

Alla mia famiglia,
per avermi insegnato a pensare
e ad usare la mia testa.

Abstract

Qui scrivo l'abstract.

Indice

Introduzione	9
1 La fluorescenza	11
1 Cenni storici	11
2 Il fenomeno della fluorescenza	13
2.1 Photobleaching e Quenching	16
3 Sonde fluorescenti	19
3.1 Tecniche di marcatura	20
2 Microscopia a fluorescenza	25
1 Il microscopio a fluorescenza	25
1.1 Microscopio Nikon Eclipse-Ti	30
1.2 Software: Nis-Element 3.1	38
2 Imperfezioni e difetti dell'immagine	41
2.1 Cause geometriche	43
2.2 Cause fisiche	49
2.3 Cause tecniche	52
3 Algoritmo di correzione dell'immagine	53
4 Risultati ottenuti	55
Conclusioni	57
A Codice Sorgente	59
Bibliografia	61

Introduzione

*C'è una forza motrice più forte
del vapore, dell'elettricità e dell'energia atomica:
la volontà.*

- Albert Einstein -

Le immagini di microscopia a fluorescenza sono molto più di sole belle immagini, difatti qualsiasi rivista di biologia cellulare mostra che esse sono ormai divenute dati cruciali, sempre più usati come risultati per analisi quantitative. Ciò è possibile perché la microscopia a fluorescenza fornisce una misura, risolta sia spazialmente che temporalmente, della concentrazione di varie molecole presenti in cellule, tessuti e persino in interi animali. L'ampia varietà di etichette molecolari specifiche, tra cui proteine fluorescenti geneticamente codificate, ed una serie di nuove tecniche e modalità di imaging hanno trasformato tale tipo di microscopia da semplice test di localizzazione a vero e proprio strumento atto all'analisi funzionale quantitativa. Inoltre, dato l'ampio utilizzo della microscopia a fluorescenza ed il forte sviluppo di nuove metodologie, è diventato fondamentale per la maggior parte dei biologi essere in grado di valutare criticamente le immagini acquisite, facendone un'analisi quantitativa, la più corretta possibile [1].

Capitolo 1

La fluorescenza

*The beginning of knowledge
is the discovery of something
we do not understand.*
- Frank Herbert -

Questo capitolo si propone di descrivere il fenomeno della fluorescenza e come questo possa essere sfruttato nella marcatura di elementi biologici specifici.

1 Cenni storici

La fotoluminescenza è il processo con cui una sostanza assorbe fotoni provenienti da una determinata sorgente per poi riemetterli ad una lunghezza d'onda maggiore (shift di Stokes). Tale fenomeno prende il nome di *fluorescenza* nel caso in cui la riemissione sia istantanea e di *fosforescenza* se il processo continua anche una volta spenta la sorgente.

Le prime osservazioni di fotoluminescenza risalgono al Seicento, quando l'alchimista dilettante Vincenzo Casciarolo trovò sui colli bolognesi, ai piedi del Monte Paderno, una pietra con la proprietà di trattenere la luce solare e riemetterla dopo un certo intervallo di tempo. Tale processo, non essendo immediato, può essere classificato come processo fosforescente di tipo inorganico. La pietra, inizialmente considerata magica, è nota come "pietra di Bologna"; essa è costituita da barite ($BaSO_4$), un minerale che, una volta calcinato nel carbone, si trasforma in solfuro di bario (BaS), avente proprietà fosforescenti.

Per quanto riguarda la fluorescenza, le prime osservazioni vennero fatte solo agli inizi dell'Ottocento da David Brewster e John F. W. Herschel.

Brewster nel 1833 notò che quando un raggio di luce penetrava in una soluzione alcolica contenente clorofilla appariva di colore rosso, mentre nel 1845 Herschel osservò che una soluzione incolore di solfato di chinina sviluppava un colore blu quando esposta alla luce solare.

Tuttavia per poter parlare effettivamente di fluorescenza bisogna aspettare il 1852, quando lo scienziato inglese Sir G. G. Stokes coniò il termine nel suo famoso lavoro "On the Change of the Refrangibility of Light". Al suo interno Stokes descrisse ed interpretò le osservazioni da lui fatte sul minerale fluorite (CaF_2): se illuminato con luce di eccitazione ultravioletta riemetteva in modo istantaneo radiazione appartenente al rosso.

Ricerche successive permisero poi di capire che molti materiali come minerali, cristalli, vitamine, oli, resine e composti organici posseggono proprietà fluorescenti se irraggiati con luce ultravioletta.

Nel primo decennio del Novecento Heimstädt e Lehmann svilupparono il primo microscopio a fluorescenza con il quale studiarono batteri, tessuti animali e vegetali. Tuttavia, l'applicazione della fluorescenza al campo della biologia animale tardò ad essere sviluppata a causa della fluorescenza assai ridotta presentata da cellule e tessuti animali [2].

Per ovviare a ciò, Max Haitinger nel 1933 introdusse l'uso della fluorescenza secondaria nello studio dei preparati biologici. La sua idea presupponeva l'utilizzo di sostanze, dette fluorocromi o fluorofori, in grado di suscitare fluorescenza anche a concentrazioni bassissime (circa $10^{-6}\%$) e, pertanto, non in grado di danneggiare il preparato. In tal modo fu possibile marcare tessuti, batteri ed altri bersagli biochimici con alta specificità.

Il valore del microscopio a fluorescenza è stato significativamente dimostrato nel 1950 quando Coons e Kaplan riuscirono a localizzare antigeni specifici in tessuti in seguito a reazione con anticorpi marcati con il colorante fluoresceina.

Oggi la microscopia a fluorescenza è uno strumento fondamentale per le scienze biologiche e biofisiche ma ampiamente impiegato anche nello studio dei materiali, grazie ad alcune applicazioni che non sono ottenibili con nessuna delle altre tecniche di microscopia oggi esistenti.

La possibilità di utilizzare nello stesso esperimento una molteplicità di fluorofori permette di individuare le cellule ed i componenti subcellulari con un alto grado di specificità, sino a riuscire a rivelare la presenza di una singola molecola, e di identificare più molecole bersaglio contemporaneamente. Quest'ultima particolarità è molto importante in quegli esperimenti che mirano alla scoperta delle correlazioni esistenti tra i diversi meccanismi biochimici che si verificano all'interno delle cellule.

2 Il fenomeno della fluorescenza

Quando le cellule vengono attraversate da un fascio di luce laser di determinata frequenza ed intensità, fanno sì che quest'ultimo possa venire trasmesso, rifratto o, nel particolar caso in cui le molecole eccitate presentino proprietà emissive, riemesso come fotoluminescenza.

Come visto, la fotoluminescenza è quel fenomeno per cui una molecola colpita da radiazione luminosa ad una certa lunghezza d'onda (frequenza di eccitazione) ne emette un'altra a lunghezza d'onda superiore (frequenza di emissione). Infatti, in seguito a questo assorbimento d'energia gli elettroni degli orbitali più esterni si spostano da un livello energetico ad uno superiore (eccitazione), ove la permanenza è molto breve, dell'ordine dei miliardesimi di secondo; successivamente gli elettroni tornano al livello energetico originario liberando solitamente l'energia assorbita sotto forma di radiazione elettromagnetica (emissione di fotoni). Poiché la resa energetica non è mai del 100%, la radiazione liberata è di lunghezza d'onda superiore, e quindi di energia minore, rispetto a quella di eccitazione. Di conseguenza la radiazione di emissione, rispetto quella di eccitazione, risulta spostata verso la regione del rosso.

Una delle proprietà fondamentali di tali molecole è il cosiddetto "Stoke's shift" (Figura 1.1) e rappresenta la differenza tra la lunghezza d'onda della luce emessa e quella della luce assorbita, ovvero, in modo analogo, tra l'energia del fotone di eccitazione e quella del fotone di emissione. Questa proprietà è caratteristica di ogni molecola ed è limitata di solito a poche decine di nanometri.

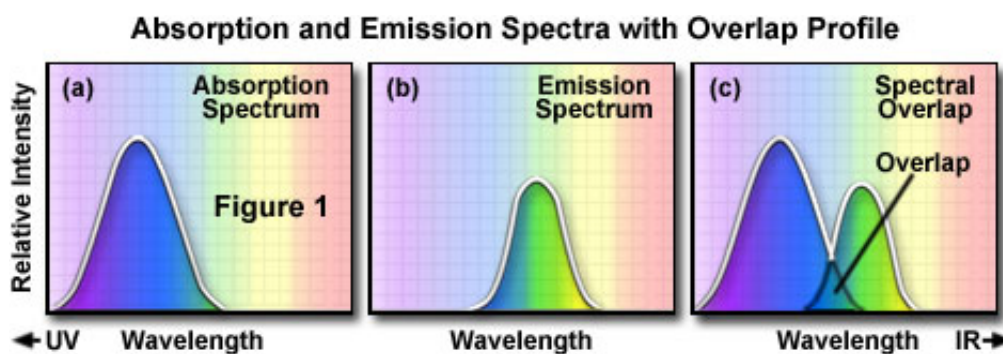


Figura 1.1: Shift di Stokes.

Una volta che la molecola ha assorbito la radiazione incidente, si trova in uno degli stati vibrazionali di un livello energetico eccitato. Essendo soggetta a collisioni con le molecole circostanti, rilascia parte della sua energia sotto

forma non radiativa, scendendo nella scala dei livelli vibrazionali interni allo stato eccitato. A questo punto, a seconda dell'intorno molecolare, la molecola può ritornare al suo stato fondamentale seguendo uno dei due seguenti processi:

1. Processo non radiativo

Se le molecole circostanti sono in grado di assorbire la restante energia elettronica della molecola eccitata, quest'ultima completa il suo rilassamento in modo non radiativo, con conseguente liberazione di calore. Ciò permette alle molecole circostanti di attivare gradi di libertà vibrazionali, rotazionali e traslazionali, e perciò, come effetto complessivo, si ha un aumento dell'energia termica.

2. Processo radiativo

Se le molecole circostanti non sono in grado di assorbire la restante energia allora la molecola subisce un decadimento radiativo, ossia l'energia in eccesso viene liberata sotto forma di fotoni, aventi energia minore rispetto a quella dei fotoni che hanno causato l'eccitazione. Tale processo dà luogo ad un evento di emissione spontanea che può essere, a seconda dei casi, fluorescenza o fosforescenza.

La distinzione tra fluorescenza e fosforescenza fu originariamente fatta in base al tempo di vita della radiazione: nella fluorescenza la luminescenza cessa quasi subito dopo aver eliminato la radiazione eccitante, mentre nella fosforescenza la radiazione continua ad essere emessa, almeno per un breve lasso di tempo, anche dopo aver eliminato la sorgente eccitante. Infatti i materiali fluorescenti cessano di essere luminosi al cessare dello stimolo che ne determina la luminosità, mentre nei materiali fosforescenti la luce continua ad essere emessa per un certo periodo dopo la fine dello stimolo.

Con l'avanzare degli studi in tale ambito, si scoprì una più profonda distinzione tra i due fenomeni, legata alla natura degli stati elettronici coinvolti nelle transizioni responsabili dell'emissione di radiazione.

Quando un elettrone viene promosso da uno stato fondamentale, solitamente di singoletto, (S_0) ad uno eccitato, esso può mantenere lo spin originario oppure invertirlo: se l'eccitazione avviene con ritenzione dello spin si parla di stato di singoletto (S_1), se invece il passaggio allo stato attivato avviene con inversione dello spin si parla di stato di tripletto (T_1) (Figura 1.2).

Allo stato di singoletto compete un'energia più alta e una vita media che va da 10^{-11} s a 10^{-9} s, mentre lo stato di tripletto ha energia inferiore e vita media che va da 10^{-3} s a 10^1 s.

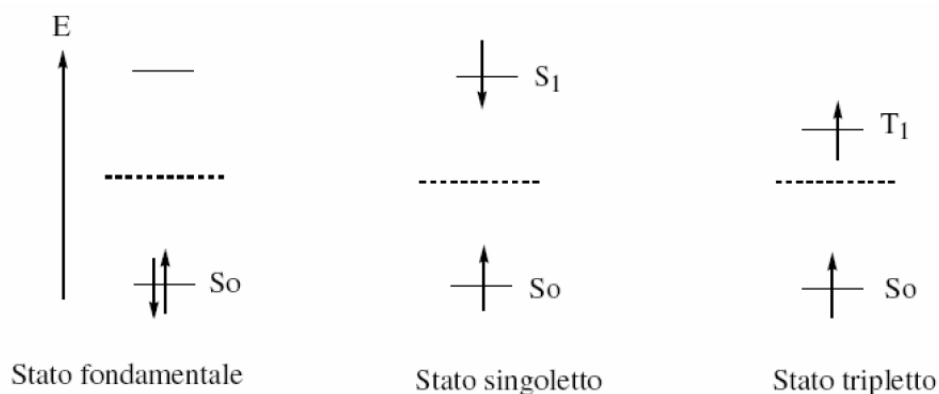


Figura 1.2: Rappresentazione dei differenti stati elettronici. Lo stato fondamentale S_0 (sinistra), in seguito ad eccitazione, può mutare nello stato di singoletto S_1 (centrale) o nello stato di tripletto T_1 (destra).

Per analizzare meglio i vari processi coinvolti nella diseccitazione bisogna fare riferimento al diagramma di Jablonski (Figura 1.3) .

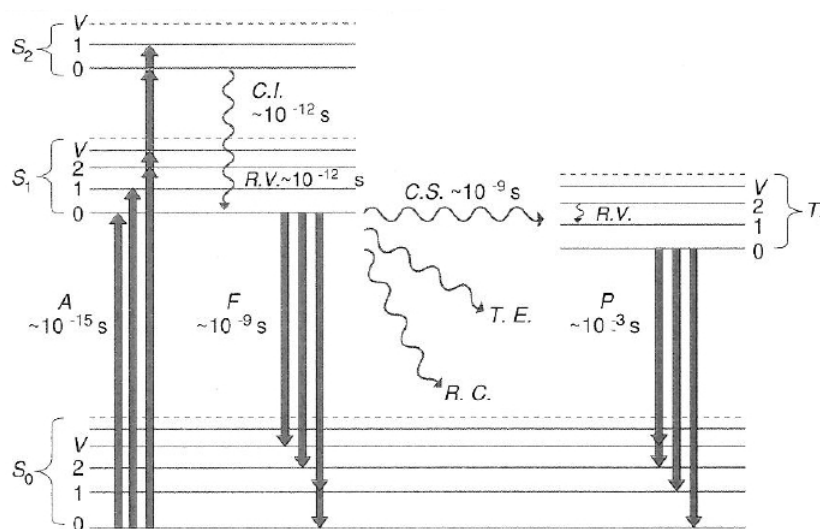


Figura 1.3: Diagramma di Jablonski. Nello schema S_0 indica il livello di energia elettronica fondamentale; S_1 ed S_2 sono rispettivamente il primo ed il secondo livello elettronico eccitato di singoletto; T_1 è il primo livello di tripletto. Sono indicati anche i sottolivelli di energia vibrazionale, in ordine di energia crescente, con V_0, V_1, \dots , mentre non sono rappresentati i sottolivelli rotazionali.

A seguito dell'assorbimento di luce (A), una molecola nello stato fonda-

mentale (S_0) viene eccitata, per la conservazione dello spin, a uno dei suoi stati elettronici di singoletto (S_1, S_2, \dots). L'energia vibrazionale della molecola eccitata viene trasferita a molecole vicine in seguito a collisioni e perciò vi è sempre un rapido ritorno al più basso livello vibrazionale dello stato di singoletto eccitato, senza emissione di radiazioni. Questo fenomeno di rilassamento vibrazionale (R.V.) viene detto *Conversione Interna* (C.I.) e si verifica in tempi dell'ordine di 10^{-12} s. C'è poi la possibilità che avvenga la *Conversione di Sistema* (C.S.) o Intersystem Crossing, ossia che lo spin dell'elettrone, a causa degli urti con le altre molecole e dei moti molecolari, si inverta, comportando perciò il passaggio dallo stato di singoletto (S_1) allo stato di tripletto (T_1).

La radiazione fluorescente (F) è generata da transizioni tra stati con la stessa molteplicità di spin (es. $S_1 \rightarrow S_0$). Nella fosforescenza (P), al contrario, la transizione coinvolta comporta sempre la variazione della molteplicità di spin (es. $T_1 \rightarrow S_0$).

I parametri tipici della fluorescenza sono:

- **Tempo di vita**

Esso è definito come tempo medio di permanenza della molecola nello stato eccitato e per la fluorescenza è solitamente dell'ordine dei nanosecondi.

- **Trasmittanza**

Essa è definita, tramite la legge di Lambert-Beer, come rapporto tra l'intensità della luce trasmessa attraverso un mezzo di spessore s e l'intensità incidente:

$$T = \frac{I}{I_0} = e^{k_\lambda s}$$

dove k_λ è detto *coefficiente di estinzione* ed è un parametro dipendente dal mezzo e dalla lunghezza d'onda della luce incidente.

- **Efficienza quantica o resa**

Essa è definita come il rapporto tra il numero di fotoni emessi rispetto a quelli assorbiti. Questo coefficiente può assumere un valore compreso tra 0 (molecola non radiativa) e 1 (fluoroforo).

2.1 Photobleaching e Quenching

Esistono casi in cui la fluorescenza di una molecola può essere ridotta di intensità o addirittura annullata. Il termine che si usa per descrivere tale fenomeno è *fading*, a sua volta distinguibile in quenching e photobleaching. Entrambi i processi riducono il valore della resa quantica e il tempo di vita

della fluorescenza.

Il meccanismo del **photobleaching** è dovuto a reazioni fotochimiche, provocate dalla luce di eccitazione, che variano in modo irreversibile la composizione del fluorocromo, rendendolo non più fluorescente. Tuttavia tale fenomeno è oggi ancora poco conosciuto, infatti esso coinvolge molti fattori e può differire da un campione all'altro o anche da parti distinte di uno stesso.

L'assorbimento di luce comporta l'aumento del numero di molecole nello stato eccitato; essendo questo molto più reattivo di quello fondamentale, si ha che una piccola ma significativa frazione di molecole si trova coinvolta in nuove reazioni fotochimiche, a discapito dell'emissione di fluorescenza. Tali reazioni avvengono per lo più con ossigeno molecolare e causano la produzione di nuove molecole, che possono essere non-fluorescenti o addirittura incapaci di assorbire la luce incidente.

Ovviamente la quantità di photobleaching dipende dall'intensità della luce di eccitazione e risulta variabile durante il periodo di illuminazione: nei primi millisecondi di irraggiamento non è presente, successivamente aumenta in modo molto veloce per pochi secondi ed infine continua a procedere più lentamente, andando ad attenuarsi.

Per ristabilire le proprietà fluorescenti del fluoroforo si può privare il campione della luce, mentre mantenuto a basse temperature. Inoltre, per evitare direttamente il fenomeno di photobleaching si può sfruttare un impulso di eccitazione molto breve o un fluorocromo particolarmente fotostabile.

Il fenomeno del photobleaching può essere anche indotto volontariamente per studiare il recupero di fluorescenza in un certo campione. Tale tecnica prende il nome di *Fluorescence Recovery After Photobleaching* (FRAP) (Figura 1.4).

Come appena analizzato, solitamente sottoporre il campione alla luce di eccitazione per periodi prolungati porta allo svanire della fluorescenza; tuttavia in particolari casi si può avere un effetto totalmente opposto e si parla a tal proposito di *photoactivation*. Nel caso in cui le cellule coinvolte siano cellule vitali, questo fenomeno può produrre effetti tossici molto dannosi.

Il meccanismo di **quenching** è dovuto alla presenza di molecole nel sistema, che comportano un processo di disattivazione in grado di ridurre la fluorescenza. Vengono solitamente distinti quattro tipi diversi di quenching [3]:

- **Quenching da temperatura**

La fluorescenza decresce all'aumentare della temperatura dall'1% al 5%, a seconda del campione in esame. La causa è probabilmente da

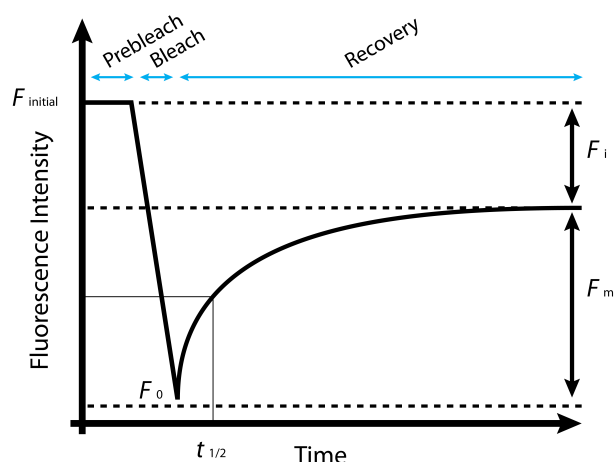


Figura 1.4: Curva del FRAP. $F_{initial}$ ed F_0 sono rispettivamente l'intensità di fluorescenza antecedente ed immediatamente successiva al photobleaching; F_m ed F_i sono rispettivamente la frazione mobile ed immobile, ossia la frazione che contribuisce o no al recupero; $t_{1/2}$ è il tempo di recupero di metà frazione mobile.

associare all'aumento di energia cinetica, quindi all'incremento delle collisioni molecolari, che provoca una maggior probabilità di transizione non radiativa verso lo stato fondamentale.

- **Quenching da impurità o dinamico**

La fluorescenza può diminuire o aumentare a causa della presenza di altre molecole nel mezzo. Una molecola eccitata può trasferire il suo eccesso di energia ad una molecola adiacente che passa quindi nel suo stato eccitato, da cui potrà decadere secondo ognuno dei meccanismi descritti precedentemente.

Se l'accettore è non-fluorescente si avrà come risultato un fenomeno di quenching. Dato che il trasferimento di energia dal marcatore all'impurità può essere molto efficiente e può aver luogo fino a distanze di un micrometro, una concentrazione molto piccola di impurità può produrre un alto valore di quenching. Uno dei quenchers più noti è l'ossigeno molecolare che causa una grande riduzione nella fluorescenza, sino alla sua completa abolizione. Ciò può essere evitato introducendo nel mezzo di coltura un agente riduttivo.

D'altra parte può anche accadere che l'accettore sia fluorescente ed in tal caso la luminescenza risulta incrementata dalla presenza dell'impurità.

Questo tipo di quenching può essere sfruttato in modo positivo, per esempio nella cosiddetta Förster Resonance Energy Transfer (FRET o

FET). Essa consiste nel trasferimento dell'eccitazione di una molecola donatrice ad una accettrice attraverso un processo non radiativo di interazione dipolo-dipolo. La FRET ha varie caratteristiche: varia come $1/R^6$ e di conseguenza dipende strettamente dalla distanza donatore-accettore (R) che deve essere al più dell'ordine di 10 nm; necessita la sovrapposizione dello spettro di emissione del donatore con quello di eccitazione dell'accettore; dipende dall'orientazione relativa dei momenti di dipolo di transizione delle due molecole.

- **Quenching statico**

Esso si verifica quando le molecole del donatore e dell'accettore si trovano nello stato fondamentale, invece che in quello eccitato, e si legano insieme a formare un'unica molecola, anch'essa nello stato fondamentale ma non più fluorescente, avente un unico spettro di assorbimento. La causa è spesso legata ad effetti di idrofobia, ossia le due molecole si uniscono insieme per minimizzare il contatto con l'acqua.

- **Quenching da concentrazione**

Normalmente con l'aumentare della concentrazione del fluorocromo aumenta la quantità di fluorescenza. Tuttavia a concentrazioni molto elevate interviene il cosiddetto quenching da concentrazione, che comporta una riduzione della fluorescenza.

3 Sonde fluorescenti

Sia nel mondo vegetale che nel mondo animale, diverse sostanze naturali manifestano una fluorescenza intrinseca, detta anche *autofluorescenza*.

Ne sono esempi le clorofille, molti pigmenti naturali (in particolare quelli di natura lipidica), alcuni amminoacidi (es. triptofano e tirosina), molti enzimi, coenzimi (es. NAD e NADH), cofattori (es. FAD e FADH) e molecole aromatiche. Tuttavia la maggior parte delle molecole biologiche di interesse biofisico non sono autofluorescenti all'interno degli intervalli spettrali sfruttati e anche quelle che lo sono, in genere, non possono essere distinte tra loro sulla base della loro fluorescenza intrinseca.

Per ovviare a ciò, Max Haitinger nel 1933 introdusse l'uso della fluorescenza secondaria nello studio dei preparati biologici, ossia aggirò tale problema utilizzando dei marcatori esterni, detti anche sonde o *probes* fluorescenti. Da allora la procedura comunemente usata in microscopia è quella di marcare gli elementi che si vogliono studiare con fluorofori, che si legano a target specifici delle molecole di interesse, le quali, dopo opportuna eccitazione, potranno essere selettivamente rivelate grazie al segnale luminoso emesso dal probe.

Ovviamente introdurre un agente esterno all'interno di un componente biologico non è così banale, infatti bisogna fare in modo che rispetti tutte le esigenze della cellula: il marcatore deve raggiungere il target e non allontanarsi da esso durante l'intera rilevazione; una volta in situ il probe idealmente si deve comportare come un agente passivo che non induce perturbazioni significative nelle strutture o nelle funzioni biologiche che si vogliono studiare; infine si deve cercare di evitare che tramite il processo di misura si creino effetti negativi come fading e fototossicità.

I primi fluorofori usati erano semplici coloranti, perciò non specifici, e per questo si legavano a costrutti presenti praticamente ovunque nella cellula, producendo un segnale molto diffuso. Poi, con l'avanzare delle conoscenze biochimiche si trovarono sonde organiche, inorganiche o chimiche in grado di marcare costrutti molto specifici all'interno della cellula (es. nucleo, membrana, mitocondri, ...) e si introdussero protocolli sperimentali adeguati. La tecnologia attuale permette persino di sfruttare fluorocromi in grado di marcare solo particolari ioni, come ad esempio Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{2+} , Cl^{-} ed O_2 .

Le proprietà che caratterizzano maggiormente i marcatori fluorescenti sono:

- Spettri di eccitazione ed emissione, importanti per la scelta del fluoroforo più adatto al proprio apparato sperimentale. Il primo si sceglie in modo da essere il più possibile centrato sulla lunghezza d'onda emessa dalla sorgente di luce, mentre il secondo deve poter essere rilevabile dagli strumenti a disposizione.
- Efficienza quantica, per avere il miglior segnale in fluorescenza rilevabile con i rivelatori utilizzati.
- Affinità con i diversi costrutti molecolari e tessuti subcellulari.
- Modalità con cui possono penetrare all'interno della cellula.

Perciò, per la scelta del protocollo sperimentale atto alla marcatura, è fondamentale analizzare le specifiche dei vari coloranti, disponibili su database online. Nella Tabella 2.1 ne vengono riportati alcuni di uso comune:

3.1 Tecniche di marcatura

Dall'analisi delle proprietà dei vari fluorocromi sono nate cinque principali tecniche specifiche di marcatura [4]:

1. tecnica di marcatura con coloranti fluorescenti

Colorante	Eccitazione (nm)	Emissione (nm)
Fluorofori comunemente impiegati		
Fluoresceina-5-isotiocianato (FITC)	496	518
Isotiocianato di tetrametilrodamina (TRITC)	550	570
Tetrametilrodamina	554	576
Lissamina rodamina	572	590
Rosso Texas	592	610
Coloranti per il nucleo		
4',6'-Diamidino-2-fenilindolo cloridrato (DAPI)	359	461
Indicatori di calcio		
Indo-1	380	400/475
Fluo-2	340/380	510
Fluo-3	506	526
Molecole reporter		
Proteina fluorescente verde (GFP)	395/475	509
DsRed	558	583
Coloranti per i mitocondri		
Rodamina 123	507	529

Tabella 1.1: Caratteristiche dei fluorofori di uso comune.

2. tecnica di immunofluorescenza
3. tecnica dell'ibridazione fluorescente in situ (FISH)
4. tecnica di marcatura con proteine fluorescenti
5. Quantum Dots (QD)

Nella **tecnica di marcatura con coloranti fluorescenti** le sonde sono assorbite direttamente dalla cellula, sfruttando solitamente i gradienti di concentrazione o il potenziale di membrana, ed in questo modo esse si concentrano in zone intracellulari specifiche. Con tale metodo è possibile anche eseguire misure quantitative delle cellule vive che hanno assorbito il colorante fluorescente, dato che appaiono intensamente colorate su sfondo scuro.

La **tecnica di immunofluorescenza** si basa su anticorpi legati chimicamente a fluorofori, così da sfruttare successivamente il legame altamente specifico anticorpo-proteine. Dato che gli anticorpi sono molecole che si legano selettivamente a specifiche parti della cellula, in tal caso non sarà più il fluorocromo a decidere il legame, ma direttamente la molecola biologicamente attiva. Questo metodo presenta come vantaggio il poter ottenere informazioni molto precise sia dal punto di vista spaziale che della specificità del

legame, a discapito di dell'intensità, che risulta in tal caso debole a causa della piccola quantità di colorante legato.

Tuttavia il segnale può essere amplificato utilizzando la tecnica di *immuno-fluorescenza indiretta*: un anticorpo specifico non marcato, detto anticorpo primario, diviene target di numerosi anticorpi secondari marcati da uno specifico fluoroforo. Solitamente per tale scopo si sfruttano come coloranti la fluoresceina, che emette nel verde se eccitata con luce blu, e la rodamina, che emette nel rosso se eccitata con luce giallo/verde.

La **tecnica dell'ibridazione fluorescente in situ** (FISH, Fluorescence In Situ Hybridization) sfrutta probes che si legano in modo estremamente selettivo ad alcune regioni del cromosoma. Tale metodo permette di rilevare e localizzare la presenza/assenza di specifiche sequenze di DNA.

La **tecnica di marcatura con proteine fluorescenti** sfrutta tecniche di ingegneria molecolare, in grado di modificare geneticamente una cellula eucariota rendendola capace di produrre una proteina fluorescente, ma senza alterarne la sua normale funzionalità. In questo modo la proteina marcata può essere sfruttata come tracciante (oltre che marcatore), ossia può essere seguita nel corso della sua sintesi, dalla compartimentalizzazione intracellulare sino alle interazioni con le diverse strutture cellulari.

Il fatto che le proteine fluorescenti possano essere fuse alla proteina d'interesse così da rendere il targeting molto preciso è un grande pregio rispetto ai coloranti organici. I vantaggi di questo metodo biomolecolare sono soprattutto il non avere bisogno di tecniche invasive per visualizzare in cellule vive una proteina oggetto di studio, a differenza di quel che accade per esempio nella tecnica di immunofluorescenza dove le cellule devono essere precedentemente fissate; l'assenza di problemi di loading del fluoroforo, di rumore di fondo, di interazioni tra colorante ed ambiente circostante e tra le stesse molecole di fluoroforo ed infine l'alta precisione del targeting in quanto la proteina è prodotta dalla cellula stessa. Le difficoltà risiedono invece per lo più nell'ottimizzazione delle tecniche di trasfezione, attraverso cui la cellula viene geneticamente modificata, così da produrre la proteina di interesse.

Tra le più famose proteine fluorescenti vi sono la Green Fluorescent Protein (GFP), isolata dalla medusa *aequorea victoria*, e la Red Fluorescent Protein (RFP), isolata dal corallo *discosoma* (Figura 1.5). La fluorescenza intrinseca di queste proteine è dovuta alla presenza di triptofano.

I **Quantum Dots (QD)** sono una classe di fluorocromi sviluppata negli ultimi anni sulla base di nuove competenze in ambito nanotecnologico. Essi sono costituiti da un nucleo semiconduttore di cadmio-selenio (*CdSe*)

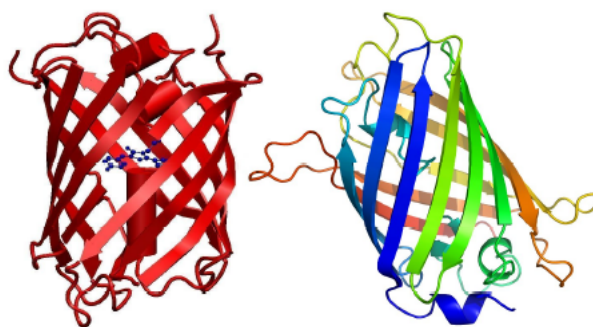


Figura 1.5: Struttura tridimensionale della RFP (sinistra) e della GFP (destra).

ricoperto da uno strato di solfato di zinco (ZnS), necessario per migliorare l'efficienza quantica e la fotostabilità. Questi nanocristalli hanno dimensioni comparabili con le proteine (es. GFP) e, se eccitati ad opportune lunghezze d'onda, emettono fluorescenza, in colori differenti a seconda della dimensione della loro struttura (Figura 1.6). Infatti è il diametro del nucleo semiconduttore che determina lo spettro di emissione del QD: all'aumentare della dimensione si ha un aumento della lunghezza d'onda. Ciò è dovuto al fatto che QD più grandi presentano livelli di energia più vicini tra loro, così da poter assorbire anche i fotoni meno energetici ed emettere a grandi lunghezze d'onda.

Un pregio di questa classe di fluorofori è legato agli spettri di eccitazione e di emissione: il primo risulta pressoché continuo e molto ampio, mentre il secondo è particolarmente piccato e simmetrico. In tal modo è possibile l'eccitazione di diverse specie di QD utilizzando un'unica fonte luminosa per la fluorescenza multipla, senza sovrapposizioni di segnale.

I QD emettono una fluorescenza circa 20 volte maggiore rispetto ai coloranti organici, la loro luminescenza ha lunga vita media (30-100 ns) e presentano, grazie alla loro natura inorganica, l'ulteriore vantaggio di non subire photobleaching ossidativo, presente invece per i coloranti organici e le proteine fluorescenti. Tali proprietà diminuiscono le interferenze con l'autofluorescenza di background, rendendo i Quantum Dots molto utili nella monitoraggio in continuo dei fenomeni biologici.

Dato che le proprietà luminescenti dei QD "nudi" sono molto sensibili a vari tipi di interazione, si usa ricoprirli con materiali inorganici, solitamente solfato di zinco, che avendo un maggiore gap tra i livelli energetici migliorano le capacità luminescenti anche più del 50% ((CdSe)ZnS core-shell QDs). Sotto questa forma però i QD non risultano biocompatibili e perciò è necessario sintetizzarli in presenza di composti idrofobici e inorganici, come l'ossido di

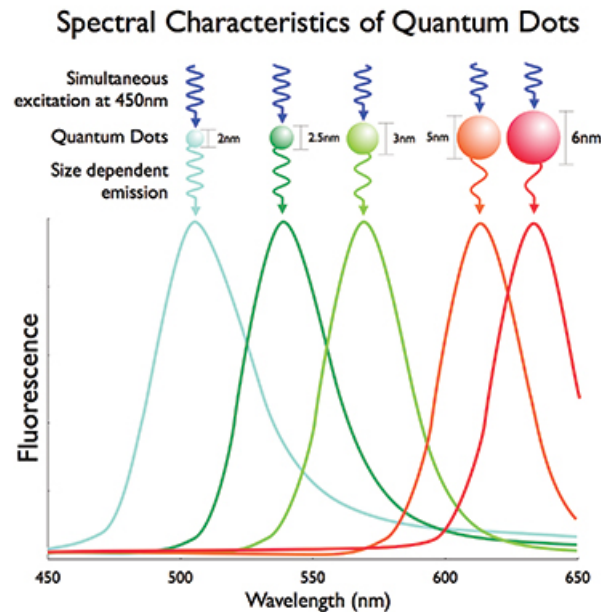


Figura 1.6: Dimensione dei QD in relazione alla lunghezza d'onda di emissione. I QD assorbono luce ad energia maggiore (lunghezza d'onda minore) e la convertono in luce ad energia minore (lunghezza d'onda maggiore). Monitorando la produzione dei Quantum Dots è possibile far sì che essi emettano luce ad ogni lunghezza d'onda dello spettro del visibile.

trioctilfosfina (TOPO). In questo modo la loro superficie viene avvolta con una lunga catena alchilica, così da renderli solubili in solventi non polari, come il toluene. Una difficoltà riscontrabile con i QD è la loro traslocazione all'interno della cellula. Tuttavia questo problema è stato risolto mediante l'utilizzo di proteine di trasporto, il cui compito naturale è quello di trasportare altre proteine dall'esterno all'interno della cellula grazie alle loro forti cariche positive.

I QD sembrano dunque essere la futura tecnologia per lo studio di alcuni processi dinamici intracellulari, come per esempio il tracciamento delle proteine recettore e la loro distribuzione nello spazio e nel tempo.

Capitolo 2

Microscopia a fluorescenza

*Man is the interpreter of nature,
science the right interpretation.*
- William Whewell -

Questo capitolo si propone di descrivere un tipico microscopio a fluorescenza, ponendo in particolare l'attenzione sul microscopio Nikon Eclipse-Ti, e inoltre di esaminare le imperfezioni ed i difetti presenti nelle immagini acquisite con esso.

1 Il microscopio a fluorescenza

Il microscopio a fluorescenza permette di studiare campioni organici o inorganici sfruttando i fenomeni di luminescenza descritti nel precedente capitolo, piuttosto che quelli di riflessione ed assorbimento della luce, basilari invece per i microscopi ottici tradizionali. In genere, tale strumento è in grado di funzionare anche come microscopio ottico convenzionale, permettendo così il confronto tra le immagini acquisite nei due differenti modi.

Questo tipo di microscopia è caratterizzata dalla marcatura specifica del target in esame con una sonda fluorescente (paragrafo 1.3.1) e da una struttura base dello strumento, costituita da: sorgente di luce, filtri, obiettivo e sistema di rivelazione.

L'analisi che segue fa riferimento ad un microscopio a fluorescenza rovesciato (Figura 2.1), ove l'ottica è posizionata al di sotto del tavolino porta oggetti. Tale scelta è stata fatta per poter comprendere più facilmente il funzionamento del microscopio Nikon Eclipse-Ti che verrà analizzato successivamente.

La sorgente di luce deve essere scelta in modo da massimizzare la quantità di fluoroforo eccitato, quindi l'intensità di emissione. Per questo motivo

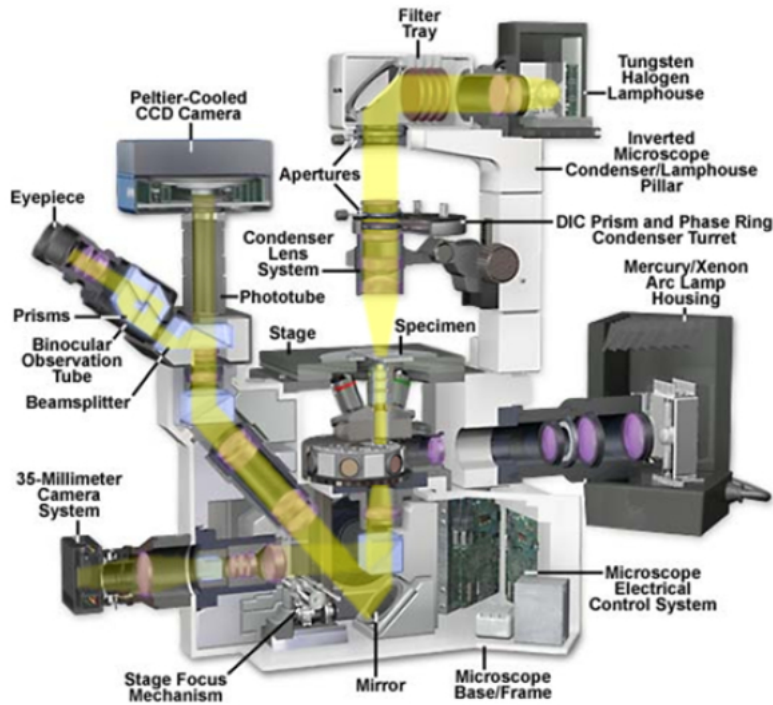


Figura 2.1: Schema ottico di un microscopio a fluorescenza rovesciato.

le lampade ad incandescenza non sono adatte, in quanto emettono prevalentemente luce di incandescenza nel rosso e nell'IR, con grande dispersione di calore. La scelta ricade in genere sulle **lampade a globo di quarzo** contenenti vapori di mercurio ad alta pressione, che soddisfano tutte le condizioni richieste.

Esse vengono denominate con le sigle HBO 50 o HBO 100 a seconda della potenza dissipata e, a differenza delle lampade ad incandescenza, sfruttano il fenomeno delle scariche dei gas, caratteristica che gli conferisce uno spettro discreto. Questa lampada è costituita da un globo di quarzo, resistente alle alte pressioni, in cui sono fusi due elettrodi. Nella camera di combustione interna, contenente mercurio, viene generato e mantenuto attivo un arco voltaico tramite scariche ad alta tensione applicate agli elettrodi; il calore prodotto fa evaporare il mercurio, così da creare una situazione di sovrappressione.

La lampada in esame emette luce molto intensa nello spettro UV, mentre nella parte del visibile l'intensità è più bassa, ma comunque sfruttabile per altre applicazioni. I picchi di intensità risultano proprio in corrispondenza dei cosiddetti "picchi del mercurio" (Figura 2.2).

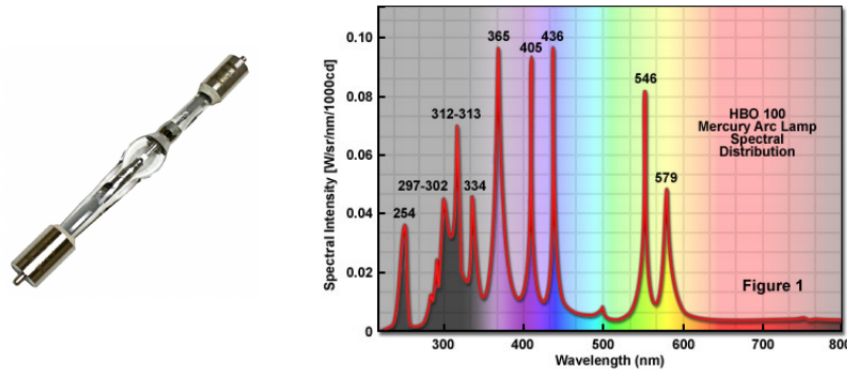


Figura 2.2: Arc-discharge fluorescence mercury lamp HBO 100 (sinistra) con associato spettro di emissione (destra).

Come visto nel paragrafo 1.3, il fascio di luce che raggiunge il campione deve avere una lunghezza d'onda prossima al picco di eccitazione del fluoroforo e inoltre il microscopio deve essere in grado di rivelare solamente la lunghezza d'onda di emissione di tale molecola, generando quindi un alto contrasto tra il background e le strutture fluorescenti. Per soddisfare al meglio queste due richieste si sfruttano due filtri:

- **Filtro di eccitazione** Serve per filtrare la luce proveniente dalla sorgente prima che raggiunga il campione, lasciando passare così solo la lunghezza d'onda di eccitazione.
- **Filtro barriera o di sbarramento** Serve per filtrare la luce proveniente dal campione, bloccando così la radiazione di illuminazione non assorbita dal fluoroforo e lasciando quindi passare solo quella di emissione.

Per poter capire il loro utilizzo, servendoci della Figura 2.1, ripercorriamo il cammino ottico della luce di eccitazione: la luce emessa dalla lampada al mercurio passa attraverso l'illuminatore lungo un asse perpendicolare all'asse ottico primario del microscopio, attraversando una lente colletttrice e un diaframma di apertura e centratura variabile. La luce viene poi filtrata dal filtro di eccitazione e incontra successivamente uno **specchio dicroico** (chromatic beamsplitter). Quest'ultimo è un filtro interferenziale specializzato nel riflettere le piccole lunghezze d'onda e trasmettere quelle più alte; esso è posto su un piano inclinato a 45° rispetto alla direzione della luce incidente e riflette la luce a 90° rispetto alla stessa direzione, proiettandola attraverso l'obiettivo, sino a colpire il campione. Il segnale di fluorescenza emesso dal campione

viene quindi raccolto dal medesimo obiettivo e passa attraverso lo specchio dicroico, in virtù del fatto che la sua lunghezza d'onda risulta maggiore di quella di eccitazione, per lo shift di Stokes. Questo segnale di emissione passa attraverso il filtro di sbarramento e infine raggiunge i dispositivi per la formazione dell'immagine.

Spesso i filtri e lo specchio dicroico vengono montati in un unico blocco ottico detto filter cube (Figura 2.3).

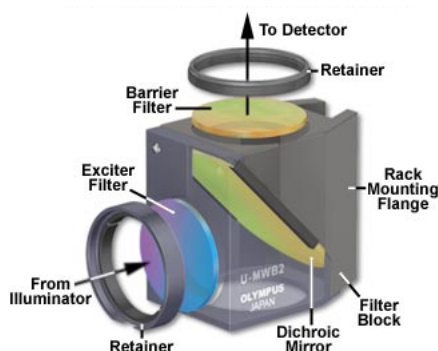


Figura 2.3: Schema ottico di un filter cube per microscopi a fluorescenza rovesciati.

Notiamo quindi che è proprio in base a tali elementi che si stabilisce quali molecole fluorescenti usare, infatti è possibile sfruttare unicamente quei fluorofori con lunghezze di eccitazione e di emissione corrispondenti a quelle trasmesse dai filtri. Inoltre, combinando vari filtri è possibile l'osservazione di un gran numero di fluorocromi con differenti proprietà di eccitazione ed emissive.

Altro elemento fondamentale è certamente l'**obiettivo** e, come accennato, le sue lenti svolgono una duplice funzione: focalizzazione della luce di eccitazione sul campione (ancor più rispetto al sistema di lenti del condensatore presente in un microscopio convenzionale) e raccolta della luce di fluorescenza emessa.

Gli obiettivi possono essere di diverso tipo e sono caratterizzati dalle informazioni riportate su di essi, come per esempio: fabbricante, ingrandimento (4x, 10x, 20x, 40x, 60x o 100x), requisiti per l'immersione ad aria, olio o acqua (in genere obiettivi con ingrandimento minore di 40x sono ad aria e quelli con ingrandimento pari o superiore a 40x sono ad immersione) e spessore del vetrino coprioggetti (solitamente 0.17 mm). Possono essere riportate anche informazioni relative alle correzioni per artefatti ottici, come aberrazioni cromatiche e appiattimento di campo. Ne sono degli esempi le

scritte "fluo" per lenti meno corrette o "plan" e "plan apo" per lenti con correzioni più fini.

Altro parametro sempre presente sull'obiettivo è l'apertura numerica (NA , Numerical Aperture). Essa è una misura della capacità di una lente di raccogliere la luce del campione ed è definita dalla relazione:

$$NA = n \cdot \sin\theta$$

dove n è l'indice di rifrazione del mezzo presente tra lente e campione e θ è l'apertura angolare della lente, ossia il semiangolo del cono di luce che entra nell'ottica. Il range di variabilità della NA è solitamente tra 0.25, per obiettivi a basso ingrandimento e a secco (es. 10x), e 1.45, per obiettivi ad immersione (es. da 40x a 100x). In microscopia a fluorescenza è necessario utilizzare obiettivi con alta apertura numerica, così da massimizzare la quantità di luce raccolta dal campione [5]. Infatti, la luminosità L dell'immagine, definita come flusso di fotoni per unità di superficie e di tempo (W/m^2), è legata all'apertura numerica tramite la relazione:

$$L \propto \frac{NA^4}{I^2}$$

dove I è l'ingrandimento. Risulta quindi evidente che le immagini a fluorescenza più brillanti saranno raccolte da obiettivi con grande NA e piccolo I ; dei buoni valori sono per esempio $NA = 0.75$ e $I = 20x$. D'altra parte il guadagno ottenuto aumentando l'apertura numerica, molto utile dato che le emissioni in fluorescenza risultano decisamente poco intense, comporta alcuni effetti indesiderati, come l'aumento dell'autofluorescenza e delle riflessioni da parte delle superfici delle lenti interne che riducono l'intensità finale. Tale problema può essere in parte marginato usando un liquido d'immersione, specialmente olio, così da eliminare la perdita di luce causata dai riflessi sulle superfici e rendere l'immagine più chiara. Inoltre, una maggior apertura numerica migliora anche la risoluzione d dell'immagine, poiché data dall'equazione:

$$d = 0.61 \cdot \frac{\lambda}{NA}$$

dove λ è la lunghezza d'onda della luce di eccitazione.

Come visto precedentemente, nei microscopi a fluorescenza l'illuminazione è pensata in modo tale che sia la luce di eccitazione che quella di emissione passino per lo stesso obiettivo: ciò comporta numerosi vantaggi. Innanzitutto il fatto che l'obiettivo funzioni sia da condensatore che da dispositivo di formazione dell'immagine fa sì che l'allineamento condensatore-obiettivo sia sempre perfetto, che l'area illuminata dalla luce di eccitazione sia ristretta a

quella che si osserva attraverso l'obiettivo e che sia disponibile tutta l'apertura numerica dell'obiettivo stesso; infine questa configurazione permette di combinare la tecnica della fluorescenza con alcune tecniche in luce trasmessa.

1.1 Microscopio Nikon Eclipse-Ti

Il microscopio a fluorescenza rovesciato Nikon Eclipse-Ti è stato acquistato alcuni anni fa dal Dipartimento di Fisica di Bologna per lo studio biofisico di alcuni effetti prodotti da radiazioni ionizzanti su cellule di fibroblasti umani, nell'ambito della ricerca sperimentale sull'invecchiamento fisiologico ed indotto dall'esposizione a radiazioni ionizzanti a differenti dosi.

Tale microscopio, di tipo rovesciato, può essere utilizzato sia per la microscopia in fluorescenza, sia per quella in campo chiaro a luce trasmessa. Per poter rivelare la luce emessa dal campione è possibile sfruttare sia l'oculare che un sistema di rivelazione digitale, come per esempio una telecamera. Nel caso in cui si utilizzi quest'ultimo sistema di rivelazione, le immagini verranno visualizzate sul monitor di un computer e registrate in formato digitale grazie ad appositi softwares, tramite cui è anche possibile elaborare ed analizzare le acquisizioni. La scelta di registrare le immagini rende inoltre possibile confrontare situazioni a tempi diversi e quindi creare una misura in dinamica, cosiddetta "time-lapse". La caratteristica principale di tale strumento è la possibilità di fare acquisizioni in vivo in time-lapse, anche per decine di ore, grazie ad un innovativo sistema di incubazione, in grado di mantenere in vita le cellule, integrato con il tavolino portaoggetti motorizzato ed un sistema di "perfect focus".

Qui di seguito viene riportata una descrizione dei vari elementi che compongono il microscopio Nikon Eclipse-Ti (Figura 2.4):

- **Lampada diascopica**

E' una lampada alogena (TI-DH Dia Pillar Illuminator 12V/100W) per osservazioni in campo chiaro e contrasto di fase.

- **Lampada episcopica**

Si tratta di una lampada per la fluorescenza al mercurio HBO (arc-discharge fluorescence mercury lamp HBO) analoga a quelle descritte in precedenza.

- **Obiettivi**

Gli obiettivi disponibili sono 10x, 20x Fluo, 40x Super Fluo, 60x Oil Fluo e rispettano, seppur con qualche compromesso, le esigenze sia dell'imaging cellulare in dinamica che dell'imaging in fluorescenza. Scegliere il giusto obiettivo è molto importante ai fini di un maggior segnale



Figura 2.4: Microscopio Nikon Eclipse-Ti.

dal campione ed un miglior trasferimento di esso al sistema di rivelazione.

- **Smart Shutter ultraveloce LAMBDA SC**

Esso permette di decidere quando lasciare che la luce illumini il campione e quando no, senza dover spegnere manualmente la lampada sorgente. Tramite software si può inoltre programmare ogni quanto aprire e chiudere lo shutter.

- **Filter Cube**

Questo microscopio è dotato di un meccanismo scorrevole che può contenere fino a sei cubi, così da disporre velocemente di sei combinazioni di filtri diversi [6]. Attualmente dispone di 3 cubi, che permettono combinazioni di filtri per l'osservazione di fluorofori che emettono nel blu, nel rosso e nel verde, con eccitazioni tipiche dei coloranti più diffusi, che sono rispettivamente: DAPI, TRITC e FITC. I filtri sono denominati in associazione a tali fluorocromi, tuttavia sono configurazioni eccitazione/emissione molto versatili, in quanto esiste un grande numero di fluorofori con proprietà di eccitazione e di emissione compatibili con esse. In Tabella 2.1 sono riportate le bande di eccitazione e di emissione dei cubi a disposizione:

	λ eccitazione (nm)	λ emissione (nm)	λ dicroico (nm)
DAPI	330 - 380	≥ 420	400
TRITC	515 - 565	550 - 660	565
FITC	465 - 495	515 - 555	505

Tabella 2.1: Bande dei tre filter cubes del Nikon Eclipse-Ti.

• Telecamera

Il rivelatore CCD di cui è dotato il microscopio è una telecamera Qimaging, modello RETIGA-2000-RV (Figura 2.5), in grado di rilevare segnali di bassa intensità, con un alto range dinamico e applicazioni rapide, caratteristiche che la rendono particolarmente adatta per l'imaging dinamico in vivo e in fluorescenza.



Figura 2.5: Telecamera Qimaging, modello RETIGA-2000-RV.

La telecamera presenta un sistema di raffreddamento che permette di regolare la temperatura fino a 30°C sotto zero, così da ridurre drasticamente il rumore termico, che costituisce un grande problema per quanto riguarda il rapporto segnale-rumore nell'imaging dinamico. Essa è sincronizzata con le lampade di illuminazione del microscopio, con il tavolino motorizzato, con il filter cube e lo shutter. Il rivelatore CCD ha una risoluzione di 1.92 megapixel e produce un output a 12 bit in livelli di grigio. E' dotata di un filtro IR, posto di fronte al rivelatore, necessario per abbattere la componente IR che potrebbe provenire dal sistema di rilevamento del fuoco (Perfect Focus System). Infine, il tempo di esposizione può variare entro il range $10\ \mu\text{s} - 17.9\ \text{min}$, regolabile attraverso software.

• Sistema di incubazione

Il microscopio Nikon Eclipse-Ti è dotato di un supporto per il tavolino portaoggetti, adatto all'inserimento di un piccolo incubatore fabbricato dalla ditta Oko-Lab (Figura 2.6 e Figura 2.7). Al suo interno si crea un ambiente adatto alla sopravvivenza delle cellule, con una temperatura

controllata, una miscela di aria e anidride carbonica ed un certo tasso di umidità.

Per creare e mantenere questo microclima all'interno dell'incubatore sono necessari diversi sistemi di controllo (Figura 2.7). La temperatura è regolata tramite un apposito software che la rileva costantemente grazie alla presenza di una termocoppia collegata all'unità di controllo. Essa è mantenuta costante grazie ad un termostato a bagno termico che tramite una resistenza scalda l'acqua, la inietta in un'intercapedine e, scorrendo lungo i bordi del piccolo incubatore, scalda l'aria al suo interno. La stessa unità di controllo che regola la temperatura, se collegata ad una pompa ad aria compressa e ad una bombola di CO_2 , permette all'operatore di regolare il flusso di aria ed anidride carbonica, creando in tal modo l' "atmosfera" ideale per la vitalità delle cellule. Infine, per quanto riguarda l'umidità è presente un'unità apposita, immersa nel bagno termico, in grado di produrre del vapore, successivamente immesso all'interno dell'incubatore.

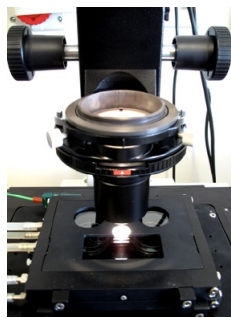


Figura 2.6: Incubatore della Oko-Lab integrato con il tavolino portaoggetti del microscopio Nikon Eclipse-Ti.

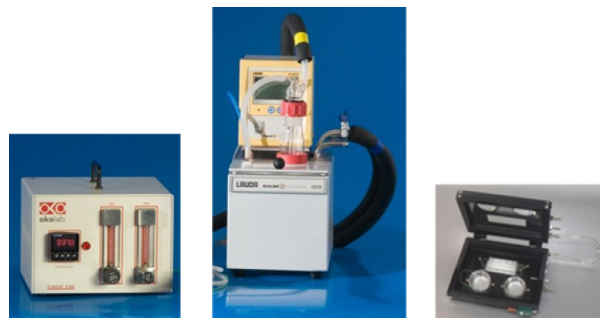


Figura 2.7: Sistemi di controllo dell'aria e della CO_2 (sinistra), termostato a bagno termico (centrale) ed incubatore della Okolab (destra).

- **Perfect Focus System (PFS)** Supponendo che tutte le condizioni ambientali esterne al campione siano ideali, l'unico disturbo alla misura è la perdita intrinseca del fuoco dovuta ai gradienti termici, vibrazioni, instabilità meccaniche e un certo numero di altri fattori difficilmente eliminabili.

La Nikon ha affrontato questo problema progettando una soluzione hardware unica, detta "Perfect Focus System" (PFS), pensata per contrastare gli spostamenti assiali in tempo reale nell'arco dell'intera acquisizione [7]. Tale soluzione risulta molto utile specialmente negli esperimenti in cui si osservano più parti del campione, ove gli spostamenti macroscopici del tavolino motorizzato sono inevitabili.

Punto critico del PFS è il rilevamento accurato di un certo piano assiale che possa essere utilizzato come riferimento per stabilire con precisione la distanza che deve intercorrere tra la superficie della lente obiettivo ed il piano focale di interesse nel campione. A questo scopo il PFS utilizza un LED infrarosso a 870 nm che non interferisce con i segnali raccolti dall'ottica dell'obiettivo: né con la luce di eccitazione, né con quella emessa dai fluorofori, poiché presentano lunghezze d'onda di emissione comprese entro il range $[340 - 770]\text{ nm}$ (Figura 2.8).

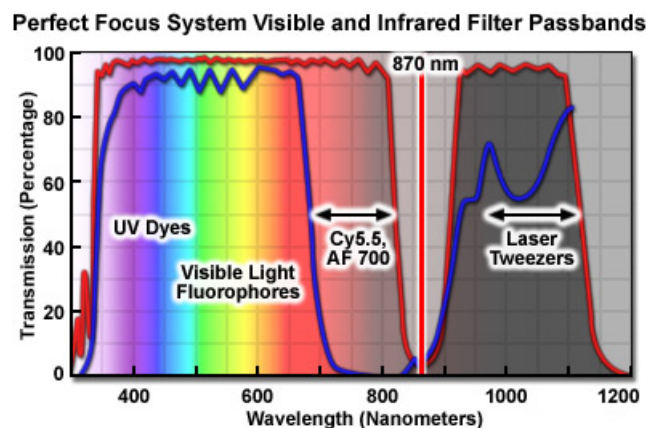


Figura 2.8: Bande di emissione dei marcatori fluorescenti e del LED a 870 nm .

Servendoci della Figura 2.9 ripercorriamo il percorso della luce prodotta dal LED.

Innanzitutto viene fatta passare attraverso una lente condensatrice e la fenditura di una piastrina (Slit Plate). Una lente collimatrice converte la luce in un fascio di raggi paralleli, fatti passare poi in una maschera a mezza luna (half-moon mask), che serve per abbattere una parte

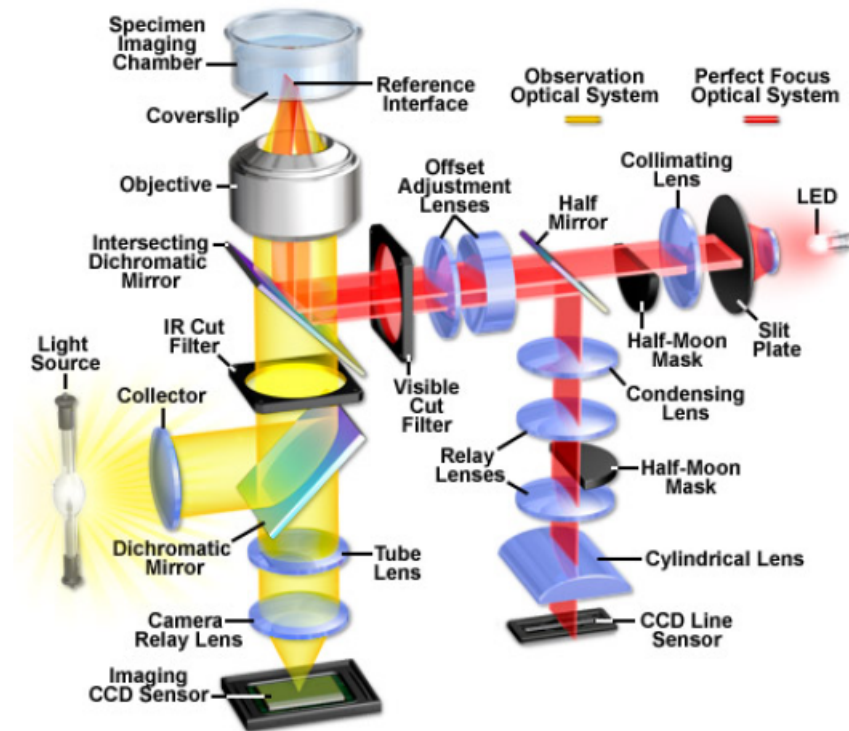


Figura 2.9: Schema ottico dell'unità di Perfect Focus System (PFS).

dei raggi luminosi lungo l'asse ottico. Il fascio viene quindi trasmesso all'half-mirror, focalizzato dalle lenti del sistema di regolazione dell'offset e diretto verso un filtro anteposto all'ingresso del percorso ottico primario. L'ingresso a tale percorso è mediato dallo specchio dicroico, che funge da intersezione dei due sistemi ottici trasmettendo la luce visibile e riflettendo quella infrarossa, evitando così che luce trasmessa o segnale di fluorescenza siano contaminati dal PFS. A questo punto, il fascio originato dal LED viene focalizzato dall'obiettivo sull'interfaccia di riferimento, ossia sulla superficie ove l'indice di rifrazione cambia: o da coprivetrino ($n = 1.5$) ad aria ($n = 1$) o da coprivetrino a mezzo che circonda il campione ($1.33 \leq n \leq 1.38$), rispettivamente per obiettivi a secco e ad immersione. Su tale interfaccia la luce viene nuovamente riflessa e convertita in una fascio di raggi paralleli nel sistema ottico primario. Quindi lo specchio dicroico riflette ancora il fascio, permettendone il rientro nel sistema ottico del PFS. Passano di nuovo attraverso il filtro per la luce visibile e le lenti di regolazione dell'offset, per poi entrare nell'half-mirror e quindi nel nuovo percorso in cui si

forma l'immagine di rilevamento del fuoco. Qui il fascio viene ritrasformato nell'immagine della fenditura da una lente colletttrice, fatto passare attraverso le lenti ritardanti, la maschera a mezza luna ed una lente cilindrica per poi arrivare nella parte centrale del sensore CCD lineare sotto forma di una linea marcata.

Una componente molto importante del PFS è il sistema di lenti per la regolazione dell'offset, posta tra l'half-mirror e lo specchio dicroico. Esso produce uno shift della posizione a fuoco dell'immagine della fenditura, in coordinazione con un sistema elettronico di feedback che controlla la posizione assiale del tavolino motorizzato.

La Figura 2.10 mostra come l'immagine del piano focale del campione (raggio giallo) e quella della fenditura (raggio rosso) siano rispettivamente dirette verso il rivelatore (o l'oculare) e verso il sensore CCD lineare attraverso due percorsi ottici indipendenti.

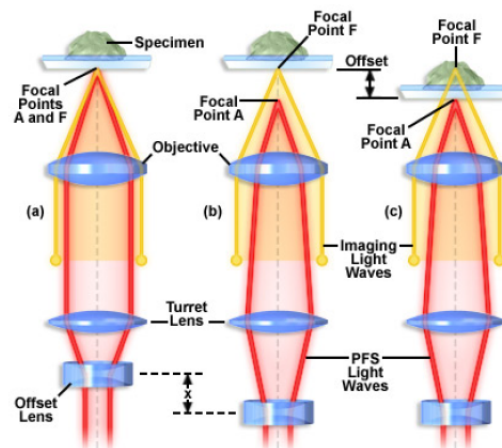


Figura 2.10: Regolazione dell'offset nel PFS.

L'immagine fa riferimento al caso particolare di obiettivi a secco, ossia ad interfaccia di riferimento data da coprivetrino-aria. Si nota che le lenti di offset si spostano in modo da regolare la posizione dell'immagine della fenditura sul sensore, mentre la "lente torretta" è fissa sull'asse ottico. Inoltre, prima dell'inizializzazione del PFS, si ha una condizione di offset nullo, ossia la posizione di fuoco della lente obiettivo (F) e dell'immagine della fenditura (A) coincidono all'interfaccia di riferimento (Figura 2.10/a). Per poter introdurre un offset tra i piani focali delle due immagini si può variare la posizione della lente di offset attraverso una manopola del PSF, e quindi variare anche la posizione di fuoco dell'immagine di fenditura (Figura 2.10/b). Quando

poi il sistema di feedback del PFS regola la z dell'obiettivo in modo da ristabilire il piano focale A all'interfaccia coprivetrino-aria, il piano focale dell'immagine F viene spostato nella parte centrale del campione in esame (Figura 2.10/c). La distanza di offset che ora separa i due piani focali può essere regolata dall'operatore in modo da esplorare diversi piani di fuoco all'interno del campione. Quando l'interfaccia di riferimento si sposta lungo l'asse z l'immagine della fenditura sul rivelatore risulta shiftata e sfuocata e di conseguenza il controller del PFS sposta l'obiettivo in direzione compensatoria al movimento precedente fin quando non raggiunge nuovamente la situazione in cui l'immagine della fenditura compare al centro del sensore.

Tale sistema di controllo del fuoco presenta come vantaggio più grande il fatto di essere più veloce di ogni altro sistema esistente, in quanto il feedback viene fornito dal PFS ogni 5 ms (per altri meccanismi esistenti di mantenimento del fuoco viene fornito al più ogni 500 ms) e la distanza tra l'obiettivo e il campione viene mantenuta costante con una precisione assiale di 0.025 nm . Tuttavia il PFS presenta alcuni limiti di utilizzo, legati al tipo di campione e di supporto usati. Per esempio, nel caso di campioni immersi in mezzi acquosi occorre che lo spessore del mezzo sia di almeno 3 mm ; la camera su cui sono coltivati i campioni deve avere un fondo di spessore compreso tra 150 nm e 180 nm per permettere una riflessione ottimale del segnale infrarosso; campioni troppo spessi o seminati su petri o vetrini di materiali diversi dal vetro, come per esempio la plastica, che presentano un forte scattering dell'infrarosso, non sono adatti per l'utilizzo del PFS.

Infine bisogna osservare che l'unità PFS Nikon è situata nel gruppo ottico di sei obiettivi, situato tra la torretta dei filtri per la fluorescenza e il tavolino del microscopio; che i suoi controlli elettronici sono anch'essi all'interno del gruppo ottico e sono autosufficienti, cioè non richiedono un software supplementare per la loro gestione e che il PFS può essere attivato o disattivato tramite una leva che inserisce o meno lo specchio dicroico nel percorso ottico primario del microscopio.

- **Software Nis-Element 3.1**

Esso è il software attraverso cui si gestiscono le varie funzionalità del microscopio, dalla creazione di sequenze spazio-temporali di acquisizione sino all'analisi delle immagini ottenute (paragrafo 2.1.2).

1.2 Software: Nis-Element 3.1

Nis-Element 3.1 è, come accennato, il software associato al microscopio Nikon Eclipse-Ti.

Tramite tale software le immagini possono essere osservate o in modalità "live", ovvero in tempo reale, oppure in modalità di "visualizzazione", cioè mostrando le immagini acquisite e salvate in precedenza, su cui è possibile avviare un'eventuale elaborazione attraverso gli strumenti di analisi delle immagini digitali di cui il programma dispone.

Nella schermata iniziale è presente un riquadro che visualizza l'immagine in esame ed il pannello "Microscope Control Pad", detto anche TiPad (Figura 2.11), da cui l'utente può gestire i diversi componenti del microscopio. Tale pannello dispone delle seguenti sezioni di controllo:

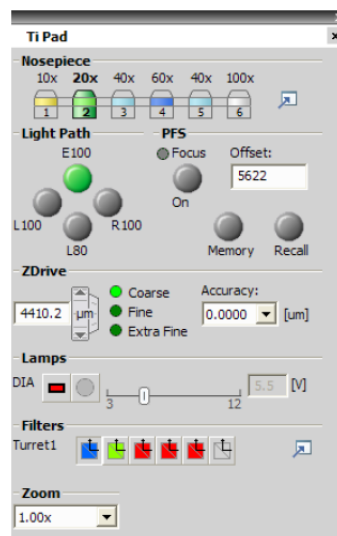


Figura 2.11: Microscope Control Pad (Tipad).

- **Nosepiece**

Permette la selezione dell'obiettivo da utilizzare durante l'osservazione e crea differenti configurazioni ottiche a seconda dell'obiettivo montato dall'utente sul corpo ottico del microscopio.

- **Light Path**

Questa box riproduce la stessa pulsantiera a croce presente alla base del microscopio (Figura 2.4), attraverso cui si seleziona il percorso ottico della luce. Le due modalità "L100" e "R100" mandano il 100% del segnale rispettivamente all'uscita di sinistra e di destra, dove sono presenti i collegamenti per i rivelatori CCD; la modalità "Eye" direziona

tutto il segnale verso l'oculare; la modalità "L80" direziona l'80% del segnale verso l'uscita del rivelatore di sinistra ed il 20% verso l'oculare.

- **PFS**

E' il pulsante per l'attivazione e la disattivazione del Perfect Focus System. Quando la spia è verde significa che il PFS è attivato ed il fuoco non è più regolabile con la manopola tradizionale ma con quella del PFS. Una volta messa a fuoco l'immagine, cliccando sul pulsante Memory si può memorizzare l'offset della posizione scelta.

- **Z Drive**

Permette di decidere la sensibilità degli spostamenti assiali del tavolino motorizzato per la ricerca del piano focale nella modalità senza PFS inserito. E' possibile impostare tre differenti sensibilità: Coarse (grezzo), Fine (fine) e ExFine (extra fine).

- **Lamp**

Questa box permette l'accensione e la regolazione della potenza della luce di illuminazione per le osservazioni in luce trasmessa.

- **Filters**

Questa box permette di inserire i diversi filter cubes necessari per la fluorescenza nel percorso ottico primario del microscopio. L'operatore può creare configurazioni differenti a seconda delle combinazioni di filtri di cui dispone, memorizzando per ciascuna le bande di lunghezze d'onda del filtro di eccitazione, di emissione e dello specchio dicroico. Una volta impostati questi parametri il programma assocerà all'immagine monocromatica acquisita dalla telecamera, in una data combinazione di filtri, un colore fittizio corrispondente alla banda di lunghezza d'onda impostata per il filtro di emissione.

Ovviamente tale pannello non è l'unico presente, infatti si possono visualizzare altre interfacce: quella per la regolazione del tempo di esposizione e del guadagno del pixel della telecamera durante l'acquisizione o quella per la visualizzazione dell'istogramma dell'immagine acquisita.

Tale software risulta essere molto comodo per l'utente poiché prevede la possibilità di salvare alcune configurazioni di utilizzo del microscopio, quindi memorizzare tutti i parametri del TiPad e le impostazioni di acquisizione della telecamera, ed attivarle ogni volta che viene premuto il pulsante associato alla configurazione desiderata.

Nis-Element 3.1 permette inoltre di programmare vari tipi di acquisizione. In particolare, grazie al menu "ND Acquisition" (Figura 2.12), è possibile effettuare l'*acquisizione in 6D*, ossia combinare a seconda delle esigenze dell'utente sequenze spaziali, temporali e vari tipi di filtri.

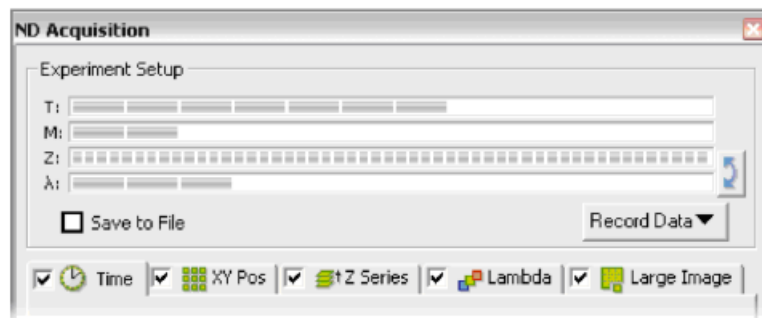


Figura 2.12: Menu ND Acquisition per l'acquisizione in 6D.

Nel menu a tendina "Time" si impostano i parametri per l'*acquisizione in time-lapse*, dove è possibile creare filmati ".AVI". Via software si può impostare ogni quanto acquisire le immagini, da qualche ms a qualche ora, tenendo presente che non è possibile acquisire le immagini ad intervalli temporali minori del tempo di esposizione settato per la telecamera. Le immagini vengono salvate in un file unico da cui è possibile estrarre solo alcuni fotogrammi o selezionare solo alcuni intervalli di tempo per produrre successivamente dei filmati separati, sempre in formato ".AVI". E' inoltre possibile impostare diverse fasi di lavoro, salvate in file separati, e decidere per ciascuna fase il rate temporale di acquisizione e la durata totale dell'osservazione. La tendina "XY Pos" permette invece di impostare l'*acquisizione in multi-point*, in cui si possono memorizzare varie posizioni (x, y, z), così da poter osservare più di un campo di vista all'interno del campione. Nel menu a tendina "Z Series" si imposta l'*acquisizione in z-serie* che permette di acquisire immagini a diversi piani di fuoco e di visualizzarle poi in modalità tridimensionale, sfruttando un apposito algoritmo di deconvoluzione che elimina in parte i segnali fuori fuoco. Nella tendina corrispondente al tasto "Lambda" si imposta l'*acquisizione in multichannel*, ovvero si seleziona il filtro da utilizzare nella determinata sequenza spazio-temporale. Questo menu è particolarmente utile nel caso in cui si vogliano utilizzare più fluorofori per marcare diverse componenti del campione oppure nel caso in cui si vogliano acquisire immagini sia in campo chiaro che in fluorescenza. Nel menu "Large Image" si imposta l'*acquisizione di immagini consecutive* che ricoprono un'area del campione stabilita dall'utente. Inoltre, all'interno di ogni tendina è possibile settare ulteriori impostazioni, come per esempio decidere quando aprire e chiudere lo shutter e quando accendere o spegnere la luce usata in trasmissione.

Tuttavia, nel software sono presenti menu separati, oltre a quello per la misura in 6D, che permettono di eseguire solo un tipo alla volta di queste sequenze

di acquisizione e menu che invece consentono di creare più fasi di sequenze in 6D.

Bisogna notare che Nis-Element 3.1 è un software versatile non solo per quanto riguarda la fase di acquisizione delle immagini, ma anche per la parte di gestione e di elaborazione di quelle acquisite. Esso possiede infatti dei moduli che permettono una vasta gamma di operazioni di "misura" sulle immagini (Figura 2.13), come quantificare distanze, aree, perimetri e angoli, e operazioni di elaborazione (Figura 2.14), come l'aumento del contrasto, il rilevamento di bordi, la sogliatura ed alcune operazioni morfologiche (es. erosione e dilatazione).

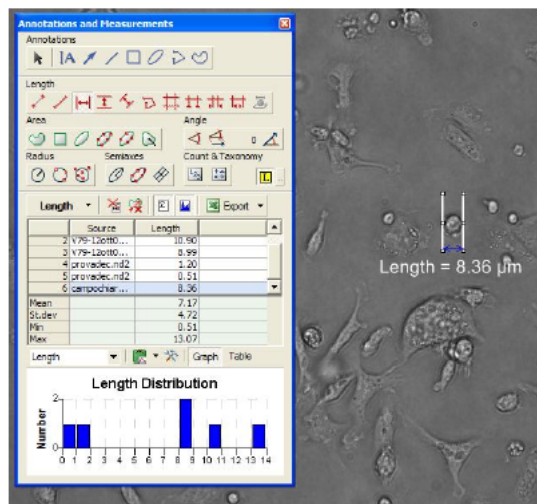


Figura 2.13: Esempio di utilizzo del software Nis-Element 3.1 per misure di distanza.

2 Imperfezioni e difetti dell'immagine

Nel campo dell'ottica, data la complessità dello studio geometrico del comportamento delle lenti, spesso ci si limita ad una trattazione basata sulla cosiddetta *approssimazione di Gauss* [8]. Questa teoria, detta anche "teoria delle lenti sottili" o "ottica parassiale", è applicabile per sistemi ottici ideali, ossia sistemi che soddisfano tali richieste:

- lenti di spessore trascurabile;
- raggi incidenti parassiali, quindi molto prossimi all'asse della lente, e poco inclinati sull'asse, cosicché tutti gli angoli da essi formati (es. angoli di incidenza, di apertura e di campo) siano piccoli, tali da approssimare $\sin\theta \sim \tan\theta$;

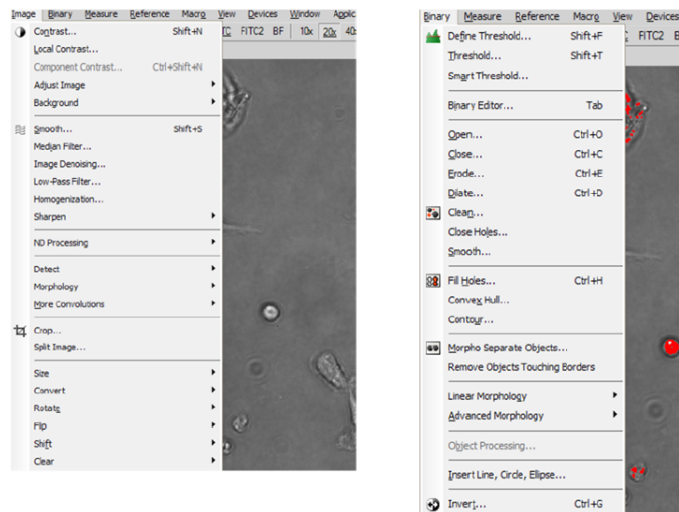


Figura 2.14: Panoramica di alcune operazioni di elaborazione di immagini previste dal software Nis-Element 3.1.

- radiazione monocromatica;
- onde sferiche o piane, nel caso in cui il loro raggio di curvatura sia infinito

Il risultato di tali ipotesi semplificative è che le immagini godono anch'esse di proprietà ideali, quali:

- l'immagine di un oggetto esteso, piano e perpendicolare all'asse è geometricamente simile all'oggetto e a sua volta piano e perpendicolare all'asse;
- l'immagine di un oggetto privo di dimensioni, cioè di un punto, è ancora un punto;
- i valori dell'ingrandimento, della focale e la posizione dei punti principali sono indipendenti dalle dimensioni dell'oggetto, dall'inclinazione dei raggi sull'asse e dalle lunghezze d'onda interessate;
- il contrasto nell'immagine risulta uguale a quello nell'oggetto.

Ossia, sulla base dell'approssimazione di Gauss si otterrebbero immagini piane, non deformate e con risoluzione infinita, in quanto ogni punto dell'oggetto avrebbe il suo corrispondente nell'immagine e si potrebbero ritrovare in quest'ultima strutture e dettagli dell'oggetto piccoli quanto si vuole, con contrasto immutato.

Tuttavia sussistono tre cause principali di deviazione dello stato reale da quello ideale, e quindi dell'immagine effettivamente osservata da quella prevista secondo tale teoria: cause geometriche, fisiche e tecniche.

2.1 Cause geometriche

Quando si considerano sistemi reali di lenti spesse, con angoli di campo e di apertura non trascurabili e radiazione policromatica, risultano essere molto rilevanti per la formazione dell'immagine anche gli effetti rifrattivi sulle interfacce di riferimento (superficie aria-vetro o vetro-vetro).

Le differenze dall'immagine ideale causate da tale classe di deviazioni dalle condizioni ideali dell'ottica di Gauss sono globalmente indicate con il termine di *aberrazioni*.

Il loro effetto globale è la produzione, per ogni punto oggetto, di un'immagine allargata, detta "cerchio di confusione", di forma e profilo fotometrico assai variabile. Tale cerchio danneggia sia la risoluzione dell'immagine che il microcontrasto, dove con tale termine si intende l'andamento fotometrico dell'immagine di un oggetto in cui una zona buia ed una luminosa sono separate da una linea netta, senza transizioni. Infatti, a causa della presenza del cerchio di confusione il passaggio chiaroscuro all'interno dell'immagine non è più rappresentabile con una curva a gradino, bensì avente pendenza più o meno regolare, comportando perciò una minor definizione (o nitidezza) dell'immagine stessa.

Le aberrazioni del punto possono essere di diverso tipo:

- **Aberrazione cromatica**

Tale "difetto" è legato alla lunghezza d'onda della radiazione e perciò risulta assente per radiazione di tipo monocromatico. Ai fini della microscopia a fluorescenza, l'aberrazione cromatica risulta essere non trascurabile all'aumentare del numero di fluorofori differenti utilizzati all'interno del campione.

Per la comprensione di tale fenomeno si supponga di utilizzare radiazione bianca per la formazione dell'immagine, così da disporre di un intero spettro continuo entro il range del visibile, ossia circa [400-800] nm. Ad ognuna delle lunghezze d'onda λ interne a tale intervallo sarà associato un determinato indice di rifrazione n , secondo la legge di Cauchy [9]:

$$n(\lambda) = A + \frac{B}{\lambda^2}$$

dove A e B sono costanti dipendenti dal mezzo in esame, ed un determinato angolo di deviazione, angolo tra la direzione entrante ed uscente del raggio, dato che, tramite costruzione geometrica, risulta direttamente proporzionale all'indice stesso.

Tale variazione dell'angolo di dispersione, quindi della focale, al variare della lunghezza d'onda provoca una variazione della coniugata immagine, dando origine alla cosiddetta *aberrazione cromatica assiale*

o longitudinale. Per tale effetto, un oggetto che emette o è attraversato da luce bianca fornisce una serie di sue immagini di differente colore, a diversa distanza dalla lente: la distanza massima si avrà per le lunghezze d'onda maggiori (parte rossa del visibile) poiché corrispondenti ad indice di rifrazione minore e quindi focale maggiore (Figura 2.15/a).

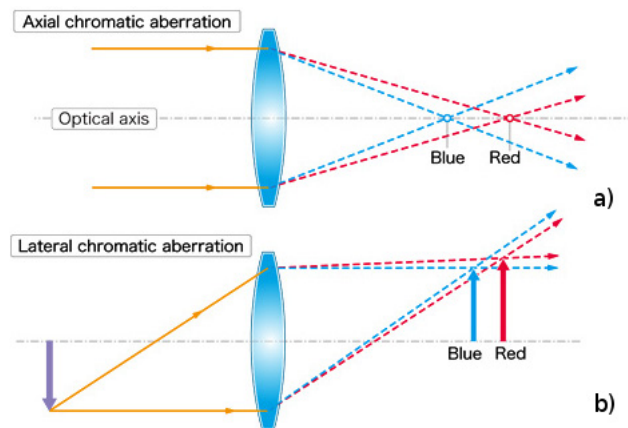


Figura 2.15: Formazione dell'aberrazione cromatica longitudinale (caso a) e trasversale (caso b).

Si ha dunque una successione di immagini corrispondenti ai valori di lunghezza d'onda presenti, detta "spettro primario" e l'immagine risultante appare quindi circondata da aloni colorati (Figura 2.16).



Figura 2.16: Esempio di aberrazione cromatica assiale.

Supponiamo a questo punto di ignorare o di avere corretto la cromatica assiale e quindi che la posizione dell'immagine sia unica per tutto lo spettro. Ciò nonostante, la dispersione dell'indice di rifrazione e della focale portano ad un diverso ingrandimento per ogni valore di lunghezza d'onda (Figura 2.15/b). Questo significa, sempre operando in luce bianca, che le infinite immagini possono anche giacere sullo stesso piano, ma hanno diverse dimensioni (Figura 2.17). Tale effetto viene

definito con il nome di *aberrazione cromatica laterale o trasversale*. In tal caso gli aloni non esistono al centro del campo e crescono di larghezza all'aumentare della distanza dall'asse, cioè del campo.

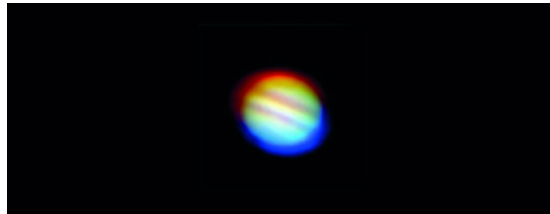


Figura 2.17: Aberrazione cromatica laterale della Luna.

Per ridurre tale cromatica assiale si possono combinare vetri con diverso potere dispersivo, così da ottenere sistemi convergenti o divergenti in cui i valori di focale e di immagine coniugata coincidono per due lunghezze d'onda agli estremi dello spettro visibile. In ordine del grado di complessità crescente e del numero di lenti utilizzate nel sistema, si hanno le cosiddette correzioni acromatiche ed apocromatiche, associate ai corrispondenti obiettivi acromatici ed apocromatici. Inoltre il diametro del suo cerchio di confusione diminuisce chiudendo il diaframma d'apertura. Tale aberrazione dipende molto dalla combinazione dei sistemi ottici (obiettivo, oculare e sistemi intermedi) e può essere ridotta tramite l'uso di filtri.

Per quanto riguarda la cromatica laterale, la larghezza delle frange colorate prodotte non dipende dall'apertura del diaframma. Ancor più della longitudinale, questa cromatica è sensibile all'accoppiamento obiettivo-oculare, alla presenza di sistemi intermedi ed all'uso di filtri.

- **Aberrazione sferica**

Si tratta di un'aberrazione del punto acromatica, ossia presente anche con radiazione monocromatica, pur essendo il suo andamento legato al valore della lunghezza d'onda in gioco.

L'aberrazione sferica è una variazione della focale e quindi della posizione dell'immagine al variare dell'apertura.

La Figura 2.18 illustra il fenomeno nel caso particolare di distanza infinita del punto dalla lente: per uno stesso punto oggetto si hanno diverse immagini a diversa distanza dalla lente al variare dell'apertura, ossia dell'inclinazione, degli infiniti raggi convergenti nell'immagine. Si identificano un fuoco "parassiale" P formato alla minima apertura, un fuoco "marginale" M alla massima apertura ed uno "zonale" Z formato

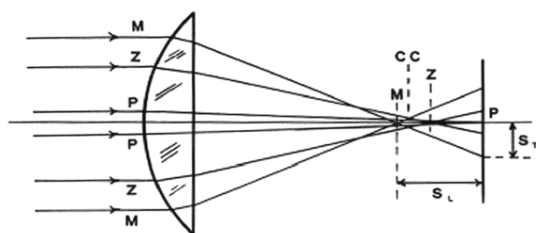


Figura 2.18: Formazione dell'aberrazione sferica.

da raggi appartenenti ad una regione intermedia. Qualunque dei fuochi sopra citati si scelga come migliore immagine, esso sarà sempre circondato da un alone dovuto ai raggi che convergono in un fuoco più vicino o più lontano (Figura 2.19). Questo alone è sempre presente e si può solamente cercare di minimizzarlo.

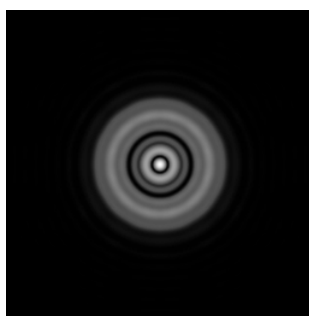


Figura 2.19: Esempio di aberrazione sferica su un punto oggetto.

L'involuppo di tutti i raggi appartenenti a tutte le zone della lente costituisce una figura caratteristica, detta "caustica", che, sezionata con un piano perpendicolare all'asse, mostra sempre una figura circolare, mai un punto. E' proprio la caustica che rappresenta il cerchio di confusione dovuto all'aberrazione sferica e si cercherà sempre il cerchio di minima confusione, (CC in Figura 2.18), dato che tale figura si può minimizzare cercando il miglior fuoco, ma mai annullare.

Il termine "sferica" si riferisce al fatto che tale aberrazione è legata alla forma sferica delle superfici delle lenti usuali e perciò si può eliminare dando forme asferiche particolari, metodo utilizzato per collettori, condensatori e certi obbiettivi fotografici, oppure combinando lenti sferiche di forma ed indice diversi, metodo utilizzato nei microscopi. Un sistema corretto dall'aberrazione sferica si chiama aplanatico.

- **Coma**

La coma ha come radice etimologica i termini "chioma", "cometa", facendo riferimento al suo tipico aspetto, ancor più evidente se agente su piccoli oggetti (Figura 2.20).

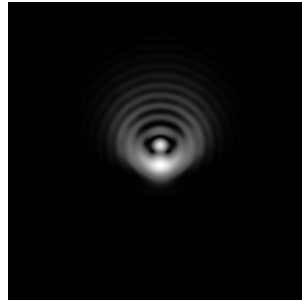


Figura 2.20: Esempio di coma su un punto oggetto.

Questa aberrazione acromatica è di tipo extra-assiale, così come la cromatica laterale, ossia non esiste sull'asse di un sistema centrato e cresce con l'aumentare del campo. Di conseguenza il suo cerchio di confusione non può essere circolare ma risulta allungato in senso radiale e presenta un punto molto luminoso che sfuma gradatamente in una larga coda. In microscopia la coma si corregge facilmente scegliendo in modo opportuno la posizione del diaframma e la forma delle lenti, prestando attenzione al fatto che essa è assente in un sistema simmetrico col diaframma al centro. Risulta ovvio che la coma in asse non può esistere, perciò se al centro del campo di un microscopio si osserva un residuo di coma in generale è indice che una o più lenti dell'obiettivo non sono centrate sull'asse comune.

- **Astigmatismo**

L'astigmatismo è un'aberrazione acromatica, extra-assiale che crea un'immagine sdoppiata e deformata di ogni punto oggetto (Figura 2.21).

In tal caso, il fascio di raggi che convergono nell'immagine di un punto oggetto non si raccoglie attorno ad una zona circolare, bensì attorno ad un segmento tangenziale, detto "focale astigmatica".

L'astigmatismo, come la coma, è nullo sull'asse e cresce col campo e se nell'uso pratico si riscontra astigmatismo anche al centro del campo allora la causa può essere varia: inclinazione di qualche prisma o di qualche lente rispetto all'asse, errore di centratura o errore nella forma

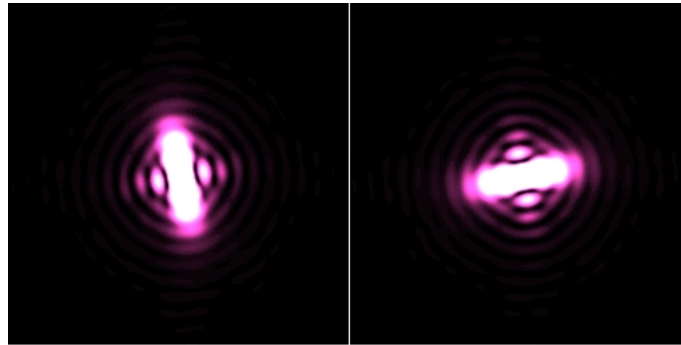


Figura 2.21: Esempi di astigmatismo su un punto oggetto.

di qualche lente. Tuttavia modificando la messa a fuoco del microscopio, si evince una grande differenza tra la figura della coma e dell'astigmatismo nell'immagine di un punto oggetto: la prima si può allargare ma conserva la sua forma, con la coda che resta diretta radialmente, mentre la seconda si allunga in direzione da radiale a tangenziale o viceversa.

Un sistema corretto da astigmatismo si chiama genericamente "anastigmatico". Per la correzione di tale aberrazione bisogna tener conto che essa è influenzata, più che dalla forma delle lenti, dalla posizione del diaframma e dal numero di lenti interposte, dato che una lente divergente mostra un astigmatismo di segno opposto di una convergente, da cui l'utilità di porne varie in successione.

- **Distorsione**

La distorsione consiste in una variazione dell'ingrandimento trasversale con la distanza dall'asse, per cui l'immagine di un oggetto esteso piano non gli è simile.

Se l'ingrandimento cresce col campo, cioè con la distanza del punto dall'asse, allora l'oggetto sembra dilatarsi verso la periferia e si parla di distorsione positiva o "a cuscinetto"; viceversa, se l'ingrandimento diminuisce al crescere del campo allora l'oggetto sembra contrarsi e si ha la cosiddetta distorsione negativa o "a barilotto" (Figura 2.22).

La distorsione di una lente sottile è in genere trascurabile, non è invece così per le lenti spesse: una lente spessa convergente tende a mostrare una distorsione positiva, se invece divergente la mostra negativa. Tuttavia in microscopia la distorsione disturba i fini dell'esperimento solo quando si debbono eseguire misure di superficie o di lunghezza sull'oggetto, ma in genere essa è assai contenuta ed in prevalenza data dall'oculare poichè quella dell'obbiettivo non supera in genere 1%.

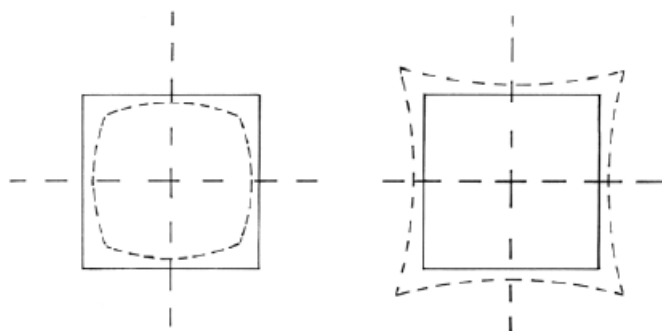


Figura 2.22: Distorsione a cuscinetto (destra) e a barilotto (sinistra) di un oggetto quadrato.

Un sistema corretto da distorsione e curvatura di campo si dice ortoscopico.

2.2 Cause fisiche

Finora abbiamo esaminato molti fenomeni ottici, che si verificano nel microscopio, servendoci di un approccio per lo più di natura geometrica e si è visto in tale contesto che, dato un punto oggetto, un sistema ottico reale non produce mai un'immagine puntiforme, se non altro a causa delle aberrazioni del punto.

Supponendo ora di operare in un sistema ideale, in cui siano assenti sia le aberrazioni che i difetti costruttivi, ebbene nuovamente non riusciremo ad ottenere da esso un'immagine puntiforme. Ciò è dovuto al fatto che la radiazione elettromagnetica non si può trattare sempre come se costituita da semplici "raggi", ossia rette di propagazione che obbediscono solo a leggi geometriche, bensì è necessario tenere conto della sua natura ondulatoria.

Una tipica conseguenza che si evince da tale approccio fisico alla propagazione della radiazione è la generazione di effetti diffrattivi. Per comprendere tale fenomeno consideriamo una sorgente puntiforme Q , posta davanti ad uno schermo avente una fenditura circolare P , con una lente convergente L posta a ridosso dell'apertura, che crea sullo schermo S l'immagine Q' dell'oggetto Q (Figura 2.23). Si noti l'evidente analogia che intercorre tra la fenditura P ed un diaframma d'apertura per la lente L .

Supponendo che la lente sia stata corretta da ogni tipo di aberrazione, il cerchio di confusione è previsto con raggio nullo. In realtà ciò che si osserva in Q' è una figura caratteristica, detta *figura di diffrazione*, o anche "figura di Airy" o "centrica", avente l'aspetto tipico mostrato dalla Figura 2.24:

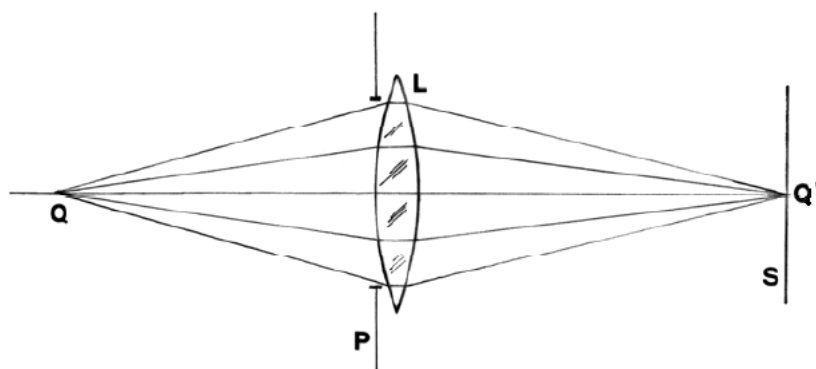


Figura 2.23: Schema del sistema fenditura-lente convergente per la formazione della figura di diffrazione.

un disco centrale di massima intensità con orli sfumati ("disco di Airy"), circondato da una successione di anelli concentrici scuri e chiari, sempre sfumati e di intensità decrescente.

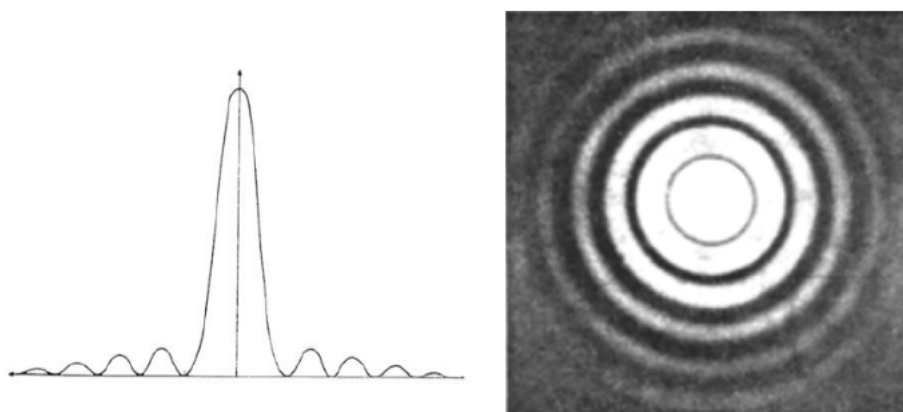


Figura 2.24: Profilo fotometrico della centrica (sinistra) e figura di Airy (destra).

Detta NA l'apertura numerica della lente L e λ la lunghezza d'onda dell'onda incidente, i valori del raggio dell' n -esimo anello chiaro sono:

$$r_n = k_n \frac{\lambda}{NA}$$

dove k_n vale 0.61, 1.12 e 1.62 rispettivamente per il primo (disco di Airy), secondo e terzo anello chiaro. E' inutile andare oltre poiché gli anelli successivi sono troppo poco intensi per poter essere osservati, dato che l'intensità decresce molto rapidamente nelle varie zone della centrica. Infatti per il disco

di Airy l'energia è l'84% di quella totale e per i successivi anelli: 7,1%, 2,8% e 1,5%.

Dunque, un sistema ottico ideale, anche in assenza di aberrazioni, non dà un'immagine puntiforme di un punto oggetto, ma nuovamente una sorta di cerchio di confusione, questa volta non dovuto a fenomeni geometrici, quali la rifrazione, ma a fenomeni ondulatori, cioè alla diffrazione.

L'effetto diffrattivo, al contrario delle aberrazioni, è una proprietà intrinseca alla natura fisica del fenomeno in esame e perciò è molto più difficile poter limitare i difetti da esso apportati sull'immagine. Tuttavia, in alcuni casi, esso può venire attenuato tramite algoritmi applicati in una fase post-acquisizione sull'immagine desiderata, come per esempio con il cosiddetto *algoritmo di deconvoluzione*.

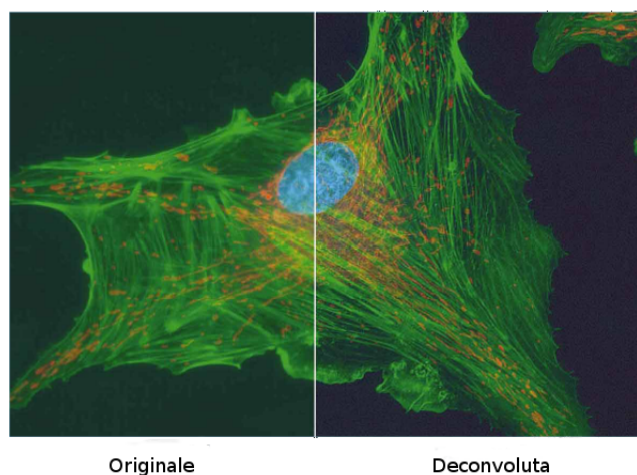


Figura 2.25: Immagine a fluorescenza di una cellula endoteliale di bovino. La regione a sinistra mostra l'immagine originale, quella a destra il risultato di un processo iterativo di deconvoluzione bidimensionale.

Questa tecnica inizialmente nacque con lo scopo di rimuovere le sfocature caratteristiche di un sistema fuori fuoco che contaminavano le immagini di una vasta gamma di microscopi [10]. Un microscopio è in genere caratterizzato dalla sua "Point Spread Function" (PSF), una descrizione bidimensionale o tridimensionale di come un singolo punto luce venga trasformato dallo strumento e mostrato all'utilizzatore. La PSF è determinata dalla combinazione delle caratteristiche ottiche del campione, del vetrino, delle lenti dell'obiettivo e della lunghezza d'onda usata; per esempio un microscopio confocale

ha tipicamente una PSF che assomiglia ad un ellissoide posto nella direzione assiale. Un oggetto arbitrario può essere pensato come insieme di punti luce posti in diverse posizioni, con differenti intensità. Quindi, l'immagine osservata dall'utilizzatore può essere descritta come una collezione di varie PSF, ciascuna nella posizione del corrispondente punto luce all'interno del campione, con intensità opportunatamente scalata. Matematicamente tale operazione è detta "convoluzione", perciò, invece che vedere un'immagine pulita, si osserva, a causa della sovrapposizione delle PSF, una sfocatura che copre le caratteristiche di interesse. Di conseguenza l'immagine ottenuta dal microscopio non è l'oggetto nella sua rappresentazione reale, bensì una semplice rappresentazione di esso.

Lo scopo della deconvoluzione è proprio utilizzare la rielaborazione via software per invertire tale processo e ripristinare l'oggetto in esame. Questo particolare algoritmo sta diventando negli ultimi anni parte integrante della microscopia digitale poiché, come si evince dalla Figura 2.25, è in grado di produrre immagini rielaborate con maggior risoluzione, miglior contrasto e rapporto segnale-rumore.

2.3 Cause tecniche

L'immagine acquisita con il microscopio può essere affetta da difetti non solo di natura fisica-geometrica ma anche di origine tecnica-strumentale. In linea di principio si tratta di difetti eliminabili con opportuni accorgimenti tecnici, generalmente con un certo aggravio di costi di produzione e manutenzione. Essi possono essere legati ad una imprecisa lavorazione dei materiali presenti all'interno del microscopio, come per esempio: irregolarità delle superfici, difetti nell'omogeneità dei materiali trasparenti, luce diffusa sulle pareti o sulle montature delle lenti, difetti di montaggio e di centratura, errori di messa a fuoco e mancata pulizia.

Tuttavia possono essere anche difetti intrinseci alla misura stessa, come ad esempio la presenza di una fluorescenza residua di sfondo e la non omogeneità del fascio. Entrambe sono connesse alla luce di eccitazione utilizzata durante l'esperimento: la prima inserisce un offset di luminosità nel background dell'immagine, mentre la seconda crea immagini con, a priori, intensità differente a seconda della posizione del pixel preso in esame, causate da un fascio di radiazione di per sé non omogeneo.

Capitolo 3

Algoritmo di correzione dell'immagine

*Any fool can write code that a computer can understand.
Good programmers write code that humans can understand.*
- Martin Fowler -

Qui scrivo il terzo capitolo.

Capitolo 4

Risultati ottenuti

*Hard science gives sensational results
with a horribly boring process.*
- Nassim Nicholas Taleb -

Qui scrivo il quarto capitolo.

Conclusioni

*Computers are useless.
They can only give you answers.*
- Pablo Picasso -

Qui scrivo le conclusioni.

Appendice A

Codice Sorgente

Qui metto il programma.

Bibliografia

- [1] Waters, J.C., and Swedlow, J.R. (2007), *Interpreting Fluorescence Microscopy Images and Measurements. In Evaluating Techniques in Biochemical Research*
D. Zuk, ed. (Cambridge, MA: Cell Press),
<http://www.cellpress.com/misc/page?page=ETBR>.
- [2] Marco Brusadin (2010), *La microscopia in fluorescenza*
<http://www.marcobrusadin.it>
- [3] F.W.D. Rost (1996), *Fluorescence microscopy*
ed. Cambridge University Press
- [4] J.B. Pawley (2006), *Handbook of biological confocal microscopy*
ed. Springer
- [5] M.E. Dailey, A. Khodjakov, C.L. Rieder, M. Platani, J.R. Swedlow, P.D. Andrews, Yu-li Wang, J.C. Waters, N.S. Claxton, S.G. Olenych, J.D. Griffin and M.W. Davidson, *Optical system and detector requirements for live-cell imaging*
<http://www.microscopyu.com/articles/livecellimaging/imagingsystems.html>
- [6] M.W. Davidson, K.R. Spring (2006), *Introduction to fluorescence microscopy - Nikon microscopy, the source for microscopy education*
[Online; accessed 15-October-2010, Nikon]
- [7] S.A. Schwartz, M.W. Davidson, J.S. Silfies, E.G. Lieser (2010), *Nikon perfect focus system - Nikon microscopy, the source for microscopy education*
[Online; accessed 19-October-2010, Nikon]
- [8] G. Pietro Sini, Donato Di Ferdinando, Gabriele Sirri (2013), *Problemi tecnici della microscopia ottica*
http://www.funsci.com/fun3_it/sini/mo/m_ottica.htm

- [9] P. Mazzoldi, M. Nigro, C. Voci (2007), *Fisica - Volume II*
ed. EdiSES
- [10] Dr. David S.C. Biggs (2004), *Biophotonics International, photonic solutions for biotechnology and medicine - Clearing Up Deconvolution*
ed. Laurin Publishing Co. Inc.

Ringraziamenti

Qui ringrazio tutti!