti dalle tracce biologiche forensi, andando oltre gli approcci convenzionali come l'esame fisico e microscopico. Questi dati forniscono ulteriori informazioni cruciali per ricostruire gli eventi sulla scena del crimine, chiarire la dinamica del crimine stesso e determinare l'identità del donatore di una particolare traccia. Alcuni esempi di queste preziose informazioni includono:

Determinazione precisa dell'identità dei fluidi biologici : questo passo è essenziale per stabilire se i fluidi biologici presenti sulla scena del crimine provengono da un individuo specifico.

Stima del tempo trascorso dalla deposizione della traccia : Questa informazione è cruciale per determinare quanto tempo una traccia è rimasta sulla scena del crimine, il che può essere fondamentale per le indagini.

Raccolta di informazioni comportamentali e fenotipiche sul donatore : Queste informazioni includono dettagli come l'età, il sesso e l'ascendenza geografica del donatore, che possono essere utili per restringere ulteriormente il campo degli sospettati.

Questa revisione si propone di esaminare come la ricerca abbia affrontato la raccolta di informazioni investigative da alcune delle tracce biologiche più comuni trovate sulle scene del crimine, tra cui fluidi corporei, impronte digitali e capelli. Si presta particolare attenzione alle tecniche analitiche che possono essere utilizzate in situazioni in cui le analisi tradizionali non sono applicabili, ma che consentono rapidità ed evitano la distruzione delle prove, rendendole quindi adatte all'ambiente impegnativo e frenetico dell'analisi forense.

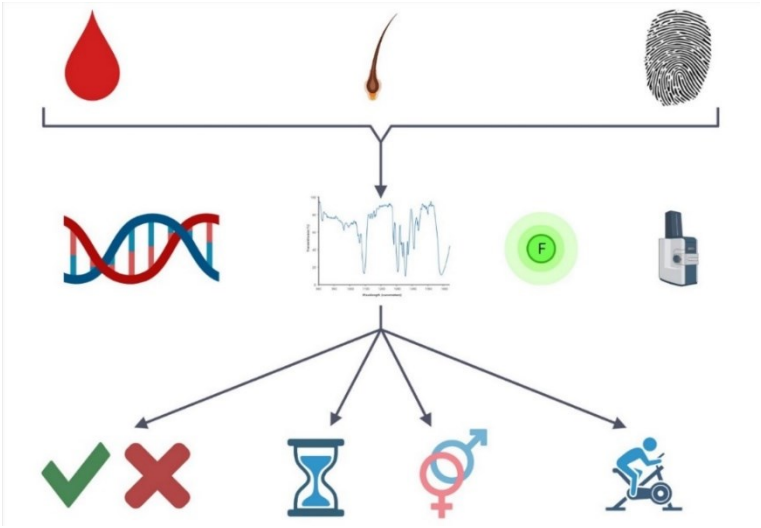


*Figura 1-**Rappresentazione grafica dell'esame di campioni biologici attraverso nuove tecniche analitiche** (ad esempio analisi genetica , spettroscopia a infrarossi , spettroscopia a fluorescenza o spettrometria di massa) allo scopo di raccogliere informazioni forensi. Questi includono: la natura della traccia, il tempo trascorso dalla deposizione, le caratteristiche fenotipiche del donatore o le informazioni comportamentali del donatore.[a]*

L'imaging iperspettrale (HSI) ha trovato applicazione nel campo delle indagini criminali e della patologia forense. Questa tecnica innovativa unisce la tradizionale fotografia con la spettroscopia, acquisendo una serie di immagini dello stesso oggetto attraverso centinaia di bande di lunghezze d'onda molto strette.

Fin dai primi passi nel 2000, è stato condotto uno studio iniziale per valutare l'utilità dell'HSI nell'incidenza di traumi e altre condizioni patologiche [33]. Più recentemente, nel 2020, l'HSI è stato affiancato alla modellazione chemiometrica, con l'obiettivo di potenziare la sua sensibilità e selettività nel contesto forense [34]. Questi studi hanno chiaramente dimostrato che l'HSI può rappresentare un valido strumento nelle analisi forensi. Non solo è in grado di fornire preziose informazioni chimiche, ma la sua componente visiva può anche agevolare la rapida individuazione di macchie latenti, rendendolo una risorsa preziosa per gli esperti forensi.

In questo contesto, l'imaging iperspettrale (HSI) è emerso come uno strumento analitico promettente che preserva l'integrità dei campioni o degli oggetti per analisi multiple e sequenziali, nonché per esami di controprova. Negli ultimi dieci anni (2011-2021), l'HSI è stato impiegato nella scienza forense con diverse applicazioni. Tra queste, l'esame di documenti è stata la principale area di esplorazione, seguita dall'analisi dell'invecchiamento delle macchie di sangue, l'analisi di tracce di esplosivi e residui di armi da fuoco.

Inoltre, strumenti chemiometrici sono stati affrontati e ritenuti cruciali per ottenere informazioni cruciali dai campioni. Nonostante le grandi sfide nell'applicazione dell'HSI nella scienza forense, ci sono stati chiari progressi sia dal punto di vista tecnologico che scientifico. Di conseguenza, è stata costruita una solida base per l'utilizzo dell'HSI in casi reali, consentendo ai periti forensi di ottenere risultati più accurati ed efficaci nelle loro indagini.

L'imaging iperspettrale (HSI) è una tecnologia innovativa che raccoglie ed elabora informazioni da tutto lo spettro elettromagnetico per ottenere uno spettro per ogni pixel presente nell'immagine di una scena. Il suo scopo principale è individuare oggetti e identificare materiali presenti nell'ambiente circostante. Grazie alla sua natura senza contatto e non distruttiva, l'HSI può essere utilizzato senza modificare o alterare il bersaglio analizzato.

Nell'ambito forense, l'HSI ha dimostrato grande efficacia e viene ampiamente utilizzato nelle indagini e nelle analisi sulla scena del crimine. Questa tecnologia è in grado di rilevare e analizzare diversi tipi di prove, rendendola uno strumento di notevole utilità per gli esperti forensi.

Tra le applicazioni più comuni della scienza forense, spiccano l'analisi delle tracce di sangue, la contraffazione di documenti, l'identificazione dei residui di arma da fuoco e delle impronte digitali. Grazie alla sua capacità di fornire informazioni dettagliate e accurate, l'HSI ha dimostrato di essere particolarmente promettente in queste aree, contribuendo significativamente alle indagini e fornendo prove cruciali per i procedimenti legali.

L'identificazione e il rilevamento delle prove forensi sono aspetti critici nelle indagini sulla scena del crimine. Diverse tecniche sono disponibili a tale scopo, tra cui quelle di potenziamento chimico e l'uso di sorgenti luminose specifiche per aumentare il contrasto tra le tracce e il loro sfondo. Tuttavia, molte di queste tecniche possono essere distruttive o soggette a interpretazioni umane.

L'imaging iperspettrale (HSI) si dimostra particolarmente adatto per l'identificazione senza contatto delle prove, riducendo al minimo il rischio di contaminazione e distruzione delle tracce. HSI combina l'imaging e la spettroscopia per ottenere un set di dati tridimensionale contenente informazioni spaziali e spettrali del campione. Questa tecnica offre la possibilità di analizzare il comportamento temporale degli spettri, fornendo informazioni preziose sulla

stima dell'età delle tracce forensi e agevolando la ricostruzione della sequenza temporale degli eventi.

Sebbene HSI sia stato inizialmente sviluppato per applicazioni di telerilevamento utilizzando dati di immagini satellitari, è stata estesa con successo ad altri campi, compresa la scienza forense. L'HSI può essere utilizzato in diverse parti dello spettro elettromagnetico, come nell'ultravioletto, nel visibile, nel vicino infrarosso, nel medio infrarosso o nell'infrarosso termico, e può essere adattato a diverse risoluzioni spaziali, dai microscopici ai paesaggi.

Uno dei vantaggi principali di HSI è la velocità di acquisizione dei dati e la possibilità di ridurre l'errore umano, oltre alla mancanza di distruzione delle tracce e la capacità di fornire risultati visivamente chiari. L'HSI si è dimostrato un potente strumento per l'analisi di tracce forensi latenti, come impronte digitali, e ha anche trovato impiego nella comparazione di materiali come fibre, vernici e inchiostri per identificare possibili collegamenti tra diverse tracce.

Recenti sviluppi nella tecnologia HSI hanno reso possibile l'utilizzo di sistemi portatili sulla scena del crimine, consentendo agli investigatori di visualizzare e interpretare le tracce nel loro contesto originale. L'introduzione di sistemi di scansione rapida ha inoltre semplificato il lavoro nei laboratori forensi, fornendo rapidamente informazioni utili alle indagini.

In conclusione, l'imaging iperspettrale rappresenta un prezioso strumento per le indagini scientifiche forensi, offrendo nuove opportunità e potenzialità per migliorare l'efficienza e l'accuratezza delle indagini sulla scena del crimine.

Capitolo 2 Sangue

2.1 Anatomia e Fisiologia del sangue

Il sangue ha sempre avuto un significato particolare nell'immaginario umano. Fin dai tempi antichi, l'uomo ha associato il fluire del sangue con la vita stessa della persona. Tuttavia, prima della metà del XX secolo, si sapeva relativamente poco riguardo alle specifiche funzioni del sangue. Negli ultimi anni, grazie all'avanzamento tecnologico, l'ematologia, la scienza che studia il sangue, ha fatto notevoli progressi aprendo una nuova era di conoscenza.

L'apparato circolatorio è composto dal cuore, dai vasi sanguigni e dal sangue. Quando ci riferiamo al cuore e ai vasi, parliamo dell'apparato cardiovascolare. L'ematologia è la branca specifica della medicina che si occupa dello studio del sangue.

Le funzioni fondamentali dell'apparato circolatorio si possono dividere in tre grandi gruppi: il trasporto, la protezione e la regolazione. Riguardo al trasporto, il sangue ha il compito di portare ossigeno dai polmoni ai tessuti dell'organismo e di prelevare anidride carbonica dai tessuti per portarla ai polmoni e eliminarla dal corpo. Inoltre, trasporta sostanze nutritive dall'apparato digerente a tutti gli altri tessuti, porta i prodotti di scarto metabolici ai reni per essere eliminati e trasporta gli ormoni dalle cellule endocrine ai loro organi bersaglio. Infine, il sangue veicola anche le cellule staminali provenienti dal midollo osseo e da altre fonti ai tessuti, dove si impiantano e maturano.

Per quanto riguarda la protezione, il sangue svolge un ruolo cruciale nell'infiammazione, che è un meccanismo di difesa volto a limitare la diffusione delle infezioni. I globuli bianchi presenti nel sangue sono responsabili della distruzione di microrganismi e cellule neoplastiche, mentre gli anticorpi e altre proteine ematiche neutralizzano tossine e patogeni. Inoltre, le piastrine secernono fattori coinvolti nel processo di coagulazione, che è fondamentale per minimizzare la perdita di sangue in caso di lesioni.

Per quanto riguarda la regolazione, il sangue mantiene un bilancio ottimale dei fluidi nel corpo, assorbendo o liberando fluido in diverse condizioni. Le proteine ematiche aiutano a stabilizzare il pH dei fluidi extracellulari tamponando gli acidi e le basi, e le modificazioni nel flusso ematico contribuiscono a regolare la temperatura corporea, indirizzando il sangue alla cute per la dispersione del calore o mantenendolo nelle regioni più profonde per conservarlo.

Considerando l'importanza di un trasporto efficiente di sostanze nutritive, prodotti di scarto, ormoni e soprattutto ossigeno da una parte all'altra dell'organismo, è facile comprendere perché una perdita eccessiva di sangue sia rapidamente fatale e perché l'apparato circolatorio necessiti di meccanismi per minimizzare queste perdite.

Un individuo adulto in media ha circa da 4 a 6 litri di sangue. Il sangue è un tessuto connettivo che contiene una sostanza intercellulare liquida, chiamata plasma ematico. Il plasma è un liquido giallo brillante e costituisce poco più della metà del volume del sangue.

Sospesi nel plasma, troviamo gli elementi figurati, ovvero cellule e frammenti cellulari, tra cui i globuli rossi, i globuli bianchi e le piastrine.

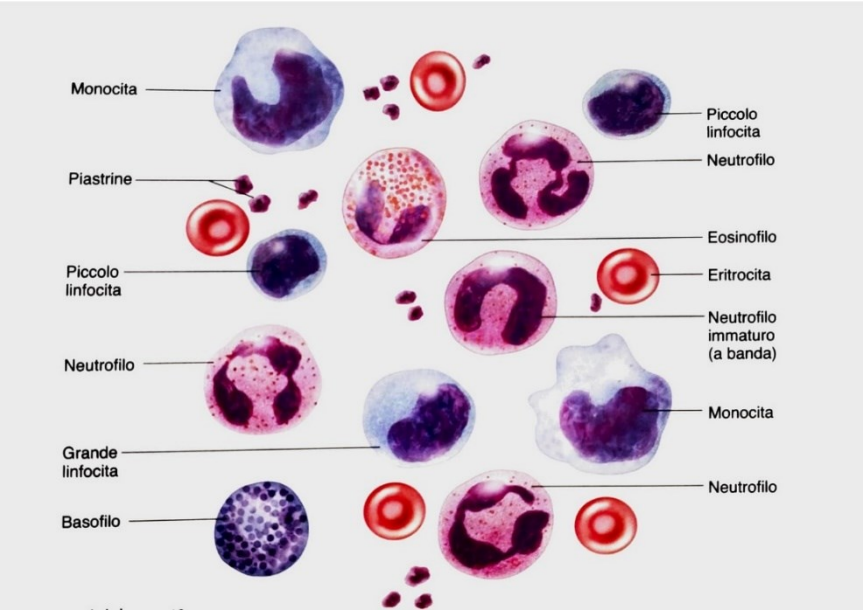


Figura 2.1.1- ***Elementi figurati del sangue.****[35]*

Il rapporto tra elementi figurati e plasma può essere facilmente verificato prelevando un campione di sangue, inserendolo in una provetta e centrifugandolo per alcuni minuti.

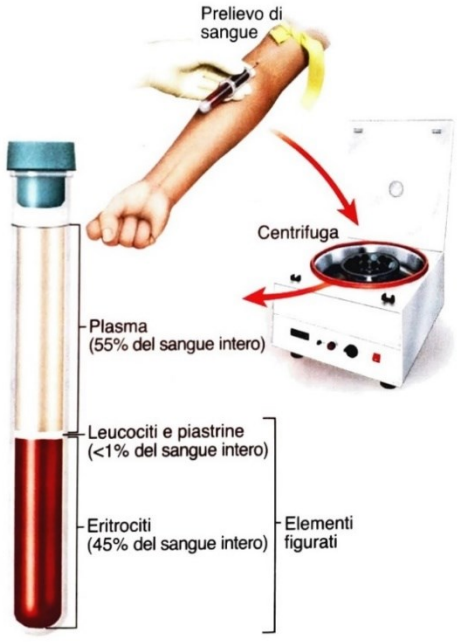


Figura 2.1.2- ***Separazione del plasma e degli elementi figurati del sangue.*** *Si mette una piccola quantità di sangue in una provetta e si centrifuga per separare il plasma dalle cellule. Gli eritrociti sono gli elementi più densi e sedimentano sul fondo della provetta; poi sedimentano le piastrine ed i globuli bianchi, mentre il plasma resta nella parte alta della provetta.[35]*

I globuli rossi, con una densità maggiore, si depositano sul fondo della provetta quando si effettua una centrifugazione, costituendo tipicamente dal 37% al 52% del volume totale (valore noto come ematocrito). I globuli bianchi e le piastrine, invece, formano una sottile zona color crema o cuoio chiamata buffy coat, appena sopra i globuli rossi, e insieme costituiscono una quota pari o inferiore all'1% del volume del sangue. Infine, nella parte più alta della provetta si trova il plasma, che costituisce circa dal 47% al 63% del volume.

In sintesi, il sangue è un prezioso tessuto connettivo che svolge funzioni vitali di trasporto, protezione e regolazione nel nostro organismo.

Frazione media del peso corporeo	8%
Volume in un organismo adulto	Donne: 4-5 L; Uomini: 5-6 L
Volume/peso corporeo	80-85 mL/kg
Temperatura media	38°C (100,4°F)
pH	7,35-7,45
Viscosità (relativa all'acqua)	Sangue intero: 4,5-5,5; plasma :2,0
Osmolarità	280-296 mOsm/L
Salinità media (soprattutto NaCl)	0,9%
Ematocrito (volume delle cellule ammassate)	Donne:37%-48% Uomini: 45%-52%
Emoglobina	Donne: 12-16 g/dL Uomini: 13-18 g/dL
Conta media dei GR	Donne: 4,2-5,4 million/µL Uomini: 4.6-6,2 million/ µL
Conta piastrinica	130.000-360.000/ µL
Conta dei GB totali	5000-10.000/ µL

Tabella 2.1.1-**Proprietà generali del sangue** (i valori possono lievemente variare a seconda dei metodi impiegati per la valutazione). *[35]*

2.2 Plasma

Il plasma è una complessa soluzione contenente acqua, proteine, sostanze nutritive, elettroliti, prodotti di scarto azotati, ormoni e gas. Dopo la coagulazione del sangue e la rimozione dei solidi, il liquido residuo è chiamato siero ematico. Il siero è sostanzialmente identico al plasma, con l'unica differenza dell'assenza della proteina coagulante fibrinogeno.

Le proteine sono il gruppo di soluti plasmatici più abbondanti in termini di peso, costituendo circa il 6-9 g/dL. Svolgono diverse funzioni cruciali, tra cui la coagulazione del sangue, la difesa immunitaria e il trasporto di altre sostanze come ferro, rame, lipidi e ormoni idrofobici. Le proteine plasmatiche si suddividono principalmente in tre categorie: le albumine, le globuline e il fibrinogeno. Esistono altre proteine plasmatiche essenziali per la sopravvivenza, ma costituiscono meno dell'1% del totale.

Acqua	92% del peso
Proteine	Albumina, globuline, fibrinogeno, altri fattori di coagulazione, enzimi e altre (vedi Tabella)
Nutrienti	Glucosio, amminoacidi, acido lattico, lipidi (colesterolo, acidi grassi, lipoproteine, trigliceridi e fosfolipidi), ferro, oligoelementi e vitamine
Elettroliti	Sali di sodio, potassio, magnesio, calcio, cloro, bicarbonato, fosfato e solfato
Prodotti di scarto azotati	Urea, acido urico, creatinina, creatina, bilirubina e ammoniaca
Ormoni	Tutti gli ormoni trasportati nel sangue
Gas	Ossigeno, anidride carbonica e azoto

Tabella 2.2.1- ***Composizione del plasma ematico.*** *[35]*

L'albumina è la proteina plasmatica più piccola e abbondante, svolge importanti funzioni di trasporto di vari soluti e tamponamento del pH plasmatico. Inoltre, contribuisce alla viscosità e all'osmolarità del sangue, influenzando così il volume ematico, la pressione e il flusso sanguigno.

Le globuline si suddividono in tre sottoclassi: alfa (α), beta (β) e gamma (γ) globuline. Queste proteine hanno ruoli chiave nel trasporto di soluti, nella coagulazione e nell'immunità.

Il fibrinogeno, invece, è un precursore solubile della fibrina, una proteina adesiva che forma l'impalcatura del coagulo ematico, contribuendo alla formazione della coagulazione.

Oltre a queste, molte altre proteine plasmatiche svolgono funzioni enzimatiche coinvolte nel processo di coagulazione. Insieme, queste proteine plasmatiche svolgono un ruolo essenziale nel mantenimento dell'omeostasi del sangue e della salute generale dell'organismo.

PROTEINE	**FUNZIONI**
Albumina (60%)	Il contributore più importante alla viscosità e all'osmolarità del sangue; trasporta lipidi, ormoni , calcio ed altri soluti; tampona il pH ematico
Globuline(36%)	
Alfa(α) globuline	
Aptoglobulina	Trasporta l'emoglobina rilasciata dagli eritrociti morti
Ceruloplasmina	Trasporta il rame
Protrombina	Promuove la coagulazione del sangue
Altre	Trasportano lipidi, vitamine liposolubili ed ormoni
Beta (β) globuline	
Transferrina	Trasporta il ferro
Proteine del complemento	Aiutano nella distruzione di tossine e microrganismi
Altre	Trasportano lipidi
Gamma (γ) globuline	Anticorpi; combattono i patogeni

Fibrinogeno (4%)	Diventa fibrina, il componente principale dei coaguli ematici

Tabella 2.2.2- ***Principali proteine del plasma ematico*** *(percentuale della proteina plasmatica totale in base al peso). [35]*

2.3 Eritrociti

Gli eritrociti, noti anche come globuli rossi del sangue (GR), svolgono due funzioni principali nel nostro organismo: la prima è quella di raccogliere l'ossigeno dai polmoni e trasportarlo ai tessuti del corpo, mentre la seconda è quella di prelevare l'anidride carbonica dai tessuti e liberarsene nei polmoni. Queste funzioni sono di vitale importanza per la sopravvivenza dell'organismo.

I globuli rossi costituiscono la maggioranza degli elementi figurati nel sangue ed è proprio questa abbondanza che li rende facilmente studiabili. Tuttavia, la loro importanza fondamentale va oltre l'aspetto della facilità di studio. Infatti, sebbene un deficit grave di leucociti (globuli bianchi) o piastrine possa comportare rischi letali nel giro di pochi giorni, una carenza severa di eritrociti può risultare fatale nel giro di pochi minuti.

La mancanza di una quantità sufficiente di eritrociti, che sono responsabili del trasporto dell'ossigeno vitale, può portare rapidamente alla morte in caso di un trauma grave o di un'emorragia. Senza una quantità adeguata di eritrociti che trasportano l'ossigeno ai tessuti, l'organismo non può sopravvivere a lungo.

Pertanto, la presenza e la funzione dei globuli rossi sono essenziali per la vita stessa dell'essere umano. Garantire la loro adeguata produzione e funzionalità è di cruciale importanza per il mantenimento della salute e la prevenzione di gravi conseguenze per l'organismo.

2.3.1 Forma e Funzione

Un eritrocita ha una forma discoidale con i margini più spessi e la zona centrale incavata. Ha un diametro di circa 7,5 μm e uno spessore di 2 μm nella zona periferica . Sebbene la maggior parte delle cellule, compresi i globuli bianchi , posseggano molti organuli, i GR perdono quasi tutti i propri organuli durante lo sviluppo e la loro struttura interna risulta perciò notevolmente scarsa. Quando viene osservato al microscopio elettronico a

trasmissione, l'interno di un GR appare uniformemente grigio. Dal momento che sono privi di mitocondri i GR contano solo sulla fermentazione anaerobica per produrre ATP. Non avendo nucleo e DNA, i GR non possono produrre proteine e dividersi per mitosi. La mancanza di un nucleo ha un vantaggio di primaria importanza. Quando il GR nel corso del suo sviluppo perde il nucleo, diventa concavo al centro ed acquisisce una forma biconcava. Il vantaggio principale di questa forma è quello di consentire alla fitta sospensione di globuli rossi di scorrere attraverso i grandi vasi sanguigni con un flusso laminare tranquillo che minimizza la turbolenza e permette al globulo rosso di piegarsi e passare lungo i vasi sanguigni più sottili. Tale forma è stata ritenuta la più semplice , più stabile per la cellula stessa e il suo citoscheletro si rilassa all'interno quando il nucleo viene rimosso, e non può avere alcuna altra funzione fisiologica. La membrana plasmatica di un GR maturo è provvista di glicoproteine e glicolipidi sulla superficie esterna che determinano il tipo sanguigno di un individuo. Sulla sua superficie interna ci sono due proteine citoscheletriche (la spectrina e l'actina) che conferiscono alla membrana elasticità e durezza. Questo è specialmente importante quando i GR passano attraverso i piccoli capillari sanguigni e i sinusoidi. Molti di questi vasi sono più stretti del diametro di un GR, costringendo quest'ultimo a stirarsi, flettersi e piegarsi per poterci passare attraverso. Quando entrano in vasi di dimensioni più grandi , tornano alla loro forma discoidale come un tubo ripieno d'aria all'interno. Non essendoci spazio occupato dagli organuli, i GR possono trasportare più emoglobina per un dato volume cellulare. Il loro citoplasma è formato principalmente da una soluzione al 33% di emoglobina (circa 280 milioni di molecole per cellula).

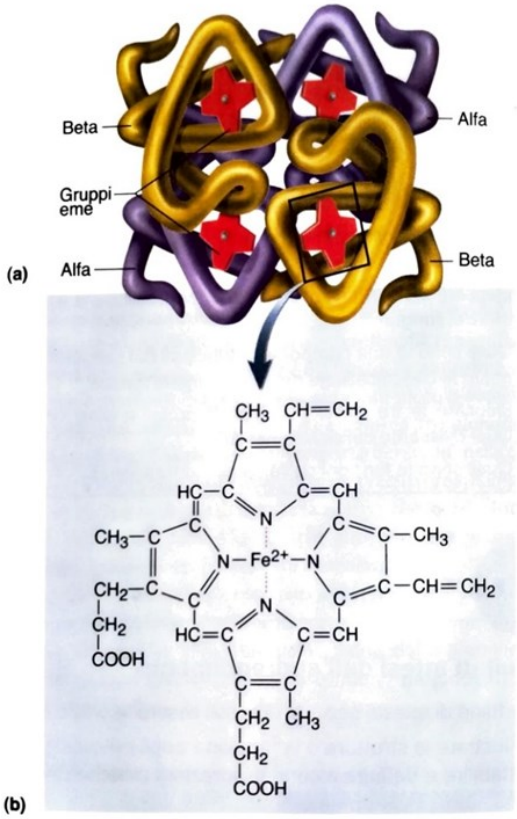


Figura 2.3.1.1- ***Struttura dell'emoglobina****. a) Una molecola di emoglobina è costituita da due proteine alfa e da due proteine beta, ciascuna delle quali è coniugata a un gruppo eme non proteico. b)Struttura del gruppo eme. [35]*

L'emoglobina è conosciuta per la sua funzione di trasporto di ossigeno , ma contribuisce anche al trasporto dell'anidride carbonica ed all'azione tamponante del pH del sangue.

La quantità dei globuli rossi circolanti è molto importante per la salute, perché determina la quantità di ossigeno che il sangue può trasportare. Due misure che si fanno più spesso sono misure quantitative: il conteggio dei globuli rossi e l'ematocrito , o volume dei globuli rossi ammassati (Ht). Il numero varia normalmente da 4,6 a 6,2 milioni di GR/µL negli uomini e da 4,2 a 6,2 milioni di GR/µL nelle donne. L'ematocrito è la percentuale del volume di sangue composto di GR. Negli uomini normalmente varia tra 45% e 52%; nelle donne tra 37% e 48%.

Il colore rosso del sangue è causato dalla sua emoglobina (Hb), una proteina che serve per il trasporto di gas , che contiene ferro e che normalmente si trova solo nei globuli rossi. L'emoglobina è costituita da quattro catene proteiche chiamate globine. Nell'emoglobina dell'adulto , due di queste globine , le catene alfa (α), sono lunghe 141 amminoacidi e le

altre due , le catene beta (β), sono lunghe 146 amminoacidi. Un componente non proteico , chiamato gruppo eme è legato ad ogni catena proteica. Al centro di ogni eme c'è uno ione ferroso, che è il sito di legame per l'ossigeno. Avendo quattro gruppi eme, ogni molecola di emoglobina può trasportare fino a 4 O_2 . Anche circa 5% della CO_2 del sangue è trasportata dall'emoglobina , ma questa è legata alla componente globina invece che all'eme. Una molecola di emoglobina può quindi trasportare simultaneamente entrambi i gas. La concentrazione di emoglobina nel sangue è normalmente compresa tra i 13 e i 18 g/dL negli uomini e tra i 12 e i 16 g/dL nelle donne.

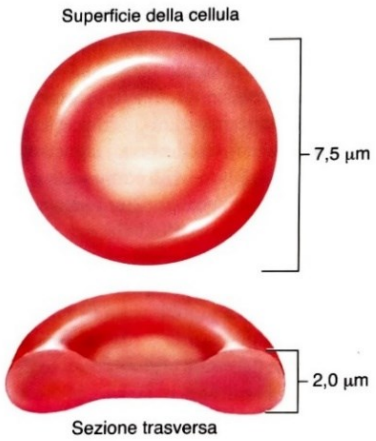


*Figura 2.3.1.2-**Dimensione e forma di un eritrocita.** [35]*



*Figura 2.3.1.3- **Microscopio elettronico a scansione**. Si osservi la forma concava delle cellule. [35]*

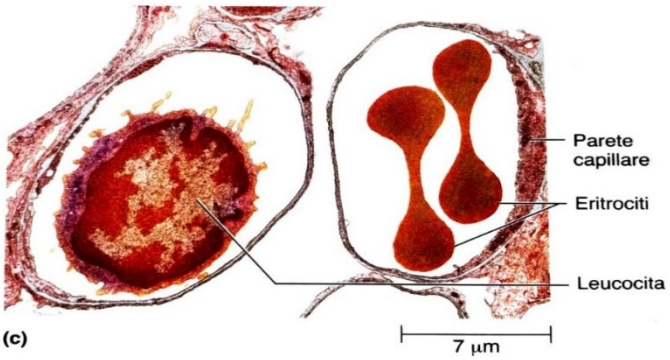


Figura 2.3.1.4- ***Microfotografia al microscopio elettronico a trasmissione di eritrociti in un capillare sanguigno.*** *Si noti quanto siano sottili le cellule al centro, e la mancanza di organuli o di altre strutture interne. [35]*

2.3.2 Ciclo vitale

Il processo di produzione dei globuli rossi è noto come eritropoiesi. Comprendere l'emopoiesi fornisce le basi per la comprensione di patologie come le leucemie, le anemie e altre malattie del sangue. I tessuti responsabili della produzione delle cellule del sangue sono chiamati tessuti emopoietici. Durante lo sviluppo embrionale, il primo tessuto emopoietico si forma nel sacco vitellino, una membrana presente in tutti gli embrioni dei vertebrati. Questo tessuto produce i precursori delle prime cellule del sangue. Anche negli animali che non depongono uova, il sacco vitellino mantiene la sua funzione emopoietica. Entro la terza settimana dello sviluppo umano, si formano gli ammassi cellulari chiamati isole sanguigne, da cui derivano le cellule staminali che migrano nell'embrione per colonizzare il midollo osseo, il fegato, la milza e il timo. Questi siti saranno responsabili della produzione di cellule del sangue durante tutto lo sviluppo fetale. Il fegato smette di produrre cellule del sangue poco prima della nascita, mentre la milza cessa di produrre globuli rossi poco dopo, ma continua a produrre linfociti per tutta la vita. Dall'infanzia in poi, il midollo osseo rosso diventa il principale responsabile della produzione di tutti e sette i tipi di elementi del sangue, mentre i linfociti vengono prodotti sia nel midollo osseo che nei tessuti e negli organi linfatici. La formazione di sangue nel midollo osseo e negli organi linfatici è rispettivamente chiamata emopoiesi mieloide e linfoide.

Tutti gli elementi del sangue derivano da un tipo comune di cellula staminale del midollo osseo chiamata cellula staminale emopoietica. Queste cellule si moltiplicano a un ritmo relativamente lento, mantenendo una popolazione relativamente ridotta nel midollo. Alcune

di queste cellule si differenziano in unità formanti colonie (CFU), ciascuna destinata a produrre una specifica classe di elementi del sangue. Attraverso le cellule precursore, le CFU si dividono e si differenziano in elementi formati maturi.

La produzione dei globuli rossi, o eritropoiesi, inizia quando una cellula staminale pluripotente diventa un'unità formante colonie eritrocitarie (ECFU). L'ormone eritropoietina (EPO) stimola le ECFU a svilupparsi in proeritroblasti, seguiti da eritroblasti. Gli eritroblasti si moltiplicano e sintetizzano l'emoglobina. Una volta completata questa fase, il nucleo si riduce di volume e viene espulso dalla cellula. A questo punto, la cellula è chiamata reticolocito, per via delle reti temporanee di ribosomi presenti al suo interno. I reticolociti lasciano il midollo osseo e passano nel sangue circolante. Quando tutti i poliribosomi si sono disintegrati, la cellula diventa un eritrocita maturo. Normalmente, dallo 0,5% all'1,5% dei globuli rossi circolanti sono reticolociti, ma questa percentuale aumenta quando l'organismo sta producendo globuli rossi in modo particolarmente rapido, ad esempio per compensare le perdite di sangue. L'intero processo di trasformazione delle cellule staminali pluripotenti in globuli rossi maturi dura da 3 a 5 giorni e comprende quattro fasi principali: riduzione del volume cellulare, aumento del numero delle cellule, sintesi dell'emoglobina e perdita del nucleo e di altri organuli. Questo processo genera circa 1 milione di globuli rossi al secondo, pari a 20 mL di globuli rossi prodotti al giorno. Dopo aver lasciato il midollo osseo, i globuli rossi hanno una durata di vita media di 120 giorni. Con il passare del tempo, le proteine delle loro membrane si deteriorano, rendendo la membrana sempre più fragile. Poiché i globuli rossi non hanno nucleo o ribosomi per sintetizzare nuova spectrina, alla fine si rompono mentre cercano di passare attraverso capillari e sinusoidi stretti. La milza è stata definita il "cimitero degli eritrociti" perché i globuli rossi trovano particolare difficoltà a attraversare i suoi piccoli canali. Qui le cellule vecchie sono intrappolate, si rompono e vengono distrutte. La vita media di un globulo rosso è considerata relativamente breve, poiché non ha gli organuli per la sintesi proteica e non può autoripararsi. Tuttavia, 120 giorni costituiscono un periodo di vita piuttosto lungo rispetto agli altri elementi del sangue. La maggior parte dei leucociti ha una vita inferiore a una settimana, mentre le piastrine sopravvivono per circa 10 giorni. Solo i monociti e i linfociti vivono più a lungo dei globuli rossi.

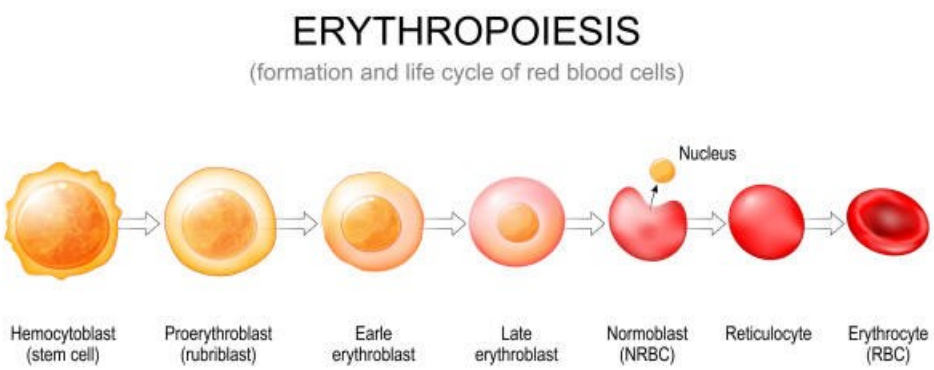


*Figura 2.3.2.1-**Eritropoiesi**. Fasi dello sviluppo di un globulo rosso del sangue*

2.3.3 Gruppi sanguigni

All'interno della popolazione umana, esistono numerosi gruppi sanguigni determinati geneticamente, ognuno dei quali comprende diversi tipi di sangue. Tra i gruppi più noti si trovano il sistema ABO (con i gruppi sanguigni A, B e O) e il sistema Rh (con i tipi Rh positivo e Rh negativo). Questi tipi sanguigni differiscono in base alla composizione chimica dei glicolipidi presenti sulla superficie dei globuli rossi. Questi glicolipidi agiscono come antigeni, cioè sostanze capaci di stimolare una reazione immunitaria. Nel plasma sanguigno sono presenti anticorpi che reagiscono contro gli antigeni incompatibili presenti sui globuli rossi estranei.

L'interazione tra gli antigeni presenti sui globuli rossi e gli anticorpi presenti nel plasma determina la compatibilità tra donatore e ricevente nelle trasfusioni di sangue. Ad esempio, una persona di tipo A ha anticorpi di tipo B nel proprio plasma sanguigno. Se per errore viene somministrata una trasfusione di sangue di tipo B a questa persona, gli anticorpi reagiranno con i globuli rossi del donatore. Ciò provoca l'aggregazione dei globuli rossi, che possono ostruire la circolazione nei piccoli vasi, causando danni gravi agli organi vitali come il cervello, il cuore, i polmoni e i reni. I globuli rossi agglomerati si rompono, rilasciando l'emoglobina nel sangue. Questa emoglobina liberata viene filtrata dai reni, dove può ostruire i tubuli renali e causare l'insufficienza renale in appena una settimana. Situazioni simili si verificano quando una persona di tipo B riceve sangue di tipo A, oppure quando una persona di tipo O riceve sangue di tipo A o B.

L'incompatibilità tra i tipi Rh di madre e feto può talvolta causare una grave anemia nel neonato, nota come malattia emolitica del neonato.

Ecco perché è fondamentale considerare attentamente la compatibilità dei gruppi sanguigni e del sistema Rh nelle trasfusioni di sangue per evitare reazioni avverse e problemi di salute potenzialmente gravi.

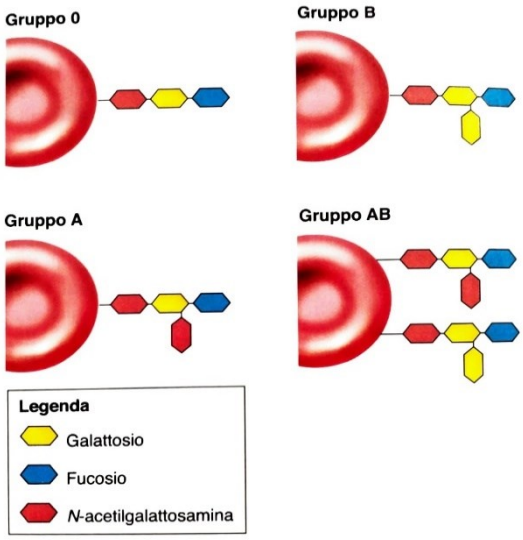


*Figura 2.3.3.1- **Basi chimiche dei gruppi sanguigni AB0**. I tipi sanguigni sono determinati dalla composizione chimica dei fosfolipidi della membrana plasmatica dei globuli rossi. I tipi A, B, AB E O degli eritrociti differiscono solo nei tre o quattro amminoacidi terminali delle molecole dei glicolipidi. Finiscono tutti con galattosio e fucosio, ma differiscono per la presenza o assenza e per il tipo di zucchero legato al galattosio. Lo zucchero aggiuntivo è assente nel tipo O; è N-acetilglucosamina nel tipo A; è un altro galattosio nel tipo B; le cellule di tipo AB hanno entrambe le catene tipo A e B. [35]*

2.4 Leucociti

2.4.1 Forma e Funzione

I leucociti, noti anche come globuli bianchi (GB), costituiscono la minoranza degli elementi presenti nel sangue, con un numero compreso tra 5000 e 10.000 GB/µL. Nonostante la loro bassa quantità, il loro ruolo è fondamentale poiché svolgono una funzione essenziale nel proteggere l'organismo dai microrganismi infettivi e da altri patogeni.

All'interno di uno striscio di sangue, i leucociti sono facilmente riconoscibili grazie ai loro nuclei di notevoli dimensioni, che presentano colorazioni che variano dal violetto brillante al porpora scuro con i comuni metodi di colorazione istologica. Nonostante la loro scarsa presenza nel flusso sanguigno, i leucociti sono molto più abbondanti nell'organismo poiché

trascorrono solo poche ore nel torrente ematico; successivamente, migrano attraverso le pareti dei capillari e delle venule per continuare il loro ciclo vitale nei tessuti connettivi.

A differenza degli eritrociti, i leucociti mantengono i loro organuli durante tutto il loro ciclo di vita. Al microscopio elettronico a trasmissione, si può osservare la complessa struttura interna di questi globuli bianchi. Tra gli organuli presenti, troviamo quelli necessari per la sintesi proteica, tra cui il nucleo, il reticolo endoplasmatico rugoso, i ribosomi e il complesso di Golgi, poiché i leucociti devono continuamente sintetizzare proteine per svolgere le loro funzioni.

Inoltre, alcune di queste proteine vengono immagazzinate nei lisosomi e in altri organuli, manifestandosi come granuli citoplasmatici di notevoli dimensioni. Questa caratteristica permette di distinguere i diversi tipi di leucociti tra loro, ciascuno con specifiche funzioni e ruoli nel sistema immunitario.

2.4.2 Tipi di leucociti

I leucociti, noti comunemente come globuli bianchi (GB), sono suddivisi in cinque tipi distinti, differenziandosi per dimensione relativa, numero, forma e dimensione del nucleo, la presenza di granuli citoplasmatici e altre caratteristiche morfologiche. La funzione di questi globuli bianchi è di fondamentale importanza per il sistema immunitario, difendendo l'organismo da potenziali minacce.

Tutti i leucociti contengono lisosomi chiamati granuli non specifici (azzurrofili) nel citoplasma, così denominati perché assorbono i coloranti blu o violetti utilizzati nelle analisi del sangue. Tre dei cinque tipi di leucociti (neutrofili, eosinofili e basofili) sono classificati come granulociti a causa della presenza di granuli specifici che si colorano distintivamente e permettono di distinguere un tipo di cellula dall'altro. I basofili prendono il nome dai loro granuli specifici, intensamente colorati dal blu di metilene, un colorante basico contenuto nella miscela di coloranti utilizzati per le analisi ematiche. Gli eosinofili, invece, si distinguono per i granuli specifici che si colorano con l'eosina, un colorante acido della colorazione di Wright. I granuli specifici dei neutrofili non si colorano intensamente con questi coloranti e contengono enzimi e altre sostanze chimiche impiegate nella difesa contro i patogeni.

I restanti due tipi di leucociti (monociti e linfociti) sono denominati agranulociti in quanto mancano di granuli specifici nel citoplasma. Le cellule agranulocitiche presentano granuli

non specifici poco visibili al microscopio a campo chiaro, risultando in un citoplasma relativamente libero. È importante ricordare che il colore dei nuclei e dei granuli nei granulociti non è naturale, ma dipende dai coloranti utilizzati per la colorazione degli strisci di sangue analizzati. La formula leucocitaria, invece, fornisce il numero di cellule di ciascun tipo relativamente al totale dei leucociti.

I neutrofili costituiscono il gruppo più numeroso di globuli bianchi, rappresentando dal 60% al 70% del totale dei leucociti circolanti. Il loro nucleo è chiaramente visibile e nei neutrofili maturi è composto tipicamente da tre a cinque lobi connessi da sottili segmenti nucleari. Nei neutrofili giovani, il nucleo appare indiviso a forma di banda, denominati cellule a banda o a bastone. Il citoplasma contiene granuli specifici rossastri-violetti che conferiscono un colore lilla-pallido. Queste cellule svolgono una funzione antibatterica molto aggressiva, distruggendo i batteri attraverso fagocitosi e digestione, ma anche rilasciando una potente miscela di prodotti chimici tossici, tra cui ipoclorito (HClO) e anione superossido, letali per gli invasori ma anche per i neutrofili stessi.

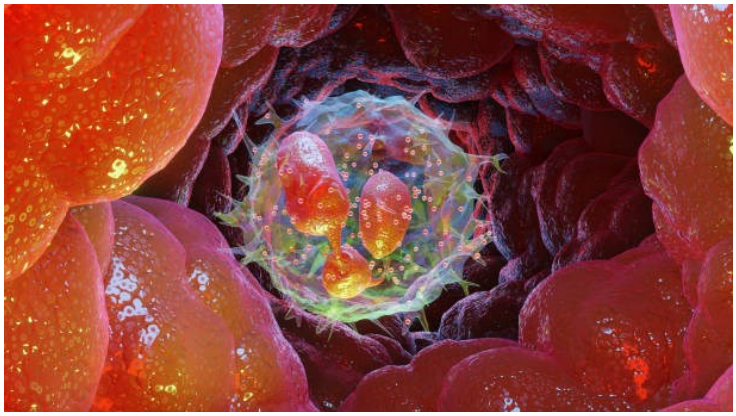


Figura 2.4.2.1- ***Neutrofilo***

Gli eosinofili sono presenti in una quota compresa tra il 2% e il 4% dei globuli bianchi totali. La loro conta può variare in base al momento della giornata, stagione o fase del ciclo mestruale, e aumenta in presenza di allergie, infezioni parassitarie, malattie del collagene o patologie che coinvolgono milza e sistema nervoso centrale. Gli eosinofili sono abbondanti nelle membrane mucose dei tratti respiratorio, digestivo e urinario inferiore. Il loro nucleo è costituito da due grandi lobi connessi da un segmento sottile, e il citoplasma è ricco di granuli specifici grossolani, colorati dal rosa all'arancione. Questi leucociti secernono composti chimici che indeboliscono o distruggono parassiti di dimensioni relativamente grandi, non facilmente fagocitabili da altri globuli bianchi. Inoltre, essi eliminano composti chimici

infiammatori, complessi antigene-anticorpo e allergeni, contribuendo alla risposta immunitaria.

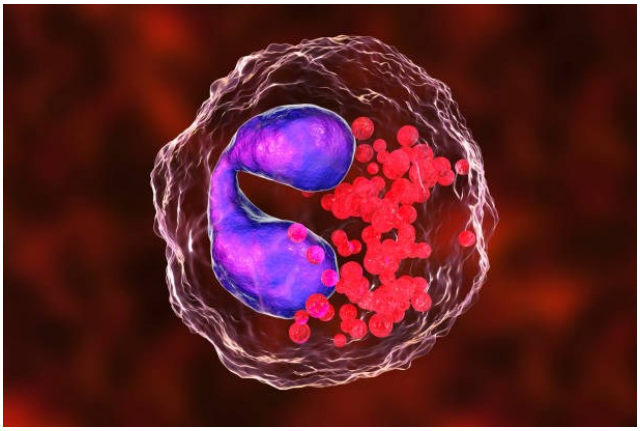


Figura 2.4.2.2- ***Eosinofilo***

I basofili, meno rappresentati tra i globuli bianchi, costituiscono meno dello 0,5% del totale dei leucociti. Sono caratterizzati dalla presenza di granuli specifici di grandi dimensioni, di un colore viola intenso, che nascondono in gran parte il nucleo a forma di S o di U. Questi globuli bianchi secernono due composti chimici fondamentali per la difesa dell'organismo: l'istamina, un vasodilatatore che favorisce il flusso sanguigno verso tessuti lesionati, e l'eparina, un anticoagulante che promuove la mobilità di altri globuli bianchi nell'area interessata. Inoltre, i basofili rilasciano segnali chimici che richiamano eosinofili e neutrofili nel sito dell'infezione. Il numero dei basofili può aumentare in alcune patologie come il diabete o la varicella.

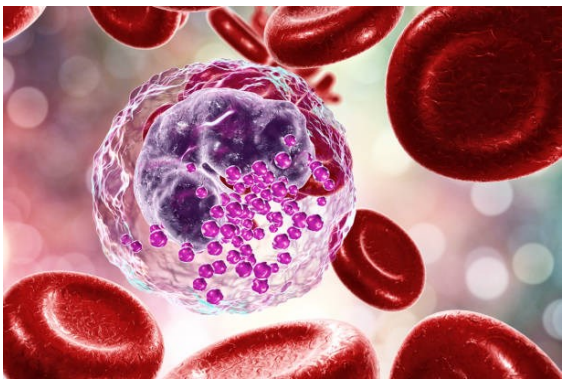


*Figura 2.4.2.3-****Basofilo***

I monociti, i più grandi tra i globuli bianchi, costituiscono circa dal 3% all'8% del totale dei leucociti. Il loro nucleo è ampio e chiaramente visibile, spesso di un violetto relativamente

brillante e con forma ovoidale, reniforme o a ferro di cavallo. Il citoplasma contiene granuli finemente dispersi, e gli monociti sono in grado di assumere forme con profili netti angolari o appuntiti negli strisci di sangue. La conta dei monociti aumenta in caso di infiammazione e infezioni virali. Essi svolgono la loro funzione solo dopo aver lasciato il flusso sanguigno e trasformandosi in macrofagi, grandi cellule tissutali dotate di elevate proprietà fagocitarie. I macrofagi svolgono un ruolo cruciale nell'eliminazione di cellule morte o estranee,

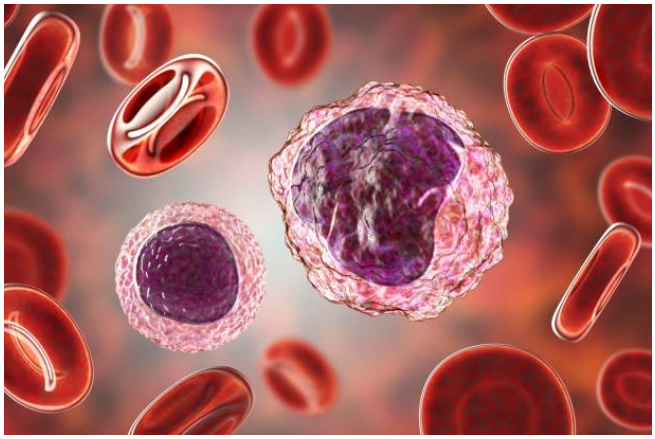


*Figura 2.4.2.4-**Monocita***

composti chimici patogeni e microrganismi, e presentano frammenti di antigeni estranei sulla loro superficie cellulare per avvisare il sistema immunitario della presenza di un patogeno.

Infine, i linfociti, i globuli bianchi più piccoli, costituiscono dal 25% al 33% del totale dei leucociti, con un numero di circa 2200 cellule/μL. Il loro nucleo rotondo o ovoidale appare di colore violetto scuro e riempie gran parte del volume cellulare. Il citoplasma, che si colora di blu chiaro, forma un sottile bordo intorno al nucleo, ma è più abbondante nei linfociti più grandi. I linfociti non si distinguono con il microscopio ottico, ma si dividono in tre classi funzionali: cellule natural killer (NK), cellule B e cellule T, che combattono diverse categorie di patogeni.

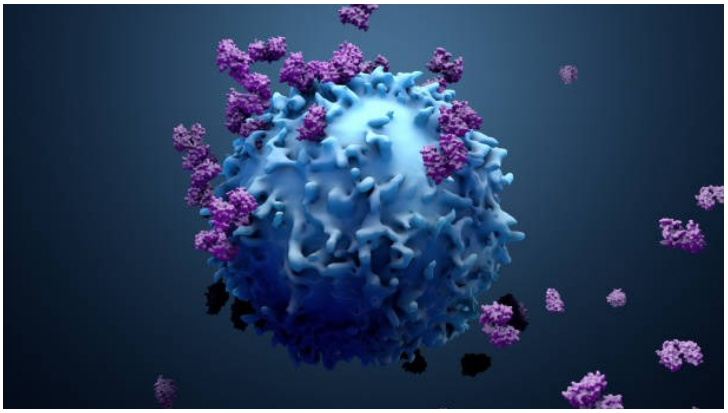


*Figura 2.4.2.5- **Linfocita***

I leucociti, con le loro caratteristiche morfologiche e funzionali uniche, collaborano tra loro per fornire un sistema immunitario efficace e proteggere l'organismo da infezioni e altre minacce esterne.

2.4.3 Ciclo vitale

La produzione dei globuli bianchi del sangue, nota come leucopoiesi, ha origine dalla medesima cellula staminale pluripotente (PPSC) coinvolta nell'eritropoiesi, ossia la produzione dei globuli rossi. Le PPSC si differenziano in diverse unità formanti colonie (CFU) e avviano la produzione delle seguenti linee cellulari: i mieloblasti, che danno origine ai tre tipi di granulociti; i monoblasti, responsabili della produzione dei monociti; e i linfoblasti, che generano i linfociti.

I granulociti e i linfociti rimangono nel midollo osseo fino a quando non diventano necessari; infatti, il midollo contiene un numero di queste cellule 10-20 volte superiore a quello presente nel sangue circolante. I linfociti B (cellule B) completano il loro processo di maturazione nel midollo osseo, alcuni rimanendo nel midollo stesso, mentre altri si spostano e colonizzano i linfonodi, la milza, le tonsille e le membrane mucose. Il nome "linfociti B" deriva dall'organo in cui sono stati scoperti per la prima volta, la borsa di Fabrizio, in polli. I linfociti T (cellule T), invece, cominciano la loro maturazione nel midollo osseo e poi migrano nel timo, una ghiandola situata nel mediastino sopra il cuore. Qui, maturano completamente, e la "T" in "linfociti T" indica appunto il timo. I linfociti T maturi si diffondono dal timo e colonizzano gli stessi organi in cui si trovano i linfociti B.

Le cellule natural killer (NK) si sviluppano nel midollo osseo, come i linfociti B, e i globuli bianchi circolanti non rimangono a lungo nel sangue. I granulociti, ad esempio, circolano per 4-6 ore e poi migrano nei tessuti, dove sopravvivono per altri 4 o 5 giorni. I monociti viaggiano nel sangue per 10-20 ore e successivamente migrano nei tessuti, dove si trasformano in diverse tipologie di macrofagi, che vivono a lungo, persino per alcuni anni. I linfociti responsabili dell'immunità a lungo termine hanno una durata di vita variabile, da settimane a decadi.

Quando i leucociti muoiono, vengono generalmente fagocitati e digeriti dai macrofagi. Nei casi in cui i neutrofili muoiano, ad esempio, essi sono responsabili del colore giallognolo del pus e possono essere rilasciati quando una vescicola si rompe sulla superficie cutanea.

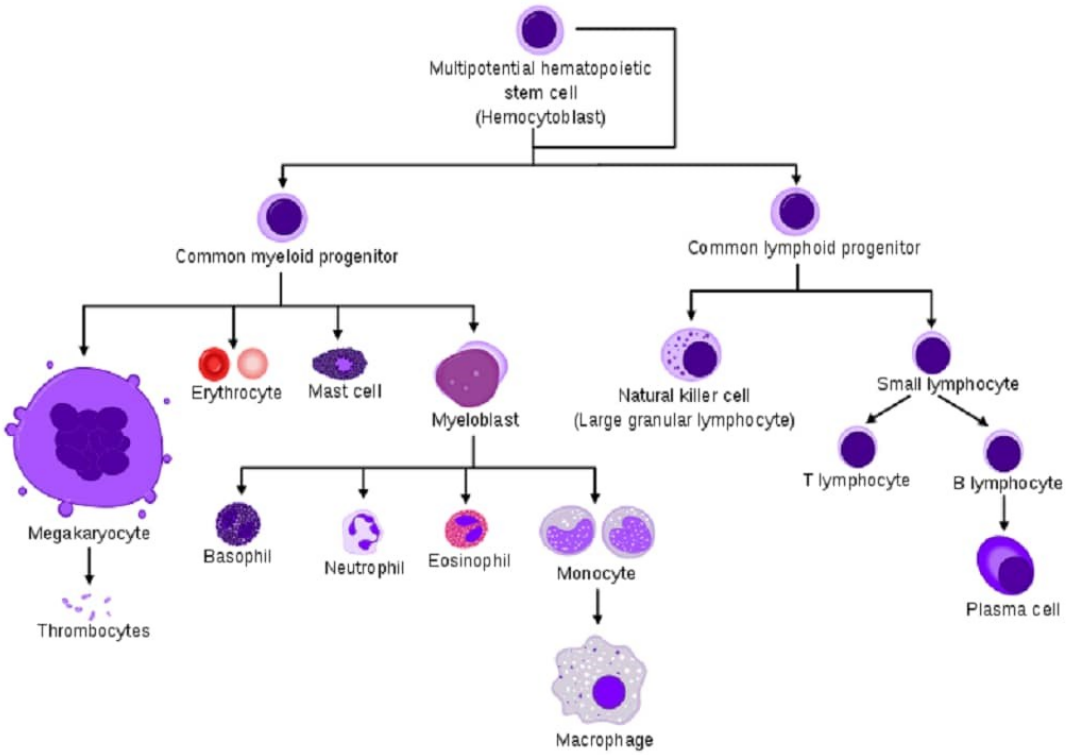


*Figura 2.4.3.1-**Leucopoiesi**. Fasi dello sviluppo dei globuli bianchi del sangue*

2.5 Piastrine

Durante l'evoluzione degli animali, i sistemi circolatori hanno sviluppato tempestivamente meccanismi essenziali per arrestare il flusso del sangue, i quali rivestono una vitale importanza poiché possono prevenire situazioni potenzialmente fatali. Tra questi meccanismi, le piastrine ricoprono un ruolo fondamentale nella cessazione del sanguinamento.

2.5.1 Forma e Funzione

Le piastrine sono frammenti di piccole dimensioni, derivati dalle cellule midollari chiamate megacariociti. Sebbene siano il secondo tipo più abbondante tra gli elementi figurati del sangue, subito dopo gli eritrociti, il loro numero può variare notevolmente a seconda delle condizioni fisiologiche e delle diverse parti dell'organismo da cui vengono prelevati campioni ematici. In genere, una normale conta piastrinica ottenuta da un campione di sangue prelevato dal polpastrello si attesta tra 130.000 e 400.000 piastrine per microlitro (μL).

Nonostante il loro numero, le piastrine sono così piccole, con un diametro compreso tra 2 e 4 μm, che contribuiscono ancora meno rispetto ai globuli bianchi al volume complessivo del sangue. Tuttavia, hanno una struttura interna complessa, composta da lisosomi, mitocondri, microtubuli e microfilamenti, nonché granuli contenenti secrezioni piastriniche. Possiedono anche un sistema di canali noto come sistema canalicolare aperto, che si apre sulla superficie piastrinica. Da notare che le piastrine non possiedono un nucleo.

Quando vengono attivate, le piastrine formano pseudopodi, capaci di movimenti ameboidi. Nonostante le loro dimensioni ridotte, le piastrine svolgono numerose funzioni vitali. Tra queste, secernono vasocostrittori, mediatori chimici che inducono il vasospasmo dei vasi ematici lesionati, contribuendo a ridurre la perdita di sangue. Inoltre, si aggregano tra loro per formare provvisori tappi piastrinici che tamponano le piccole lesioni dei vasi sanguigni.

Le piastrine rilasciano anche procoagulanti, noti come fattori della coagulazione, che promuovono la coagulazione del sangue. Iniziano la formazione di un enzima che degrada i coaguli ematici quando questi ultimi hanno esaurito la loro utilità. Inoltre, le piastrine secernono composti chimici che richiamano neutrofili e monociti verso i siti infiammati. Esse sono in grado di internalizzare e distruggere i batteri presenti nel sangue e secernono fattori di crescita che stimolano la mitosi nei fibroblasti e nel muscolo liscio, contribuendo così al mantenimento e alla riparazione dei vasi sanguigni.

In conclusione, nonostante le loro ridotte dimensioni, le piastrine svolgono una vasta gamma di funzioni essenziali nel mantenimento dell'integrità e dell'omeostasi del sistema circolatorio.

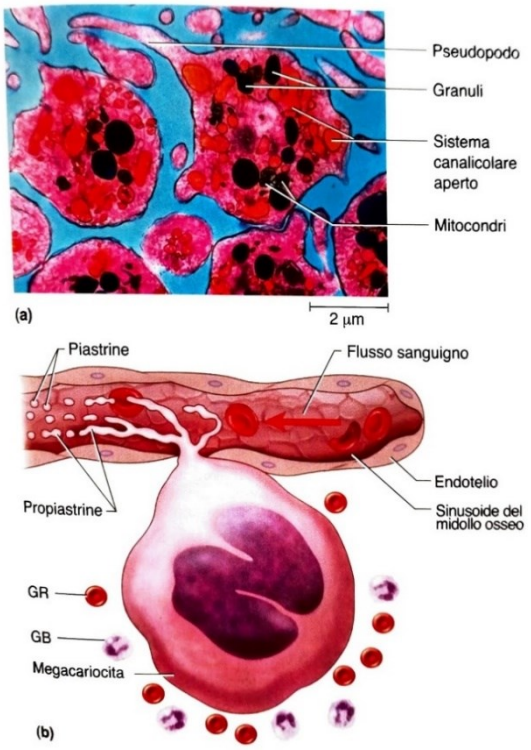


*Figura 2.5.1.1- **Piastrine**. a) struttura delle piastrine del sangue (MET). B) Le piastrine si producono dalla frammentazione del citoplasma periferico di un megacariocita.[35]*

2.5.2 Produzione delle piastrine

La produzione delle piastrine è una parte essenziale del processo ematopoietico chiamata trombopoiesi. Inizialmente, alcune cellule staminali pluripotenti sviluppano recettori per un ormone chiamato trombopoietina, trasformandosi così in megacarioblasti, cellule specializzate nella produzione delle piastrine. Questi megacarioblasti sperimentano una duplicazione del loro DNA in modo ripetuto, senza subire divisione nucleare o citoplasmatica. Questo processo porta alla formazione di un gigantesco megacariocita, una cellula con un diametro che può raggiungere fino a 150µm, visibile ad occhio nudo, caratterizzato da un enorme nucleo multilobato e numerosi raggruppamenti di cromosomi.

La maggior parte dei megacariociti risiede nel midollo osseo rosso, in prossimità di spazi pieni di sangue chiamati sinusoidi, rivestiti da un sottile strato di cellule epiteliali chiamato endotelio. Dai megacariociti si dipartono lunghi filamenti chiamati propiastrine, che si protrudono attraverso il rivestimento endoteliale e penetrano nel sangue all'interno dei

sinusoidi. Durante il flusso sanguigno, le propiastrine si staccano dai filamenti e si degradano, trasformandosi in piastrine, mentre viaggiano all'interno del torrente ematico.

Una parte significativa di questa degradazione delle propiastrine sembra avvenire nei vasi polmonari di minori dimensioni. Questo è evidente dal fatto che l'analisi del sangue mostra un numero maggiore di propiastrine all'ingresso dei polmoni rispetto alla loro uscita, e un numero maggiore di piastrine a valle di questo punto. È inoltre importante notare che tra il 25% e il 40% delle piastrine prodotte vengono immagazzinate nella milza e vengono rilasciate solo in caso di necessità. La restante parte delle piastrine circola liberamente nel sangue, dove ha una durata di vita di circa 10 giorni, prima di essere rimosse dal corpo.

Questo processo complesso e ben regolato assicura la produzione costante di piastrine, cruciali per il mantenimento dell'emostasi e la prevenzione di sanguinamenti eccessivi.

2.5.3 Emostasi

L'emostasi è il processo che permette la cessazione del sanguinamento quando un vaso sanguigno viene danneggiato. In caso di lesione del vaso, le piastrine svolgono un ruolo fondamentale. Esse rilasciano la serotonina, una sostanza chimica che stimola la vasocostrizione, cioè il restringimento del vaso sanguigno, al fine di ridurre la perdita di sangue. Le piastrine si aggregano tra loro e si attaccano alla parete del vaso, formando un

tappo piastrinico, una sorta di massa appiccicosa che temporaneamente chiude le rotture dei piccoli vasi sanguigni.

Inoltre, sia le piastrine che i tessuti danneggiati intorno al vaso sanguigno rilasciano i fattori della coagulazione. Tramite una serie di reazioni enzimatiche, questi fattori trasformano una proteina del plasma chiamata fibrinogeno in fibrina, una proteina altrettanto appiccicosa. La fibrina si lega alle pareti del vaso e, quando le cellule del sangue arrivano, numerose piastrine si aderiscono alla fibrina. Questa combinazione di fibrina, piastrine e cellule del sangue forma un coagulo che ha la funzione di chiudere la rottura del vaso sanguigno, permettendo al vaso di riportarsi in uno stato funzionale.

Una volta che la perdita di sangue è stata arrestata e la situazione è sotto controllo, le piastrine iniziano a rilasciare il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF). Questa sostanza stimola i fibroblasti e il muscolo liscio a proliferare e a rimpiazzare il tessuto danneggiato del vaso sanguigno. Una volta completata la riparazione del tessuto e non essendo più necessario il coagulo, è necessario eliminare il coagulo di sangue. Le piastrine iniziano

quindi a rilasciare il fattore XII, una proteina che avvia una serie di reazioni che portano alla formazione di un enzima chiamato plasmina, responsabile di digerire la fibrina. La plasmina



Figura 2.5.3.1 - ***Coagulo ematico (MES).*** *Le piastrine sono intrappolate all'interno di maglie proteiche dotate di proprietà adesive.[35]*

dissolve il vecchio coagulo di sangue, ripristinando così la normale circolazione.

2.6 Prospettive cliniche

Abbiamo esplorato l'origine embrionale del sangue e il suo sviluppo. Passando all'estremità opposta della vita, la vecchiaia esercita numerosi effetti sul sistema ematopoietico. Benché vi siano elementi che suggeriscono che il processo di base dell'emopoiesi cambi poco con l'età - il numero di cellule, la concentrazione di emoglobina e altre variabili sono quasi simili tra individui sani di 70 e 30 anni - le persone anziane sembrano non adattarsi adeguatamente allo stress esercitato sull'apparato emopoietico, forse a causa dell'invecchiamento di altri organi.

I fattori che contribuiscono all'anemia negli anziani sono complessi e correlati tra loro. Essa può derivare da carenze alimentari, mancanza di esercizio fisico o specifiche malattie. L'atrofia renale, tipica dell'età avanzata, può essere un fattore contribuente in quanto i reni secernono l'eritropoietina, stimolante principale per la produzione dei globuli rossi. Potrebbe anche esservi un limite intrinseco al numero di divisioni delle cellule staminali ematopoietiche, che continua a produrre nuove cellule del sangue. Tuttavia, è difficile

stabilire se sia solo l'invecchiamento a causare l'anemia in assenza di altri fattori contribuenti, come il livello di attività fisica o le abitudini alimentari.

Nell'età avanzata, la trombosi, ovvero la coagulazione anomala del sangue all'interno di un vaso sanguigno intatto, diventa un problema sempre più rilevante. Le placche arteriosclerotiche presenti nei vasi possono favorire la coagulazione del sangue, specialmente nelle vene dove il flusso sanguigno è più lento. Circa il 25% delle persone sopra i 50 anni sperimenta episodi di blocco venoso causato da trombosi. Le persone che hanno una scarsa attività fisica o sono costrette a letto o su una sedia a rotelle sono particolarmente esposte agli episodi di trombosi venosa. I trombi venosi immobili possono causare ictus, infarti cardiaci o insufficienza renale e possono staccarsi e viaggiare attraverso il flusso sanguigno (fenomeno noto come tromboembolia) fino a bloccare piccoli vasi, compromettendo il flusso di sangue verso altri organi. Il tromboembolismo può anche provocare insufficienza respiratoria.

Concludiamo con uno studio sugli aspetti clinici dell'ematologia, concentrandoci in particolare sulle malattie che influenzano il numero relativo degli elementi costituenti del sangue e quindi sulle caratteristiche degli strisci colorati del sangue, oltre che sulle malattie che alterano la forma dei singoli elementi del sangue.

2.6.1 Malattie degli eritrociti

Le due principali malattie che coinvolgono i globuli rossi sono l'anemia, caratterizzata da un deficit di globuli rossi, e la policitemia, che rappresenta un eccesso di globuli rossi ed è anche conosciuta come eritrocitosi. L'anemia può essere classificata in tre tipi distinti.

Il primo tipo è causato da una riduzione dell'eritropoiesi o della sintesi dell'emoglobina, dove la produzione di nuovi globuli rossi non riesce a compensare la morte normale delle cellule. Nell'anziano, l'atrofia dello stomaco e dei reni può ridurre la produzione di globuli rossi a causa della deficienza di fattore intrinseco ed eritropoietina. A qualsiasi età, una carenza dietetica di ferro o di alcune vitamine può causare anemie nutrizionali, come l'anemia sideropenica. Inoltre, l'irradiazione, i virus e alcune sostanze tossiche possono danneggiare il midollo osseo e causare anemie.

Il secondo tipo è l'anemia emolitica, in cui avviene una rapida distruzione dei globuli rossi, superiore alla velocità di produzione. Questa condizione può essere causata da sostanze

tossiche, reazioni ai farmaci, malattia falciforme o infestazioni parassitarie, come la malaria, che distruggono i globuli rossi.

Il terzo tipo è l'anemia emorragica, una deficienza di globuli rossi causata da emorragie. Può essere dovuta a traumi come colpi di arma da fuoco o incidenti automobilistici, malattie come l'emofilia, ulcere sanguinanti, rottura di un aneurisma o mestruazioni molto abbondanti. L'anemia non solo influisce sul numero di globuli rossi, ma può anche alterarne la morfologia. Ad esempio, la talassemia, una malattia ereditaria del sangue che colpisce persone di origine mediterranea, è caratterizzata da una sintesi ridotta dell'emoglobina, una diminuzione del numero di globuli rossi e alterazioni morfologiche, rendendo i globuli rossi piccoli e pallidi.

La malattia a cellule falciformi è un altro esempio di anemia ereditaria con globuli rossi dalla morfologia anomala. Le anemie, indipendentemente dalla causa, possono provocare sintomi come stanchezza, sonnolenza e mancanza di respiro, o addirittura conseguenze gravi, come il deterioramento degli organi a causa della mancanza di ossigeno.

D'altra parte, la policitemia rappresenta un aumento eccessivo del numero di globuli rossi ed è causata da diverse condizioni. Può derivare da una neoplasia maligna del midollo osseo (policitemia primaria) o da molte altre condizioni (policitemia secondaria), come una richiesta anomala di ossigeno, come nel caso di persone impegnate in esercizi fisici estremamente intensi, o a una bassa concentrazione di ossigeno, come nelle persone che vivono ad alta quota o che soffrono di malattie polmonari come l'enfisema. L'elevato numero di globuli rossi nel sangue può raggiungere valori fino a 11 milioni per microlitro (µL) e l'ematocrito può salire fino all'80%. Questo sangue più denso scorre con difficoltà nei vasi, aumenta notevolmente la pressione arteriosa e sottopone l'apparato cardiovascolare a uno sforzo pericoloso, che può portare all'insufficienza cardiaca o all'ictus.

2.6.2 Malattie dei leucociti

La leucopenia è un termine utilizzato per descrivere un deficit di globuli bianchi nel sangue. Questa condizione può essere causata da diversi fattori, come l'avvelenamento da metalli pesanti, l'esposizione a radiazioni o malattie infettive come il morbillo, la varicella, la poliomielite e l'AIDS. Quando il numero di globuli bianchi che combattono le infezioni è insufficiente, una persona diventa più vulnerabile alle infezioni opportuniste, che normalmente verrebbero superate dal sistema immunitario di una persona sana. Tali infezioni

possono diventare gravi o addirittura pericolose per la vita nelle persone con un sistema immunitario compromesso.

D'altra parte, un numero anormalmente elevato di globuli bianchi è indicato come leucocitosi. Solitamente, la leucocitosi è causata da infezioni o allergie, ma può anche verificarsi in situazioni di stress emotivo o disidratazione, poiché i globuli bianchi si concentrano maggiormente quando la quantità di acqua nel sangue diminuisce.

La leucemia, invece, è una forma di cancro che colpisce i tessuti emopoietici e provoca un aumento del numero di globuli bianchi circolanti. Tuttavia, nonostante l'aumento quantitativo, questi globuli bianchi sono immaturi e incapaci di svolgere appieno le loro funzioni difensive. Di conseguenza, una persona affetta da leucemia diventa altrettanto vulnerabile alle infezioni opportunistiche, nonostante l'elevato numero di globuli bianchi nel sangue. Questa condizione maligna tende anche a provocare anemia e piastrinopenia, poiché le cellule staminali del midollo osseo sono indirizzate alla rapida produzione di globuli bianchi a scapito della produzione di globuli rossi e piastrine.

In sintesi, sia la leucopenia che la leucocitosi rappresentano squilibri nel numero di globuli bianchi, con implicazioni significative per la salute dell'individuo. La leucemia, invece, è una forma di cancro che comporta un'eccessiva produzione di globuli bianchi immaturi, influenzando negativamente anche la produzione di altre cellule del sangue.

2.6.3 Malattie delle piastrine

La piastrinopenia, nota anche come trombocitopenia, si verifica quando il numero di piastrine nel sangue scende al di sotto di 100.000 per microlitro (μL). Questo disturbo può essere causato da diverse condizioni, tra cui leucemia, esposizione a radiazioni o l'assunzione di sostanze nocive che danneggiano il midollo osseo.

La diminuzione del numero di piastrine porta a una compromissione della coagulazione, poiché queste piccole cellule svolgono un ruolo fondamentale nella formazione di coaguli quando un vaso sanguigno viene danneggiato. Di conseguenza, si verifica un aumento del sanguinamento, poiché le piastrine non possono svolgere adeguatamente la loro funzione di mantenere il vaso integro.

È importante sottolineare che la piastrinopenia rappresenta un serio rischio per la salute, poiché un'inadeguata capacità di coagulazione può portare a sanguinamenti e lividi spontanei, mettendo a rischio la vita del paziente. Pertanto, è fondamentale identificare la

causa sottostante della trombocitopenia e adottare le misure adeguate per trattare e gestire la condizione. Un monitoraggio regolare e un intervento tempestivo sono essenziali per garantire la sicurezza e il benessere del paziente affetto da piastrinopenia.

Capitolo 3 Metodologia di estrazione delle tracce ematiche

Stabilire l'influenza del substrato sulla macchia di sangue nell'imaging iperspettrale può rivelarsi un compito complesso. Infatti, il contributo del substrato, oltre a dipendere dal tipo di materiale e dalla sua tessitura, è strettamente legato alla fonte di illuminazione e alla composizione variabile del sangue nel tempo. Quando il sangue fresco viene depositato come macchia su una superficie, si forma una complessa sospensione di componenti cellulari, tra cui globuli rossi, globuli bianchi, piastrine e plasma. Il plasma contiene acqua, proteine, elettroliti inorganici e fattori di coagulazione. Nel corso del tempo, i diversi componenti cellulari e del plasma svolgono ruoli distinti nella formazione del modello sanguigno [28].

Durante il processo di essiccazione della macchia di sangue, si sviluppano tre regioni distintive: una regione essiccata (in stato solido), una regione gelificata (in stato di gel), e una regione sovrasatura (in stato liquido). Mentre il liquido evapora, la gelificazione del plasma avviene ai bordi della goccia a causa dell'aumentata concentrazione di proteine a macromolecola, mentre gli elettroliti inorganici si accumulano nella parte centrale. L'ulteriore evaporazione porta alla formazione di un modello di fessurazione [28]. Il sistema descritto in questo studio è stato ottimizzato in termini di efficienza luminosa, dal lato hardware, ed è stato testato su diversi substrati e in diverse fasi di deposizione delle macchie.

È importante sottolineare che la variazione temporale e le interazioni complesse tra i componenti del sangue e il substrato sottostante possono portare a sfide significative nella corretta identificazione delle macchie di sangue. La presenza di diversi stati di essiccazione e gelificazione nel processo di formazione delle macchie può introdurre variazioni spettrali che devono essere affrontate con attenzione durante l'analisi dei dati iperspettrali. Pertanto, una strategia ben definita per l'acquisizione dei dati e la successiva elaborazione è

fondamentale per ottenere risultati accurati e affidabili nell'identificazione delle macchie di sangue e nella loro valutazione.

3.1 PCA per identificazione di macchie di sangue

Nonostante i notevoli progressi tecnologici, un elemento fondamentale che richiede ancora miglioramenti sostanziali è la capacità di condurre una classificazione delle tracce in modo robusto e automatizzato. L'Intelligenza Artificiale (AI) e i suoi sottocampi, come il Machine Learning e il Deep Learning, hanno di recente guadagnato rilevanza anche nell'ambito delle applicazioni forensi. Tuttavia, gran parte di queste applicazioni sono attualmente concentrate nella Digital Forensics, che si occupa dei reati informatici, dando vita al termine "Machine Learning Forense".

Sebbene l'intelligenza artificiale abbia fatto un ingresso dirompente nelle scienze forensi, inclusa la medicina legale, l'adozione completa di questa tecnologia richiede ancora una validazione oggettiva dei risultati che può offrire. La comunità scientifica ha intrapreso passi in questa direzione e sono stati fatti tentativi molto recenti per proporre un approccio metrologico ai processi di classificazione basati sull'intelligenza artificiale. Tuttavia, il cammino verso l'adozione piena di tali approcci nelle scienze forensi deve ancora essere esplorato e consolidato.

Soprattutto nei contesti forensi, la robustezza, l'oggettività e la riproducibilità sono elementi cruciali. La capacità dell'intelligenza artificiale di analizzare grandi quantità di dati e di identificare pattern complessi apre nuove opportunità nell'identificazione e nella classificazione delle tracce, ma deve essere accompagnata da un rigoroso lavoro di convalida e da standard di metrologia adeguati per garantire risultati affidabili e scientificamente validi. Solo attraverso un approccio collaborativo e una rigorosa ricerca scientifica sarà possibile realizzare il pieno potenziale dell'intelligenza artificiale nelle scienze forensi.

La riduzione delle caratteristiche mediante l'analisi delle componenti principali (PCA) rappresenta un metodo ampiamente utilizzato. Nei contesti di imaging iperspettrale, che permettono di raccogliere dati in tre dimensioni, dove la terza dimensione rappresenta la lunghezza d'onda dello spettro, la PCA è spesso impiegata per trasformare i dati originali in vettori ortogonali noti come componenti principali (CP). Questi componenti sono organizzati in modo tale che i primi catturino la massima quantità di variazione presente nei dati.

Nella ricerca, come descritto in [29], i componenti principali sono stati sfruttati per addestrare diversi classificatori di Intelligenza Artificiale per riconoscere le macchie di sangue rispetto ad altre sostanze. Un'altra applicazione dell'analisi multivariata e della PCA è stata evidenziata in [30], dove è stata utilizzata per stimare l'età delle macchie di sangue essiccato. Tuttavia, è importante notare che l'impiego della PCA in combinazione con algoritmi basati sull'Intelligenza Artificiale richiede la disponibilità di ampi set di dati e un lungo periodo di tempo per l'addestramento degli algoritmi stessi.

Proprio per questo motivo, nel presente lavoro si propone un secondo approccio basato sull'adattamento dello spettro sanguigno. Questo metodo considera che lo spettro sanguigno presenta caratteristiche peculiari e un andamento particolare che può essere considerato come una firma distintiva [31]. Questi tratti distintivi rendono lo spettro del sangue unico rispetto ad altre tracce biologiche, come la saliva o sostanze simili al sangue, ad esempio ketchup o coloranti rossi. Utilizzando queste peculiarità, si mira a sviluppare un approccio che sia meno dipendente dall'addestramento di algoritmi e che possa fornire una soluzione più rapida ed efficiente per l'identificazione delle tracce di sangue nell'ambito dell'imaging iperspettrale.

3.2 Traccia campione

L'oggetto di studio è stato creato appositamente per rappresentare un insieme di particolari evidenze (PE) che potrebbero tipicamente essere rilevati in uno scenario ipotetico di scena del crimine. Questo campione è stato composto da un substrato di cotone bianco, un materiale frequentemente riscontrato nelle scene del crimine, ma che presenta proprietà che rendono la sua cooperazione nell'identificazione di macchie biologiche piuttosto complessa. Infatti, il cotone bianco è caratterizzato da un'elevata capacità assorbente, il suo colore influisce notevolmente sulle firme spettrali delle macchie e la tessitura introduce un rumore di fondo che rende più ardua l'individuazione delle particelle evidenziate depositate su tale substrato.

Le immagini iperspettrali sono state catturate circa 45 minuti dopo la deposizione delle tracce biologiche. Questo intervallo di tempo è stato scelto per garantire un adeguato assorbimento e parziale essiccamento dei fluidi depositati, al fine di minimizzare il rischio di riflessioni speculari, che sono tipiche dei liquidi.

Per ogni traccia contenuta nel campione, è stata calcolata la firma media di riflettanza. Questo calcolo è stato ottenuto mediante la media degli spettri di riflettanza provenienti dai pixel all'interno dell'area della traccia stessa.

3.3 Identificazione delle tracce su PCA

L'analisi PCA è un utile strumento per migliorare il contrasto dell'immagine, ma spesso non riesce a ottenere una separazione completa tra diverse sostanze. Per affinare ulteriormente l'accuratezza dell'identificazione del sangue, è stato applicato il metodo di adattamento dello spettro sanguigno. Questo approccio mira a ottenere risultati più precisi nell'individuare la presenza di sangue.

L'analisi delle componenti principali (PCA) è un approccio ampiamente utilizzato nell'ambito dell'analisi multivariata per ridurre le dimensioni dei dati. Nel contesto dell'identificazione delle macchie di sangue, tuttavia, la PCA può essere applicata in modo diverso, fungendo da strumento per migliorare il contrasto delle immagini. In questo documento, stiamo utilizzando la PCA per evidenziare le aree caratterizzate da diverse composizioni.

L'algoritmo PCA sfrutta una trasformazione lineare basata sulla decomposizione degli autovalori. L'obiettivo è ruotare le variabili correlate, che rappresentano i dati (come le immagini nelle diverse lunghezze d'onda che costituiscono l'ipercubo), trasformandole in variabili non correlate chiamate Componenti Principali (CP) in uno spazio ortogonale nuovo.

Il processo di stima dei Componenti Principali è delineato in Figura 3.3.1. Inizialmente, l'ipercubo di dimensioni x, y e n (dove x e y sono il numero di pixel nell'immagine e n è il numero di lunghezze d'onda considerate nello spettro) viene espanso in una matrice

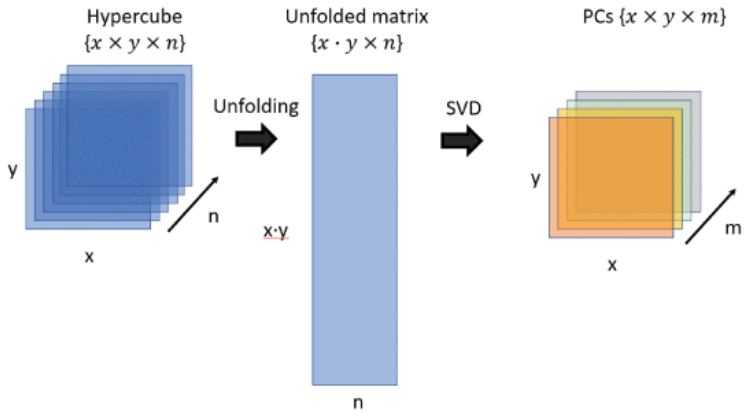


*Figura 3.3.1-**Rappresentazione schematica della PCA applicata ad un ipercubo**.[d]*

bidimensionale di dimensioni x * y, n. Successivamente, attraverso la Decomposizione ai Valori Singolari (SVD), vengono calcolati gli autovettori. Questi autovettori sono associati agli autovalori ordinati in ordine decrescente e rappresentano le Componenti Principali decorrelate. La selezione del numero di Componenti Principali significative è indicata come m, che è ovviamente minore di n, la dimensione originaria dell'ipercubo.

Nel contesto della tecnica iperspettrale, la Principal Component Analysis (PCA) offre una doppia potenzialità che sfruttiamo appieno. In primo luogo, attraverso la decorrelazione delle bande spettrali catturate, la PCA consente una trasformazione dei dati iperspettrali in cubi di dimensioni ridotte. Le prime immagini risultanti da questa trasformazione contengono principalmente le informazioni spaziali più significative, facilitando così l'analisi. In secondo luogo, il processo di PCA, che condensa le informazioni di base negli ultimi componenti, solitamente approssimati da una distribuzione gaussiana, rende questa tecnica estremamente adatta all'applicazione di metodi di individuazione di anomalie. Di conseguenza, si ottiene un notevole aumento del contrasto nei dati.

In aggiunta, la PCA offre la possibilità di correlare sostanze diverse con Componenti Principali differenti, soprattutto quando gli spettri di tali sostanze presentano una

decorrelazione sufficiente tra loro. Questo attributo risulta particolarmente utile per discriminare le varie sostanze presenti nell'immagine iperspettrale[32].

Capitolo 4 Procedura di acquisizione delle tracce ematiche mediante telecamera iperspettrale

L'imaging iperspettrale (HSI) è una tecnica all'avanguardia con molteplici applicazioni, che spaziano dalla medicina all'industria, dalla qualità dei prodotti alla scienza forense. Questo metodo consente di ottenere ipercubi, cioè spettri risolti spazialmente, contenenti due dimensioni spaziali e una dimensione spettrale. La sua versatilità lo ha reso oggetto di interesse sia in campo medico, per la caratterizzazione dei tessuti e l'analisi delle loro proprietà fisiche e chimiche, sia nel settore forense, per l'identificazione e la classificazione di tracce biologiche e materiale di prova.

Diverse ricerche hanno esplorato l'uso delle telecamere iperspettrali nel settore forense, con particolare attenzione alla visualizzazione delle tracce biologiche come le impronte digitali e le macchie di sangue. Gli analisti forensi possono sfruttare questa tecnologia per ottenere informazioni sia sulla geometria delle tracce biologiche, ad esempio la forma delle impronte digitali o delle macchie di sangue, sia sulla loro composizione chimica.

Sono stati sviluppati metodi chemiometrici per l'analisi dei dati iperspettrali, consentendo una rapida analisi dell'omogeneità dei campioni e facilitando la selezione delle aree di interesse. Tuttavia, un limite nell'analisi è rappresentato dall'utilizzo di campioni Dry Blood Spot (DBS), che potrebbero non essere rappresentativi di situazioni reali.

Una revisione completa dell'uso dell'imaging iperspettrale per l'analisi forense ha esaminato teoria, strumenti e tecniche di elaborazione coinvolte, evidenziando il progresso nelle applicazioni della scienza forense. Un aspetto importante è l'interazione tra la luce e il campione, che dipende dalle proprietà ottiche del materiale. Nell'analisi di macchie di sangue depositate su un substrato, è essenziale considerare l'effetto di tutti i diversi strati, compreso il substrato stesso, al fine di ottenere una visione più completa e accurata dell'interazione luce-campione.

In sintesi, l'HSI rappresenta un potente strumento di analisi in vari campi, inclusa la scienza forense. Le sue capacità di fornire dati spettrali e spaziali consentono una caratterizzazione dettagliata dei materiali, rendendola una tecnica promettente per il futuro delle indagini scientifiche e forensi. [13-17].

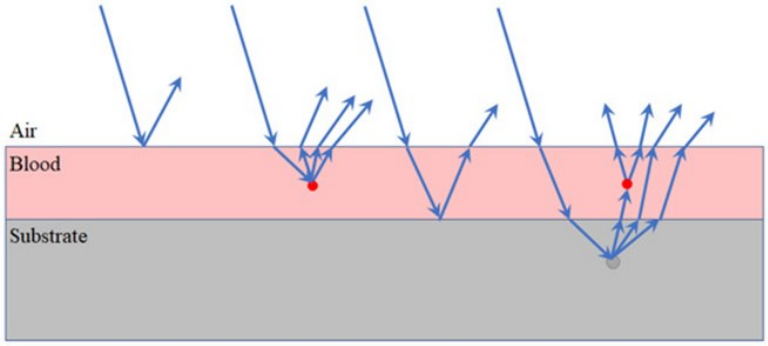


Figura 4.1-***Schema dei percorsi di diffusione della luce sulla macchia di sangue su un substrato****.[c]*

L'imaging iperspettrale (HSI) sfrutta le diverse lunghezze d'onda della luce per ottenere informazioni sulla composizione chimica dei materiali. L'assorbimento della luce in diverse regioni dello spettro elettromagnetico, come la lunghezza d'onda visibile, il vicino infrarosso

(NIR) e l'infrarosso (IR), corrisponde a differenti comportamenti molecolari nel materiale. Queste caratteristiche possono essere utilizzate per identificare il contenuto chimico di un campione attraverso l'analisi con la telecamera iperspettrale.

L'analisi delle tracce su substrati è una delle sfide più importanti per il progresso delle applicazioni di HSI nella scienza forense. Sono stati fatti studi per comprendere e superare questo problema, specialmente quando si tratta di veri scenari di crimine che possono presentare condizioni molto diverse da quelle ideali di laboratorio. La presenza di substrati colorati, soprattutto se scuri, può complicare la distinzione del sangue da altre macchie e rendere difficile la successiva analisi.

Gli approcci basati sull'intelligenza artificiale (AI) hanno dimostrato di essere strumenti preziosi nel campo forense per affrontare questa sfida. Numerosi autori hanno utilizzato l'intelligenza artificiale per classificare le macchie di sangue rispetto ad altre sostanze, in qualsiasi materiale, consentendo una discriminazione accurata e non invasiva delle tracce.

Sebbene ci siano ancora sfide da affrontare, l'HSI in combinazione con l'intelligenza artificiale sta aprendo nuove prospettive nella scienza forense, consentendo una maggiore precisione e affidabilità nell'analisi delle tracce e migliorando così la capacità degli investigatori di ottenere informazioni preziose da una scena del crimine.[18]

L'interazione tra la luce e un campione è influenzata dalle proprietà ottiche del materiale e dalla luce incidente. L'imaging iperspettrale è una tecnica che misura questa interazione, consentendo di caratterizzare il campione analizzato. Per eseguire questa analisi, il campione viene illuminato con luce adatta.

Inizialmente, la luce interagisce con la superficie del campione, dove parte di essa viene riflessa (Fig. 4.2a). Questa riflessione contiene informazioni relative all'interno del campione, ma è influenzata dall'indice di rifrazione dei diversi materiali presenti. Successivamente, la luce penetra nel materiale, e qui possono verificarsi due fenomeni: diffusione o assorbimento. La luce può essere dispersa all'interno del campione (Fig. 4.2b), oppure può essere assorbita da specifici componenti del materiale (Fig. 4.2c).

L'imaging iperspettrale sfrutta queste interazioni per ottenere informazioni spettrali e spaziali del campione, consentendo una caratterizzazione approfondita dei materiali analizzati. Questa tecnica si è dimostrata preziosa in molteplici applicazioni, tra cui la scienza forense, dove è utilizzata per identificare, distinguere e analizzare tracce biologiche e materiali presenti sulle scene del crimine. La combinazione tra l'analisi iperspettrale e l'uso di tecniche avanzate, come l'intelligenza artificiale, sta aprendo nuove possibilità nella risoluzione dei casi e nell'ottenimento di informazioni cruciali per le indagini.

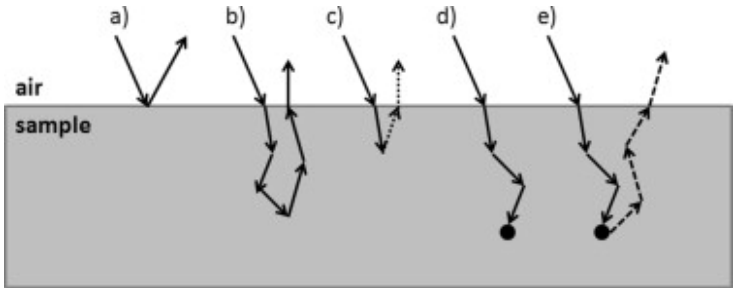


Figura 4.2-L'interazione della luce con un campione può portare a (a) riflessione speculare, (b) diffusione elastica seguita da riflessione diffusa, (c) diffusione anelastica seguita da emissione di luce spostata Raman (linee tratteggiate), (d) assorbimento e (e) assorbimento seguito da emissione di fotoluminescenza (linee tratteggiate).[b]

Lo processo di scattering rappresenta l'interazione della luce con le strutture presenti nel campione, causando un cambiamento nella direzione di propagazione, che dipende dalla lunghezza d'onda, la dimensione delle particelle e l'indice di rifrazione del materiale (Fig. 4.2b). La maggior parte della luce viene diffusa con la stessa lunghezza d'onda della luce incidente, in un fenomeno noto come diffusione elastica. Tuttavia, una piccola frazione di luce può essere diffusa anelasticamente, chiamata scattering Raman, che provoca spostamenti di lunghezza d'onda associati agli stati vibrazionali delle molecole presenti nel campione (Fig. 4.2c). Questa tecnica, nota come scattering Raman, può essere utilizzata per analizzare il contenuto chimico del campione.

Le proprietà di assorbimento di un composto chimico variano in funzione della lunghezza d'onda. L'assorbimento nella gamma di lunghezze d'onda visibili è correlato agli stati elettronici delle molecole, mentre nell'infrarosso prossimo (NIR) e nell'infrarosso (IR) è determinato dai modi vibrazionali. Quando le molecole assorbono la luce, possono rilasciare energia sotto forma di radiazione termica o fotoluminescenza al rilassamento e ritorno allo stato fondamentale. Questi fenomeni di assorbimento spettrale e fotoluminescenza possono

essere misurati utilizzando telecamere iperspettrali sia nella modalità di riflettanza che di trasmissione (Fig. 4.2d/e). Tuttavia, l'analisi quantitativa di queste informazioni è complessa poiché la lunghezza del percorso seguito dalla luce rilevata è influenzata dalle proprietà ottiche del campione [19].

4.1 Banco di prova

Il sistema utilizzato per la raccolta dei campioni di macchie di sangue depositate su diversi substrati è l'Hinalea 4250, dotato di un filtro sintonizzabile che, posizionato davanti al sensore, seleziona sequenzialmente le bande spettrali del visibile e del vicino infrarosso (NIR) in un ampio intervallo compreso tra 400 nm e 1000 nm, con un passo di 2 nm (per un totale di 300 bande spettrali nominali), generando un cubo iperspettrale. Questo cubo iperspettrale ha una dimensione spaziale di 2,3 MP (sensore RGB effettivo monocromatico equivalente a 588.544 pixel senza demosaicizzazione). Le immagini vengono acquisite ad una distanza fissa di 35 cm dal sensore, ottenendo una risoluzione spaziale di 0.06 mm/pixel.

La fotocamera è posizionata sopra il campione di macchie di sangue tra due lampade alogene, come mostrato nella Figura 4.1.1. L'utilizzo di lampade alogene garantisce un'illuminazione uniforme e a banda larga, essenziale per ottenere la giusta intensità luminosa su una gamma di lunghezze d'onda il più ampia possibile. La scelta delle proprietà della luce, in termini di contenuto spettrale (banda larga vs. banda stretta), distribuzione direzionale (direzionale vs. diffusa) e uniformità sulla superficie del campione, è di fondamentale importanza per garantire l'accuratezza della registrazione dell'immagine. L'analisi spettrale viene limitata all'intervallo compreso tra 412 e 774 nm, con un passo di 2 nm (per un totale di 185 bande spettrali nominali), poiché l'intensità spettrale massima delle

lampade alogene rientra in questo intervallo. Come spiegato precedentemente, questo intervallo copre alcune caratteristiche spettrali peculiari del sangue.

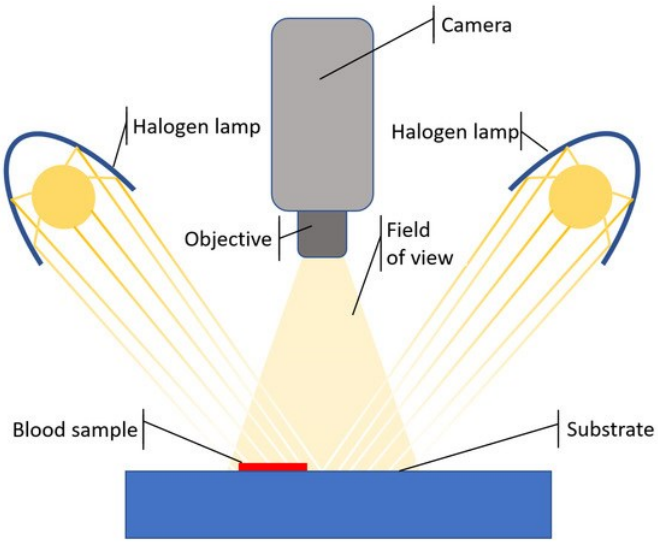


Figura 4.1 .1- ***Schema di configurazione dell'acquisizione di immagini iperspettrali****.[c]*

L'immagine iperspettrale può essere descritta come una pila di immagini, ognuna acquisita in una specifica banda spettrale. Questo insieme di dati costituisce un cubo tridimensionale noto come ipercubo, con due dimensioni spaziali (x, y) e una dimensione di lunghezza d'onda (λ) (Figura 4.1.2). All'interno di questo ipercubo, è possibile ottenere un'immagine per ogni lunghezza d'onda (λi) e da ogni singolo pixel (xj, yk) è possibile estrarre uno spettro, come mostrato nella Figura 4.1.2.

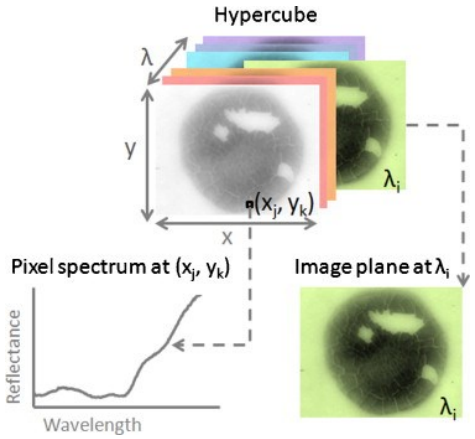


Figura 4.1 .2- ***Ipercubo di una macchia di sangue, con due dimensioni spaziali (x , y) e una lunghezza d'onda (λ).*** *Dall'ipercubo viene mostrato un piano dell'immagine per una lunghezza d'onda (λ i) e uno spettro è ottenuto da un pixel (x j , y k). [b]*

Per ottenere un ipercubo tridimensionale, che rappresenta simultaneamente tutte e tre le dimensioni (spaziali e spettrali), è necessario eseguire una scansione temporale, che consiste nell'acquisire dati bidimensionali in sequenza. Esistono tre metodi comuni per acquisire un ipercubo (Figura 4.1.3): scansione puntiforme (o "frusta"), scansione lineare (o "scopa") e scansione dell'area (o "sguardo fisso"). Questi metodi si riferiscono alla modalità hardware utilizzata per catturare gli ipercubi:

Nel sistema di scansione puntiforme, uno spettro completo viene acquisito in un singolo punto. La luce proveniente da quel punto è dispersa tramite uno spettrometro e rilevata da un rivelatore a matrice lineare. Dopo aver completato l'acquisizione spettrale in un punto, si passa a registrare lo spettro in un altro punto. È necessario scansionare in entrambe le direzioni spaziali per ottenere l'intero ipercubo.

Nei sistemi di scansione lineare, gli spettri di tutti i pixel lungo una riga dell'immagine vengono acquisiti simultaneamente. La luce è dispersa su un rivelatore CCD bidimensionale, permettendo di ottenere una matrice bidimensionale di dati con la dimensione spettrale e una dimensione spaziale. Per ottenere la seconda dimensione spaziale dell'ipercubo, è necessario spostare il campione rispetto alla linea di imaging o spostare la telecamera iperspettrale rispetto al campione.

Un sistema di scansione dell'area acquisisce anche una matrice di dati bidimensionali, ma in questo caso rappresenta un'immagine convenzionale con due dimensioni spaziali. Un ipercubo completo viene ottenuto raccogliendo una sequenza di queste immagini per una banda di lunghezze d'onda alla volta. La lunghezza d'onda della luce in ingresso in questa configurazione viene tipicamente modulata utilizzando un filtro regolabile.

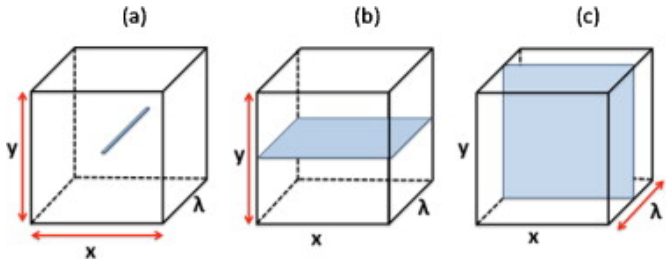


*Figura 4.1.3- **Metodi per l'acquisizione di ipercubi tridimensionali**: (a) scansione di punti, (b) scansione di linee e (c) scansione di aree. Gli ipercubi contengono due dimensioni spaziali (x , y) e una spettrale (λ). Le aree blu rappresentano i dati acquisiti da una scansione. Le frecce rosse rappresentano la scansione temporale necessaria per completare l'ipercubo. [b]*

I sistemi di imaging iperspettrale tipici sono costituiti da diversi componenti, ognuno dei quali può essere personalizzato per adattarsi alle esigenze specifiche dell'applicazione (Figura 4.1.4). Questi componenti includono un obiettivo, un modulatore di lunghezza d'onda, un rivelatore, un sistema di illuminazione e un sistema di acquisizione dei dati.

L'obiettivo svolge un ruolo fondamentale nell'ottenere la giusta risoluzione spaziale per l'applicazione. A seconda delle esigenze, possono essere utilizzate diverse tipologie di lenti, come lenti macroscopiche, lenti zoom o lenti grandangolari. Per analisi su scala microscopica, il sistema HSI può essere accoppiato a un microscopio per ottenere immagini dettagliate a livello cellulare.

Il modulatore di lunghezza d'onda permette di selezionare le diverse bande spettrali di interesse, consentendo così di catturare dati in diverse regioni dello spettro elettromagnetico, come l'ultravioletto (UV), il visibile (VIS), il vicino infrarosso (NIR) e altre. Questa flessibilità spettrale permette di ottenere informazioni specifiche sul materiale analizzato.

Il rivelatore è responsabile di catturare le informazioni spettrali provenienti dal campione illuminato. A seconda dell'applicazione, possono essere utilizzati diversi tipi di rivelatori, come ad esempio rivelatori a matrice lineare o rivelatori a dispositivo bidimensionale ad accoppiamento di carica (CCD).

Il sistema di illuminazione è essenziale per garantire una corretta illuminazione del campione e ottenere un segnale di buona qualità. Le sorgenti luminose possono essere selezionate in base alle specifiche esigenze, assicurando che l'illuminazione sia uniforme e copra l'intero spettro di lunghezze d'onda di interesse.

Infine, il sistema di acquisizione dei dati registra e memorizza le informazioni raccolte dal rivelatore. Questo sistema deve essere in grado di gestire grandi quantità di dati ad alta dimensione, tipiche dell'ipercubo iperspettrale.

Tutti questi componenti possono essere configurati e adattati alle condizioni dell'ambiente di analisi forense, che può variare da un ambiente di laboratorio controllato a un ambiente sul campo. Inoltre, il sistema HSI può essere utilizzato in diverse scale, dalle analisi microscopiche fino alla visualizzazione di ampie aree paesaggistiche.

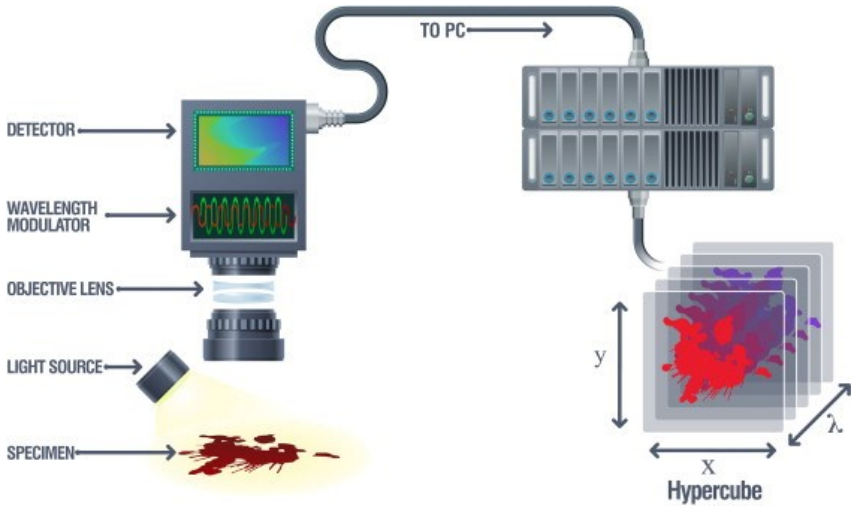


*Figura 4.1.4- **Schema che mostra i componenti di un sistema HSI**, risultante in un ipercubo del campione. [b]*

Nel campo dell'imaging iperspettrale, sono utilizzati diversi modulatori di lunghezza d'onda, tra cui i filtri sintonizzabili acusto-ottici (AOTF) [20] e i filtri sintonizzabili a cristalli liquidi (LCTF) [21] . Tuttavia, questi filtri possono presentare alcuni svantaggi, come dimensioni ingombranti e costi elevati. Recentemente, nuove tecnologie sono state introdotte, come i filtri Fabry-Pérot e i sistemi laser sintonizzabili basati sulla tecnologia dell'oscillatore ottico parametrico (OPO) [22] . Queste nuove opzioni offrono vantaggi quali dimensioni e peso ridotti, maggiore velocità di sintonizzazione della lunghezza d'onda e maggiore produttività ottica, rendendo possibile la creazione di HSI portatili a basso costo per l'analisi delle tracce nelle applicazioni di scienze forensi.

Dopo che la luce è stata separata nelle diverse lunghezze d'onda di interesse, il rilevatore, come ad esempio un dispositivo ad accoppiamento di carica (CCD), misura l'intensità della luce raccolta. I rilevatori CCD [23] possono essere organizzati in array unidimensionali o bidimensionali, dando origine rispettivamente ai rilevatori di linea e ai rilevatori di area. Inoltre, sono disponibili rilevatori specifici per la regione del medio infrarosso (come il seleniuro di piombo, l'antimoniuro di indio e il tellururo di mercurio cadmio), ma in alcuni casi potrebbe essere necessario raffreddarli per garantire la sensibilità del rilevatore a basse intensità di luce. La scelta della sorgente di illuminazione e delle sue proprietà (come la banda spettrale, la direzionalità e l'uniformità) è fondamentale per le prestazioni e l'affidabilità del sistema di imaging iperspettrale. Lampade alogene e diodi a emissione di luce (LED) sono comunemente utilizzate come sorgenti di illuminazione a banda larga o

stretta. I laser sono sorgenti luminose monocromatiche e direzionali, che li rendono adatti a specifiche applicazioni, come la fotoluminescenza e lo scattering Raman.

Infine, il sistema di acquisizione delle immagini può essere progettato per adattarsi alle specifiche esigenze dell'applicazione. Ad esempio, i sistemi online in tempo reale utilizzano l'approccio di scansione in linea, che è ideale per il monitoraggio all'interno delle industrie di processo. Per applicazioni scientifiche forensi su larga scala, esistono configurazioni di scansione della linea che consentono il monitoraggio di un'ampia area fissa di interesse, come un muro, un pavimento o un'intera scena di indagine[24].

L'evoluzione di queste tecnologie offre un grande potenziale per l'implementazione di sistemi HSI portatili, a costi accessibili, con la risoluzione desiderata per l'analisi delle tracce nell'ambito delle scienze forensi.



Figura 4.1.5- ***Sistema di imaging iperspettrale su una scena del crimine simulata.*** *[b]*

4.2 Impostazione della misurazione dell'immagine iperspettrale

Il sistema di misurazione utilizzato nel nostro studio era costituito da una camera iperspettrale di modello HSC-2 della Senop Oy e un sistema di illuminazione posizionato su un banco di prova, come mostrato nella Figura 4. La fotocamera era dotata di un sensore di immagine CMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor) con una risoluzione di 1024 × 1024 pixel e un obiettivo grandangolare con apertura f/3.8, consentendo di operare a una distanza operativa minima di 30 cm e con un campo di vista (FOV) di 36,8°.

Il sistema di illuminazione comprendeva due lampade alogene da 200 V-100 W disposte in una configurazione tale da avere un'altezza di 36.1 cm dal piano e poste a metà delle lunghezze delle due aste, questo per garantire un'illuminazione uniforme nell'area catturata dalla fotocamera.

L'HSI ci ha permesso di acquisire immagini rappresentative dell'oggetto inquadrato, ma i dati effettivamente utilizzati per l'identificazione delle tracce erano i dati di riflettanza. Per ottenere la riflettanza relativa da un'immagine spettrale grezza, abbiamo eseguito una correzione del pattern noise acquisendo un'immagine di una superficie bianca di riferimento (uno standard di riflettanza diffusa Spectralon® al 99%) e un'immagine mantenendo chiuso l'otturatore della fotocamera (immagine scura per la memorizzazione dei rumori interni della fotocamera causati dalla corrente di buio).

Questa configurazione ci ha consentito di ottenere dati accurati per l'analisi delle tracce e di identificare in modo affidabile le caratteristiche delle superfici in esame.

I dati di riflettanza relativa (R) possono essere calcolati utilizzando le cornici scure (D_λ(x, y)) e bianche (W_λ(x, y)) alla lunghezza d'onda λ e alla posizione del pixel (x, y), seguendo l'equazione:

$$\frac{D_\lambda(x,y)-W_\lambda(x,y)}{W_\lambda\,(x,y)} = R_\lambda(x,y)$$

Dove:

R_λ(x,y) rappresenta la riflettanza relativa alla lunghezza d'onda λ nel pixel di coordinate (x, y).

D_λ(x, y) è l'intensità di riflettanza dell'immagine scura alla lunghezza d'onda λ nel pixel (x, y).

W_λ(x, y) è l'intensità di riflettanza dell'immagine bianca alla lunghezza d'onda λ nel pixel (x, y).

Il calcolo della riflettanza relativa consente di ottenere informazioni sulla composizione del campione, fornendo una base per l'analisi e l'identificazione delle tracce presenti sulla superficie oggetto di studio.

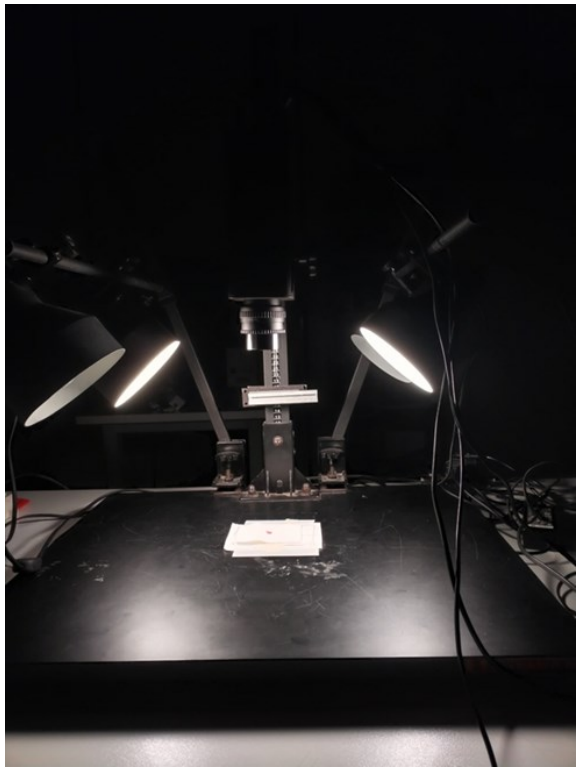


*Figura 4.2.1-**Allestimento sperimentale con l'HSI***

4.3 Acquisizione dell'immagine

La tecnologia di imaging iperspettrale [25] si basa su uno spettrometro di imaging che copre una vasta gamma spettrale dall'ultravioletto al vicino infrarosso (200–2500 nm). Durante questo processo, vengono catturate decine o addirittura centinaia di bande spettrali all'interno dell'intervallo spettrale dell'oggetto in esame. Questo approccio permette di ottenere una rappresentazione completa delle caratteristiche spettrali dell'oggetto di interesse.

Durante l'acquisizione delle immagini delle caratteristiche spaziali dell'oggetto, il sistema registra anche le informazioni spettrali associate all'oggetto stesso [26]. Questo significa che oltre alla struttura e alla disposizione spaziale dell'oggetto, si ottiene anche un insieme dettagliato delle sue proprietà spettrali. Questo è possibile grazie a un insieme integrato di tecnologie che coprono vari aspetti, tra cui la tecnologia ottica di precisione, la tecnologia dei rivelatori, l'aspetto meccanico, la tecnologia informatica, la capacità di rilevare segnali e una solida comprensione della tecnologia di analisi delle informazioni.

La portata di applicazione di questa tecnologia è estremamente vasta e diversificata e tale tecnologia trova impiego in una serie di campi che vanno dalla scienza dei materiali all'indagine forense, dalla diagnosi medica alla sorveglianza ambientale. La capacità di acquisire simultaneamente informazioni spaziali e spettrali consente un livello di dettaglio e precisione notevole nelle analisi, aprendo nuove opportunità di ricerca e scoperta in una varietà di settori.

La tecnologia di imaging iperspettrale è in grado di catturare non solo le caratteristiche spaziali di un oggetto, ma anche le sue proprietà spettrali. Questo approccio permette di ottenere bande spettrali continue dell'oggetto [27], con il numero di bande che può raggiungere diverse centinaia. Ogni pixel nell'immagine iperspettrale risultante presenta una curva completa dello spettro di riflettanza dell'oggetto.

A differenza della tecnologia di imaging multispettrale, in cui le bande spettrali sono limitate e più ampie, la tecnologia di imaging iperspettrale può ottenere una maggiore quantità di informazioni all'interno di una singola banda di frequenza più ristretta. Inoltre, la risoluzione spettrale ottenibile con questa tecnologia può essere estremamente precisa, misurata fino a pochi nanometri. Ciò consente una caratterizzazione molto accurata delle proprietà spettrali dei materiali e degli oggetti, aprendo la strada a una vasta gamma di applicazioni in settori come la scienza dei materiali, la biologia, l'ambiente e molte altre.

Per il nostro studio, abbiamo raccolto campioni di sangue donati da una volontaria sana. Il sangue è stato raccolto in contenitori, seguendo procedure standard di raccolta.

Successivamente, abbiamo depositato il sangue sui diversi substrati utilizzando una pipetta. Abbiamo mantenuto la dimensione della macchia di sangue depositata su ciascun substrato a circa un centimetro di diametro. Tuttavia, è importante notare che, nonostante abbiamo eseguito questa operazione con la massima precisione, la dimensione effettiva della macchia potrebbe variare leggermente a seconda dell'assorbimento del sangue nel substrato bersaglio.

Per garantire la coerenza del nostro studio, abbiamo scelto di utilizzare lo stesso substrato di cotone bianco per tutti i campioni. I campioni di macchie di sangue sono stati depositati su segmenti rettangolari del substrato, misurando 8,5 cm × 6,5 cm.

Ogni campione è stato identificato con un ID univoco per tracciare e distinguere i risultati delle analisi. Questo ID ci permetterà di associare le informazioni specifiche di ciascun campione durante l'intera ricerca.

Con questi campioni pronti per l'analisi, possiamo procedere con l'utilizzo della tecnica di imaging iperspettrale per caratterizzare la composizione delle diverse macchie di sangue e ottenere risultati significativi per il nostro studio.

Prima di acquisire ciascun cubo iperspettrale, è fondamentale eseguire una procedura di calibrazione del campo scuro e del campo piatto per garantire misurazioni accurate della riflettanza. Questa calibrazione, nota come calibrazione flat field, si basa sull'utilizzo di immagini inquadrate di un target bianco di riferimento esposto sul banco di prova.

Abbiamo scelto un campione di cotone bianco con una macchia di sangue come campione di riferimento per l'analisi dei cubi iperspettrali. Questa scelta è motivata da due importanti ragioni:

Colore della luce bianca: Utilizzando un target bianco, siamo in grado di ottenere una visualizzazione accurata della macchia di sangue senza interferenze dal colore del substrato. Questo ci consente di focalizzarci esclusivamente sulla reazione e sul comportamento del sangue sulla superficie del substrato senza influenze esterne.

Grazie alla scelta oculata del campione di riferimento, possiamo effettuare misurazioni precise della riflettanza e ottenere risultati affidabili durante le analisi dei cubi iperspettrali. Questo contribuirà notevolmente alla nostra ricerca e ci consentirà di ottenere informazioni accurate sulla composizione delle diverse macchie di sangue presenti sui vari substrati.

Le immagini iperspettrali sono state catturate circa 30/45 minuti dopo la deposizione, con l'intento di consentire un completo assorbimento e una parziale essiccazione dei fluidi. Questo approccio mirava a minimizzare il rischio di riflessioni speculari, le quali sono comunemente associate ai liquidi.

4.4 Elaborazione delle immagini

Per ciascuna delle immagini iperspettrali catturate, vengono effettuate selezioni manuali delle aree che corrispondono alle macchie, sia quelle di sangue che quelle di altro tipo, e delle aree del substrato. Queste selezioni vengono compiute attraverso l'uso di una regione di interesse (ROI) circolare. Ogni spettro di riflettanza individuale è considerato come un'osservazione a sé stante. Tali spettri vengono successivamente normalizzati rispetto al valore massimo di riflettanza.

Prima di procedere con la raccolta dei dati, vengono eseguite due acquisizioni iniziali che fungono da punti di riferimento e saranno successivamente utilizzate per scopi di confronto. Queste acquisizioni mirano a ottenere lo spettro di riferimento del sangue e lo spettro di riferimento della candeggina.

Analogamente al sangue, lo stesso processo viene applicato per la candeggina. Tuttavia, a differenza del primo, in questo caso, non è necessario selezionare una regione specifica poiché l'intero campione viene considerato. Questo perché tutto il rettangolo è stato trattato con candeggina e acqua, pertanto l'intera area è oggetto di analisi.

4.5 Preparazione tracce e raccolta dati

Il procedimento utilizzato è stato il seguente: inizialmente, si è proceduto all'acquisizione delle immagini tramite la camera iperspettrale, posizionando due lampade alogene al centro dell'area di interesse. Successivamente, diverse gocce di sangue sono state prelevate e posizionate su campioni rettangolari di cotone bianco, ciascuno delle dimensioni di 8,5 cm x 6,5 cm. Questi campioni sono stati lasciati asciugare per un periodo di circa 10/12 minuti. Successivamente, tutti i campioni sono stati accuratamente lavati con una soluzione di candeggina e acqua fredda attraverso sfregamento. Dopo il lavaggio, sono stati esposti alla luce solare per circa 15 minuti per assicurare che fossero completamente asciutti. Infine, una volta che i campioni erano pronti, sono stati sottoposti all'acquisizione tramite il sistema iperspettrale e ai successivi processi di analisi dei dati.

Prima di effettuare tutte le varie analisi di acquisizione, come riportato nella sezione 3.4, sono stati ricavati i due spettri medi fondamentali: quello relativo del sangue e quello della candeggina.

Il primo spettro medio, relativo al sangue, viene ottenuto partendo dal posizionamento di una goccia di sangue asciutto al centro di un rettangolo di cotone bianco, attendendo circa 15 minuti ed eseguendo poi l'acquisizione. A questo punto effettuando l'analisi dell'ipercubo, si seleziona la ROI di interesse (i pixel relativi alla macchia di sangue) e si calcola lo spettro medio degli spettri di ogni pixel selezionato.

Il secondo spettro medio viene ottenuto partendo sempre da un rettangolo di cotone bianco precedentemente trattato con candeggina e acqua, anch'esso lasciato asciugare per circa 15

minuti, prima di procedere con l'acquisizione. A questo punto effettuando l'analisi dell'ipercubo, si seleziona la ROI di interesse, che in questo caso ricopre tutto il campione e si calcola lo spettro medio degli spettri di ogni pixel selezionato.

Questi due spettri rappresentano punti di riferimento fondamentali per le successive analisi e confronti. Lungo gli assi di tutti gli spettri sono stati riportati le lunghezze d'onda espresse in nm lungo le ascisse e la riflettanza normalizzata lungo le ordinate.

Di seguito lo spettro di riferimento medio del sangue e della candeggina:

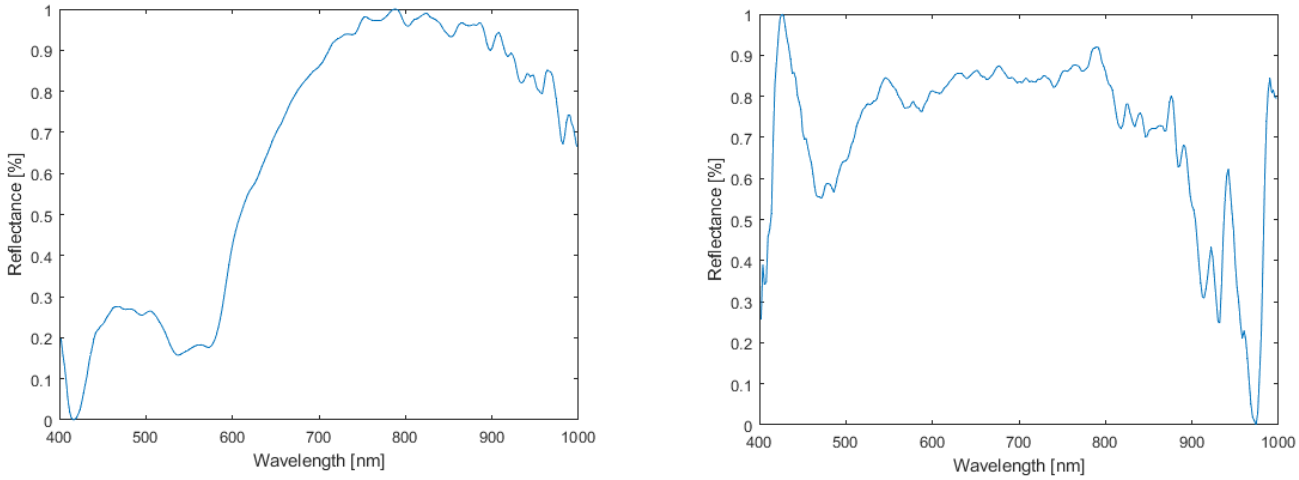


Figura 4.5.1- ***Spettro di riferimento del sangue(a sinistra)e della candeggina (a destra)***

Successivamente sono stati sovrapposti i due spettri ,ottenendo come risultato:

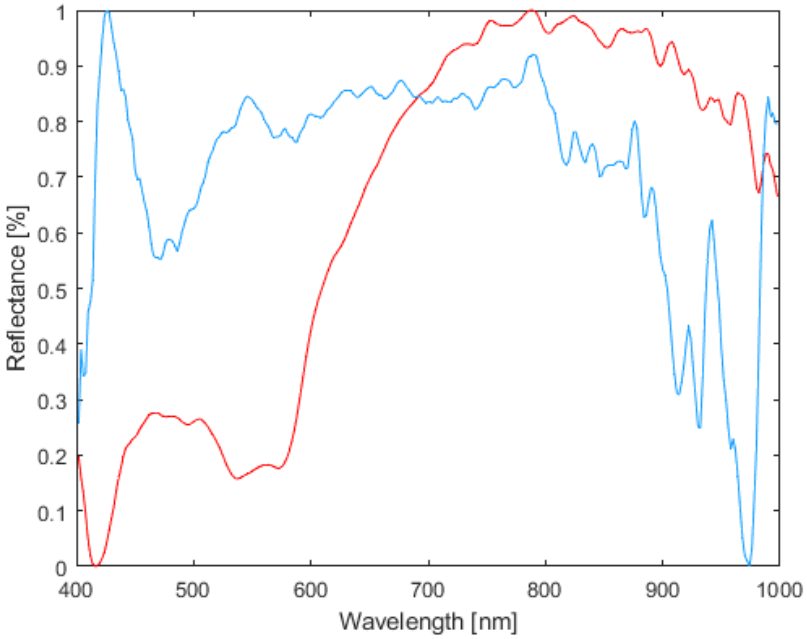


Figura 4.5.2- ***Spettro del sangue(rosso) e della candeggina (blu)***

I due spettri rappresentano rispettivamente in blu la candeggina e in rosso il sangue, entrambi acquisiti subito dopo l'asciugatura.

Di seguito i campioni utilizzati e il banco di prova:

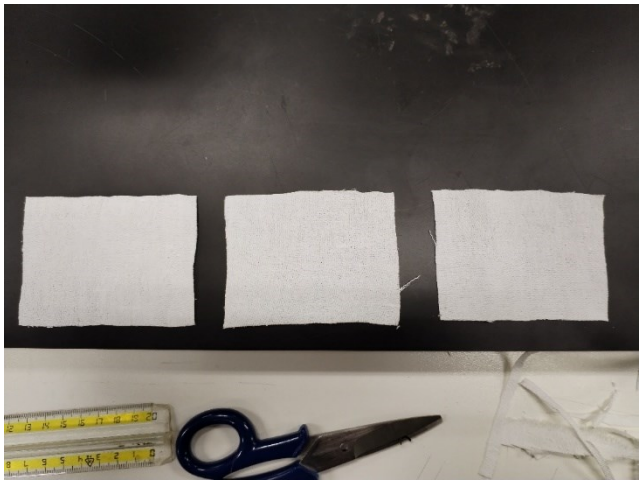


*Figura 4.5. 3-****Tre campioni di cotone bianco***

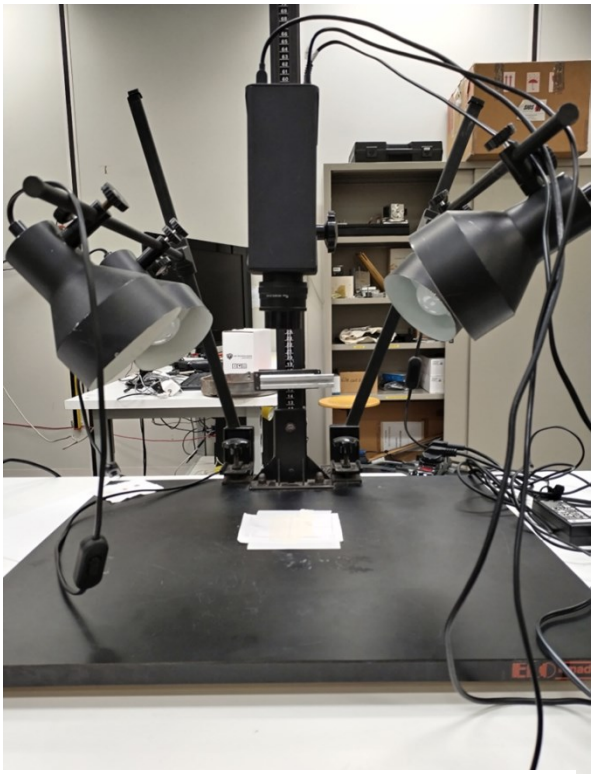


*Figura 4.5 .4 -****Camera iperspettrale***



*Figura 4.5 .5-**Tre campioni con tre gocce di sangue prima del lavaggio con candeggina***

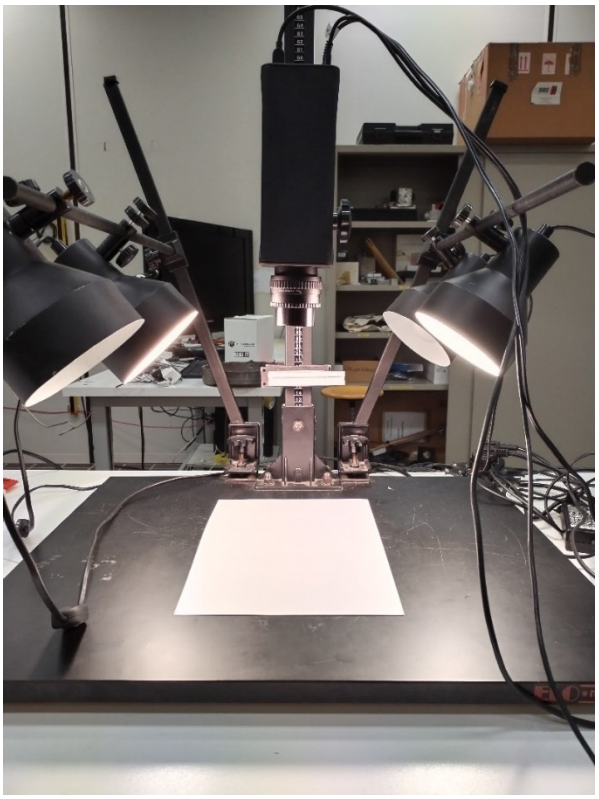


*Figura 4.5.6-**Piano di lavoro***

La procedura è stata avviata con l'acquisizione del campione contenente una goccia di sangue asciutto. Questo è stato effettuato dopo che il sangue era stato lasciato asciugare per 15 minuti, senza ulteriori procedure di lavaggio.



*Figura 4.5.7-**Immagine del campione di sangue asciutto dopo 15 minuti acquisito***

Successivamente per ogni campione analizzato è stata fatta la clusterizzazione iperspettrale. La clusterizzazione iperspettrale in MATLAB è un processo che coinvolge l'uso di algoritmi di clusterizzazione su dati iperspettrali per raggruppare pixel o regioni simili in un'immagine

iperspettrale. Questo può essere utile per identificare automaticamente diverse classi o materiali presenti in un'immagine iperspettrale basandosi sulle informazioni spettrali contenute nei dati. Ecco una panoramica dei passaggi tipici per eseguire la clusterizzazione iperspettrale in MATLAB:

Preparazione dei dati : Prima di tutto, è necessario caricare i dati iperspettrali nell'ambiente MATLAB. Questi dati sono generalmente una matrice 3D in cui le dimensioni sono larghezza x altezza x lunghezza d'onda.

Riduzione delle dimensioni (opzionale) : A volte, i dati iperspettrali possono essere ridotti in dimensioni per migliorare le prestazioni dell'algoritmo di clusterizzazione e ridurre i tempi di calcolo. Una tecnica comune è la riduzione delle dimensioni tramite analisi delle componenti principali (PCA).

Scelta dell'algoritmo di clusterizzazione : Scegliere un algoritmo di clusterizzazione appropriato in base alle esigenze del problema. Alcuni degli algoritmi comuni includono il clustering k-means, il clustering spettrale e il clustering gerarchico, tra gli altri.

Applicazione dell'algoritmo di clusterizzazione : Applicare l'algoritmo di clusterizzazione ai dati iperspettrali. Ad esempio, se si utilizza il k-means, è necessario specificare il numero di cluster desiderato.

Visualizzazione dei risultati : Visualizzare i risultati della clusterizzazione sull'immagine iperspettrale. Questo può essere fatto colorando i pixel o le regioni in base al cluster a cui appartengono.

Analisi e interpretazione : Esaminare i risultati della clusterizzazione per identificare le diverse classi o materiali presenti nell'immagine. Questa fase potrebbe richiedere un'analisi più approfondita per comprendere appieno la distribuzione dei cluster.

Validazione (opzionale) : Se necessario, eseguire la validazione dei cluster per misurare quanto i risultati della clusterizzazione corrispondono alla realtà o ai dati di riferimento.

Utilizzo dei risultati : I risultati della clusterizzazione possono essere utilizzati per scopi diversi, come la classificazione di regioni in un'immagine iperspettrale o l'analisi di materiali presenti in uno scenario iperspettrale.

In questo caso è stata utilizzata:

numEndmembers = countEndmembersHFC(data_cube_1);

endmembers = fippi(data_cube_1,numEndmembers, 'ReductionMethod',['PCA']);

countEndmembersHFC(data_cube_1): come il nome stesso suggerisce viene utilizzato per contare il numero di endmember in un "data cube" (un volume di dati tridimensionale) utilizzando il metodo HFC (High-Frequency Content). Gli endmember sono spesso considerati materiali o spettri puri che compongono un'immagine iperspettrale. Il metodo HFC è un algoritmo specifico per identificare tali endmember all'interno del tuo set di dati.

Il termine "numEndmembers" è un'abbreviazione di "numero di endmembers". In questo contesto, gli "endmembers",diversi per ogni dato analizzato, si sono riservati a spettri o firme spettrali indipendenti che vengono utilizzati per l'appunto nell'analisi spettrale o nell'analisi delle immagini iperspettrali.

Le iperspettrali sono immagini acquisite in molte bande di lunghezza d'onda diversa, ciascuna delle quali cattura informazioni spettrali diverse. Gli endmembers sono spettri rappresentativi dei diversi materiali o coperture presenti nell'immagine.

Questi endmembers possono essere utilizzati per l'analisi e l'estrazione di informazioni specifiche dall'immagine.

fippi(data_cube_1, numEndmembers, 'ReductionMethod',['PCA']): questa funzione sembra eseguire un'analisi sugli endmember identificati in data_cube_1 utilizzando un approccio noto come Principal Component Analysis (PCA) o Analisi delle Componenti Principali. PCA è una tecnica di riduzione della dimensionalità che può essere utilizzata per semplificare un set di dati mantenendo le informazioni più importanti. Nel contesto dell'analisi iperspettrale, PCA potrebbe essere utilizzato per ridurre la dimensione dei dati iperspettrali e ottenere una rappresentazione più compatta degli endmember.

I parametri dell'analisi sembrano essere i seguenti:

data_cube_1: il "data cube" iperspettrale di input.

numEndmembers: il numero di endmember da identificare o utilizzare nell'analisi.

'ReductionMethod': un parametro facoltativo che specifica il metodo di riduzione della dimensionalità, in questo caso, PCA.

['PCA']: Il valore associato al parametro 'ReductionMethod' indica che si desidera utilizzare PCA per la riduzione della dimensionalità.

In generale, questo codice sembra essere utilizzato per analizzare dati iperspettrali in modo da identificare gli endmember e quindi eseguire una riduzione della dimensionalità utilizzando PCA per scopi di visualizzazione o ulteriori analisi.

Come riportato dalla Figura 4.5.8 è possibile riconoscere lo spettro del sangue come riportato in Figura 4.5.1 (spettro di sinistra).

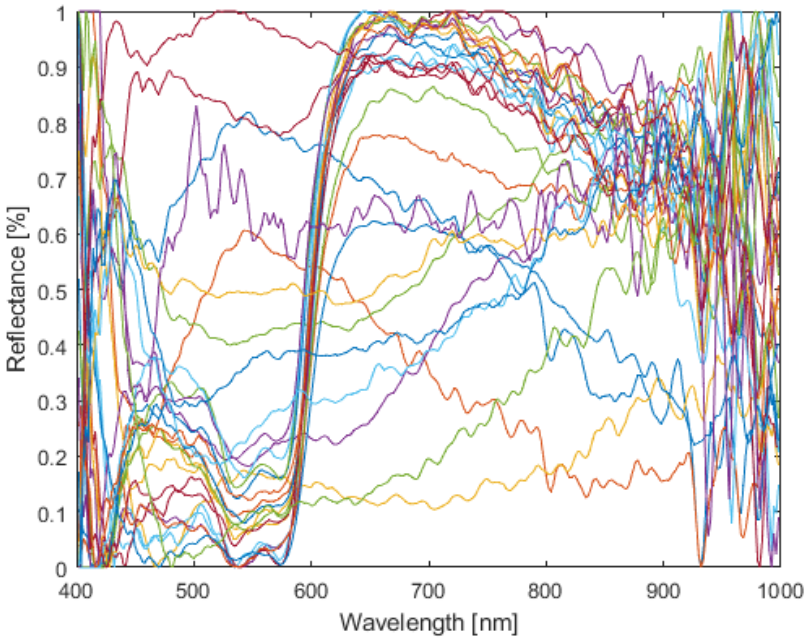


*Figura 4.5.8-**Clusterizzazione iperspettrale del campione di sangue asciutto dopo 15 minuti***

In Matlab è stato utilizzato ,come detto, un parametro definito numEndmembers. In questo caso vale 26 il che significa che ci sono 26 spettri indipendenti (endmembers) che rappresentano diverse caratteristiche o materiali nell'immagine iperspettrale.

Successivamente il campione è stato lavato con candeggina ed acqua e acquisito dopo la sua asciugatura (circa 15 minuti).

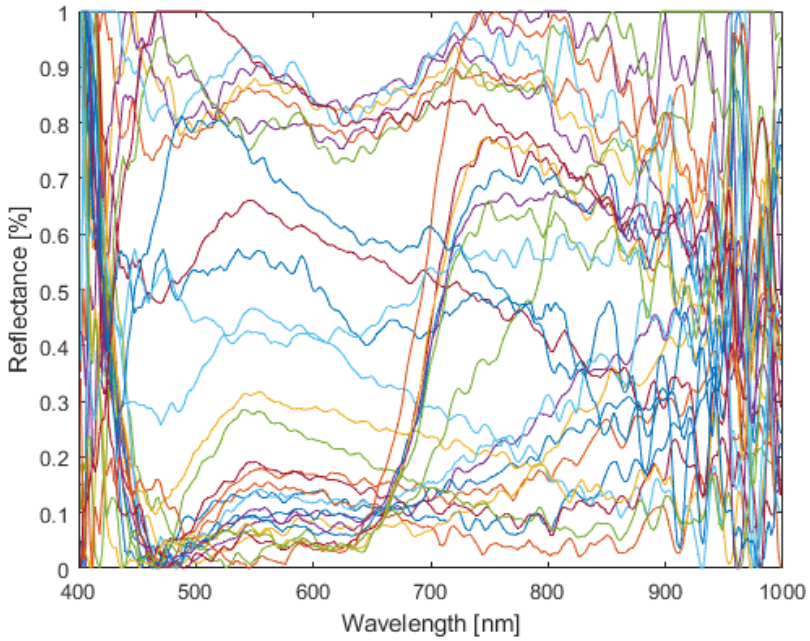


Figura 4.5.9- ***Clusterizzazione iperspettrale del campione di sangue lavato con candeggina e acqua***

La stessa operazione è stata effettuata dopo 48 ore ottenendo il seguente risultato:

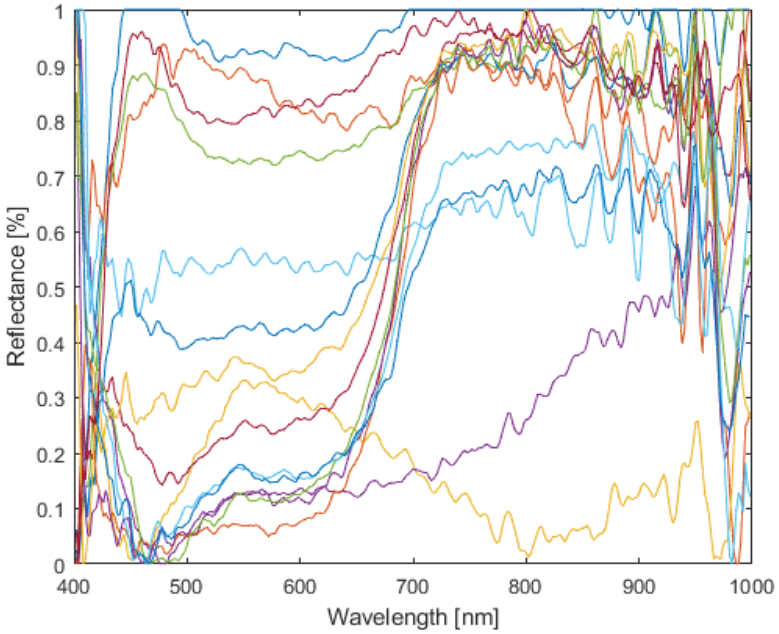


Figura 4.5 .10- ***Clusterizzazione iperspettrale del campione di sangue lavato con candeggina e acqua dopo 48 ore***

La stessa operazione è stata eseguita anche dopo 8 giorni ottenendo :

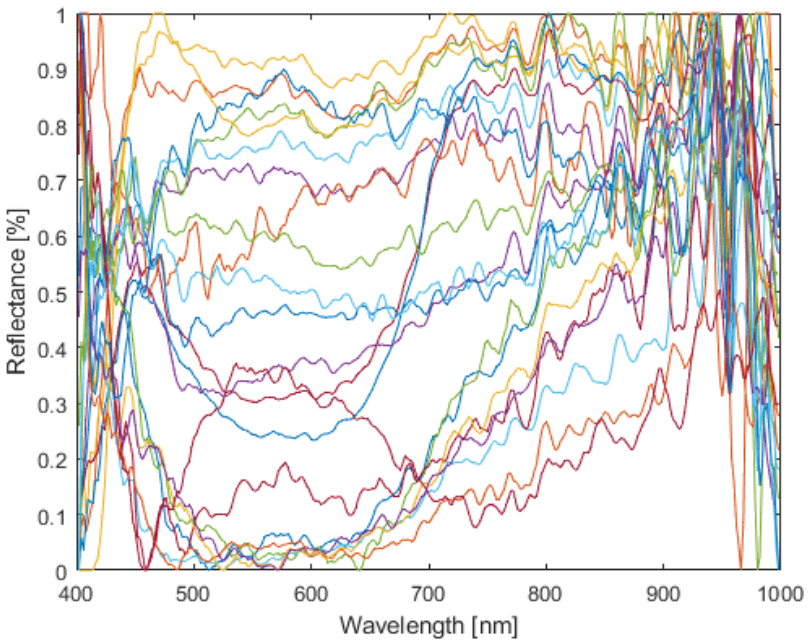


Figura 4.5 .11- ***Clusterizzazione iperspettrale del campione di sangue lavato con candeggina e acqua dopo 8 giorni***

Per ottenere ulteriori prove è stato eseguito un altro esperimento. L'esperimento descritto coinvolge l'uso di bicchieri di plastica contenenti una soluzione di acqua e candeggina, nonché campioni di cotone bianco, per studiare gli effetti della candeggina sui campioni di cotone e sul sangue.

Ecco una descrizione più dettagliata del processo:

Preparazione della soluzione: È stata preparata una soluzione contenente 50 ml di acqua e 50 ml di candeggina in ciascun bicchiere di plastica.

Preparazione dei campioni: Sono stati utilizzati campioni rettangolari di cotone bianco. In sei di questi campioni è stata applicata una goccia di sangue. Questi sei campioni sono stati poi posizionati all'interno dei sei bicchieri contenenti la soluzione di candeggina. Gli altri quattro campioni di cotone bianco sono stati posizionati in quattro bicchieri senza sangue.

Esposizione alla soluzione di candeggina: Tutti e dieci i bicchieri, contenenti i campioni con e senza sangue, sono stati lasciati in esposizione alla soluzione di candeggina per un periodo

di 45 minuti. Questo è stato fatto per osservare come la candeggina influisce sui campioni di cotone e sul sangue.

Lavaggio dei campioni: Trascorsi i 45 minuti, tutti i campioni sono stati lavati con acqua per rimuovere la soluzione di candeggina residua.

Asciugatura: Dopo il lavaggio, i campioni sono stati lasciati asciugare alla luce solare per un periodo di 15 minuti o fino a quando sono stati completamente asciutti. Questo passaggio è stato incluso per assicurarsi che siano completamente asciutti prima dell'analisi successiva.

Acquisizione ed elaborazione dei risultati: Dopo l'asciugatura, i campioni sono stati analizzati o valutati in base a qualche parametro specifico. Questa fase può includere l'uso di strumenti di misurazione, analisi visive per determinare gli effetti della candeggina sui campioni di cotone e sul sangue.

La fase successiva ,e finale, coinvolge l'acquisizione e l'elaborazione dei risultati per trarre conclusioni sulla reazione dei campioni alla candeggina.

Di seguito le immagini di tale esperimento:

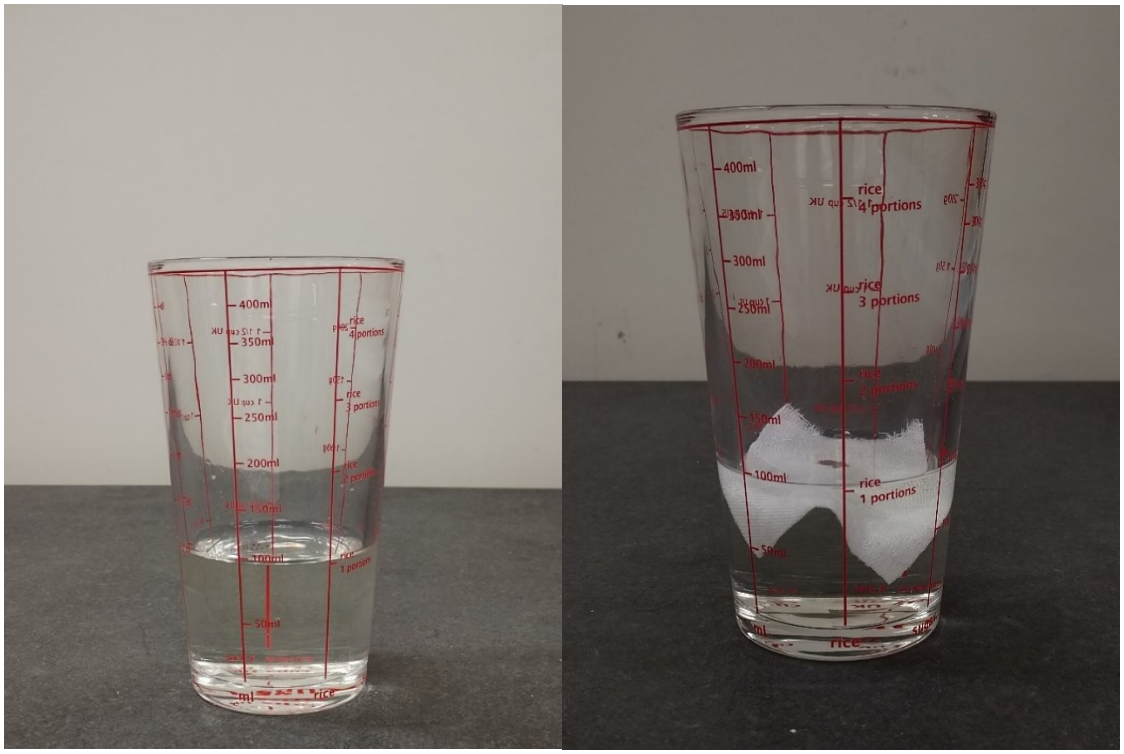


Figura 4.5.12- ***Rappresentazione della composizione della soluzione.*** *La prima immagine contiene la soluzione di acqua e candeggina mentre la seconda è stato immerso un campione di cotone con una goccia di sangue.*

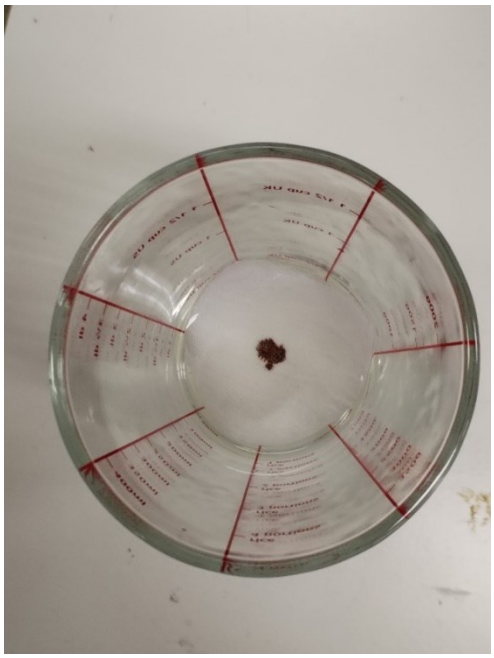


Figura 4.5.13- ***Visione dall'alto della seconda foto di Figura 4.5.12***



*Figura 4.5.14-****Visione frontale dei dieci campioni immersi nella miscela***



Figura 4.5.15- ***Visione dell'alto dei dieci campioni immersi nella miscela***

Da tale esperimento abbiamo ottenuto:

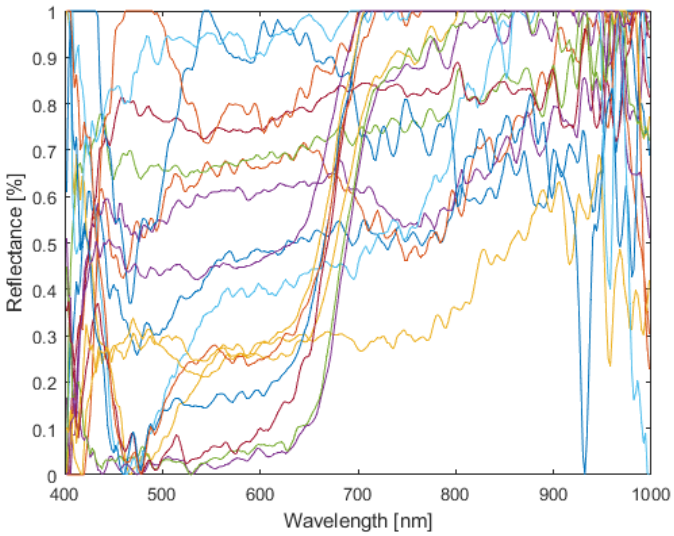


*Figura 4.5.16-****Prova 1 campione con sangue***

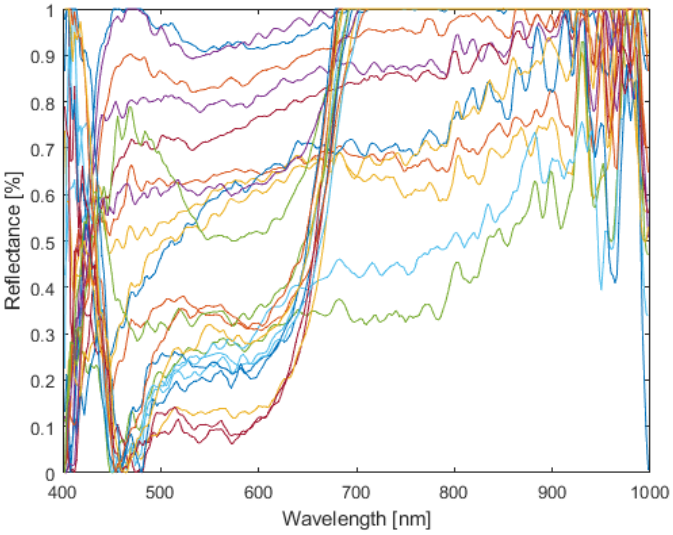


Figura 4.5.17- ***Prova 2 campione con sangue***

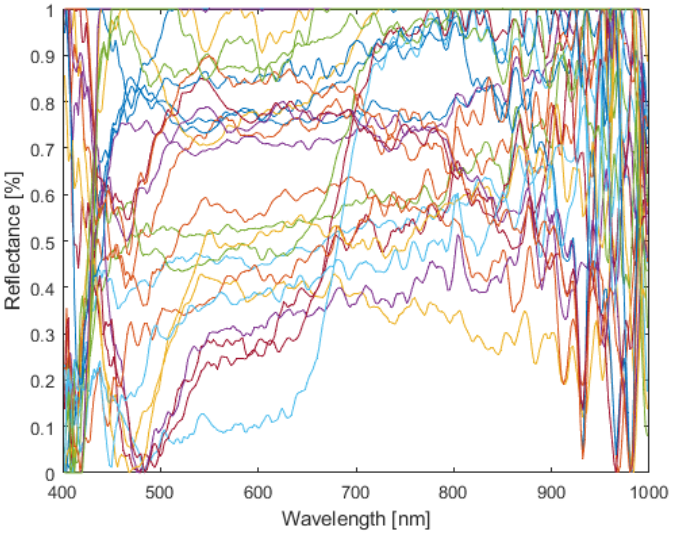


Figura 4.5.18- ***Prova 3 campione con sangue***

Per quanto riguarda invece la candeggina sono stati ottenuti i seguenti risultati:

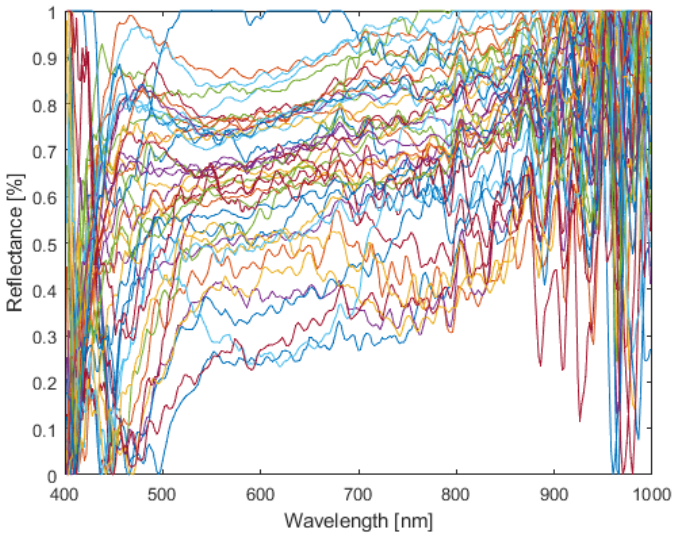


Figura 4.5.19- ***Prova 1 di candeggina***

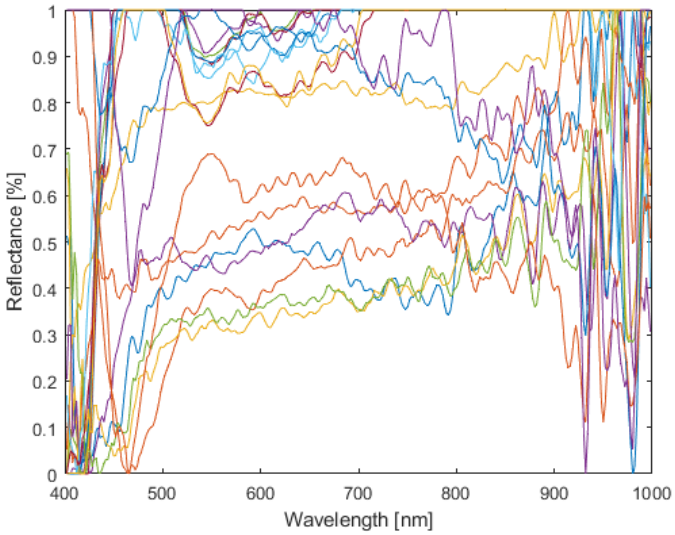


Figura 4.5.20- ***Prova 2 di candeggina***

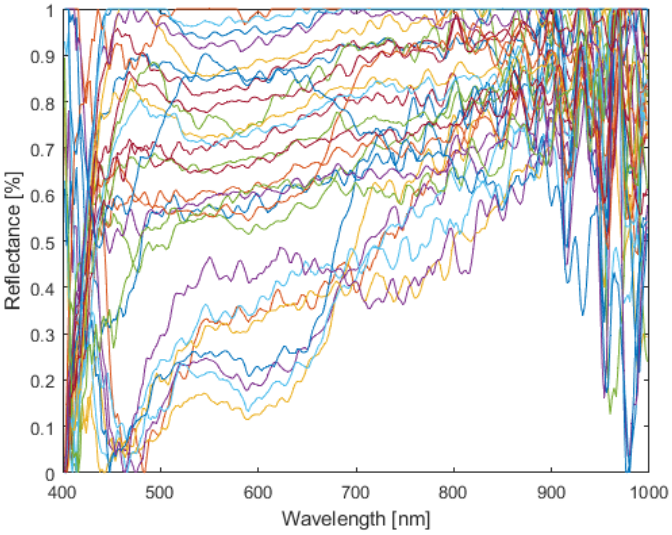


Figura 4.5.21- ***Prova 3 di candeggina***

Nel corso ricerca, sono state condotte ulteriori procedure di acquisizione dei campioni, effettuate un mese dopo le prime operazioni al fine di studiare l'evoluzione degli spettri di campioni di cotone bianco e di sangue. Questo studio è stato suddiviso in tre fasi principali, ciascuna delle quali comprendeva nove acquisizioni per cinque giorni consecutivi al fine di monitorare le variazioni negli spettri.

Nella prima fase, sono stati utilizzati tre campioni di cotone bianco. In questi abbiamo depositato tre gocce di sangue nella zona centrale e si è monitorato l'evoluzione dello spettro del sangue asciutto nel corso di cinque giorni. Prima di procedere con le acquisizioni, abbiamo atteso l'asciugatura del sangue, che solitamente richiede circa 15-20 minuti. Questo approccio ha consentito di analizzare come lo spettro del sangue puro cambia nel tempo.

Nella seconda fase, sono stati utilizzati sempre tre campioni di cotone bianco, ma questa volta è stato utilizzato l'effetto del lavaggio con candeggina e acqua. I campioni sono stati lavati attraverso lo sfregamento e, successivamente, si è aspettato che si asciugassero completamente, utilizzando una pistola termica quando necessario, prima di eseguire le acquisizioni. Questo passo ha permesso di confrontare gli spettri della candeggina lavata con i campioni di solo sangue precedentemente studiati.

Infine, nella terza fase, è stato ripetuto il processo di deposito di gocce di sangue su tre campioni di cotone bianco, seguito dall'asciugatura e dal lavaggio con candeggina e acqua

attraverso lo sfregamento. Ancora una volta, si è aspettato che i campioni si asciugassero completamente. Questo ha permesso di studiare l'effetto del lavaggio con candeggina sugli campioni di sangue asciutto.

Tutte queste nove acquisizioni sono state ripetute per cinque giorni consecutivi al fine di osservare l'evoluzione temporale degli spettri, concentrandosi in particolare sugli spettri del sangue. Questa metodologia ha fornito una panoramica dettagliata delle variazioni negli spettri dei campioni di cotone bianco e dei campioni di sangue in risposta a diverse condizioni sperimentali.

Di seguito le foto di tale processo:

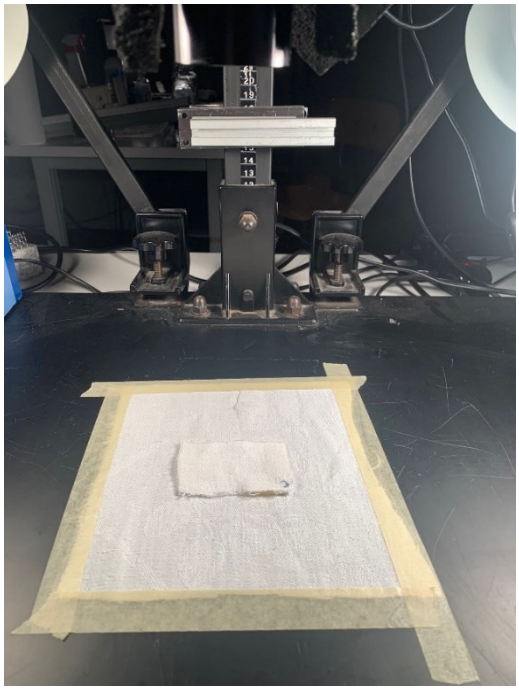


*Figura 4.5.22-**Piano di acquisizione mediante HSI***

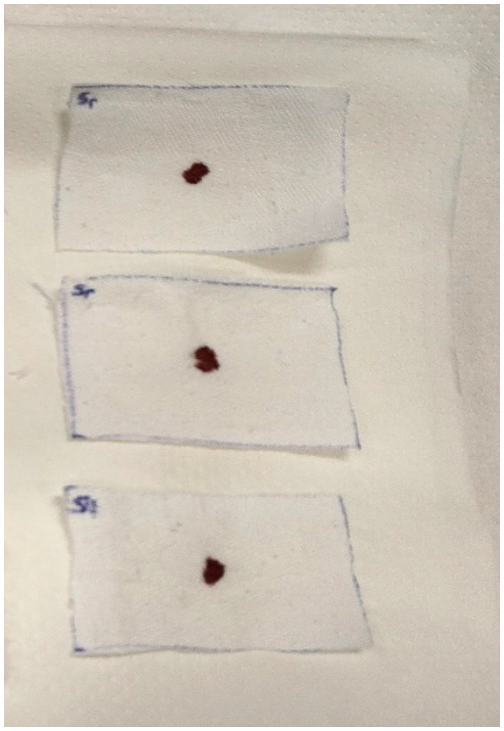


Figura 4.5.23- ***Tre campioni di sangue come riferimento del primo giorno***

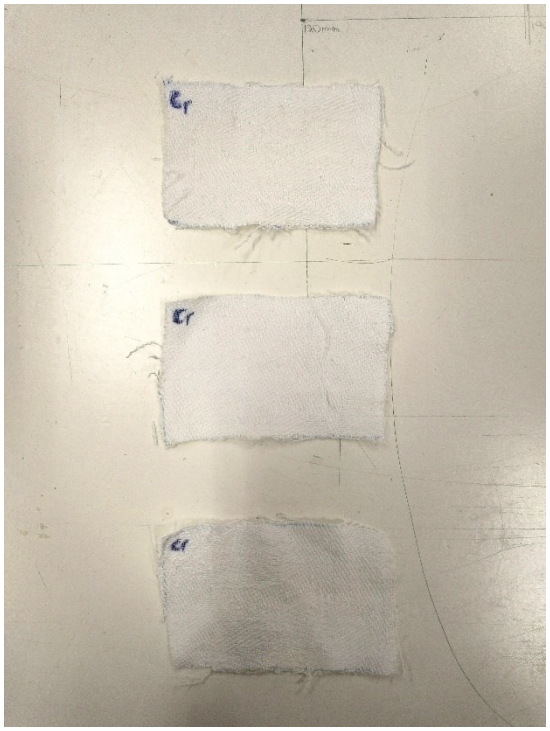


Figura 4.5.24- ***Tre campioni di candeggina come riferimento del primo giorno***

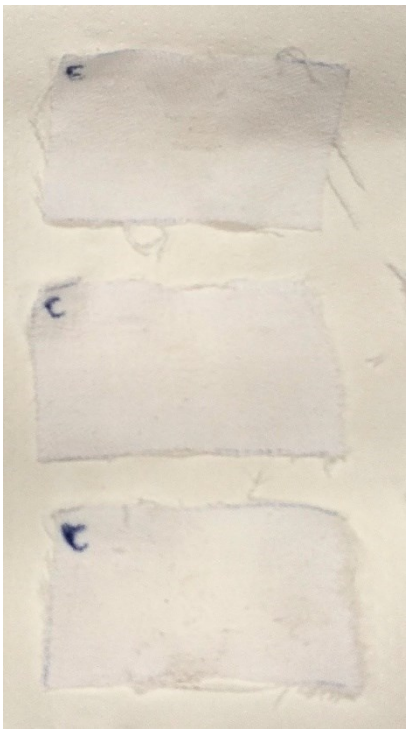


Figura 4.5.25- ***Tre campioni di sangue lavato mediante candeggina del primo giorno***

L'analisi dati è stata condotta secondo la seguente procedura:

Acquisizione dei dati iniziali : Acquisizione dei campioni di riferimento del cotone, del sangue e della candeggina depositati nel rispettivo sostrato. L'obiettivo è stato quello di ottenere gli spettri medi delle del sostato e delle due sostanze.

Acquisizione dei campioni di sangue lavati con candeggina: L'obiettivo di questo step è stato quello di estrarre, mediante principal component analysis, gli spettri caratteristici presenti nel materiale analizzato. Questi spettri sono stati ottenuti osservando il plot Browser (Matlab) e andando a selezionare manualmente gli spettri di interesse e andando a investigare le lunghezze caratteristiche di ogni sostanza.

Sovrapposizione e confronto degli spettri : Una volta ottenuti i quattro spettri distinti, sono stati sovrapposti per valutare le differenze e le somiglianze presenti tra loro.

Questo intero processo è stato ripetuto per i cinque giorni considerati nello studio. Questo ci ha permesso di valutare non solo la capacità del sistema di misura di distinguere le sostanze di interesse, ma anche di evidenziare l'evoluzione temporale di ciascuna di esse.

Capitolo 5 Lo Spettrofotometro

Lo spettrofotometro è uno strumento utilizzato in varie discipline scientifiche per misurare l'assorbimento o la riflessione della luce da parte di una sostanza in funzione della lunghezza d'onda della luce stessa. Questo strumento è ampiamente utilizzato per diverse applicazioni, tra cui:

Analisi chimiche: Gli spettrofotometri vengono utilizzati per determinare la concentrazione di una sostanza chimica in una soluzione tramite la misurazione dell'assorbimento della luce su una specifica lunghezza d'onda. Questa tecnica è comunemente utilizzata in chimica analitica per determinare la concentrazione di soluzioni di composti chimici.

Biologia molecolare: In biologia molecolare, gli spettrofotometri vengono utilizzati per misurare la concentrazione di acidi nucleici come il DNA e l'RNA. La quantificazione di queste biomolecole è fondamentale per molte applicazioni, come la preparazione di campioni per la PCR (reazione a catena della polimerasi) o la determinazione della purezza del campione.

In generale, gli spettrofotometri forniscono dati quantitativi sulla quantità di luce assorbita o trasmessa da una sostanza in funzione della lunghezza d'onda della luce, il che li rende strumenti molto versatili nelle scienze fisiche e biologiche.

Nell'ambito della caratterizzazione dei materiali, si effettua la misurazione della riflettanza spettrale su un ampio intervallo di lunghezze d'onda compreso tra 300 e 2200 nm. Questa misurazione viene eseguita utilizzando uno spettrofotometro UV/Vis/NIR, specificamente un modello JASCO V-670, in combinazione con una sfera integrata da 150 mm, seguendo il protocollo standard ASTM E903. La scelta di questo intervallo spettrale tiene conto dell'ampio spettro della radiazione solare.

Dai dati di riflettanza spettrale ottenuti, è possibile estrarre tre tipi principali di informazioni, di cui uno è la Riflettanza Solare (SR). Questa grandezza rappresenta la capacità di un materiale di riflettere la radiazione solare ed è calcolata attraverso una media pesata della riflettanza spettrale ($\rho(\lambda)$) nell'intervallo compreso tra 300 nm (λmin) e 2200 nm (λmax). La formula utilizzata per calcolare la Riflettanza Solare è la seguente:

$$SR = \int_{\lambda_{min}}^{\lambda_{max}} \frac{\rho(\lambda) * I(\lambda)}{I_{tot}} d\lambda$$

Dove SR rappresenta la Riflettanza Solare; $\rho(\lambda)$ è la riflettanza spettrale del materiale su una data lunghezza dell'onda λ; λmin è la lunghezza d'onda minima dell'intervallo spettrale considerato (300 nm); λmax è la lunghezza d'onda massima dell'intervallo spettrale considerato (2200 nm).

Questo calcolo fornisce una misura della capacità del materiale di riflettere la radiazione solare nell'intervallo spettrale specificato.

Nel processo di analisi, è necessario calcolare la Riflettanza Solare (SR) utilizzando la formula precedentemente menzionata, in cui $I(\lambda)$ rappresenta l'irradianza solare spettrale emisferica conforme alla norma ASTM G173, e I tot si ottiene tramite l' integrazione dell'irraggiamento solare $I(\lambda)$ nell'intervallo spettrale da λ min a λ max.

Per valutare l'accuratezza delle misurazioni di riflettanza solare, è necessario condurre un test di ripetibilità.

Inoltre, è stata calcolata la Riflettanza NIR (R NIR) utilizzando l'equazione sopra riportata, con l'unica differenza che l'intervallo spettrale considerato è ristretto alla regione NIR (700–2200 nm).



*Figura 5.1-**Spettrofotometro***

Capitolo 6 Risultati

Questa sezione riporta i risultati ottenuti dallo studio. Nella prima parte vengono illustrati i dati acquisiti con lo spettrofotometro.

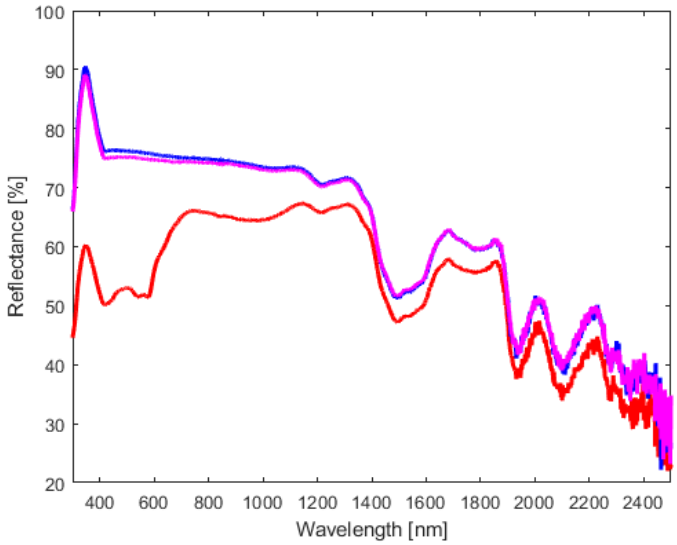


*Figura 6 .1-**Spettro del sangue (rosso), della candeggina(blu) e del sapone(magenta) misurati con lo spettrofotometro***

La Figura 6.1 riporta gli spettri caratteristici del sangue, della candeggina e del sapone acquisiti mediante lo spettrofotometro nelle lunghezze d'onda tra i 300 e 2500 nm. E' possibile osservare come gli spettri della candeggina e del sapone presentano un andamento molto simile. Il motivo di questo è dato dal fatto che il sostrato di interesse è il medesimo cotone bianco e entrambi i tessuti sono stati lavati con acqua.

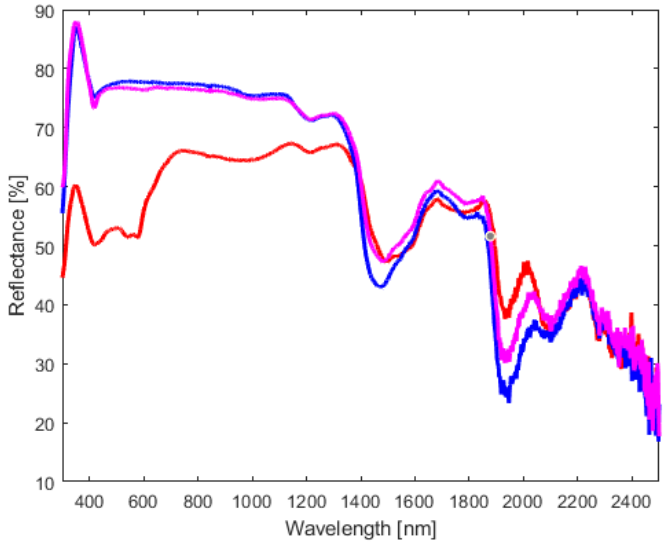


Figura 6.2 ***-Spettro del sangue (rosso), del sangue lavato con sapone(magenta) e del sangue lavato con candeggina(blu) misurati con lo spettrofotometro***

La Figura 6.2 riporta gli spettri del sangue (di riferimento), del campione di sangue lavato con acqua e candeggina e del sangue lavato con sapone acquisiti mediante lo spettrofotometro nelle lunghezze d'onda sempre tra i 300 e 2500 nm. Anche qui è possibile osservare come gli spettri della candeggina e del sapone presentano un andamento molto simile.

Nella seconda parte viene analizzato in una maniera alternativa la capacità di estrarre il contenuto della goccia di sangue andando a visualizzare le immagini estratte dal cubo iperspettrale.



*Figura 6 .3-**Immagine campione di sangue lavato con poca candeggina e acqua***

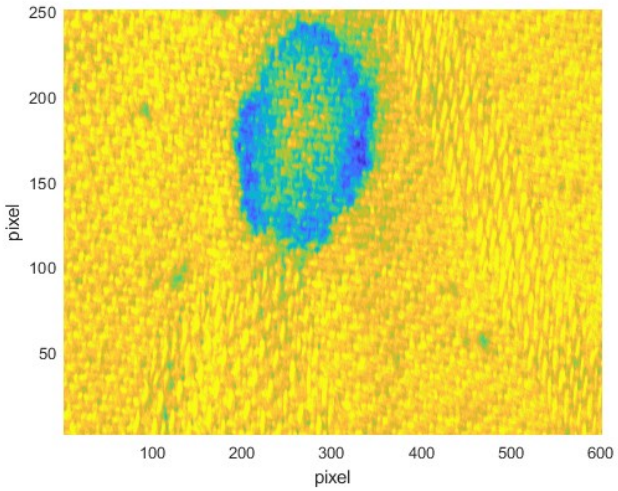


*Figura 6.4- **Immagine estratta del campione di sangue lavato con poca candeggina e acqua***

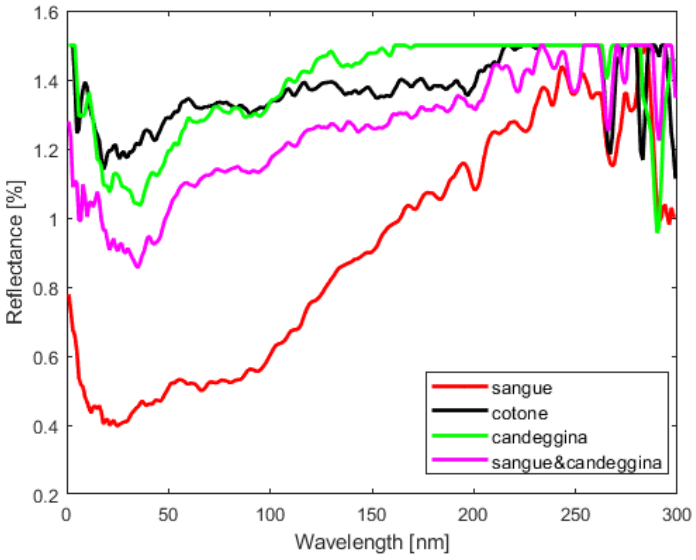


*Figura 6 .5-**Insieme degli spettri del sangue, del cotone, della candeggina e del sangue lavato con candeggina***

La stessa procedura è stata ripetuta anche per il secondo giorno, ottenendo:

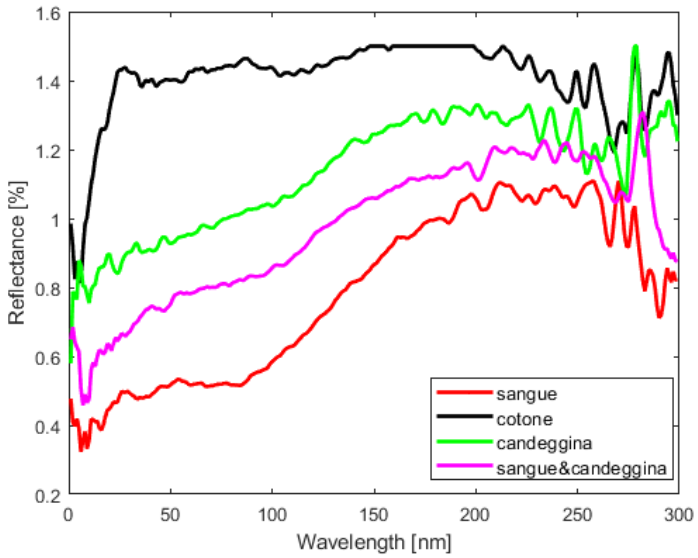


Figura 6.6- ***Insieme degli spettri del sangue, del cotone, della candeggina e del sangue lavato con candeggina per il secondo giorno***

Nella seguente parte viene riportata l'analisi dell'evoluzione temporale dei dati :

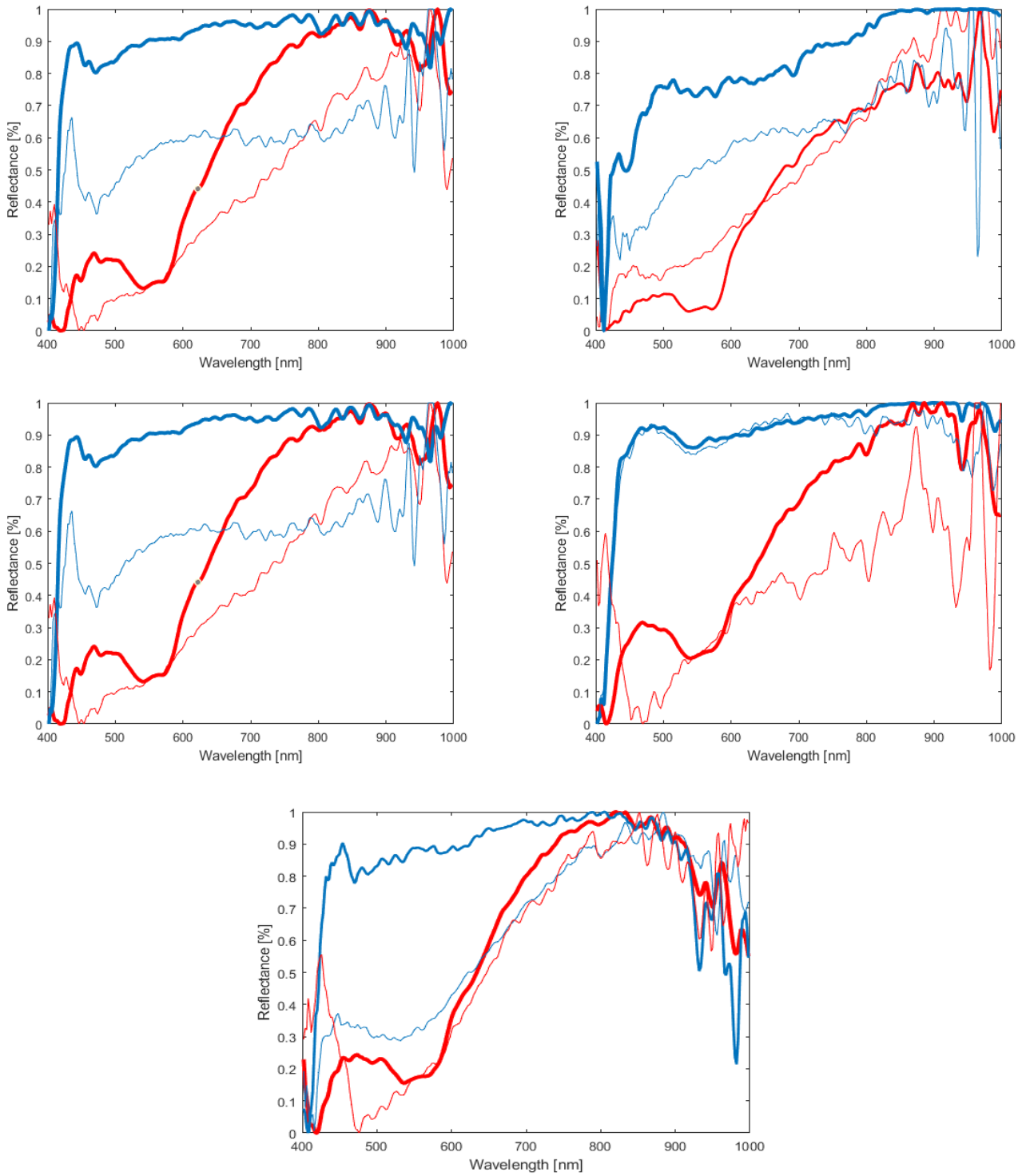


*Figura 6.7-**Evoluzione temporale in PCA***

Tali figure, mostrano l'evoluzione temporale degli spettri estratti della PCA. L'evoluzione tratta di come cambia lo spettro del campione di sangue lavato con candeggina rispetto ai due spettri di riferimento, ovvero quello del sangue e della candeggina. Si parte in alto a sinistra con il primo giorno fino ad arrivare all'ultimo del quinto giorno.

Infine è stato utilizzato il sapone come altra metodologia di lavaggio del sangue. In questo caso il cubo iperspettrale della goccia di sangue lavata con il sapone è stata normalizzata per il cubo caratterizzante il sapone nello stesso sostrato di cotone . Le figure mostrate in Figura 6.8 e in Figura 6.9 sono state ottenute mediante rapporto tra due lunghezze d'onda caratteristiche, la prima lunghezza d'onda è stata quella in corrispondenza del picco del sapone mentre la seconda lunghezza d'onda corrispondente alla fine della pendenza caratteristica del sangue.

S1

S2

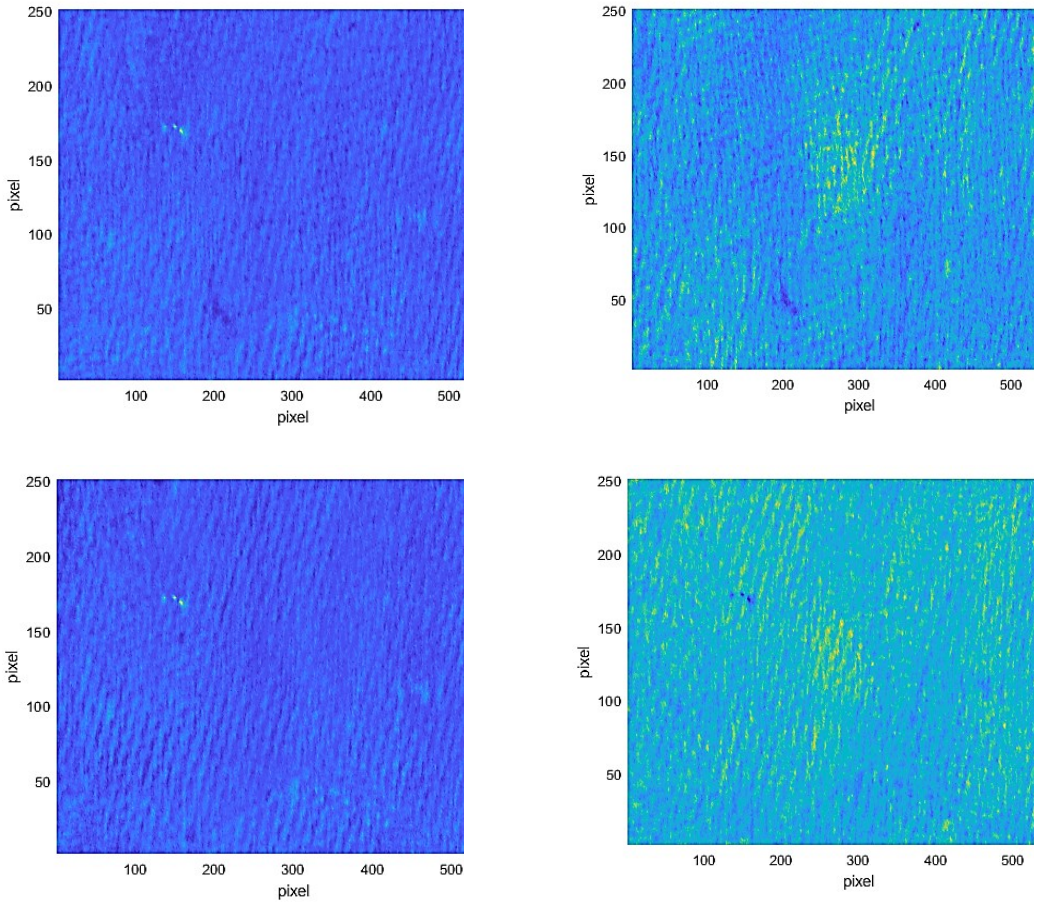


*Figura 6.8-**Campioni di sapone del primo giorno***

S1

S2

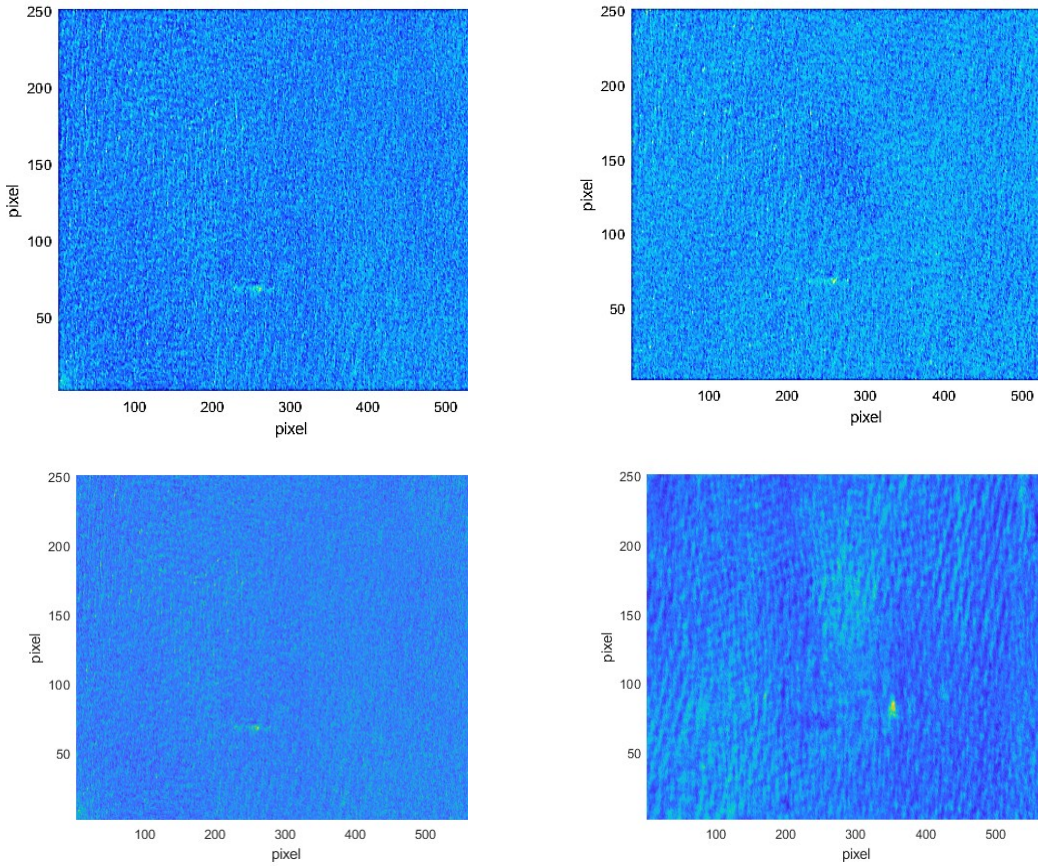


*Figura 6 .9-**Campioni di sapone del secondo giorno***

Come ultima analisi è stata fatta l'acquisizione del cotone bianco e quello che abbiamo ottenuto è stato :

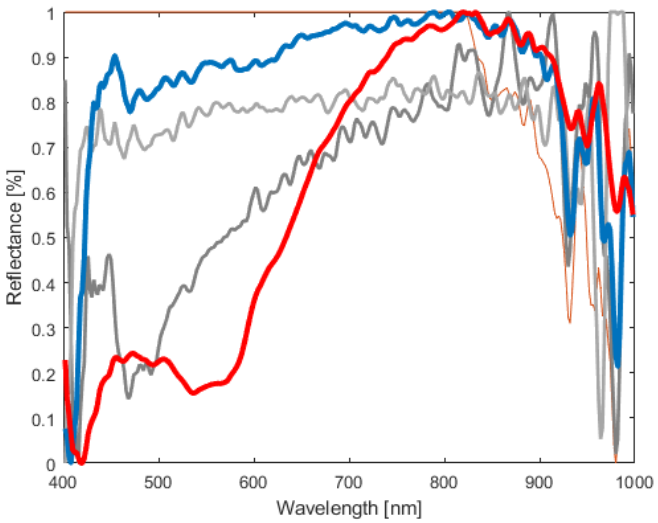


*Figura 6.10- **Spettri del cotone (grigio scuro e grigio chiaro), del sangue (rosso) e della candeggina (blu)***

Capitolo 7 Conclusioni

L'emoglobina è un componente vitale del sangue, costituendo circa il 97% dei suoi componenti nelle macchie essiccate. Le caratteristiche spettrali dei derivati dell'emoglobina sono sfruttate per sviluppare criteri di identificazione.

Nello specifico, nei campioni di sangue, vengono osservati gli spettri di riflettanza media ei loro derivati, confrontandoli con una serie di sostanze di colore rosso che potrebbero essere confuse con il sangue. Nella regione visibile dello spettro elettromagnetico, emergono due distinti picchi, α ed β, a causa dell'ossiemoglobina, come illustrato nella Figura 4.5.1 Con il passare del tempo, questi picchi tendoni a diventare meno evidenti all'ispezione visiva all'interno della firma spettrale.

Per ottenere lo spettro del sangue abbiamo utilizzato la ROI, selezionando manualmente i limiti del quadrato dove effettuare le analisi. Una "regione di interesse" (ROI) rappresenta una parte specifica di un'immagine su cui si desidera applicare un filtro o intervenire in qualche modo. Questa ROI può essere visualizzata come un'immagine maschera binaria, in cui i pixel che fanno parte della ROI sono impostati su 1, mentre quelli all'esterno della ROI sono impostati su 0. La casella degli strumenti mette a disposizione diverse opzioni per definire e creare queste maschere binarie.

Abbiamo poi normalizzato per riportare la riflettanza tra 0 e 1 rappresentato lo spettro.

Quello che è possibile osservare dalla sezione 4.5 sono i due spettri caratteristici sia del sangue che della candeggina, notevolmente diversi. Inoltre dai primi dati raccolti si può vedere come cambiano i due spettri di riferimento con il passare del tempo , considerando anche l'incidenza dello stesso cotone che costituisce il campione e la trama stessa delle fibre che lo compongono. Infatti come appare dalla Figura 6.10 si riconoscono i tre spettri differenti. Quello che è stato rilevato dalla prima parte dell' analisi dati è stato che i fattori ambientali hanno inciso fortemente nell'acquisizione ed elaborazione e successiva individuazione dei vari spettri. Questo spiega perché nel processo dei dieci campioni immersi nella soluzione di candeggina e acqua siano stati riportati solo quelli più evidenti .

Per questo motivo sono state ripetute le acquisizioni in un tempo successivo , con una temperatura molto più favorevole. In questo caso sono stati analizzati i campioni per un periodo totale di cinque giorni confrontandoli di volta in volta con i spettri di riferimenti del

sangue e della candeggina rispettivi dei giorni in esame. Quello che ne risulta è che il sangue è visibile grazie alla camera iperspettrale anche al quinto giorno.

Infine è stato analizzato il sapone come sostituente della candeggina, ma in questo caso è stata utilizzata un'altra tecnica ovvero rapporto tra due lunghezze d'onda analizzate in due giorni. In tal caso il sangue dove presente è visibile e quindi è possibile riconoscere la traccia di sangue.

Come prova sono stati analizzati i spettri anche attraverso lo spettrofotometro.

Lista degli Acronimi e dei Simboli

OSAC National Institute of Stardards and Technology Organization of Scientific Area Committees

HSI Imaging Iperspettrale

PM autorità giudiziaria competente

PH Potenzial of Hydrogen

GR globuli rossi

GB globuli bianchi

ATP adenosina trifosfato

DNA acido desossiribonucleico o acido deossiribonucleico

Ht ematocrito

Hb emoglobina

CFU colonie delle cellule

ECFU colonie eritrocitarie

EPO ormone eritropoietina

NK cellule natural killer

PPSC cellula staminale pluripotente

PDGF fattore di crescita

AIDS Acquired Immune Deficiency Sindrome

DBS Dry Blood Spot

NIR Near Infra Red

IR Infrared Radiation

Al intelligenza Artificiale

UV ultravioletto

VIS visibile

CCD	Charge-Coupled Device
AOTF	filtri sintonizzabili acusto-ottici
LCTF	filtri sintonizzabili a cristalli liquidi
OPO	oscillatore ottico parametrico
LED	diodi a emissione di luce
CMOS	Complementary Metal Oxide Semiconductor
FOV	Field Of View
ID	identificativo
ROI	Region Of Interest
PCA	Principal Component Analysis
CP	componenti principali
PNG	Portable Network Graphics
PE	particolari evidenze
SVD	Singular Value Decomposition
RNA	Ribonucleic Acid
PCR	Polymerase Chain Reaction
SR	Riflettanza Solare
R NIR	Riflettanza NIR
CIE	Commission Internationale de l'Eclairage

Bibliografia

[1] Lu X, Xu Z, Niu QS, Tu Z. [Applicazione del Touch DNA nella pratica investigativa]. Fa Yi Xue Za Zhi. 2018 giugno; 34 (3):294-298. [PubMed]

[2] McCracken LM. Living forensics: un'evoluzione naturale nelle cure di emergenza. Accid Emerg Nurs. 1999 ottobre; 7 (4):211-6. [PubMed]

[3] B. Caddy, P. Cobb, in: P. White (Ed.), Crime Scene to Court: The Essentials of Forensic Science, second edition, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2004, pp. 1–473.

[4] Organization of Scientific Area Committees for Forensic Science, OSAC Lexicon, Dec. 10, 2022. Available https://lexicon.forensicosac.org/.

[5] G. Sauzier, W. van Bronswijk, S.W. Lewis, Chemometrics in forensic science: approaches and applications, in: Analyst, Vol. 146, no. 8, Royal Society of Chemistry, Apr. 21, 2021, pp. 2415–2448, doi: 10.1039/d1an00082a.

[6] M.M. Houck, J.A. Siegel, Fundamentals of Forensic Science, Elsevier/Academic Press, 2006.

[7] C.S. Silva, A. Braz, M.F. Pimentel, Vibrational spectroscopy and chemometrics in forensic chemistry: critical review, current trends and challenges, J. Braz. Chem. Soc. 30 (11) (2019) 2259–2290, https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190140.

[8] K.B. Bec, J. Grabska, C.W. Huck, Issues in hyperspectral traceability of foods, in: Comprehensive Foodomics, Elsevier, 2020, pp. 258–289, https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22848-5.

[9] A. Nakamura, et al., Portable hyperspectral imager with continuous wave green laser for identification and detection of untreated latent fingerprints on walls, Forensic Sci. Int. 254 (Sep. 2015) 100–105, https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.06.031.

[10] J.M. Amigo, H. Babamoradi, S. Elcoroaristizabal, Hyperspectral image analysis. Atutorial, in: Analytica Chimica Acta, Vol. 896, Elsevier B.V., Oct. 08, 2015, pp.

34–51, doi: 10.1016/j.aca.2015.09.030.

[11] M.A.F. ´ de La Ossa, C. García-Ruiz, J.M. Amigo, Near infrared spectral imaging for the analysis of dynamite residues on human handprints, Talanta 130 (2014)

315–321, https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.026.

[12] M. Albino de Carvalho, et al., NIR hyperspectral images for identification of gunshot residue from tagged ammunition, Anal. Methods 10 (38) (2018)

4711–4717

[13] Lu, G.; Fei, B. Imaging iperspettrale medico: una recensione. J.Biomed. Optare. 2014 , 19 , 010901. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

[14] Indalecio-Céspedes, CR; Hernández-Romero, D.; Legaz, I.; Sánchez Rodríguez, MF; Osuna, E. Rilevazione di macchie di sangue occulte nell'analisi della scena del crimine. Chimica forense. 2021 , 26 , 100368. [Google Scholar] [CrossRef]

[15] James, ME Gradi di contrasto: rilevamento di macchie di sangue latenti sul tessuto utilizzando una fonte di luce alternativa (ALS) e gli effetti del lavaggio. J. Forense Sci. 2020 , 66 , 1024–1032. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

[16] Majda, A.; Wietecha-Posłuszny, R.; Mendys, A.; Wojtowicz, A.; Łydżba-Kopczyńska, B. Imaging iperspettrale e analisi multivariata nelle indagini sulle macchie di sangue essiccato. Appl. Fis. A 2018 , 124 , 312. [Google Scholar] [CrossRef]

[17] Edelmann, G.; Gastone, E.; van Leeuwen, T.; Cullen, P.; Aalders, M. Imaging iperspettrale per l'analisi senza contatto di tracce forensi. Sci forense. Int. 2012 , 223 , 28–39. [Google Scholar] [CrossRef]

[18] Edelmann, G.; Manti, V.; van Ruth, SM; van Leeuwen, T.; Aalders, M. Identificazione e stima dell'età delle macchie di sangue su sfondi colorati mediante spettroscopia nel vicino infrarosso. Sci forense. Int. 2012 , 220 , 239–244. [Google Scholar] [CrossRef]

[19] R.H. Bremmer, S.C. Kanick, N. Laan, A. Amelink, T.G. van Leeuwen, M.C. Aalders, Non-contact spectroscopic determination of large blood volume fractions in turbid media, Biomed. Opt. Express 2 (2011) 396–407

[20] D.R. Suhre, L.H. Taylor, N.B. Singh, W.R. Rosch, Comparison of acousto-optic tunable filters and acousto-optic dispersive filters for hyperspectral imaging, in: Proceedings of SPIE, 27th AIPR Workshop: Advances in Computer-Assisted Recognition, vol. 3584, 1999, pp. 142–147.

[21] M.D. Evans, C.N. Thai, J.C. Grant, Development of a spectral imaging system based on a liquid crystal tunable filter, Trans. ASAE 41 (1998) 1845–1852.

[22] E. Margalith, R.J. Barnes, Spectral imaging device with tunable light source. I. Opotek, US7233392, 19-6-2007.

[23] J. Qin, Instruments for constructing hyperspectral imaging systems, in: Hyperspectral Imaging for Food Quality Analysis and Control, Elsevier, New York, 2010, pp. 133–172.

[24] T. Kirkhus, B.G. Fismen, J. Tschudi, M. O'Farrell, Calibration of a multi-object spectrometer with programmable and arbitrary field of view, spectroscopy, color, & imaging II, in: Applied Industrial Optics: Spectroscopy, Imaging and Metrology, 2010.

[25] W. Fu, S. Li, L. Fang, X. Kang e JA Benediktsson, "Classificazione delle immagini iperspettrali tramite rappresentazione sparsa congiunta adattativa alla forma", Ieee Journal of Selected Topics in Applied Earth Observations and Remote Sensing , vol. 9, n. 2, pagine 556–567, 2016.Visualizza su: Google Scholar

[26] H. Hong, F. Luo, Z. Ma e H. Feng, "Riduzione della dimensionalità semi-supervisionata dell'immagine iperspettrale basata sull'apprendimento multiforme sparso", Journal of Computer and Communications , vol. 03, n. 11, pagine 33–39, 2017.Visualizza su: Google Scholar

[27] F. Luo, B. Du, L. Zhang, L. Zhang e D. Tao, "Apprendimento delle caratteristiche utilizzando l'analisi discriminante dell'ipergrafo spaziale-spettrale per l'immagine iperspettrale", IEEE Transactions on Cybernetics , vol. 49, n. 7, pp. 2406–2419, 2019.Visualizza su: Sito dell'editore | Google Scholar

[28] Chen, R.; Zhang, L.; Zang, D.; Shen, W. Modelli di gocce di sangue: formazione e applicazioni. Avv. Interfaccia colloidale Sci. 2016 , 231 , 1–14. [Google Scholar] [CrossRef]

[29] Zulfiqar M, Ahmad M, Sohaib A, Distefano S, Hyperspectral Imaging for Bloodstain Identification, Sensors 21(9):3045, 2021

[30] Majda A, Wietecha-Posłuszny R, Mendys A, Wójtowicz A, ŁydżbaKopczyńska B, Hyperspectral imaging and multivariate analysis in the dried blood spots investigations, Applied Physics A volume 124, Article number: 312, 2018

[31] Romaszewski M, Głomb P, Sochan A, Cholewa M, A dataset for evaluating blood detection in hyperspectral images. Forensic Science International 320, 110701, 2021

[32] Amigo J. M., Hyperspectral imaging, Elsevier, 2020

[33] D.B. Malkoff, W.R. Oliver, Hyperspectral imaging applied to forensic medicine, Proc. SPIE 3920 (2000).

[34] C. Malegori, E. Alladio, P. Oliveri, C. Manis, M. Vincenti, P. Garofano, F. Barni, A. Berti, Identification of invisible biological traces in forensic evidences by hyperspectral NIR imaging combined with chemometrics, Talanta 215 (2020), 120911.

[35] Kenneth S.Saladin, Anatomia Umana, editore: Piccin, anno pubblicazione:2017

Sitografia

a.https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1355030622000417

b.https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379073812004495

c.https://www.mdpi.com/1424-8220/22/19/7311#sec3dot1-sensors-22-07311

d.https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/9967666?figureId=fig4#fig4

e.https://unibiofor.it/tecnologia-e-scena-del-crimine-luso-del-laser-scanner/

f.https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37169464/

g.https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36121069/

h.https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/9967666?figureId=fig4#fig4

i.https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379073821000219

l.https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958946512002107

Ringraziamenti

Alla conclusione di questo lavoro di ricerca, è mio dovere esprimere la mia più profonda gratitudine a tutte le persone che hanno sostenuto il mio percorso universitario e la stesura di questa tesi. Senza il loro prezioso aiuto e supporto, questo lavoro non avrebbe raggiunto la completezza che potete leggere ora, e il mio cammino accademico sarebbe stato indubbiamente più arduo.

In queste pagine, desidero dedicare uno spazio speciale a coloro che hanno contribuito in modo significativo alla mia crescita accademica e professionale. Questa tesi è il risultato del costante sostegno di molte persone, e in questo momento di riflessione, desidero esprimere la mia riconoscenza verso ciascuno di loro.

Nelle prossime pagine, voglio rendere omaggio a coloro che hanno lavorato istantaneamente al mio fianco, contribuendo alla realizzazione di questo progetto. Le loro parole di incoraggiamento, la loro guida e il loro affetto hanno reso possibile questo traguardo, e per questo, saranno per sempre nel mio cuore.

Un sentito ringraziamento va in primo luogo al mio relatore, la Prof.ssa Milena Martarelli , e il mio correlatore, il Prof. Paolo Castellini, che hanno accompagnato e supportato ogni fase della realizzazione di questa tesi, dalla scelta dell'argomento fino alla sua conclusione. La loro gentilezza e disponibilità sono stati un faro costante nel mio cammino accademico. Inoltre il loro contributo con consigli puntuali e critiche costruttive ha arricchito notevolmente il mio lavoro.

Desidero esprimere la mia profonda riconoscenza a Silvia, la mia tutor, per il ruolo fondamentale che ha svolto nel mio percorso accademico. La sua presenza costante e il suo impegno sincero hanno illuminato ogni fase di questa tesi. Ti ringrazio enormemente perché hai dimostrato una dedizione straordinaria , mettendo a disposizione le tue competenze e il tuo tempo senza riserve. Le tue preziose indicazioni, i consigli esperti e la tua pazienza infinita hanno fatto la differenza in ogni momento critico della mia ricerca. Hai trasformato le sfide in opportunità e le incertezze nella crescita personale. Grazie a te, ho imparato non solo a svolgere un lavoro accademico di qualità, ma anche a sviluppare una mentalità critica e analitica che mi sarà utile per tutta la vita. Inoltre la tua gentilezza, il tuo spirito collaborativo e la tua capacità di ascolto attento sono state fonte di ispirazione e conforto nei momenti di stanchezza e incertezza. In questo percorso di crescita, hai condiviso con me la tua passione per la conoscenza e la tua dedizione all'apprendimento. È stato un onore e un

privilegio imparare da te. Grazie per essere stata una guida eccezionale, un mentore e, soprattutto, un'amica in cui ho potuto sempre fidarmi.

Silvia non posso che essere profondamente grato per tutto ciò che hai fatto per me. Questo traguardo non sarebbe stato raggiunto senza di te. Grazie di cuore per aver illuminato il mio cammino accademico e aver reso possibile questo risultato straordinario.

Vorrei dedicare un momento a esprimere la mia profonda gratitudine e riconoscenza alle persone che sono state la mia fonte di ispirazione costante e il mio pilastro in questo percorso di studio: mamma e papà. Il mio viaggio accademico è stato pieno di sfide e momenti di crescita , e senza il loro amore incondizionato e il loro sostegno costante, non sarei mai riuscito a raggiungere questo traguardo. Questa tesi non è solo il mio successo, ma anche il vostro, poiché siete stati parte integrante di questo percorso e rappresenta anche la vostra dedizione, il vostro amore e il vostro sacrificio. Questo traguardo non sarebbe stato possibile senza di voi, e ogni successo che otterrò in futuro sarà un riflesso dell'amore e del supporto che mi avete dato.

Mamma, sei stata la mia guida, il mio modello di dedizione e la mia sorgente di forza in ogni momento. Hai sempre creduto in me quando avevo dubbi, e hai visto il mio potenziale quando io stesso faticavo a vederlo. Hai fatto sacrifici inimmaginabili per permettermi di realizzare i miei sogni accademici, e non dimenticherò mai il tuo impegno e il tuo amore incondizionato. Le tue parole di conforto, i tuoi consigli saggi e il tuo affetto mi hanno sostenuto nei momenti di stanchezza e dubbio. Grazie per essere stata la mia più grande sostenitrice e per avermi spinto a dare sempre il massimo. Spero che possa essere orgogliosa dei risultati che ho ottenuto grazie al tuo sostegno. Questo traguardo è anche un modo per dimostrarti quanto apprezzo tutto ciò che hai fatto per me.

Grazie, mamma, per essere la migliore madre e la migliore amica che potessi desiderare.

Papi è impossibile esprimere a parole la profonda gratitudine e il rispetto che provo per te in questo momento significativo della mia vita. Questo traguardo accademico rappresenta non solo il mio duro lavoro, ma anche il risultato di una profonda connessione e di un supporto incondizionato da parte di mio padre. Papi, sei stato la mia costante fonte di ispirazione e la guida nella mia crescita personale. Hai incarnato l'essenza della perseveranza, della dedizione e dell'integrità in tutto ciò che hai fatto, ed è attraverso il tuo esempio che ho

imparato l'importanza di seguire i miei sogni con passione e determinazione. Hai sempre creduto in me, anche quando avevo dubbi su me stessa, e il tuo incoraggiamento mi ha spinto a superare le sfide e a raggiungere le stelle.
Oltre al tuo sostegno emotivo, hai fatto enormi sacrifici per garantire che avessi le risorse e le opportunità necessarie per ottenere questa realizzazione accademica. So quanto hai lavorato duramente per fornirmi le basi solide su cui poter costruire la mia educazione, e sarò eternamente grata per il tuo impegno e la tua dedizione. Le conversazioni significative che abbiamo avuto, le tue parole sagge ei tuoi consigli preziosi sono stati una costante fonte di orientamento e forza nella mia vita. Sono grato per ogni momento trascorso insieme, perché ognuno di essi ha contribuito a plasmare la persona che sono diventata.
Papi, spero che tu sia orgoglioso dei risultati che ho ottenuto grazie al tuo sostegno incrollabile. Questo è un tributo al nostro legame e alla tua straordinaria influenza sulla mia vita.

Grazie, papi, sei il mio eroe e il mio più grande mentore.

Ora dedico questo momento speciale ai miei ringraziamenti più profondi a mio fratello Lorenzo. Sei stata la mia costante fonte di ispirazione e supporto in ogni fase di questa straordinaria avventura accademica. Anche se sei il mio fratello più piccolo, hai dimostrato una saggezza e una maturità che vanno oltre i tuoi anni. Le tue parole incoraggianti e il tuo sostegno incondizionato sono stati un faro nella mia vita durante i giorni di studio più bui. Le tue risate, i tuoi abbracci e la tua comprensione silenziosa hanno alleviato lo stress e le pressioni che ho conversato. In questo viaggio, ho imparato quanto sia preziosa la famiglia, e tu sei il mio più grande tesoro.Non esistono parole sufficienti per esprimere quanto apprezzi il tuo amore, il tuo supporto e la tua presenza costante nella mia vita. Questa tesi è dedicata a te, con la speranza che il mio impegno e la mia dedizione possano riflettere la profondità della gratitudine che provo.
Grazie, per essere la mia roccia, il mio amico e il mio miglior alleato. Il mio successo è anche il tuo, e non avrei potuto farlo senza di te. La tua sorella maggiore ha sempre guardato a te come una fonte di ispirazione. Nonostante la differenza di età, hai dimostrato di essere un vero amico e compagno di avventure. Con te, ho condiviso le mie ansie ei miei sogni, e ogni giorno hai reso la mia vita più ricca. So che il futuro tiene in serbo molte opportunità per te, e non vedo l'ora di vedere tutto ciò che realizzerai.
I miei successi sono anche i tuoi successi, poiché il tuo supporto costante è stato una parte

essenziale del mio cammino. Spero che un giorno sarai fiero di me come io sono orgoglioso di te oggi.

Grazie, Lollo, per essere la mia fonte di ispirazione, il mio sostegno incondizionato e il mio amico.

Desidero dedicare un momento speciale ai miei amati nonni, Maurizio ,Dina, Floriana e il mio angelo custode Carmelo ,che hanno sostenuto e ispirato il mio cammino accademico. Le vostre storie mi hanno aperto gli occhi su un mondo diverso e mi hanno spinto a cercare di comprendere meglio la complessità della vita. I vostri consigli e il vostro incoraggiamento sono stati fondamentali per il mio successo. Mi avete sempre sostenuto nei momenti difficili, e le vostre parole di saggezza hanno illuminato il mio percorso. Il vostro affetto e il vostro sostegno incondizionato sono stati fondamentali nella mia vita, e non posso mai ringraziarvi abbastanza per tutto quello che avete fatto. Questa tesi è un tributo a voi, per il vostro amore, la vostra dedizione e il vostro continuo incoraggiamento. Spero che il mio impegno nello studio e nella ricerca rifletta la vostra eredità di conoscenza e di amore per la famiglia.

Vorrei dedicare uno spazio speciale per esprimere la mia profonda gratitudine ai miei amici, che sono stati una parte fondamentale del mio viaggio accademico. Amici cari, la vostra presenza nella mia vita ha portato gioia, supporto e un senso di comunità che ha reso questi anni di studio davvero memorabili. Le vostre parole incoraggianti, il vostro sostegno incondizionato e le risate condivise hanno reso ogni sfida più gestibile e ogni successo più significativo. Le lunghe notti di studio, le discussioni appassionate e le condivisioni di esperienze hanno reso questo percorso accademico più ricco e soddisfacente. Le vostre diverse prospettive e il vostro supporto costante mi hanno aiutato a crescere come individuo e a maturare come studente. Ogni momento trascorso con voi è stato un regalo, e sono grato per il vostro amore, l'amicizia e la comprensione. Anche se potrei non riuscire a menzionare tutti voi singolarmente, sappiate che ognuno di voi ha avuto un impatto positivo sulla mia vita. Il vostro sostegno è stato fondamentale per il mio successo, e porterò con me le preziose memorie e le amicizie che ho fatto durante questo percorso.

Ora però desidero prendere un momento per esprimere la mia gratitudine a me stessa per il duro lavoro e la dedizione che ho messo in questo progetto di ricerca e in tutto il mio percorso

accademico. Questo viaggio non è stato privo di sfide e momenti difficili, ma grazie alla mia amica ansia ho superato ogni ostacolo che si è presentato. Mi sono spinta a cercare risposte, a porre domande difficili e a mettere alla prova le mie capacità. Ho imparato a gestire il tempo, a lavorare duramente e a perseverare anche quando sembrava impossibile. Ho superato momenti di dubbio e stanchezza, e ho continuato a spingermi oltre i miei limiti. Ogni passo del mio percorso è stato guidato dalla mia passione per il mio campo di studio e dalla mia determinazione a raggiungere gli obiettivi che mi ero prefissata. Questo percorso mi ha insegnato a credere in me stessa, a coltivare la mia passione per il sapere e a vedere il valore intrinseco della conoscenza.

Sono grata a me stessa per aver abbracciato questa sfida, per aver continuato a spingere i miei limiti e per aver coltivato la mia crescita personale e accademica. Mi auguro che questo sia solo l'inizio di un percorso di apprendimento continuo e di crescita personale. Continuerò a credere in me stessa e a sostenere i miei obiettivi con la stessa passione e determinazione che ho dimostrato finora. Questa tesi è un risultato tangibile del mio impegno e della mia dedizione, e mi ricorda che posso raggiungere qualsiasi obiettivo che mi proponga. Mi congratulo con me stessa per il mio successo e mi auguro che questo sia solo l'inizio di una serie di realizzazioni straordinarie. Grazie, Lavinia, per non aver mai smesso di credere in te stessa e per aver dimostrato che con determinazione, tutto è possibile.