

Studente: Enrico Baria

Relatore: Prof. Francesco Saverio Pavone (francesco.pavone@unifi.it)

Titolo della tesi: Sviluppo di una piattaforma microscopica non-lineare multimodale e sua applicazione allo studio dei tessuti arteriosi

Riassunto della tesi:

In questo lavoro di tesi è stato realizzato un microscopio laser a scansione, sul quale sono state implementate le seguenti tecniche di microscopia ottica non-lineare: microscopia a generazione di seconda armonica (SHG), microscopia in fluorescenza con eccitazione a due fotoni (TPEF) e microscopia in fluorescenza risolta nel tempo (FLIM). Tali tecniche microscopiche forniscono informazioni tra loro complementari riguardo alla morfochimica dei campioni analizzati e possono essere applicate con successo per l'*imaging* di campioni biologici, in virtù del fatto che non necessitano di marcatori fluorescenti e che, a causa della non-linearità dell'eccitazione, riducono il rischio di fotodanneggiamento.

Il microscopio multimodale è stato utilizzato per lo studio di campioni *ex-vivo* di tessuto arterioso contenente placche aterosclerotiche, al fine di caratterizzarne le regioni di parete arteriosa sana e di deposizione lipidica. Sono state acquisite immagini SHG e FLIM da due tipologie di sezione di aorta (trasversale e longitudinale). La loro caratterizzazione è stata effettuata per mezzo di tre tecniche di analisi (trasformata di Fourier, matrice di co-occorrenza e vita media di fluorescenza) al fine di studiare il livello di anisotropia, la lunghezza di correlazione e i parametri del decadimento di fluorescenza del collagene e delle deposizioni lipidiche. Le regioni di deposizione risultano mediamente più isotrope rispetto a quelle di parete arteriosa; inoltre la lunghezza di correlazione si è dimostrata un utile strumento per discriminare zone caratterizzate da fibre di collagene e zone caratterizzate da placche di colesterolo. Infine, l'analisi della vita media è in grado di evidenziare la diversa composizione molecolare dei due tipi di regione.

Durante la fase di progettazione del microscopio ho messo a punto lo schema ottico di eccitazione e di rivelazione e ho disegnato le componenti meccaniche destinate al corretto posizionamento delle ottiche e dei vari strumenti. Durante la fase di caratterizzazione del microscopio ho misurato la risoluzione temporale e spaziale, ho calibrato il rivelatore FLIM e il sistema di regolazione dell'intensità di eccitazione. Concluse queste procedure, ho eseguito l'acquisizione e l'analisi delle immagini SHG e FLIM.

I risultati ottenuti da questo lavoro di tesi dimostrano che l'impiego combinato di SHG, TPEF e FLIM costituisce un potente strumento per la caratterizzazione delle placche aterosclerotiche. In generale, se applicate a campioni biologici *ex-vivo*, queste tecniche possono fornire un valido supporto per l'analisi istopatologica tradizionale; inoltre, consentendo un *imaging* non invasivo e *label-free*, hanno le potenzialità per essere utilizzate nella diagnosi *in vivo* di molteplici tipi di tessuto e patologie. Un ulteriore sviluppo futuro consiste nel combinare queste tecniche con la microscopia Raman, in modo da ottenere informazioni aggiuntive sulla composizione molecolare del campione studiato.