

**Università degli Studi di Genova**

**Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali**

Corso di Laurea in Fisica

Analisi delle aberrazioni indotte da variazioni di indice di rifrazione in microscopia confocale

**Relatori**

Chiar.mo Prof. Mauro Robello  
Dott. Alberto Diaspro

**Correlatore**

Chiar.mo Prof. Lorenzo Mattera

**Allievo**

Federico Federici

**Anno Accademico 1999/2000**

## Introduzione

La microscopia ottica si pone da sempre come una tecnica di largo utilizzo nella ricerca in ambito biofisico, data la versatilità con cui permette lo studio dei campioni nelle loro condizioni fisiologiche.

L'analisi dei sistemi biologici, la cui struttura è intrinsecamente tridimensionale, richiede strumenti in grado di compiere un'accurata indagine della loro distribuzione spaziale. Questo risulta il più delle volte essenziale visto il complesso e delicato legame tra struttura e funzione; tale esigenza non trova, di fatto, completo riscontro nelle possibilità della microscopia convenzionale.

I notevoli miglioramenti tecnologici di cui hanno usufruito negli ultimi anni alcune tecniche di microscopia ottica, e in particolare quelle in fluorescenza, hanno portato alla possibilità di analisi 3D di sistemi cellulari e subcellulari mediante la tecnica del sezionamento ottico realizzato in modo particolarmente efficace nella Microscopia Confocale a Scansione Laser (*CLSM, Confocal Laser Scanning Microscopy*).

Un comune microscopio ottico non è di per sé predisposto per uno studio accurato di oggetti tridimensionali, in quanto esso fornisce generalmente una immagine bidimensionale, che consiste nella sovrapposizione di regioni del campione a fuoco e fuori fuoco.

Il principio su cui si basa la microscopia confocale consiste, viceversa, nell'illuminazione selettiva, 'punto per punto' e nell'acquisizione (in riflessione o fluorescenza) della sola luce proveniente dalla zona illuminata. Attraverso una scansione del campione lungo l'asse ottico (*sezionamento ottico*) è poi possibile ricostruire al computer l'intera struttura tridimensionale, così come essa appare in condizioni fisiologiche.

Le problematiche affrontate nell'ambito di questo lavoro di tesi sono prevalentemente legate allo studio degli effetti che la variazione dell'indice di rifrazione del mezzo d'immersione del campione rispetto a quello d'immersione dell'obiettivo produce sui procedimenti di imaging condotti attraverso un'architettura confocale.

L'importanza di un'analisi sperimentale di questo tipo risiede soprattutto nella difficoltà di approntare un modello teorico che renda agevolmente conto di tale fenomeno nel campo della microscopia ottica a fluorescenza ad uno o più fotoni.

Si vuole cercare di fornire un quadro organico dei diversi risvolti che questa problematica ha sulle prestazioni del sistema come formatore di immagini tridimensionali, sia descrivendone il progressivo deteriorarsi in termini di risposta all'impulso (PSF, point spread function), sia attraverso l'indagine morfometrica di campioni fluorescenti opportunamente scelti.

Ciò permetterà, da un lato di giungere ad una stima del potere risolutivo dello strumento nelle effettive condizioni sperimentali, dall'altro di disporre dell'andamento sperimentale della PSF, utile ai fini di implementare eventuali algoritmi di deconvoluzione.

Ogni particolare assetto operativo del sistema verrà inizialmente indagato impiegando oggetti di forma e dimensioni note, attraverso i quali valutare gli effetti introdotti dalle diverse aberrazioni presenti. I risultati così ottenuti verranno, in un secondo tempo, confrontati con quelli ottenuti, in identiche condizioni, dall'analisi di un preparato biologico ed utilizzati per trarre da esso informazioni di tipo essenzialmente morfometrico.

Si proveranno altresì a suggerire, nei casi esaminati, alcuni pratici accorgimenti attraverso i quali minimizzare gli effetti del mismatch o, dove ciò non sia possibile per la particolare natura del campione, attraverso i quali tenere conto dei necessari fattori correttivi per un'accurata analisi quantitativa di distanze, superfici, volumi.

A margine di queste problematiche, legate prevalentemente al recupero di informazioni morfometriche ed alla caratterizzazione del sistema in termini di risposta all'impulso, si considererà anche un approccio sperimentale al problema inverso, consistente nella stima dell'indice di rifrazione di un mezzo sconosciuto a partire dalla misura dell'estensione assiale di oggettini.



## CAPITOLO 1

### Introduzione alla microscopia confocale

*In questo primo capitolo sono affrontati alcuni aspetti introduttivi legati alla microscopia confocale a fluorescenza ed alle sue problematiche. In particolare, ne vengono sottolineati gli aspetti peculiari rispetto a quella convenzionale.*

*Nel corso della dissertazione si fa uso delle ipotesi di linearità ed invarianza spaziale per modellare matematicamente i sistemi ottici, ipotesi queste analizzate in dettaglio nel successivo capitolo relativo alla formazione delle immagini.*

## 1.1 Cenni storici e problematiche della microscopia confocale e convenzionale

Allo storico che volesse indagare l'evoluzione nel corso dei secoli dei diversi strumenti ottici “*associati all'occhio*”, l'evoluzione del microscopio come “*protesi per un'indagine più ravvicinata della natura*” (S. Freud) apparirebbe sorprendentemente variegata, a tratti quasi contraddittoria.

Per l'avvento della microscopia si fa generalmente riferimento all'opera di A. van Leeuwenhoek (1632-1723), considerato una sorta di ‘padre della microscopia’.

Di fatto, è storicamente accertato che vi fu un forte ritardo nell'impiego e nell'ulteriore sviluppo di dispositivi ottici esistenti già da tempo: la tecnologia di cui si è valsa la microscopia nei secoli XVII e XVIII e anche in gran parte del secolo XIX era già nota da secoli, basti pensare che alcune delle prime grandi scoperte nel campo della biologia e delle scienze naturali nel corso di tali secoli furono compiute, in realtà, osservando i preparati attraverso una semplice lente convergente, o *microscopio semplice*, nota fin dal XIII secolo. Le ragioni di tale ritardo vanno ricercate principalmente nelle idee filosofiche che dominarono nell'ambiente scientifico fino al tempo di Galileo e che furono abbandonate soprattutto grazie al suo intervento innovatore.

Gli obiettivi dei primi microscopi (come quelli adoperati da Galileo stesso, da C. Drebbel, R. Hooke ed altri ricercatori del tempo) erano costituiti da lenti semplici, affette da numerose aberrazioni e sorrette da stativi in legno o cartone approssimativi e traballanti. Nonostante questo approccio, il *microscopio semplice* fu ben presto portato verso i 200 ingrandimenti convenzionali e oltre. Nonostante la precarietà di un tale assemblaggio delle componenti e la scarsa praticità di utilizzo, esso diede, come detto, risultati eccellenti per le ricerche dell'epoca.

Quando si cominciarono a fabbricare i primi obiettivi acromatici e si svilupparono adeguati strumenti matematici per lo studio e l'analisi quantitativa dell'ottica, anche gli obiettivi usati nei microscopi subirono un'evoluzione via via più rapida, finché, verso la metà del secolo XIX, l'introduzione da parte di G. B. Amici della ‘*lente emisferica frontale*’ e, successivamente, i perfezionamenti introdotti da E. Abbe a Jena, nonché la teoria che questi sviluppò intorno all'immagine degli oggetti illuminati gettarono le basi di quella che è considerata la *moderna microscopia*.

Nel caso più comune e di più antico impiego, l'idea di fondo è quella di costruire un dispositivo in grado di sfruttare la radiazione ottica trasmessa o riflessa dall'oggetto sotto osservazione per fornirne un'immagine quanto meno verosimile: è questo il cosiddetto *microscopio ottico* che possiamo considerare come una sorta di antenato di quelli presenti ai giorni nostri ed in continua via di sviluppo.

Esistono infatti dispositivi concepiti per sfruttare anche altri tipi di interazioni con la materia investigata o radiazioni quali fasci di elettroni (*microscopio elettronico*, al quale si assimilano i microscopi ad emissione di campo) oppure fasci di raggi X (*microscopio a raggi X*).

Il motivo di questa ricerca in costante evoluzione non risiede tanto nel tentativo di ottenere ingrandimenti sempre maggiori, quanto nella necessità di aumentare il *potere risolutivo* dello strumento, che limita di fatto la possibilità di mettere in evidenza le particolarità dell'oggetto sotto osservazione anche quando si sia riusciti ad aumentare notevolmente l'ingrandimento.

Per ottenere l'ingrandimento desiderato, ogni microscopio opera sul fascio di radiazione per il quale è progettato in base alle caratteristiche intrinseche delle varie radiazioni che entrano in gioco e precisamente:

- \* con lenti ottiche (nei vari tipi di microscopio ottico)
- \* con lenti magnetiche o elettrostatiche (nel microscopio elettronico)

- ✱ sfruttando la dispersione del fascio di radiazione emesso dalla sorgente, in modo da raccoglierne l'immagine ad una distanza conveniente affinché essa risulti sufficientemente ingrandita e 'leggibile' (nei microscopi a emissione di campo e in quelli a raggi X)

D'altra parte, poiché il meccanismo secondo il quale si forma, nell'immagine, il contrasto fra i particolari del campione osservato cambia a seconda della radiazione impiegata, esso potrà essere esaltato mediante una conveniente preparazione del campione stesso: questa fase preliminare è di particolare importanza nel caso di materiali biologici e nella microscopia per trasmissione, anche se il concetto ha validità del tutto generale.

Nell'ambito della microscopia ottica, la preparazione consiste prevalentemente (quando necessita) nella colorazione selettiva di oggetti di per sé 'trasparenti' in modo che la radiazione venga diversamente assorbita, in funzione della lunghezza d'onda, in zone diversamente colorate e quindi il fascio originario giunga al rivelatore differenziato, per intensità e lunghezza d'onda, a seconda dei punti del preparato dai quali proviene.

Nell'ultimo decennio si sono sviluppate, in seno alla microscopia ottica, tecniche avanzate di analisi quantitativa dei campioni, basate fondamentalmente sull'utilizzo di molecole fluorescenti. Tra di esse la microscopia confocale (oggetto di questa tesi) e quella con eccitazione a due fotoni assumono particolare rilievo per la loro capacità di fornire strumenti adatti allo studio della delicata problematica della relazione tra struttura e funzione nei sistemi biologici. Infatti, se, da un lato, tecniche come quella della microscopia elettronica o anche del tipo a scansione di sonda (in particolare STM, *Scanning Tunnelling Microscopy* e AFM, *Atomic Force Microscopy*) hanno recentemente permesso di indagare dettagli risolti su scala molecolare e atomica, dall'altro si sono rilevate inefficienti quando l'indagine si rivolga su preparati biologici dei quali siano peculiari le informazioni legate alla struttura tridimensionale, visto che, come nel caso di una molecola proteica, struttura e funzione sono intimamente intrecciate.

Di fatto, l'analisi di un sistema biologico condotta per mezzo di un microscopio ottico può essere effettuata, come già accennato in precedenza, sia sfruttando direttamente l'interazione delle sue strutture con la radiazione luminosa, che marcando specificamente il campione (o parti di esso) oggetto di studio con sostanze in grado di interagire con la radiazione luminosa ( ad esempio *sonde fluorescenti* ).

In tal senso i recenti progressi compiuti nell'ambito della biologia molecolare e della biochimica hanno reso possibile una sempre più selettiva marcatura di varie componenti cellulari quali molecole di actina o sequenze di DNA costituite da 1000 o più coppie di basi, permettendo così una sempre più affidabile discriminazione delle singole componenti elementari sotto studio.

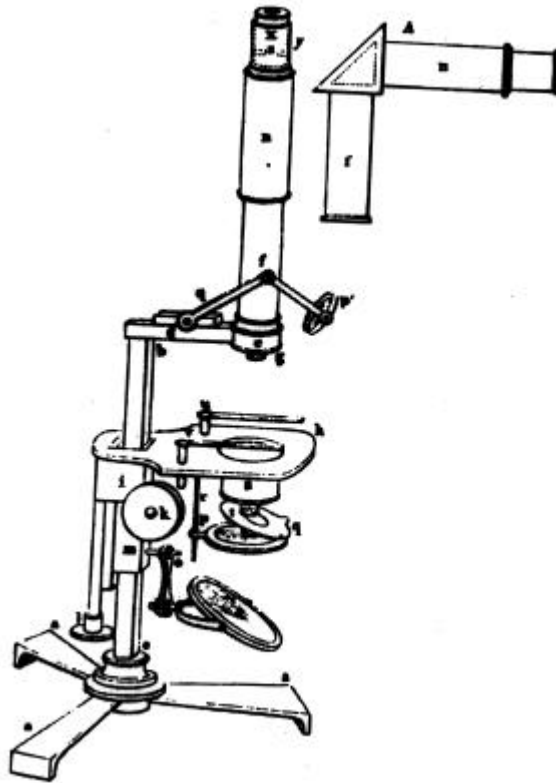
Nonostante ciò, un comune microscopio ottico risulta di per sé inadeguato all'analisi tridimensionale, in quanto fornisce tipicamente un'immagine bidimensionale del campione costituita dalla mera sovrapposizione di regioni del campione a fuoco e fuori fuoco.

E' proprio questa la problematica che, almeno in linea di principio, può essere risolta dall'impiego della microscopia confocale, che, illuminando selettivamente il campione 'punto per punto' e raccogliendo la sola risposta fornita dal piano a fuoco, permette, previa una successiva rielaborazione (tipicamente offline) delle informazioni raccolte, la completa ricostruzione tridimensionale dell'oggetto osservato.

Attraverso l'impiego di un tale dispositivo (descritto in dettaglio nel seguito), non si sono solo aperti nuovi orizzonti nell'imaging *in vivo* di preparati biologici, ottenendo informazioni morfometriche impensabili nell'ambito della microscopia convenzionale, ma si è pure migliorato il limite di risoluzione, arrivando, in particolare, ad un significativo aumento della risoluzione assiale, legato proprio alla drastica riduzione dell'informazione fuori fuoco presente in ogni singola immagine acquisita.

Nell'ambito di questo lavoro di tesi si è affrontato lo studio delle problematiche (ad oggi ancora in gran parte irrisolte) relative all'analisi quantitativa di campioni di diversa natura in presenza di una discontinuità nell'indice di rifrazione tra il mezzo di immersione dell'obiettivo e quello di immersione del campione e alla caratterizzazione del sistema ottico in termini di funzione di trasferimento (nota come PSF: *point spread function*), sempre in funzione di tale discontinuità.

L'apparato strumentale impiegato è un sistema di microscopia confocale a scansione laser (CLSM: *confocal laser scanning microscope*) a singola apertura, particolarmente compatto e con accoppiamento totale in fibra ottica, NIKON PCM 2000.



**Fig. 1.1:** Il microscopio di Amici del 1835 (Pieter Harting , *Das Mikroskop* (Brunswick, 1859), pag.719.) . <sup>(\*)</sup>

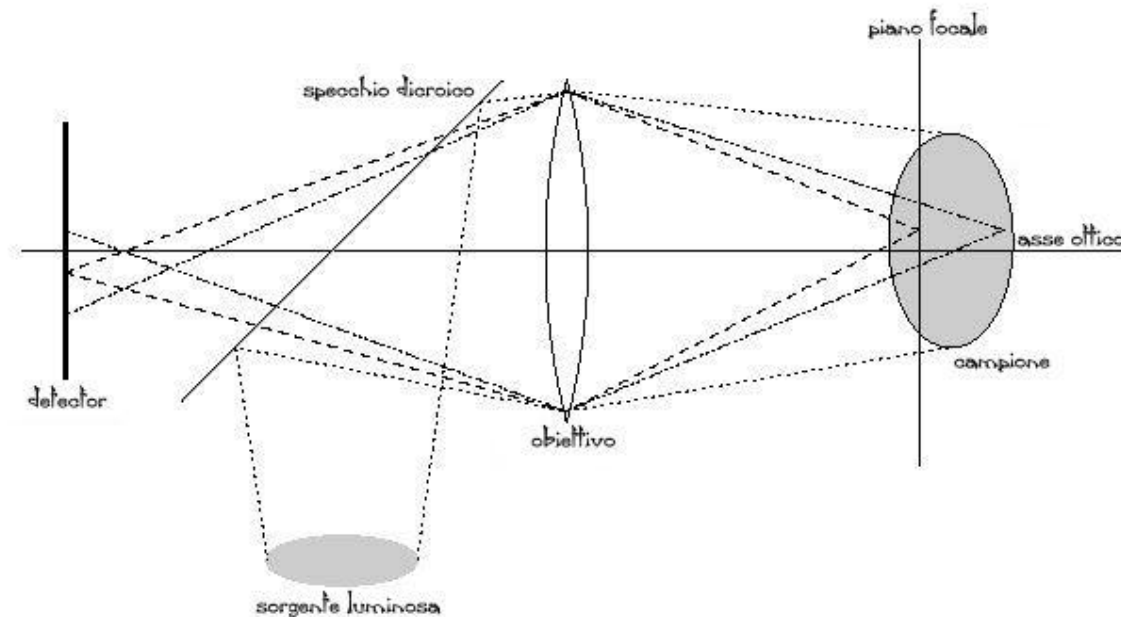
---

<sup>(\*)</sup> L'immagine è stata gentilmente offerta dal Dott. A. Paoletti

## 1.2 Microscopia a fluorescenza

Il microscopio ottico più diffuso è il cosiddetto microscopio a *campo largo*.

In figura 1.2a è riportato uno schema che riassume il principio di funzionamento di un microscopio ottico in fluorescenza.

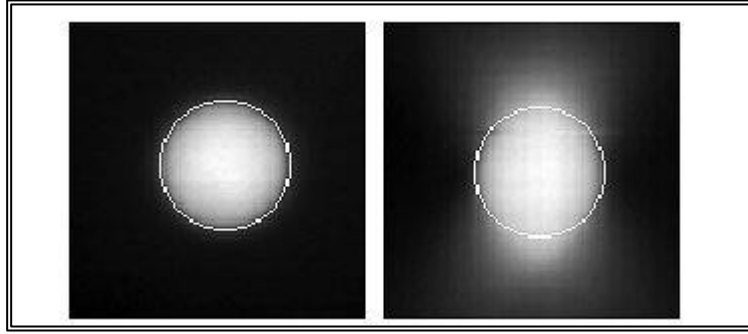


**Fig. 1.2a:** schema esemplificativo del principio di funzionamento di un microscopio a campo largo in fluorescenza. L'emissione luminosa proveniente da un punto nel piano focale viene rappresentata in una zona fortemente localizzata del detector che, in questo caso, presenta una superficie estesa. La radiazione che, viceversa, proviene da un qualsiasi altro punto al di fuori del piano focale viene visualizzata su una più larga regione del detector, producendo così un tipico fenomeno di blurring da sfuocamento. Ogni singola acquisizione consiste così in un'immagine completa dell'oggetto osservato.

Come si vede, il campione è completamente illuminato dalla radiazione d'eccitazione: a seguito di ciò, all'emissione fluorescente proveniente dai punti del piano focale, si sovrappone quella originata da piani non a fuoco, fenomeno, questo, responsabile di quegli indesiderati effetti di sfuocamento che degradano la qualità dell'immagine e riducono l'affidabilità dello strumento in tutti quei procedimenti di misura basati essenzialmente sul sezionamento ottico.

A questo si aggiungono poi gli effetti dovuti alla diffrazione della radiazione luminosa, allo studio dei quali è demandata l'analisi sperimentale e teorica della funzione caratterizzante il microscopio, nota come PSF (*point spread function*) o risposta all'impulso.

Gli effetti pratici di quanto appena detto sono ben visibili in figura 1.2b.



**Fig. 1.2b:** viste della sezione centrale (x-y a sinistra, x-z a destra) di una sfera fluorescente (diametro nominale: 6.42  $\mu\text{m}$ ) acquisita con un microscopio convenzionale. Il bordo segnato in bianco indica il profilo teorico. L'immagine è stata ottenuta con un campionamento assiale di passo 0.225  $\mu\text{m}$ .

L'acquisizione dei contributi dei punti a fuoco e di quelli fuori fuoco ha come effetto quello di limitare notevolmente la risoluzione assiale: l'immagine ottenuta risulta così la combinazione di un profilo netto, nitido, determinato dalla regione 'a fuoco' con una serie di profili scarsamente definiti, rumorosi, frutto dei contributi dei punti fuori fuoco.

Una modello fisicamente convincente in grado di descrivere le proprietà di un sistema ottico (e quindi di rendere, in qualche modo, conto dei suddetti limiti risolutivi) è basato sulla conoscenza della forma analitica della PSF (Hopkins, 1955; Frieden, 1967; Sheppard, 1986; Sheppard and Török, 1997; van der Voort and Brakenhoff, 1990; Visser and Brakenhoff, 1991; Visser and Wiersma, 1994; Diaspro et al., 1999 e altri).

Si consideri un sistema bidimensionale di coordinate  $(x_d, y_d)$  nello spazio dell'immagine ed un equivalente sistema tridimensionale  $(x_o, y_o, z_o)$ , distinto dal precedente, nello spazio del campione. I due sistemi sono tra loro legati dalla seguente relazione funzionale, dipendente dal coefficiente di *magnificazione*  $M$  della lente:

$$x_d = Mx_o \quad (1.2.1)$$

$$y_d = My_o \quad (1.2.2)$$

ove  $z_s$  è lo spostamento assiale del campione durante la scansione.

Assumiamo, quindi, che l'intensità dell'emissione fluorescente sia proporzionale alla densità dell'oggetto (cioè al numero di molecole eccitabili che lo compongono)  $O(x_o, y_o, z_o)$  e all'irraggiamento della radiazione eccitante. Sotto queste ipotesi, si può dimostrare che l'immagine  $I$  del campione osservato è data da contributi, opportunamente pesati, provenienti da tutti i punti:

$$I_{wf}(x_d, y_d, z_s) = \iiint_{-\infty}^{+\infty} H_{em}\left(\frac{x_d}{M} - u, \frac{y_d}{M} - v, w\right) O(u, v, w - z_s) du dv dw \quad (1.2.3)$$

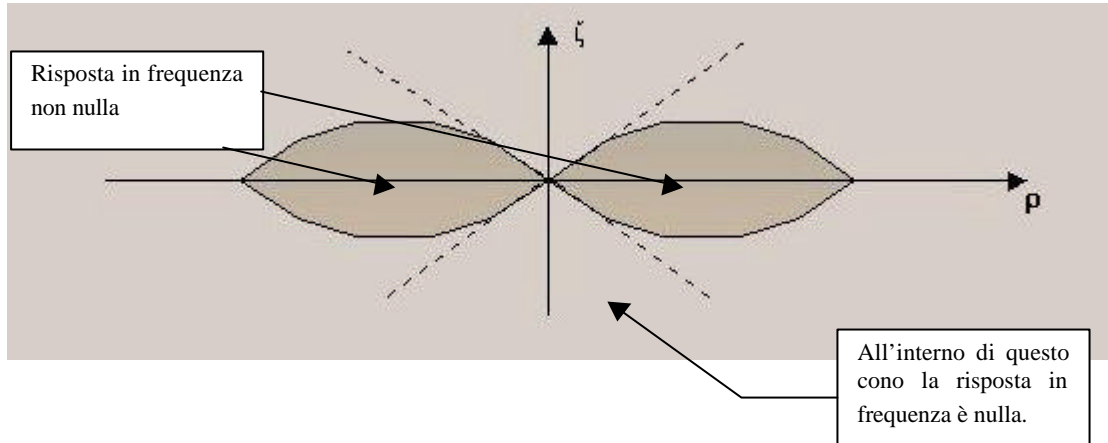
ove  $z_s$  è lo spostamento assiale del campione durante la scansione ed  $H_{em}$  rappresenta la PSF in emissione dell'obiettivo.

Tipicamente, i modelli teorici che vengono considerati nella descrizione di queste problematiche, assumono che la PSF sia spazio-invariante, ossia che non cambi con la posizione. Di fatto, questo non è, in generale, del tutto vero.

In particolare, le aberrazioni introdotte da improvvise discontinuità nell'indice di rifrazione o da sue variazioni all'interno di uno stesso mezzo, possono portare a significativi cambiamenti nell'andamento della PSF quando si effettuino acquisizioni a profondità diverse nel campione (Hell et al., 1993; Sheppard and Török, 1997; Török et al., 1995a,b,c; Visser et al., 1992).

L'ipotesi spazio-invariante, pur nei limiti di applicabilità appena descritti, permette comunque di trarre alcune importanti conclusioni circa i limiti risolutivi del sistema ottico in questione (Bertero e Boccacci, 1998).

In figura 1.2c è rappresentato l'andamento qualitativo della trasformata di Fourier di una PSF teorica, nota come OTF: (*optical transfer function*) relativa proprio ad un microscopio a campo largo.<sup>(1)</sup>



**Fig. 1.2c:** risposta in frequenza di un microscopio a campo largo;  $\zeta=1/z$ ,  $\rho=1/r$ ;

Come si vede, tutte le frequenze al di là di una certa *frequenza di taglio* sono completamente tagliate. In conseguenza di ciò, le alte frequenze non sono trasmesse e questo è, di fatto, un fattore limitante per la risoluzione: in pratica, il valore di taglio costituisce il limite fondamentale oltre il quale nessuna informazione proveniente dal campione viene registrata dal sistema.

Un'espressione matematicamente approssimata di tale frequenza di taglio è presente in letteratura nei lavori di Sheppard (1986) e di Wilson and Tan (1993).

Il fatto che la trasformata di Fourier di un microscopio a campo largo presenti tale 'cono mancante' nello spazio delle frequenze, fa sì che la quantità di informazioni che si può ottenere da un oggetto caratterizzato prevalentemente da frequenze in tale regione, sia spesso insufficiente per un'accurata analisi tridimensionale.

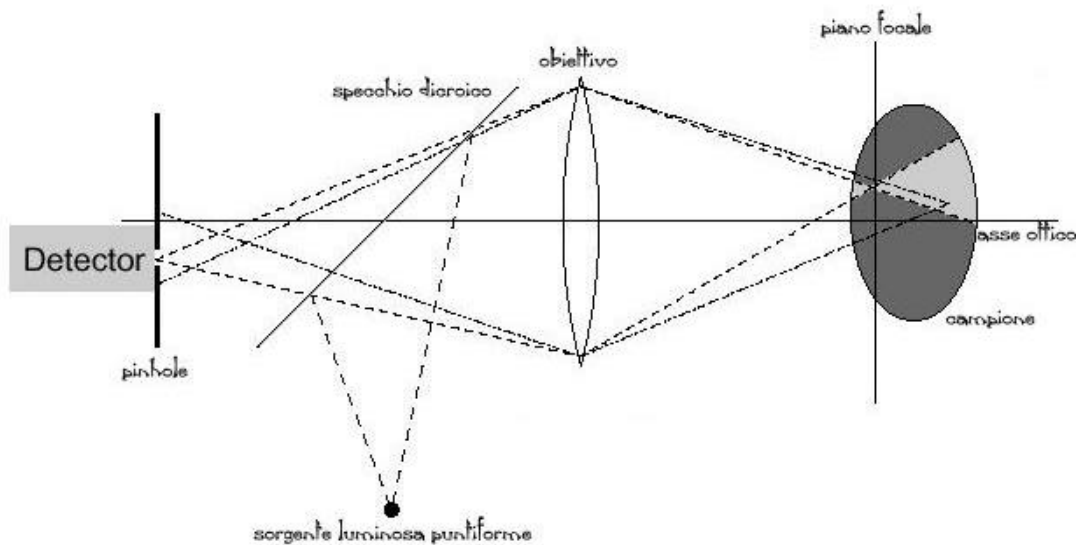
Ecco spiegato il motivo per cui questo tipo di microscopia sia per lo più inadeguata a supportare l'acquisizione tridimensionale di immagini se non a fronte dell'applicazione di algoritmi di calcolo.

<sup>(1)</sup> Vedi paragrafo (2.5.1) e seguenti per una dimostrazione.

### 1.3 Microscopia confocale a fluorescenza

L'architettura confocale è stata, in quest'ambito, concepita proprio per eliminare i contributi luminosi provenienti dalle regioni fuori fuoco e responsabili, come detto, della presenza di un indesiderato 'cono mancante' nella trasformata della risposta del sistema all'impulso.

In figura 1.3a è schematicamente rappresentato il principio fondamentale su cui si basa tutta la microscopia confocale.



**Fig. 1.3a :** Diagramma esemplificativo di un microscopio confocale a fluorescenza. Il campione viene illuminato da una sorgente puntiforme e la radiazione fluorescente originata dal punto considerato sul piano a fuoco attraversa il pinhole ed è raccolta dal detector. I punti che, viceversa, giacciono al di fuori di tale piano, ma entro il cono della luce incidente, emettono a loro volta per fluorescenza, ma tali contributi sono per lo più 'tagliati' dal pinhole stesso, che contribuisce dunque ad eliminare indesiderati fenomeni di blurring. Per come è strutturato questo dispositivo, per ottenere l'immagine 2D completa della sezione a fuoco, occorre scansionarla attraverso il movimento, opportunamente coordinato, del campione o del complesso detector-sorgente luminosa.

Il miglioramento del potere risolutivo assiale è ottenuto, in questo caso, sacrificando l'illuminazione a campo largo in favore di una illuminazione *punto per punto* ottenuta tipicamente focalizzando sulla regione di interesse un raggio laser. Attraverso questo accorgimento, automatizzato nella cosiddetta *procedura di scansione*, è possibile discriminare, a mezzo di un pinhole collocato di fronte al detector, i contributi provenienti da punti a fuoco da quelli originati da punti fuori fuoco.

Occorre inoltre tenere presente che il risultato di tale filtraggio della radiazione fluorescente non può essere raffinato a piacere semplicemente riducendo progressivamente il diametro del pinhole, come potrebbe sembrare ad una analisi superficiale dell'apparato strumentale: le leggi fondamentali dell'ottica limitano, di fatto, la risoluzione assiale, imponendo un limite superiore pari a circa un terzo di quella laterale. Anche in questo caso, come già per la microscopia convenzionale, è possibile ottenere ulteriori informazioni circa il comportamento intrinseco del sistema conoscendone la PSF.

Assumiamo, per semplicità, che la scansione avvenga muovendo il campione e che, per ottenerne l'immagine completa, occorra uno spostamento nelle tre direzioni rispettivamente pari a  $(x_s, y_s, z_s)$ .

Supponiamo inoltre che il pinhole sia descritto, nel piano del detector, da una funzione  $P(x_d, y_d)$  che, per un microscopio confocale ideale, sarà assimilabile ad una funzione delta. Sia quindi  $H_{ex}(x_o, y_o, z_o)$  la PSF in eccitazione dell'obiettivo (che occorre chiamare necessariamente in causa visto che pure la sorgente eccitante è puntiforme).

Con queste notazioni e sotto identiche ipotesi a quelle usate nella trattazione precedente per un microscopio convenzionale, si può dimostrare che il segnale raccolto dal detector è descritto da una funzione del tipo:

$$I_{cf}(x_s, y_s, z_s) = \iint_{-\infty}^{+\infty} P\left(\frac{q}{M}, \frac{r}{M}\right) \iiint_{-\infty}^{+\infty} H_{em}\left(\frac{q}{M} - u, \frac{r}{M} - v, w\right) H_{ex}(u, v, w) \times \quad (1.3.1)$$

$$\times O(u - x_s, v - y_s, w - z_s) du dv dw dq dr = \iint_{-\infty}^{+\infty} H_{cf}(u, v, w) O(u - x_s, v - y_s, w - z_s) du dv dw$$

ove

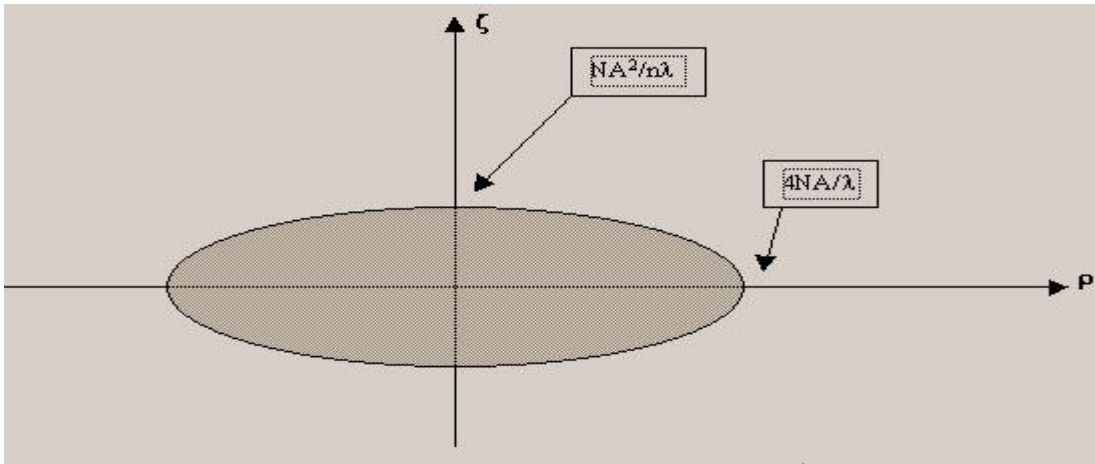
$$H_{cf}(x_o, y_o, z_o) = H_{ex}(x_o, y_o, z_o) \iint_{-\infty}^{+\infty} P\left(\frac{q}{M}, \frac{r}{M}\right) H_{em}\left(\frac{q}{M} - x_o, \frac{r}{M} - y_o, z_o\right) dq dr \quad (1.3.2)$$

La (1.3.1) stabilisce, in pratica, che l'immagine acquisita al microscopio può essere riguardata come una convoluzione tra la funzione densità dell'oggetto  $O(x, y, z)$  e la PSF complessiva del sistema ( $H_{cf}$ ) data dalla (1.3.2):

$$I_{cf} = H_{cf} \otimes O \quad (1.3.3)$$

Nel caso particolare, poi, in cui si abbia a che fare con un microscopio confocale ideale, riducendosi  $P(x_d, y_d)$  ad un impulso di Dirac, la (1.3.2) mostra come la funzione di trasferimento complessiva del sistema si riduce al prodotto della funzione di trasferimento in eccitazione ( $H_{ex}$ ) per quella in emissione ( $H_{em}$ ).

In figura 1.3b è riportato l'andamento qualitativo della OTF di un sistema confocale.<sup>(2)</sup>



**Fig. 1.3b** : risposta in frequenza di un sistema confocale;  $\zeta=1/z$ ,  $\rho=1/r$  ;

<sup>(2)</sup> Vedi paragrafo (2.5.1) e seguenti per una dimostrazione.

Assumendo quindi di essere in condizioni d'idealità, ed utilizzando per ogni singola PSF un andamento analogo a quello visto in precedenza nel caso 'a campo largo', essendo la PSF complessiva prodotto di due PSF (una in emissione ed una in eccitazione), si ha che la corrispondente trasformata di Fourier è data (per la dualità del prodotto di convoluzione) dalla convoluzione delle trasformate di  $H_{ex}$  e di  $H_{em}$ , ossia:

$$\mathfrak{F}(H_{cf}) = \mathfrak{F}(H_{ex}) \otimes \mathfrak{F}(H_{em}) \quad (1.3.4)$$

Questo comporta che, nel caso confocale, la OTF non presenti il 'cono mancante' visto precedentemente (come si vede in figura) e sia non nulla entro un range di frequenze spaziali più ampio. Più precisamente, si può mostrare che essa ha una banda di larghezza doppia rispetto a quella di un microscopio a campo largo, sia in direzione assiale che laterale.

Pertanto, oltre all'eliminazione di gran parte del disturbo prodotto dalle emissioni fuori fuoco, l'architettura confocale presenta una risoluzione doppia rispetto ad un sistema convenzionale, a patto, chiaramente, di definire tale parametro in termini di frequenza di taglio della OTF.

L'assenza del 'cono mancante' garantisce che anche le basse frequenze del campione, in direzione assiale, vengano rilevate, rendendo così possibile un più completo campionamento spaziale dell'oggetto ed una sua più dettagliata ricostruzione 3D.

Nonostante tutto questo, occorre tenere ben presente che la traccia della trasformata di Fourier resta finita anche nel caso confocale: ciò comporta che la risoluzione, come già accennato, resta fondamentalmente limitata e che parte dell'emissione fluorescente, proveniente dalle regioni più prossime al piano di fuoco, viene comunque rilevata dando così origine ad una inevitabile componente di disturbo.

L'alto potere risolutivo raggiunto da un'architettura confocale viene pagato in termini di una maggiore complessità strumentale dell'apparato e di una minore intensità del segnale raccolto. La necessità di compiere una scansione punto per punto del campione, riduce la velocità di acquisizione del sistema e, contemporaneamente, anche il numero di fotoni rilevati per un fissato tempo di esposizione. Dal momento, poi, che molti fotoni sono 'bloccati' dal pinhole, il segnale può risultare debole, se confrontato con quello ottenibile, nelle medesime condizioni sperimentali, nel caso a campo largo.

Per far fronte a questi inconvenienti, vengono tipicamente impiegate, per l'eccitazione, sorgenti in grado di fornire radiazioni luminose di maggiore intensità, spesso accoppiate a tempi di esposizione del detector più lunghi. E' questo, ad esempio, uno dei motivi che sta alla base dell'impiego di sorgenti laser fortemente focalizzate in eccitazione.

Tuttavia, a seguito di ciò, anche se i fotoni provenienti da regioni non a fuoco non vengono rilevati, tali regioni sono investite dalla radiazione eccitante: questo può essere causa di fotodanneggiamento e di fotodecadimento (*photobleaching*) delle molecole fluorescenti.

## 1.4 Importanza dell'uso del laser in microscopia confocale

L'uso di sorgenti laser per l'eccitazione è particolarmente frequente in microscopia confocale poiché queste sono in grado di fornire:

- ✱ una radiazione monocromatica della lunghezza d'onda  $\lambda$  voluta per l'eccitazione di molecole fluorescenti in modo specifico
- ✱ un'intensità luminosa sufficientemente elevata

Generalmente, sono impiegati laser all'argon, caratterizzati da due righe molto intense in corrispondenza di  $\lambda=488\text{nm}$  e  $\lambda=514\text{nm}$  ( blu e blu-verde, rispettivamente).

La riga blu a 488nm corrisponde all'incirca alla lunghezza d'onda ideale d'eccitazione della *fluorescina* e dei suoi derivati, ma funziona bene anche per alcune forme di GFP (*green fluorescent protein*) spostate verso il rosso.

Un altro laser di largo impiego in microscopia confocale è quello elio-neon, caratterizzato da  $\lambda=543\text{nm}$  (verde) e  $\lambda=633\text{nm}$  (rosso). Questi può essere ragionevolmente considerato alternativo a quello argon-krypton perché, pur non essendo i valori delle righe esattamente identici, mantiene distinte le due eccitazioni, ha un consumo in potenza inferiore ed una vita media più lunga.

I laser argon-krypton sono tuttora largamente impiegati, visto che la riga a 567nm è sufficientemente lontana da quella a 488nm da prevenire la sovrapposizione del segnale proveniente da diversi fluorocromi e che quella a 647nm fornisce un'efficiente sorgente d'eccitazione per quei fluorocromi che si eccitano nel giallo o nei pressi del rosso.

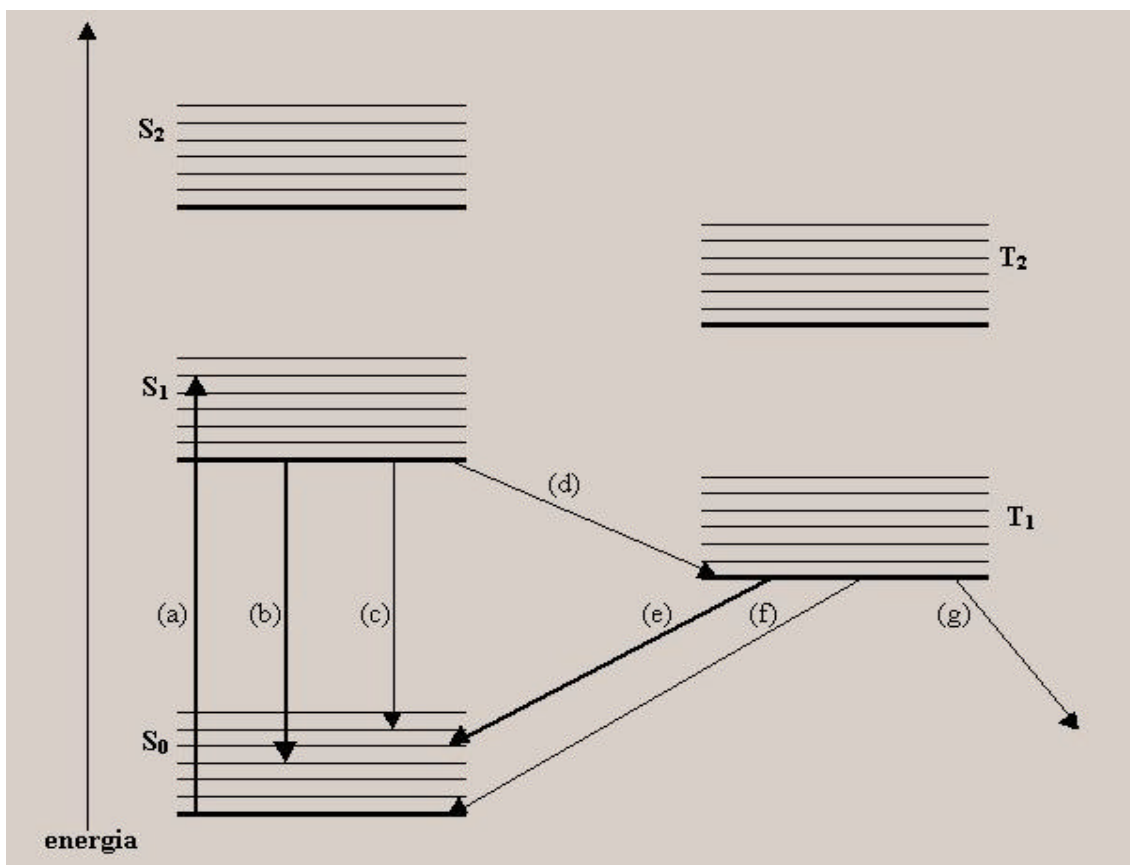
Un ulteriore range dello spettro elettromagnetico di interesse in microscopia confocale è quello del vicino ultravioletto: parecchie sonde fluorescenti impiegate per l'analisi di preparati biologici si eccitano infatti in prossimità di queste lunghezze d'onda.

I laser utilizzati per questo tipo di eccitazione sono molto più potenti (fino a cinque volte) di quelli ad argon. Di fatto, oltre alle due righe molto intense in corrispondenza di 488nm e 514nm, un laser ad argon emette, più debolmente, anche in corrispondenza di 367-368nm. In un laser UV, invece, le linee a 488nm e 514nm sono 'bloccate' e si ha la sola riga nell'ultravioletto.

## 1.5 Dinamica dell'eccitazione fluorescente e fotodecadimento

Nella microscopia a fluorescenza a scansione laser, i coloranti sono spesso esposti a radiazioni eccitanti di forte intensità: a seguito di ciò, l'emissione fluorescente e, con essa, la capacità di imaging dello strumento perdono di efficienza a causa della crescente saturazione delle molecole nello stato eccitato (S. Inoué, 1995).

La configurazione dei livelli energetici caratteristica di un colorante è schematicamente rappresentata in figura 1.5a:



**Fig. 1.5a:** schema dei livelli energetici di un generico colorante organico.

$S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$  rappresentano gli stati di singoletto,  $T_1$ ,  $T_2$  quelli di tripletto. I sottolivelli vibrazionali sono indicati come distinti gli uni dagli altri, anche se, nella realtà, la situazione è più complessa a causa della presenza, ad esempio, di interazioni col solvente. Le linee in grassetto indicano transizioni radiative, le altre transizioni non radiative.

Come si vede, ‘accanto’ alle configurazioni elettroniche di singoletto ( $S_1$ ,  $S_2$ , etc.), lo schema dei livelli prevede la presenza di stati di tripletto ( $T_1$ ,  $T_2$ , etc.) ciascuno dei quali ha energia leggermente inferiore a quella del corrispondente stato di singoletto.

In assenza di una radiazione incidente, questi stati sono popolati in accordo con la statistica di Boltzmann, per cui, a temperatura ambiente, la maggior parte delle molecole si trova nello stato fondamentale. Per effetto dell’assorbimento di un fotone, la cui energia colmi esattamente il gap tra lo stato fondamentale ed uno stato eccitato di singoletto, ciascuna di queste molecole subisce una transizione verso tale stato eccitato.

Si può dimostrare che la frequenza con cui si verifica un tale evento è data (per ciascuna molecola) da:

$$a = \frac{I\sigma}{h\nu} \quad (1.5.1)$$

ove  $I$  ( $\text{W}/\text{cm}^2$ ) è l’intensità della radiazione eccitante,  $\sigma$  ( $\text{cm}^2$ ) è la sezione trasversale d’urto (in generale dipendente dalla lunghezza d’onda  $\lambda$ ) ed  $h\nu$  è l’energia del fotone assorbito.

L’assorbimento di un fotone provoca il passaggio della molecola in uno degli stati vibrazionali all’interno della banda del primo stato eccitato di singoletto ( $S_1$ ) (situazione (a) in figura).

A questo punto, si ha un rilassamento verso il livello vibrazionale più basso: ciò avviene in tempi molto brevi ( $\approx 10^{-12}$  secondi) e non è accompagnato dall’emissione di alcuna radiazione.

Tale perdita di energia è però alla base delle differenze che si riscontrano, in natura, tra lo spettro in eccitazione e quello in emissione dei fluorocromi organici. Si presentano, quindi, diversi modi attraverso i quali la molecola può 'restituire' l'energia immagazzinata. :

- ✖ un'emissione fluorescente (caso (b) in figura) caratterizzata da tempi dell'ordine di  $\tau_f \approx 1-10\text{ns}$ : è questa la condizione preferibile per l'analisi microscopica del campione.
- ✖ un procedimento interno di riconversione non accompagnato da alcuna emissione (caso (c) ).
- ✖ il decadimento temporaneo in uno stato di tripletto  $T_1$  (caso (d)) dovuto all'improvviso ribaltamento dello spin di un elettrone eccitato, al quale fa seguito il rilassamento verso lo stato fondamentale, o per fosforescenza (caso (e)), o per mezzo di una transizione non accompagnata da emissione (caso (f)). Questo procedimento è, usualmente, di diversi ordini di grandezza più lento della semplice emissione fluorescente e può, non di rado, capitare che alcune molecole rimangano 'a lungo' ( $\approx 100\text{ns}$ ) intrappolate nello stato  $T_1$ , riducendo così di fatto l'effettiva concentrazione di materia fluorescente.

Un ultimo (indesiderato) fenomeno che può manifestarsi, è quello legato al *photobleaching* (caso (g) in figura): in tal caso, si ha un irreversibile cambiamento nella natura chimica della sonda, che decade in uno stato di non fluorescenza, limitando così la quantità complessiva di informazione che può essere ricavata dall'acquisizione del campione marcato.

La dinamica dell'emissione fluorescente può essere qualitativamente descritta assumendo, in prima approssimazione, che la frequenza di transizioni da un certo stato ad un altro sia proporzionale alla popolazione del primo stato.

Più precisamente, si può scrivere il seguente sistema di equazioni differenziali:

$$\frac{dN_0}{dt} = N_1(1/\tau_f) - N_0\alpha \quad (1.5.2)$$

$$\frac{dN_1}{dt} = N_0\alpha - N_1(1/\tau_f) \quad (1.5.3)$$

in cui:

- ✓  $N_0$  ed  $N_1$  sono, rispettivamente, la popolazione dello stato fondamentale e quella del primo stato eccitato;
- ✓  $\alpha$  è la frequenza d'eccitazione  $S_0 \Rightarrow S_1$  definita dalla (1.5.1);
- ✓  $1/\tau_f$  è la frequenza di rilassamento dal primo stato di singoletto a quello fondamentale  $S_1 \Rightarrow S_0$ ;

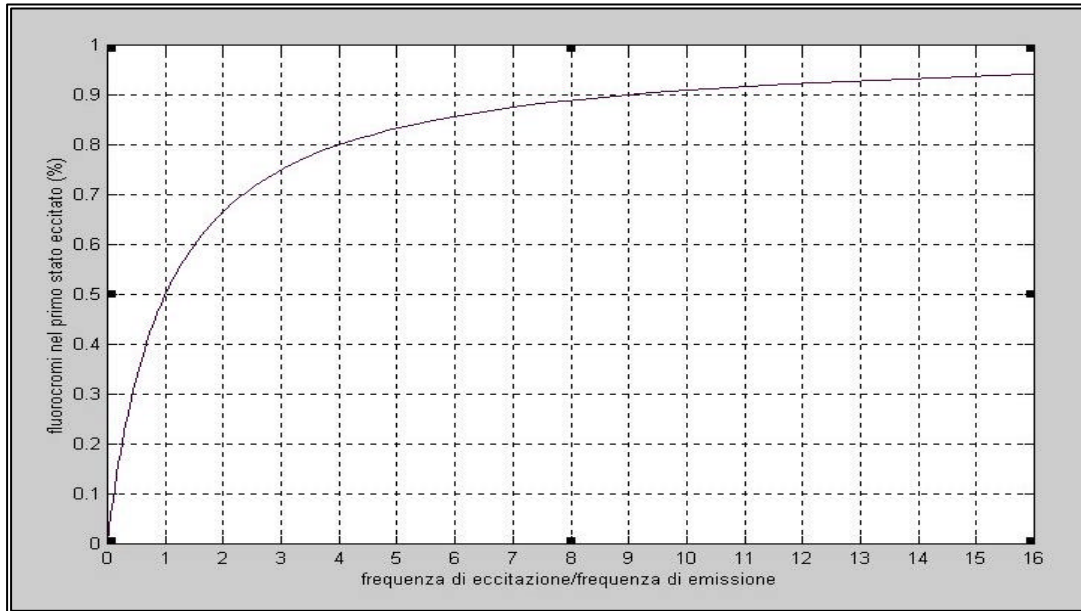
Assumendo che l'intera popolazione molecolare sia inizialmente nello stato fondamentale ( $N_1(0)=0$ ) e normalizzando, per comodità, ad uno il numero di molecole di sonda fluorescente, si ottiene:

$$N_1(t) = \frac{\alpha}{\alpha + 1/\tau_f} (1 - e^{-(\alpha + 1/\tau_f)t}) \quad (1.5.4)$$

Dalla (1.5.4) segue immediatamente che, a regime ( $t \gg \tau_f$ ), la frazione di molecole nello stato fluorescente è data da:

$$N_1 = \frac{a}{a + 1/t_f} = \frac{a t_f}{a t_f + 1} \quad (1.5.5)$$

In figura 1.5b è rappresentato proprio l'andamento di  $N_1$  in funzione di  $\alpha \tau_f$  (frequenza di eccitazione/frequenza di decadimento).



**Fig. 1.5b:** frazione di fluorocromi nel primo stato eccitato in funzione di  $\alpha \tau_f$ .

Si nota che, finché la frequenza d'eccitazione è dello stesso ordine di grandezza di quella di emissione, la frazione di fluorocromi nello stato eccitato cresce linearmente con  $\alpha$  (tratto lineare della curva). Poiché la (1.5.1) lega ( $a$  a parità di condizioni sperimentali)  $\alpha$  ad  $I$  (intensità della radiazione incidente) secondo una relazione lineare, si può concludere che, sotto la suddetta ipotesi, anche  $N_1$  cresce in maniera proporzionale ad  $I$ .

In corrispondenza di  $\alpha \approx 1/\tau_f$ , metà delle molecole si trova nel primo stato eccitato e ci si aspetta che emetta per fluorescenza entro un tempo  $\tau_f$ .

Definiamo, a partire dalla (1.5.1), l'intensità corrispondente ad  $\alpha = 1/\tau_f$  come valore di saturazione ( $I_{sat} = \hbar n / s t_f$ ), numericamente calcolabile dai valori dei parametri relativi alla sonda che si sta impiegando, in generale, reperibili in letteratura.

All'aumentare di  $I$  e quindi, in virtù della (1.5.1), di  $\alpha$ , aumenta chiaramente anche  $N_1$ . Questo, però, non si riflette necessariamente in un guadagno della qualità dell'immagine: aumentando, ad esempio, l'intensità  $I$  di un fattore 5 rispetto ad  $I_{sat}$ , si ha un incremento del segnale proveniente dal volume in prossimità del fuoco del 33% (come si può estrapolare dall'andamento della curva), ma, contemporaneamente, il segnale di background prodotto dalle regioni fuori fuoco può crescere anche di 5 volte il suo valore corrente, con il risultato di una netta diminuzione del contrasto dell'immagine, quantificabile in una diminuzione del 75% del rapporto segnale-background ( $R_{S/B}$ ) e quindi del contrasto dell'immagine. In pratica, questo fenomeno (noto come *saturazione*) si manifesta quando il flusso della radiazione incidente è così intenso che, in un qualunque istante, un numero consistente di molecole fluorescenti si trova già nello stato eccitato: queste, allora, non assorbono più fotoni all'usuale lunghezza d'onda  $\lambda$ , con il risultato che si ha una diminuzione dell'effettiva concentrazione di sonda e,

quindi, dell'efficienza, a parità di altre condizioni sperimentali, del procedimento di imaging in corso.

Questo non è il solo effetto 'spiacevole' della saturazione: infatti, in tali condizioni, viene anche alterata la dimensione e la forma dello spot laser focalizzato, cosa questa che si riflette in una diminuzione della risoluzione spaziale. Ecco allora spiegato perché la saturazione degli stati eccitati va quindi evitata, onde pervenire ad una migliore risoluzione dello strumento ed a migliori rapporti segnale-rumore ( $R_{S/N}$ ) e segnale-background ( $R_{S/B}$ ).

## 1.6 Effetti dovuti alla natura quantistica della luce

Occupandoci, nel paragrafo precedente, della dinamica dell'eccitazione fluorescente, è emerso un primo indesiderato fenomeno (quello della saturazione) legato intrinsecamente alla particolare natura fisica dei meccanismi coinvolti.

Questo non è, tuttavia, il solo fattore limitante in cui ci si imbatte operando nell'ambito della microscopia confocale a fluorescenza.

Occorre infatti tenere presente che, ogni acquisizione, sebbene visualizzata sotto forma di immagine, consiste, in realtà, in un set di valori d'intensità, direttamente collegati alla concentrazione di materiale fluorescente entro il campione.

I limiti fondamentali di una simile procedura sperimentale sono quantificabili, non solo chiamando in causa fenomeni di fotodanneggiamento (photobleaching, saturazione) come visto precedentemente, ma soprattutto tenendo anche in qualche modo conto delle problematiche connesse alla valutazione di ogni singolo valore d'intensità.

Per fare ciò, è bene rifarsi alla natura quantistica della radiazione luminosa, visto che si ha essenzialmente a che fare con la valutazione dell'incertezza nel conteggio di eventi quantistici, spesso indicata come fonte intrinseca di rumore.

Di fatto, la produzione di fotoni da parte di una qualsiasi sorgente, sia essa quella che fornisce il laser per l'eccitazione o il campione stesso che emette per fluorescenza, è assimilabile ad un processo statisticamente regolato dalle leggi della fisica quantistica.

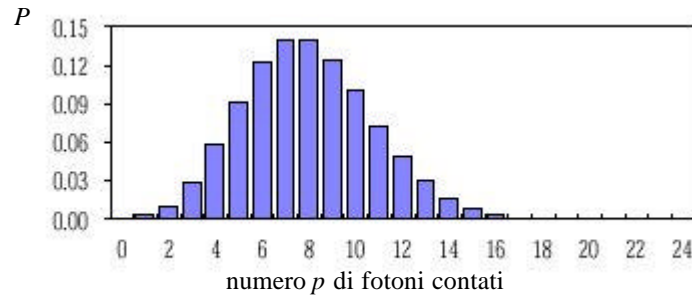
In particolare, è possibile mostrare che, in una sorgente che emetta fotoni ad intervalli di tempo *casuali*, il numero di fotoni contati entro un fissato tempo  $T$  è una variabile che obbedisce alla statistica di Poisson.

Più precisamente, la probabilità  $P$  di avere  $p$  conteggi entro  $T$  è espressa da una relazione del tipo:

$$P(p, \mathbf{r}T) = \frac{(\mathbf{r}T)^p e^{-\mathbf{r}T}}{p!} \quad (1.6.1)$$

ove  $\mathbf{r}T$  è un valore positivo, costante che rappresenta il *valore atteso* nel conteggio (*valor medio*).

In figura è data rappresentazione dell'andamento della (1.6.1) in un caso particolare ( $\mathbf{r}T = 8$ ).



**Fig. 1.6a** distribuzione di Poisson nel caso di  $rT=8$

Questo significa che, eseguendo ripetutamente il conteggio del numero  $p$  di fotoni emessi in un intervallo di tempo  $T$  da una certa porzione del campione e trovando per esso un valor medio  $rT$ , la probabilità che  $p$  cada entro  $[rT - (rT)^{1/2}, rT + (rT)^{1/2}]$  è solo del 63%. E' quindi chiaro che gli effetti sfavorevoli di una tale limitazione sono maggiormente evidenti in esperimenti a basso livello d'intensità, nei quali il minore numero di fotoni in gioco causa, per quanto appena detto, una maggiore fluttuazione del valore d'intensità rilevato. Per contro, il tentativo di rendere più precisa una simile misura semplicemente aumentando l'intensità d'eccitazione (e quindi, potenzialmente, il numero di fotoni in emissione) si rivela spesso del tutto sterile, visto che vengono contemporaneamente chiamati in causa altri non meno indesiderati fenomeni quali il fotodanneggiamento (di cui si è detto nel paragrafo precedente), che possono falsare completamente l'acquisizione in corso.

E' per questo che, per quel che riguarda l'incertezza introdotta dal *photon counting*, si parla spesso di sorgente *intrinseca* di rumore statistico, in contrapposizione ad altri tipi di sorgenti (dette *estrinseche*) che stanno, ad esempio, alla base della *dark-current* introdotta dai detector o di altri fenomeni rumorosi caratteristici dell'elettronica impiegata: in questi casi, infatti, si può sperare di limitare gli effetti indesiderati attraverso un 'semplice' miglioramento tecnologico, che nulla ha a che vedere con il cosiddetto *fatto di natura*, di fronte al quale solo soluzioni di compromesso sembrano fisicamente accettabili.

Per questo, un'efficiente architettura confocale a fluorescenza deve essere concepita in modo da eliminare al meglio i contributi portati dalle varie sorgenti estrinseche, così da assicurare che, all'interno del segnale acquisito, vi sia il massimo contributo dei fotoni disponibili: in tal senso, vari studi presenti in letteratura, mostrano proprio come l'impiego di moderne fotocamere e PMT risponda di fatto a questa esigenza, essendo tali dispositivi, essenzialmente *photon-limited*.

## 1.7 Potere risolutivo di un microscopio confocale

Prima di procedere in una più dettagliata analisi del procedimento di formazione delle immagini (capitolo 2), è opportuno soffermarsi su alcuni parametri fondamentali caratteristici di qualsiasi sistema ottico: *risoluzione laterale*, *risoluzione assiale* e *profondità di campo*.

E' noto, infatti, che, a causa di fenomeni di diffrazione, il potere risolutivo di un qualsiasi strumento che faccia uso di componenti ottiche non può essere arbitrario: non esiste però, in quest'ambito, un unico criterio possibile per stabilire la risoluzione dello strumento che si impiega.

Per quello che riguarda la *risoluzione laterale*, un metodo di largo uso è il cosiddetto *criterio di Rayleigh* definito, sostanzialmente, a partire dall'immagine di un oggetto puntiforme luminoso *infinitamente piccolo*, che *non* è di per sé infinitamente piccola, ma si presenta, a causa della diffrazione appunto, caratterizzata da un disco centrale molto luminoso (noto col nome di *disco di Airy*) attorniato da una successione di cerchi concentrici a contrasto decrescente, alternamente luminosi e bui. A partire dal valore del raggio di tale disco centrale, esprimibile, nello *spazio del campione* come:

$$r_{Airy} = 0.61 \frac{I_0}{NA_{obb.}^{(1)}} \quad (1.7.1)$$

si stabilisce che le figure di due punti ugualmente luminosi, separati da una distanza  $d$  nello *spazio del campione* sono risolte se  $d > r_{Airy}$ .

Alla base di questo criterio sta l'ipotesi che le due sorgenti puntiformi irraggino in modo incoerente. In caso contrario, è necessario riferirsi alla distribuzione delle ampiezze piuttosto che a quella delle intensità, cosa, questa, che comporta una generale diminuzione del potere risolutivo.

E' chiaro che, nel definire la (1.7.1) si è fatta la tacita assunzione che la lente dell'obiettivo sia tale da permettere una formazione di immagini priva di aberrazioni ottiche significative, requisito cui soddisfano le ottiche di ultima generazione.

Quanto si è detto vale, in generale, nel caso in cui l'oggetto sia osservato in microscopia a campo largo: quando, viceversa, il campo di vista diviene estremamente ridotto, come è il caso della microscopia confocale, la risoluzione di fatto aumenta.

Come verrà mostrato nel paragrafo 2.4 (in cui si è graficato proprio l'andamento dell'intensità della risposta all'impulso nel piano focale), si può pervenire ad un miglioramento teorico di un fattore 1.4.

Per definire la *risoluzione assiale*, si è soliti ricorrere alla figura di diffrazione tridimensionale di una sorgente puntiforme, formata nei pressi del piano di fuoco.

Così come per la risoluzione laterale si era fatto uso della sezione trasversale della figura di diffrazione 3D (sezione 'a fuoco'), analogamente si può ripetere il ragionamento andando a misurare la distanza dal primo minimo d'intensità, a partire dal piano di fuoco. Questo porta a definire la:

$$z_{min} = \frac{2I_0 n}{(NA_{obb.})^2} \quad (1.7.2)$$

---

<sup>(1)</sup> l'apertura numerica (NA, *numerical aperture*) dell'obiettivo è definita come  $NA_{obb.} = n \sin \alpha$  ove  $\alpha$  è la semiapertura angolare della lente dell'obiettivo ed  $n$  l'indice di rifrazione del mezzo di immersione tra campione ed obiettivo.

Si può allora considerare  $z_{min}$  come la misura del limite di risoluzione assiale dello strumento. Come si vede, a differenza di  $r_{Airy}$ ,  $z_{min}$  è inversamente proporzionale al quadrato di  $NA_{obb.}$ . Questo comporta un rapporto tra risoluzione laterale ed assiale pari a:

$$\frac{z_{min}}{r_{Airy}} = \frac{3.28n}{NA_{obb.}} \quad (1.7.3)$$

valore, questo, essenzialmente maggiore di uno ed inversamente proporzionale all'apertura numerica dell'obbiettivo.

Attraverso considerazioni del tutto analoghe a quelle per la risoluzione laterale, è possibile mostrare che si ha, anche in questo caso, un miglioramento in ambito confocale rispetto a quello convenzionale.

Un altro criterio di valutazione della risoluzione laterale (assiale) dello strumento è quello basato sulla misura dell'ampiezza a metà altezza della PSF a partire dal suo profilo laterale (assiale).

Questo procedimento si discosta da quello descritto precedentemente perché non ci si riferisce più direttamente all'immagine di *due* punti, bensì della *singola* risposta all'impulso del sistema. I vantaggi di un tale approccio risiedono nella possibilità di confrontare agevolmente le prestazioni di strumenti diversi 'semplicemente' a partire dalla valutazione della loro funzione di trasferimento. Naturalmente, da un punto di vista strettamente matematico, esiste la difficoltà di ricavare un'espressione teorica della PSF del sistema, che, come verrà discusso ampiamente nel capitolo successivo, è onerosa non solo da un punto di vista computazionale.

Per contro, un approccio squisitamente sperimentale al problema, permette di ottenere risultati soddisfacenti, che confermano i diversi modelli (tutti tra loro in qualche modo simili) presenti in letteratura circa la stesura di un modello teorico, il più possibile accurato, per la PSF. Per quel che riguarda la *profondità di campo* di un microscopio, essa è definita come la profondità dell'immagine (valutata lungo l'asse ottico del sistema e convertita nello spazio del campione) visibile nitidamente in una ben precisa posizione del piano a fuoco.

In microscopia ottica, tale quantità dovrebbe essere, in teoria, approssimativamente uguale alla risoluzione assiale: di fatto tale condizione non è nella pratica verificata a causa di contaminazioni rumorose di varia natura di cui non si tiene solitamente conto nel modello teorico.

Quando il rivelatore può essere considerato infinitamente sottile e costituito da elementi risolutivi spaziali sufficientemente in modo da soddisfare il *teorema di Shannon*, si può considerare solamente la profondità di campo legata al limite di Rayleigh:

$$d_{campo} = \frac{z_{min+} - z_{min-}}{4} \quad (1.7.4)$$

nella quale  $z_{min+}$  e  $z_{min-}$  rappresentano, rispettivamente, le distanze tra il primo minimo assiale al di sopra ed al di sotto del massimo centrale della figura tridimensionale di Airy, opportunamente convertite nello spazio del campione.

Nella microscopia a fluorescenza e in quella a campo scuro, la luce di eccitazione che contribuisce ad ogni punto dell'immagine finale produce un'intensità non trascurabile all'interno di un cono che si estende significativamente sopra e sotto la regione di fuoco. In questo modo, gli oggetti fuori fuoco determinano degli indesiderati contributi che vengono rilevati dall'obbiettivo, riducendo, così, il contrasto del segnale nella zona a fuoco. Per queste ragioni, può essere difficile misurare la profondità di campo nelle convenzionali tecniche di microscopia a fluorescenza e in campo scuro. In altri termini, si può affermare che, qualora gli oggetti osservati con queste tecniche convenzionali non siano infinitamente sottili, la profondità di campo è molto più grande della risoluzione assiale. Tali contributi luminosi indesiderati sono

proprio ciò che un'architettura confocale cerca di eliminare, permettendo, così, esclusivamente l'osservazione di quegli oggetti fluorescenti che si trovano nell'ambito della profondità di campo attesa, il cui spessore è dato dalla risoluzione assiale del microscopio.

## CAPITOLO 2

### Analisi teorica del procedimento di formazione delle immagini

*V*ediamo ora come sia possibile descrivere il procedimento di formazione delle immagini in un microscopio a fluorescenza basandosi sulla natura quantistica della radiazione luminosa: questo ci permetterà, in particolare, di ricavare un'espressione per la risoluzione dello strumento e di discutere sotto quali ipotesi esso possa, ragionevolmente, essere considerato come lineare e spazio invariante (LSI), ipotesi, questa, che sta, fra l'altro, alla base di tutti gli algoritmi sviluppati per l'analisi e la ricostruzione delle immagini acquisite.

Analizzeremo, innanzi tutto, alla luce della teoria della diffrazione, il caso di un generico microscopio a fluorescenza, munito di un'apertura di dimensioni finite sia di fronte alla sorgente di illuminazione che al detector. Il caso confocale, di più diretto interesse, sarà quindi ottenuto come caso particolare.

## 2.1 Sistema ottico e sistemi LSI

Come è noto, la luce può essere trattata come una perturbazione elettromagnetica governata dalle leggi di Maxwell. Tuttavia, sebbene le proprietà di un sistema ottico possano essere formulate nell'ambito di una tale teoria, non si dispone di sensori in grado di misurare ampiezza e fase della radiazione in esame: la grandezza che, tipicamente, viene misurata attraverso un comune detector è l'*intensità* della radiazione incidente, matematicamente definita come:

$$I(x) = \langle |U(x,t)|^2 \rangle \quad (2.1.1)$$

ove  $U(x,t)$  rappresenta la componente della perturbazione elettromagnetica considerata ed il simbolo  $\langle \cdot \rangle$  indica l'operatore di media rispetto al tempo  $t$ .

A questo punto, prima di addentrarci nel calcolo formale della risposta all'impulso di un sistema ottico, è bene mostrare la bontà della approssimazione LSI, di cui si è già detto in precedenza e che tornerà utile in tutta la trattazione del procedimento di formazione delle immagini.

Un sistema ottico è detto *spazio invariante* se l'immagine di una sorgente puntiforme cambia solo di posizione e non di forma a seguito di uno spostamento della sorgente nello spazio del campione.

Definiamo *impulso unitario*  $d$  una funzione che abbia la seguente forma:

$$\delta(x,y,z) = \delta(x)\delta(y)\delta(z) \quad (2.1.2)$$

in cui:

$$\delta(x)=0 \quad \forall x \neq 0 \quad (2.1.3)$$

$$\int \delta(x) dx = 1 \quad (2.1.4)$$

ev.  $y, z$ .

Sia  $h_{\xi,\eta,\zeta}(x,y,z)$  la risposta del sistema ad un impulso unitario di tale tipo situato in  $(\xi,\eta,\zeta)$ . Formalmente, allora, la proprietà d'invarianza traslazionale implica che la  $h_{\xi,\eta,\zeta}(x,y,z)$  abbia una dipendenza funzionale dalle distanze  $(x-\xi)$ ,  $(y-\eta)$ ,  $(z-\zeta)$  del tipo :

$$h_{\xi,\eta,\zeta}(x,y,z) = h(x-\xi, y-\eta, z-\zeta) \quad (2.1.5)$$

ossia che, al variare della posizione  $(\xi,\eta,\zeta)$  della sorgente, la risposta del sistema non muti la propria forma analitica, ma semplicemente subisca una traslazione.

Dalla teoria generale per i sistemi LSI si ha che *la risposta del sistema è data dalla convoluzione dell'ingresso con la funzione di risposta all'impulso*, ossia, nel caso di un sistema ottico lineare e spazio invariante, l'immagine  $g(x,y,z)$  di un oggetto  $f(x,y,z)$  verifica la seguente relazione integrale:

$$g(x,y,z) = \int d\xi d\eta d\zeta h(x-\xi, y-\eta, z-\zeta) f(\xi,\eta,\zeta) \quad (2.1.6)$$

ovvero, più sinteticamente :

$$g(x,y,z) = h(x,y,z) \otimes f(x,y,z) \quad (2.1.7)$$

In pratica, un sistema ottico reale è raramente spazio invariante su tutto lo spazio del campione, ma questa 'difficoltà' può venire superata, almeno da un punto di vista teorico, suddividendo il campione in regioni più piccole, per le quali la suddetta ipotesi sia verificata.

Di fatto, come verrà discusso nel dettaglio in seguito, un ulteriore ostacolo a questa impostazione del problema viene imposto dalle proprietà di magnificazione del sistema, che

rendono più delicata una sua completa formalizzazione matematica. Assumiamo, comunque, di trascurare, almeno a questo livello del discorso, tale ulteriore complicazione, che verrà successivamente introdotta in un paragrafo a parte sull'argomento.

Per poter far uso delle (2.1.6) ed (2.1.7), occorre, però, ancora mostrare quali siano i requisiti fisici per essere in ipotesi di *linearità*.

Tale richiesta implica, formalmente, che una combinazione lineare di funzioni eccitazioni in ingresso si traduca in una combinazione lineare di risposte in uscita, ossia, scrivendo la cosa in termini di intensità si ha, per un sistema ottico, la seguente relazione:

$$\langle |aU(x_1) + bU(x_2)|^2 \rangle = |a|^2 I(x_1) + |b|^2 I(x_2) \quad a, b \in \mathbb{C} \quad (2.1.8)$$

nella quale :

$$\langle U(x_1)^* U(x_2) \rangle = 0 \quad (2.1.9)$$

proprio in virtù della linearità, che implica l'assenza di termini di grado superiore al primo e quindi anche di termini incrociati.

La (2.1.9) richiede, in pratica, l'*incoerenza* tra le emissioni provenienti da punti distinti del campione: questa è un'assunzione *fisicamente sensata* visto che, tra le radiazioni provenienti da molecole diverse in uno stesso campione fluorescente, non esistono *fisse relazioni di fase* e ciò è sufficiente a garantirne l'incoerenza.

## 2.2 Magnificazione

Vediamo ora come affrontare il problema, precedentemente accennato, legato alle proprietà di magnificazione di una lente.

Nell'ambito dell'ottica geometrica (Young, 1989; Tao & Nicholson, 1995; Goodman, 1968) è possibile dimostrare che la relazione che lega un oggetto  $f(x, y, z)$  alla sua immagine  $g(x, y, z)$  è data da :

$$g(x, y, z) = \frac{1}{M^4} f\left(\frac{x}{M}, \frac{y}{M}, \frac{z}{M^2}\right) \quad (2.2.1)$$

Questo fatto comporta che tale proprietà della lente (legata alla magnificazione) sia descritta dalla seguente risposta all'impulso:

$$h_{x,h,z}(x, y, z) = \frac{1}{M^4} d\left(\mathbf{x} - \frac{x}{M}, \mathbf{h} - \frac{y}{M}, \mathbf{z} - \frac{z}{M^2}\right) \quad (2.2.2)$$

Tale funzione è chiaramente non spazio invariante.

D'altra parte, poiché l'ottica geometrica non prevede effetti di diffrazione, una più completa descrizione del sistema può essere ottenuta combinando tra loro le due funzioni di trasferimento (quella data dalla (2.2.2) e quella che verrà ricavata nel paragrafo successivo e legata a fenomeni di diffrazione).

Per fare questo, occorre esprimere la relazione tra  $f$  e  $g$  (data dalle sole proprietà di magnificazione) attraverso una convoluzione, ad esempio introducendo le seguenti coordinate normalizzate:

$$\tilde{\mathbf{x}} = M\mathbf{x} \quad \tilde{\mathbf{h}} = M\mathbf{h} \quad \tilde{\mathbf{z}} = M^2\mathbf{z} \quad (2.2.3)$$

Con questa notazione, l'immagine ottenuta (tenendo conto sia della diffrazione che della magnificazione della lente) può essere riscritta nella forma:

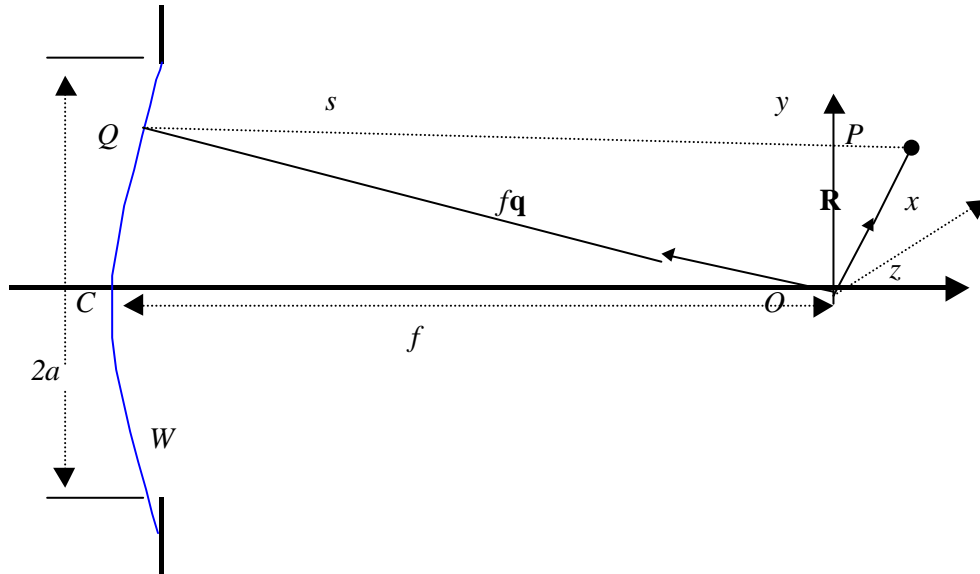
$$g(x, y, z) = h(\tilde{x}, \tilde{y}, \tilde{z}) \otimes f(\tilde{x}, \tilde{y}, \tilde{z}) \quad (2.2.4)$$

ove  $h$  è la funzione di trasferimento della lente legata alla diffrazione (che verrà ricavata nel paragrafo successivo) e le coordinate utilizzate sono quelle normalizzate in perfetta analogia con la (2.2.3).

Nella trattazione che segue, non si farà più riferimento alla magnificazione (intendendo, con questo,  $M=1$ ). I risultati ottenuti potranno, all'occorrenza, essere generalizzati al caso  $M \neq 1$  semplicemente attraverso un cambio di coordinate del tipo espresso in (2.2.3).

### 2.3 Calcolo formale della PSF

Sia  $W$  un fronte d'onda sferico, monocromatico, focalizzato, attraverso un'opportuna apertura circolare di diametro  $2a$ , in un punto  $O$  dell'asse ottico  $z$  (figura 2.3a).



**Fig.2.3a**

Siano  $U(P)$  la perturbazione elettromagnetica prodotta in un punto  $P$  nei pressi di  $O$  ed  $\mathbf{R}$  il raggio vettore spiccato da  $O$  che individua la posizione di  $P$ . Assumiamo che, tanto la distanza  $R = OP$  quanto il raggio  $a$  ( $\gg \lambda$ ) dell'apertura circolare siano piccoli rispetto al raggio  $f = CO$  del fronte d'onda  $W$ .

Indicata con  $s$  la distanza tra il punto-campo  $P$  ed un punto  $Q$  su  $W$ , se  $A/f$  è l'ampiezza dell'onda incidente in  $Q$ , allora, applicando il *principio di Huygens-Fresnel*, si perviene alla seguente espressione per  $U(P)$  (Born and Wolf, 1999):

$$U(P) = -\frac{iAe^{-ikf}}{f} \iint_W \frac{e^{iks}}{s} dS \quad (2.3.1)$$

nella quale, per piccoli angoli, si è trascurata la variazione del fattore d'inclinazione sul fronte d'onda.

Essendo poi  $\mathbf{q}$  il versore nella direzione OQ, si ha, con buona approssimazione

$$s - f \gg -\mathbf{q} \cdot \mathbf{R} \quad (2.3.2)$$

D'altra parte, detto  $d\mathbf{W}$  l'elemento di angolo solido associato a  $dS$ , si può scrivere

$$dS = f^2 d\mathbf{W} \quad (2.3.3)$$

Rimpiazzando, quindi,  $s$  con  $f$  al denominatore della funzione integranda, senza introdurre con questo un apprezzabile errore, l'equazione (2.3.1) assume l'espressione nota con il nome di *integrale di Debye*

$$U(P) = -\frac{iA}{I} \iint_{\Omega} e^{-ik\mathbf{q} \cdot \mathbf{R}} d\Omega \quad (2.3.4)$$

nella quale l'integrazione è estesa a tutto l'angolo solido sotteso dall'apertura.

Prima di procedere nel calcolo formale dell'integrale, vale la pena notare che, essendo la (2.3.4) costituita dalla sovrapposizione di soluzioni elementari (onde piane) dell'equazione delle onde, essa ne rappresenta una soluzione rigorosa che, nel limite di  $f \gg \lambda$ , è valida in tutto lo spazio. D'altra parte, però, la (2.3.4) non è soluzione rigorosa del problema originario, visto che, per arrivare ad essa, non è stata introdotta alcuna ipotesi specifica sulla natura dello schermo, assumendo, come condizioni agli estremi, quelle date dalla teoria di Kirchhoff sulla diffrazione.

Di fatto, una deduzione formalmente più completa richiederebbe anche di tenere conto dei contributi delle onde piane che si propagano in tutte le possibili direzioni. Tuttavia, se  $f \gg a \gg \lambda$  e se  $a^2/\lambda f \gg \lambda$ , si può dimostrare che l'integrale di Debye dà una buona descrizione della distribuzione del campo nei pressi della regione di fuoco.

Per valutare la (2.3.4) è innanzi tutto conveniente esprimere l'integranda in una forma più esplicita. Sia dato un sistema di assi cartesiani come in figura 2.3a, e siano  $(x, y, z)$  le coordinate di  $P$  e  $(\mathbf{x}, \mathbf{h}, \mathbf{z})$  quelle di  $Q$ .

Introduciamo la seguente trasformazione di coordinate:

$$\begin{aligned} \mathbf{x} &= a\mathbf{r} \sin \mathbf{q} & x &= r \sin \mathbf{y} \\ \mathbf{h} &= a\mathbf{r} \cos \mathbf{q} & y &= r \cos \mathbf{y} \end{aligned}$$

Poiché  $Q$  giace su un fronte d'onda sferico, vale la:

$$\mathbf{z} = -\sqrt{f^2 - a^2 \mathbf{r}^2} = -f \left[ 1 - \frac{a^2 \mathbf{r}^2}{2f^2} + \dots \right] \quad (2.3.5)$$

Alla luce della (2.3.5) è quindi possibile scrivere:

$$\mathbf{q} \cdot \mathbf{R} = \frac{x\mathbf{x} + y\mathbf{h} + z\mathbf{z}}{f} = \frac{a\mathbf{r} \cos(\mathbf{q} - \mathbf{y})}{f} - z \left[ 1 - \frac{a^2 \mathbf{r}^2}{2f^2} + \dots \right] \quad (2.3.6)$$

E' utile, a questo punto, introdurre le seguenti variabili adimensionali  $(u, v)$  che, insieme a  $\mathbf{y}$ , specificano la posizione di  $P$ :

$$u = \frac{2\mathbf{p}}{\mathbf{I}} \left( \frac{a}{\mathbf{I}} \right)^2 z \quad (2.3.7)$$

$$v = \frac{2\mathbf{p}}{\mathbf{I}} \left( \frac{a}{f} \right) r = \frac{2\mathbf{p}}{\mathbf{I}} \frac{a}{f} \sqrt{x^2 + y^2}$$

Dalla (2.3.6) e (2.3.7) segue che, se i termini di grado superiore al secondo in  $a\mathbf{r}/f$  sono trascurabili rispetto ad uno, si ha:

$$k\mathbf{q} \cdot \mathbf{R} = v\mathbf{r} \cos(\mathbf{q} - \mathbf{y}) - \left( \frac{f}{a} \right)^2 u + \frac{u\mathbf{r}^2}{2} \quad (2.3.8)$$

Inoltre, l'elemento di angolo solido è dato, a partire dalla (2.3.3) da:

$$d\Omega = \frac{dS}{f^2} = \frac{a^2 \mathbf{r} d\mathbf{r} d\mathbf{q}}{f^2} \quad (2.3.9)$$

Facendo uso di queste relazioni, la (2.3.4) può essere riscritta come:

$$U(P) = -\frac{ia^2 A}{\mathbf{I} f^2} e^{i(f/a)^2 u} \int_0^1 \int_0^{2\pi} e^{-i[v\mathbf{r} \cos(\mathbf{q} - \mathbf{y}) + 0.5u\mathbf{r}^2]} \mathbf{r} d\mathbf{r} d\mathbf{q} \quad (2.3.10)$$

Ricordando la rappresentazione integrale delle *funzioni di Bessel*<sup>(1)</sup> si ottiene la seguente forma più compatta:

$$U(P) = -2\mathbf{p} \frac{ia^2 A}{\mathbf{I} f^2} e^{i(f/a)^2 u} \int_0^1 J_0(v\mathbf{r}) e^{-0.5iu\mathbf{r}^2} \mathbf{r} d\mathbf{r} \quad (2.3.11)$$

E' conveniente, a questo punto, separare la parte immaginaria e quella reale dell'integrale:

$$2 \int_0^1 J_0(v\mathbf{r}) e^{-0.5iu\mathbf{r}^2} \mathbf{r} d\mathbf{r} = C(u, v) - iS(u, v) \quad (2.3.12)$$

$$C(u, v) = 2 \int_0^1 J_0(v\mathbf{r}) \cos(0.5u\mathbf{r}^2) \mathbf{r} d\mathbf{r} \quad (2.3.12a)$$

$$S(u, v) = 2 \int_0^1 J_0(v\mathbf{r}) \sin(0.5u\mathbf{r}^2) \mathbf{r} d\mathbf{r} \quad (2.3.12b)$$

Questi integrali possono essere più facilmente maneggiati se riscritti in termini delle *funzioni di Lommel* definite come:

$$U_n(u, v) = \sum_{s=0}^{\infty} (-1)^s \left( \frac{u}{v} \right)^{n+2s} J_{n+2s}(v) \quad (2.3.13a)$$

$$V_n(u, v) = \sum_{s=0}^{\infty} (-1)^s \left( \frac{v}{u} \right)^{n+2s} J_{n+2s}(v) \quad (2.3.13b)$$

Utilizzando la nota relazione per ricorrenza che lega fra loro le funzioni di Bessel<sup>(2)</sup>, si perviene, a mezzo di alcune ulteriori rielaborazioni formali (Born and Wolf, 1999), alle seguenti espressioni per C(u,v) ed S(u,v):

---

(1)  $\frac{i^{-n}}{2\mathbf{p}} \int_0^{2\mathbf{p}} e^{ix \cos \mathbf{a}} e^{ina} d\mathbf{a} = J_n(x)$

$$C(u, v) = \frac{\cos \frac{u}{2}}{\frac{u}{2}} U_1(u, v) + \frac{\sin \frac{u}{2}}{\frac{u}{2}} U_2(u, v) \quad (2.3.14a)$$

$$S(u, v) = \frac{\sin \frac{u}{2}}{\frac{u}{2}} U_1(u, v) - \frac{\cos \frac{u}{2}}{\frac{u}{2}} U_2(u, v) \quad (2.3.14b)$$

Le (2.3.14a) e (2.3.14b) sono valide in tutti i punti nei pressi della regione di fuoco, ma sono, nella pratica, convenienti solo nel caso  $|u/v| < 1$ .

Qualora ci si volesse riferire al caso  $|u/v| > 1$ , è più appropriata una deduzione che chiami in causa le potenze positive di  $v/u$ , cosa, questa, che porta (a parte questioni di conto) ad altre, analoghe espressioni per  $S(u, v)$  e  $C(u, v)$ :

$$C(u, v) = \frac{2}{u} \sin \frac{v^2}{2u} - \frac{\cos \frac{u}{2}}{\frac{u}{2}} V_1(u, v) + \frac{\sin \frac{u}{2}}{\frac{u}{2}} V_0(u, v) \quad (2.3.15a)$$

$$S(u, v) = \frac{2}{u} \cos \frac{v^2}{2u} - \frac{\sin \frac{u}{2}}{\frac{u}{2}} V_1(u, v) - \frac{\cos \frac{u}{2}}{\frac{u}{2}} V_0(u, v) \quad (2.3.15b)$$

Dalla definizione di intensità data precedentemente, si ha finalmente:

$$I(u, v) = \left( \frac{2}{u} \right)^2 [U_1^2(u, v) + U_2^2(u, v)] I_0 \quad (2.3.16a)$$

nella quale

$$I_0 = \left( \frac{\mathbf{p}^2 |A|}{\mathbf{f}^2} \right)^2 \quad (2.3.17b)$$

rappresenta l'intensità nel punto di fuoco  $u=v=0$  e la (2.3.17c):

$$I(u, v) = \left( \frac{2}{u} \right)^2 \left\{ 1 + V_0^2(u, v) + V_1^2(u, v) - 2V_0(u, v) \cos \left[ \frac{u^2 + v^2}{2u} \right] - 2V_1(u, v) \sin \left[ \frac{u^2 + v^2}{2u} \right] \right\} I_0$$

Dalla (2.3.17a) si ottiene, per i punti nel piano focale ( $u=0$ ):<sup>(3)</sup>

(2)  $\frac{d}{dx} [x^{n+1} J_{n+1}(x)] = x^{n+1} J_n(x)$

(3) Si è qui fatto uso delle seguenti proprietà delle funzioni di Lommel:

$$I(0, v) = 4 \lim_{u \rightarrow 0} \frac{U_1^2(u, v) + U_2^2(u, v)}{u^2} I_0 = \left[ \frac{2J_1(v)}{v} \right]^2 I_0 \quad (2.3.18)$$

Con un analogo modo di procedere, ricordando che  $V_0(u, 0) = I$  e  $V_1(u, 0) = 0$ , si trova per i punti lungo l'asse  $z$  ( $v=0$ ):

$$I(u, 0) = \frac{4}{u^2} (2 - 2 \cos \frac{u}{2}) I_0 = \left( \frac{\sin(u/4)}{u/4} \right)^2 I_0 \quad (2.3.19)$$

La (2.3.18) e (2.3.19) forniscono l'andamento cercato per la PSF tridimensionale rispettivamente nel piano di fuoco e lungo l'asse ottico.

Più in generale, possiamo dire che la PSF diffrattiva nel caso di radiazione incoerente è ricavabile a partire dalla (2.3.11) e vale, in un punto P qualsiasi prossimo alla regione di fuoco:

$$h(u, v) = |U(P)|^2 = \left| k \frac{a^2 A}{f^2} \right|^2 \left| \int_0^1 J_0(v \mathbf{r}) e^{-0.5i u r^2} \mathbf{r} d\mathbf{r} \right|^2 \quad (2.3.20)$$

Il procedimento qui seguito per ricavare un'espressione approssimata dell'andamento della PSF è solo uno dei tanti possibili presenti in letteratura che portano a formule leggermente diverse da quella qui riportata, ma ugualmente funzionali allo scopo che ci si prefigge.

Prima di procedere oltre vale la pena svolgere alcune ulteriori considerazioni circa un microscopio a fluorescenza. In un tale sistema, le molecole fluorescenti del campione che si sta analizzando vengono eccitate da una radiazione incidente di lunghezza d'onda  $\lambda_{ex}$  ed emettono ad una lunghezza d'onda  $\lambda_{em}$ : si può dimostrare, in particolare, che la differenza tra questi due valori di  $\lambda$  ( $\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex} > 0$ ) è un valore caratteristico della sonda che si sta eccitando.

Nel corso dei prossimi paragrafi assumeremo, per semplicità, che tanto la radiazione d'eccitazione quanto quella d'emissione siano monocromatiche, ossia che valgano le seguenti:

$$I_{ex}(\lambda) = I_{ex} \delta(\lambda - \lambda_{ex})$$

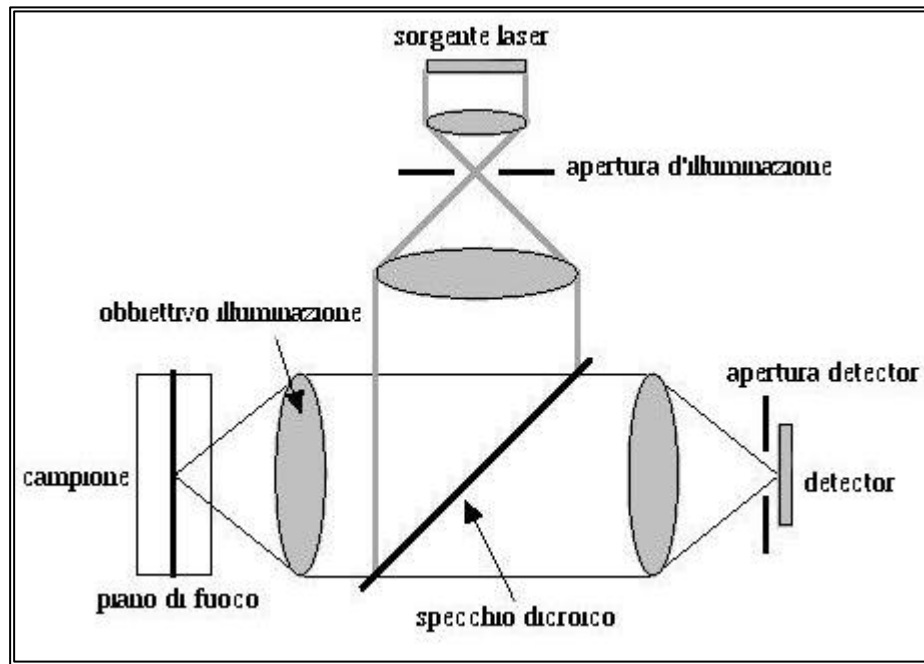
$$I_{em}(\lambda) = I_{em} \delta(\lambda - \lambda_{em})$$

Sebbene ciò non sia rigorosamente vero, visto che la maggior parte delle sostanze usate come sonde fluorescenti presenta un largo spettro sia in emissione che in assorbimento, una tale ipotesi di lavoro è supportata dal largo impiego di filtri a banda molto stretta, distribuiti sull'intero cammino ottico.

Qualora si volessero, poi, adattare i risultati ottenuti al caso più generale in cui non siano impiegati particolari filtri barriera, è sufficiente modificare le formule ricavate inserendo un operatore d'integrazione esteso al particolare spettro di emissione (eccitazione) considerato.

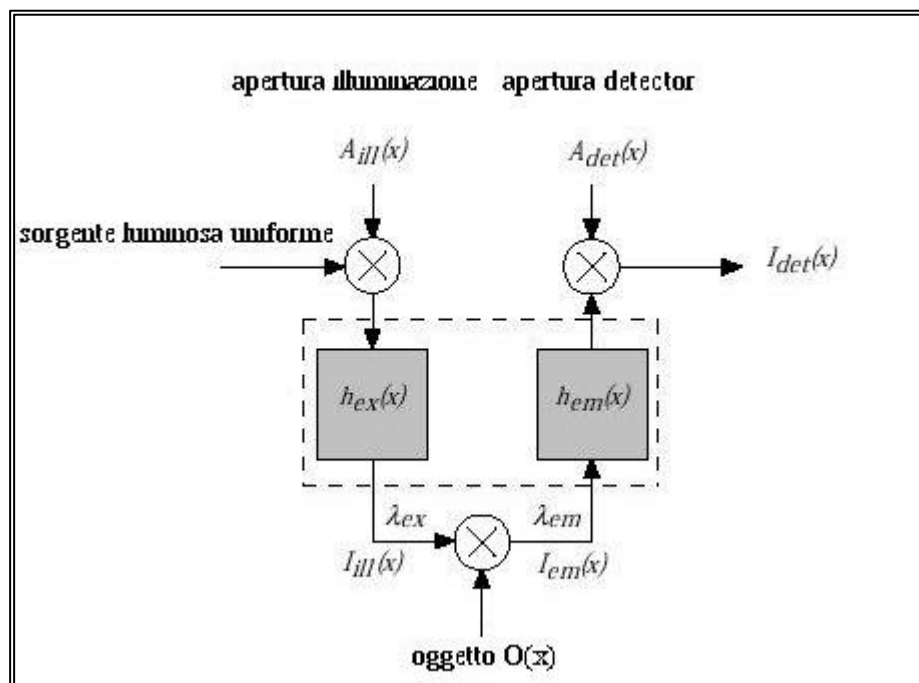
Vediamo, ora, come la trattazione appena svolta si inserisca direttamente nel calcolo della PSF di un'architettura confocale: a tale scopo analizzeremo, innanzi tutto, il caso di un generico microscopio a fluorescenza, derivando, in un secondo tempo, le formule relative al confocale come caso limite. Sia dunque data la situazione in figura 2.3b. Descriviamo matematicamente il tutto come in figura 2.3c, ove sono simbolicamente indicate le varie componenti, la forma analitica che le descrive e l'operatore matematico corrispondente alle diverse trasformazioni subite dalla radiazione lungo l'intero cammino ottico.

$$\lim_{u \rightarrow 0} \left[ \frac{U_1(u, v)}{u} \right] = \frac{J_1(v)}{v} \quad \lim_{u \rightarrow 0} \left[ \frac{U_2(u, v)}{u} \right] = 0$$



**Fig.2.3b** schema generale di un microscopio ad epifluorescenza. Come si vede, la radiazione d'eccitazione e quella rilevata in emissione condividono il medesimo obiettivo, cosa, questa, che riduce enormemente la quantità di radiazione eccitante che penetra nel cammino ottico di quella in emissione (Ploem, 1967).

L'intensità  $I_{ill}$  (figura 2.3c) rappresenta la quantità di luce proiettata dalla sorgente sul campione: dal valore che essa assume dipende la probabilità che un fotone 'colpisca' una molecola fluorescente collocata in un certo punto dell'oggetto da osservare. Analogamente,  $I_{det}$  ci informa sulla probabilità che un certo fotone, emesso in un certo punto del campione, si propaghi da esso fino al detector. In conseguenza di ciò,  $I_{det}$  sarà, in generale, dipendente sia da  $I_{ill}$  che da  $I_{em}$ .



**Fig.2.3c:** schema 'a blocchi' di un generale microscopio ad epifluorescenza.

Assumiamo in questo modello che, sia la sorgente che il detector, siano limitati da aperture di dimensione finita,  $A_{ill}$  ed  $A_{det}$  rispettivamente.

In particolare, nel caso di un microscopio a ‘campo largo’,  $A_{ill}$  sarà determinata dal diaframma, mentre, nel caso confocale, tale valore corrisponderà alle dimensioni del pinhole d’illuminazione. Analogamente,  $A_{det}$  sarà individuato dal pinhole del detector nel caso confocale e dalle dimensioni della fotocamera in quello ‘a campo largo’.

Nella nostra schematizzazione, la sorgente luminosa può essere assimilata ad un insieme di sorgenti puntiformi distribuite su  $A_{ill}$ : ognuna di esse viene ‘proiettata’ dall’obiettivo sul campione. Il valore di  $I_{ill}$  può allora essere calcolato in termini di convoluzione tra  $A_{ill}$  e la PSF dell’obiettivo (calcolata nella prima parte di questo paragrafo), che tiene conto proprio dei fenomeni di diffrazione che intervengono in corrispondenza di una certa, fissata lunghezza d’onda (nella fattispecie  $\lambda_{ex}$ ):

$$I_{ill}(x) = \int d\mathbf{x} h_{ex}(x - \mathbf{x}) A_{ill}(\mathbf{x}) = (h_{ex} \otimes A_{ill})(x) \quad (2.3.21)$$

in cui  $h_{ex} \equiv h(x, \mathbf{I}_{ex})$  ed  $h(x, \mathbf{I}_{ex})$  è espressa dalla (2.3.20).<sup>(1)</sup>

D’altra parte, è facile convincersi che l’intensità della radiazione emessa è univocamente determinata a partire dall’intensità d’illuminazione e dalla quantità complessiva di molecole fluorescenti coinvolte nel processo.

In particolare, si può dimostrare che, per una *bassa concentrazione* di sonda, l’intensità della luce emessa è data dal prodotto della distribuzione di molecole fluorescenti (che individua, quindi, il campione)  $O(x)$  per l’intensità di eccitazione:

$$I_{em}(x, \mathbf{I}_{em}) = O(x, \mathbf{I}_{em}, \mathbf{I}_{ex}) I_{ill}(x, \mathbf{I}_{ex}) \quad (2.3.22)$$

La radiazione emessa viene quindi focalizzata da un obiettivo su un apposito sensore fotosensibile: di fronte a tale obiettivo è collocata un’opportuna apertura (vedi figura 2.3b), che ha lo scopo primario di regolare il flusso luminoso che dal campione raggiunge il sensore a seguito dell’emissione.

L’intensità rilevata al di là di detta apertura può essere convenientemente modellata come:

$$I_{det}(x) = A_{det}(x) \int d\mathbf{x} h_{em}(x - \mathbf{x}) I_{em}(\mathbf{x}) = A_{det}(x) \cdot (h_{em} \otimes I_{em})(x) \quad (2.3.23)$$

in cui  $h_{em}(x) \propto h(x, \mathbf{I}_{em})$  rappresenta la PSF, espressa dalla (2.3.20), in emissione.

Ecco allora che, mettendo insieme la (2.3.22) e la (2.3.23) e sostituendo  $O(x)$  con  $\mathbf{d}(x)$  (sorgente luminosa puntiforme) si può agevolmente ricavare la PSF di un generico microscopio a fluorescenza:

$$h_{GFM}(x) = A_{det}(x) h_{em}(x) \int d\mathbf{x} h_{ex}(-\mathbf{x}) A_{ill}(\mathbf{x}) \quad (2.3.24)$$

Veniamo, finalmente, al caso di un’architettura confocale del tipo riportato in figura.

<sup>(1)</sup> La trattazione qui riportata utilizza un’unica, generica coordinata  $x$ . I risultati più significativi ottenuti verranno, in seguito, generalizzati al caso tridimensionale.

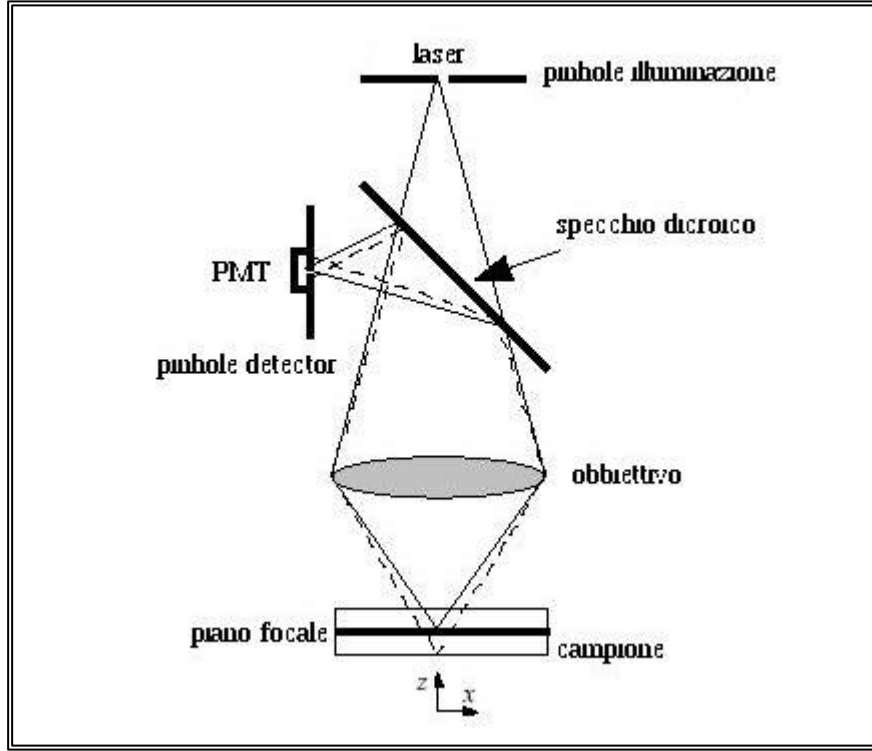


Fig. 2.3d schema di una tipica architettura confocale

Utilizzando la consueta rappresentazione a blocchi del sistema, si perviene alla schematizzazione in figura 2.3e: essa ci permette, insieme con le considerazioni appena svolte nel caso più generale di ricavare, a partire dalle (2.3.21), (2.3.22), (2.3.23) opportunamente modificate<sup>(2)</sup>, la seguente espressione per l'intensità raccolta dal fotosensore, tipicamente un PMT:

$$\begin{aligned}
 I_{PMT} &= \int dx \mathbf{d}(x) \int d\mathbf{x} h_{em}(x - \mathbf{x}) O(\mathbf{x}) \int dX h_{ex}(\mathbf{x} - X) \mathbf{d}(X) = \\
 &= \int dx \mathbf{d}(x) \int d\mathbf{x} h_{em}(x - \mathbf{x}) O(\mathbf{x}) h_{ex}(\mathbf{x}) = \int d\mathbf{x} h_{em}(-\mathbf{x}) O(\mathbf{x}) h_{ex}(\mathbf{x})
 \end{aligned} \quad (2.3.25)$$

La (2.3.25) può essere ulteriormente generalizzata introducendo un'opportuna traslazione che tenga conto del procedimento di scansione che, nella pratica, viene realizzato per acquisire un'immagine tridimensionale del campione:

$$\begin{aligned}
 I_{PMT}(x) &= \int dx' \mathbf{d}(x - x') \int d\mathbf{x} h_{em}(x' - \mathbf{x}) O(\mathbf{x}) \int dX h_{ex}(\mathbf{x} - X) \mathbf{d}(X - x) = \\
 &= \int d\mathbf{x} \int dx' \mathbf{d}(x - x') h_{em}(x' - \mathbf{x}) O(\mathbf{x}) h_{ex}(\mathbf{x} - x) = \int d\mathbf{x} h_{em}(x - \mathbf{x}) O(\mathbf{x}) h_{ex}(\mathbf{x} - x) = \\
 &= h_{em}(x) h_{ex}(-x) \otimes O(x)
 \end{aligned} \quad (2.3.26)$$

Nella realtà, le dimensioni del pinhole di fronte al detector non possono essere scelte piccole a piacere, ma sono frutto di un delicato compromesso tra risoluzione e rapporto  $R_{S/N}$  del segnale da rilevare. Per quel che riguarda, invece, il pinhole collocato di fronte alla sorgente laser, le sue dimensioni nello spazio del campione sono determinate dalle dimensioni dello spot laser focalizzato e dal valore di magnificazione dell'obiettivo: tipicamente, però, questi parametri sono tali da rendere buona l'approssimazione ad un punto.

<sup>(2)</sup> Si suppone qui che entrambi i pinhole siano infinitamente piccoli così da descriverli con funzioni tipo  $\delta(x)$ .

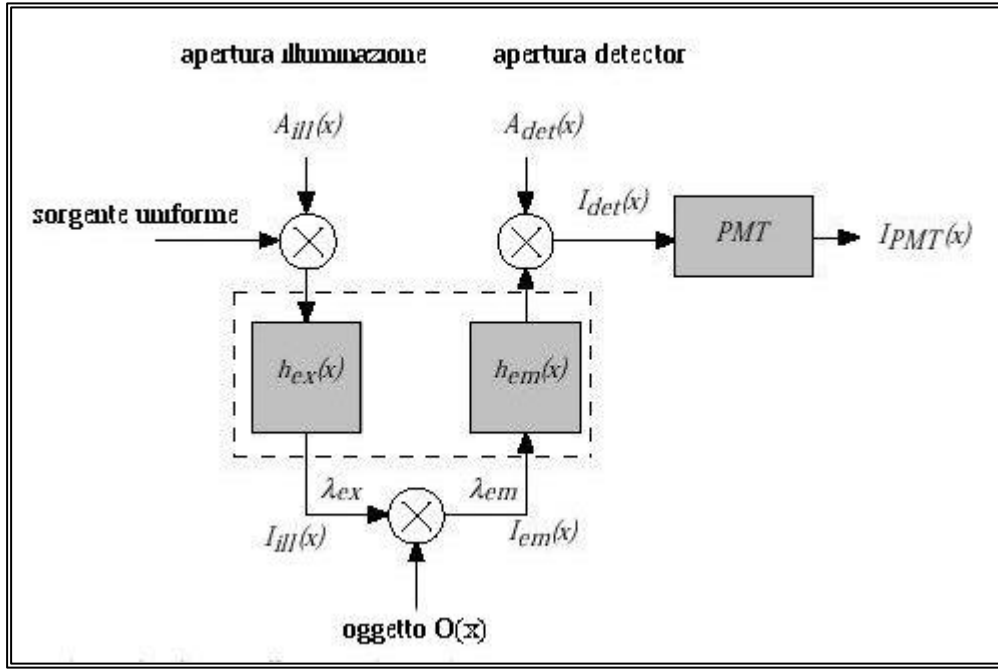


Fig. 2.3e: diagramma 'a blocchi' di un'architettura confocale.

Supponendo, viceversa, che il pinhole di fronte al detector sia descritto, invece che da una funzione tipo  $d(x)$ , da una generica  $A_{det}(x)$ , si ha dalla (2.3.26):

$$I_{PMT}(x) = \int dx' A_{det}(x-x') \int d\mathbf{x} h_{em}(x'-\mathbf{x}) O(\mathbf{x}) h_{ex}(\mathbf{x}-x) = \quad (2.3.27)$$

$$= \int d\mathbf{x} \int dx' A_{det}(x-x') h_{em}(x'-\mathbf{x}) O(\mathbf{x}) h_{ex}(\mathbf{x}-x) = [(A_{det}(x) \otimes h_{em}(x)) h_{ex}(-x)] \otimes O(x)$$

In particolare, nel limite di pinhole infinitamente largo, la (2.3.27) assume la seguente forma semplificata:

$$I_{PMT}(x) \rightarrow h_{ex}(-x) \otimes O(x) \quad (2.3.28)$$

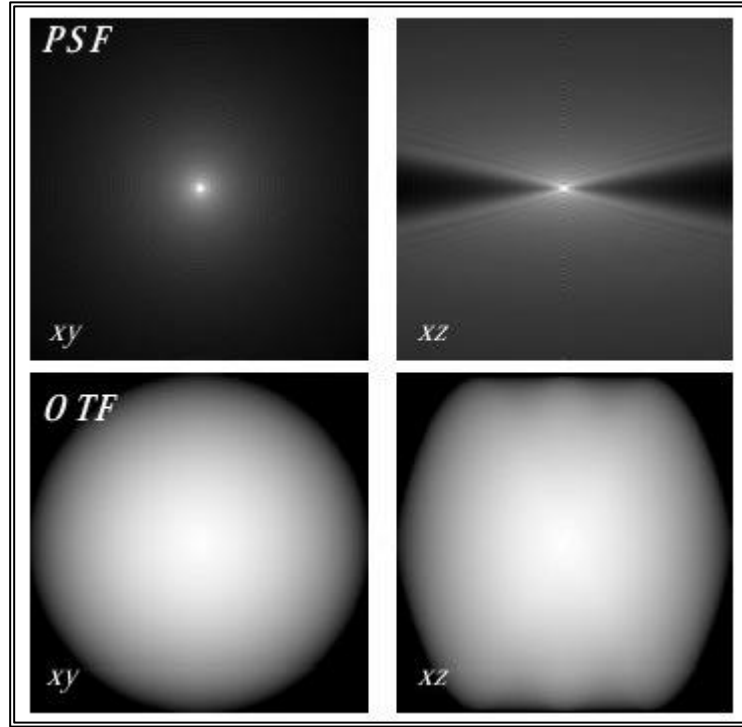
visto che la convoluzione tra  $A_{det}(x)$  ed  $h_{em}(x)$  tende ad un valore costante.

Infine, per  $\lambda_{ex} \cong \lambda_{em}$  (condizione, questa, realizzata tramite l'impiego di opportuni filtri barriera) e per un pinhole di fronte al detector idealmente piccolo a piacere, la PSF del sistema confocale appena descritto può essere ottenuta rimpiazzando nella (2.3.26) la funzione  $O(x)$  (descrittiva del campione) con un impulso  $d(x)$ , ottenendo così:

$$h_{CFM}(x, y, z) \cong h^2(x, y, z) \quad (2.3.29)$$

(ove con  $h(x, y, z)$  si intende, al solito, la PSF espressa dalla (2.3.20)).

In figura 2.3f sono riportate le immagini (teoriche) di una PSF confocale e dell'OTF, calcolate a partire da una analisi teorica del tipo appena visto (Van der Voort & Brakenhoff, 1990):



**Fig. 2.3f:** vista  $xy$  ed  $xz$  [in alto a sinistra e a destra, rispettivamente] della sezione centrale della PSF (teorica) din un sistema confocale e della corrispondente OTF [in basso a sinistra e a destra, rispettivamente].

La (2.3.29), scritta per esteso nel caso  $u=0$  ad esempio, fornisce, per un microscopio confocale, il seguente andamento dell'intensità in funzione della coordinata ottica  $v$  precedentemente definita:

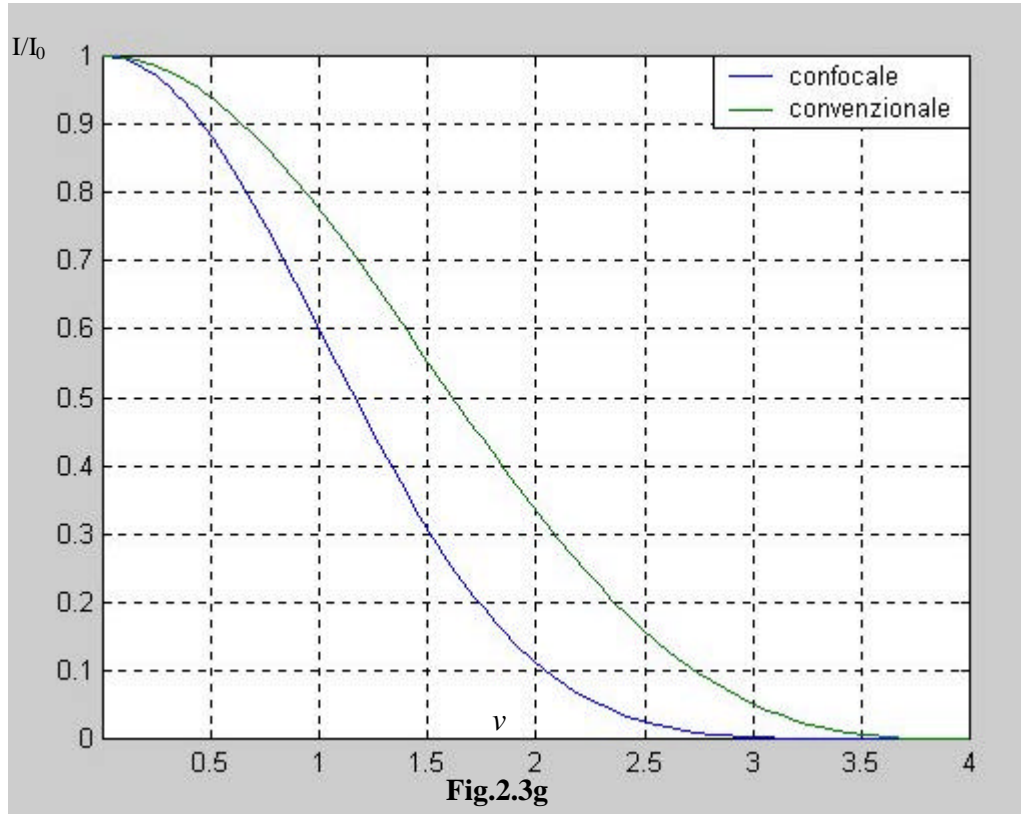
$$I(v)_{conf.} = \left( \frac{2J_1(v)}{v} \right)^4 \quad (2.3.30)$$

D'altra parte, una trattazione del tutto analoga a quella appena svolta in dettaglio, fornisce, nel caso di un microscopio convenzionale, la seguente relazione:

$$I(v)_{conv.} = \left( \frac{2J_1(v)}{v} \right)^2 \quad (2.3.31)$$

Come si vede dagli andamenti riportati in figura (2.3g), si ha un complessivo miglioramento nella risoluzione, evidenziato proprio da una minore dispersione della curva nell'intorno del suo punto di massimo, accompagnata da una minore ampiezza a metà altezza (FWHM) che caratterizza il caso confocale ( $v_{conv.}/v_{conf.} = 1.4$ ).

Eseguendo un analogo conto nel caso di punti lungo l'asse ottico (usando cioè la 2.3.19) si può infine calcolare un miglioramento in termini volumetrici di un fattore 3.



## 2.4 Generalizzazione al caso tridimensionale

Nel paragrafo precedente, si sono ricavate tutte le formule facendo intervenire la sola coordinata laterale  $x$  per descrivere il processo di formazione delle immagini in un microscopio a fluorescenza. E' bene, a questo punto, generalizzare le relazioni di più diretto interesse pratico al caso tridimensionale.

Per ottenere ciò, è utile introdurre la seguente notazione compatta, con la quale indicare la convoluzione di una funzione bidimensionale con una tridimensionale:

$$g(x, y, z) = \iint d\mathbf{x} d\mathbf{h} h(\mathbf{x} - \mathbf{x}, y - \mathbf{h}) f(\mathbf{x}, \mathbf{h}, z) \equiv h(x, y) \otimes_{2D} f(x, y, z) \quad (2.4.1)$$

A questo punto, per esprimere nelle tre coordinate spaziali il valore dell'intensità rilevata dal detector, è sufficiente osservare che le funzioni che descrivono l'apertura dei pinhole sono, nella realtà, bidimensionali: questo comporta che, sostituendo (ove sia richiesto) alle convoluzioni *unidimensionali* quelle *bidimensionali* definite secondo la (2.4.1), si ottengano, in un sistema confocale, le seguenti espressioni, rispettivamente per l'intensità rilevata dal PMT e per la PSF:

$$I_{PMT}(x, y, z) = ((A_{pinhole}(x, y) \otimes_{2D} h_{em}(x, y, z)) h_{ex}(-x, -y, -z)) \otimes O(x, y, z) \quad (2.4.2)$$

$$h_{CFM}(x, y, z) = (A_{pinhole}(x, y) \otimes_{2D} h_{em}(x, y, z)) h_{ex}(-x, -y, -z) \quad (2.4.3)$$

## 2.5 Campionamento di un'immagine

Dalla teoria generale, si sa che, a partire da un'immagine analogica  $\alpha$  (quale è, ad esempio, quella che da di sé un campione fluorescente) è possibile ottenere, attraverso un opportuno procedimento di campionamento, un'immagine digitale (che è quella che, di fatto, viene acquisita attraverso un microscopio confocale a fluorescenza) che ne sia una rappresentazione non affetta da aliasing, a patto di scegliere una frequenza di campionamento che sia di almeno due volte superiore alla frequenza di taglio caratteristica di  $\alpha$  ( $n_{\text{campionamento}} \geq 2n_\alpha$ ).

Sotto tali ipotesi, è possibile dimostrare che l'immagine analogica di partenza può essere ricostruita, senza errori, attraverso una 'semplice' interpolazione delle informazioni acquisite: è questo che stabilisce il noto criterio di Nyquist.

Vediamo ora come, a partire dalla frequenza di taglio della PSF diffrattiva, sia possibile ricavare, attraverso un'elaborazione successiva, quella dell'intera architettura confocale, dipendente, in generale, anche da altri parametri caratteristici del microscopio, oltre che dalla diffrazione.

### 2.5.1 Larghezza di banda di una PSF nel caso di sola diffrazione

La risposta in frequenza di una PSF è, come naturale, descritta dalla sua trasformata di Fourier (OTF). Nel caso particolare in cui il solo fattore limitante considerato sia la diffrazione, la larghezza di banda ed il supporto<sup>(1)</sup> della OTF sono stati determinati in vari lavori presenti in letteratura (Wilson, 1990; Wilson & Tan, 1993; Goodman, 1968).

Si può dimostrare (Wilson & Tan, 1993) che il supporto della OTF è calcolabile a partire dall'intersezione di due particolari *pupil functions*, dipendenti dall'apertura numerica della lente obbiettivo (Goodman, 1968). Con buona approssimazione, si può, in tal senso, stabilire (Wilson & Tan, 1993) che tale regione è individuata da:

$$\text{Re} \left[ \sqrt{|l|^2 - 0.25|a|^2} \right] \geq 0 \quad \text{con } |l| \leq 1, |a| \leq 1 \quad (2.5.1.1)$$

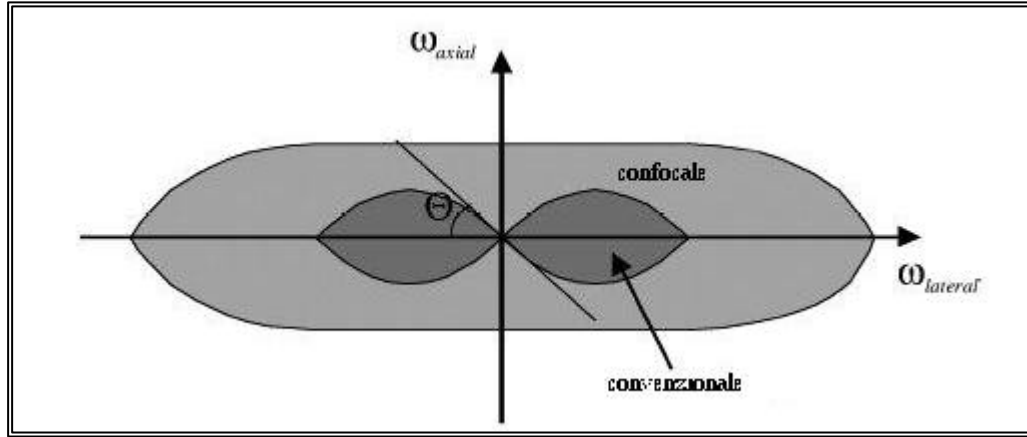
ove  $l \equiv f_{\text{laterale}} / f_{\text{taglio, assiale}}$  ed  $a \equiv f_{\text{assiale}} / f_{\text{taglio, laterale}}$  sono frequenze spaziali normalizzate e le frequenze di taglio indicate sono date da (Wilson & Tan, 1993) :

$$f_{\text{taglio, laterale}} = \frac{2n \sin \mathbf{J}}{\lambda} = \frac{2NA}{\lambda} \quad (2.5.1.2)$$

$$f_{\text{taglio, assiale}} = \frac{n(1 - \cos \mathbf{q})}{\lambda} = \frac{2n \sin^2(\mathbf{J}/2)}{\lambda}$$

in cui  $NA$  è l'apertura numerica dell'obbiettivo e  $\mathbf{q}$  è la semiapertura angolare in figura.

<sup>(1)</sup> Con *supporto* si intende, qui e nel seguito, la regione di spazio in cui una funzione è definita non nulla.



**Fig. 2.5.1a:** rappresentazione schematica del supporto della OTF di un microscopio convenzionale a fluorescenza e di uno confocale.

Per quel che riguarda, invece, la OTF diffrattiva nel caso confocale, si può mostrare (Wilson & Tan, 1993) che il suo supporto è dato, con buona approssimazione, da:

$$\text{Re}\left[\sqrt{|l| - l^2 - 0.25|a|}\right] \geq 0 \quad \text{con } |l| \leq 0.5, |a| \leq 1 \quad (2.5.1.3)$$

Dalla figura 2.5.1a, come già discusso nel primo capitolo di questa tesi, risulta evidente la regione in prossimità dell'asse  $\omega_{\text{axial}}$  in cui la OTF di un microscopio convenzionale è nulla, cosa, questa, che ne limita fortemente le potenzialità nell'ambito del sezionamento ottico di un campione.

A questo punto, per dare una veste quantitativa alle considerazioni già fatte altrove su queste particolarità della OTF, risulta opportuna una deduzione *formale* della larghezza di banda nei due casi fin qui affrontati (microscopio confocale e a campo largo).

L'ambito in cui risulta naturale affrontare una simile questione è quello della *teoria dei sistemi lineari*.

### 2.5.2 Larghezza di banda di un sistema lineare

Siano  $f(x, y, z)$  ed  $h(x, y, z)$  due funzioni ed  $F(\mathbf{w}_x, \mathbf{w}_y, \mathbf{w}_z)$  ed  $H(\mathbf{w}_x, \mathbf{w}_y, \mathbf{w}_z)$  le rispettive trasformate di Fourier.

Dalla teoria generale, si sa che tra queste quantità sussiste la seguente relazione:

$$h(x, y, z) \otimes f(x, y, z) \xrightarrow{\text{Fourier3D}} H(\mathbf{w}_x, \mathbf{w}_y, \mathbf{w}_z) \cdot F(\mathbf{w}_x, \mathbf{w}_y, \mathbf{w}_z) \quad (2.5.2.1)$$

Sfruttando proprio la (2.5.2.1), che ci dice, in sostanza, come la *trasformata di Fourier algebrizzi i prodotti di convoluzione*, è possibile mostrare che la larghezza di banda di un segnale ottenuto per convoluzione di  $f(x, y, z)$  ed  $h(x, y, z)$  è data dalla più piccola tra le larghezze di banda dei due segnali convoluti:

$$h(x, y, z) \otimes f(x, y, z) \rightarrow f_c = \min(f_{\text{taglio}}^f, f_{\text{taglio}}^h) \quad (2.5.2.2)$$

Analogamente, sfruttando la *duale* della (2.5.2.1):

$$h(x, y, z) f(x, y, z) \xrightarrow{\text{Fourier3D}} (2\mathbf{p}^{3/2})^{-1} H(\mathbf{w}_x, \mathbf{w}_y, \mathbf{w}_z) \otimes F(\mathbf{w}_x, \mathbf{w}_y, \mathbf{w}_z) \quad (2.5.2.3)$$

si ottiene che la larghezza di banda di un segnale ottenuto moltiplicando tra loro  $f(x, y, z)$  ed  $h(x, y, z)$  è data dalla somma delle larghezze di banda di  $f$  e di  $h$ :

$$h(x, y, z) f(x, y, z) \rightarrow f_c = f_{\text{taglio}}^f + f_{\text{taglio}}^h \quad (2.5.2.4)$$

Infine, per quel che riguarda la *convoluzione bidimensionale* definita dalla (2.4.1), valgono le seguenti relazioni (con ovvio significato delle notazioni):

$$\begin{aligned} g(x, y, z) &\equiv h(x, y) \otimes_{2D} f(x, y, z) \\ G(\mathbf{w}_x, \mathbf{w}_y, z) &= F_{2D}(g(x, y, z)) = H(\mathbf{w}_x, \mathbf{w}_y) F(\mathbf{w}_x, \mathbf{w}_y, z) \\ G(\mathbf{w}_x, \mathbf{w}_y, \mathbf{w}_z) &= F_{1D}(G(\mathbf{w}_x, \mathbf{w}_y, z)) \end{aligned} \quad (2.5.2.5)$$

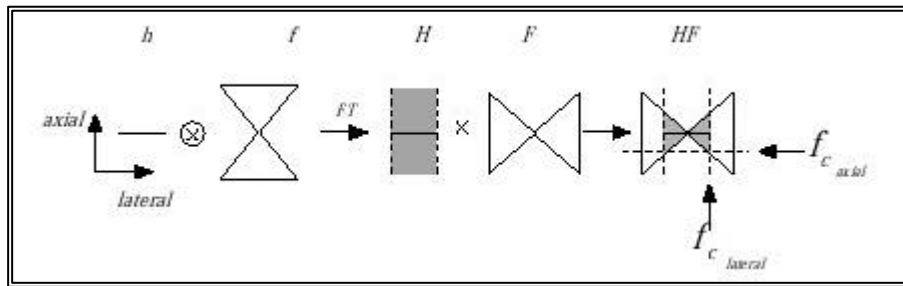
In altre parole,  $H$  si ripete, senza alcun cambiamento, nella direzione assiale introducendo, così, una larghezza di banda ‘assiale’ (cioè lungo  $z$ ) teoricamente infinita.

Se la larghezza di banda della  $f$  è funzione della frequenza laterale, la larghezza di banda assiale del segnale risultante  $g$  è allora uguale alla più alta frequenza assiale di  $f$  che cada entro la larghezza di banda laterale di  $g$ . Formalmente, valgono le seguenti relazioni:

$$f_{\text{taglio, laterale}} = \min(f_{\text{taglio, laterale}}^h, f_{\text{taglio, laterale}}^f) \quad (2.5.2.6)$$

$$f_{\text{taglio, assiale}} = \max(f_{\text{assiale}} : |F(f_{\text{laterale}}, f_{\text{assiale}})| > 0) \quad \forall f_{\text{laterale}} \leq f_{\text{taglio, laterale}}$$

Una sintetica rappresentazione grafica di questa situazione è fornita in figura 2.5.2a.



**Fig. 2.5.2a** schematica rappresentazione della larghezza di banda di un segnale risultante dalla convoluzione di un segnale tridimensionale con uno bidimensionale.

### 2.5.3 Larghezza di banda di un microscopio a fluorescenza

Come espresso dalla (2.4.3)<sup>(1)</sup>, nel caso confocale, la PSF complessiva è espressa da una *convoluzione bidimensionale* tra la funzione che descrive il pinhole collocato di fronte al detector e le due PSF diffrattive coinvolte (in emissione ed in eccitazione). Sfruttando la (2.5.2.4), si ottiene:

$$f_{\text{taglio}}^{\text{diffrazione}} = f_{\text{taglio}}^{\text{illuminazione}} + f_{\text{taglio}}^{\text{detector}} \quad (2.5.3.1)$$

ove  $f_{\text{taglio}}^{\text{detector}}$ ,  $f_{\text{taglio}}^{\text{illuminazione}}$  sono proprio le frequenze di taglio della OTF diffrattiva espresse dalle (2.5.1.2) calcolate, rispettivamente, in corrispondenza di  $I_{\text{emissione}}$  e  $I_{\text{eccitazione}}$ . Combinando questo risultato con quanto stabilito dalle (2.5.2.6) si ottengono le seguenti espressioni:

$$f_{\text{taglio,laterale}}^{\text{confocale}} = \min(f_{\text{taglio,laterale}}^{\text{pinhole}}, f_{\text{taglio,laterale}}^{\text{diffrazione}}) \quad (2.5.3.2)$$

$$f_{\text{taglio,assiale}}^{\text{confocale}} = \max(f_{\text{assiale}} : |H_{CFM}(f_{\text{laterale}}, f_{\text{assiale}})| > 0) \quad \forall f_{\text{laterale}} \leq f_{\text{taglio,laterale}}^{\text{confocale}}$$

in cui  $H_{CFM}$  indica la OTF del sistema confocale impiegato.

Con analoghi ragionamenti, si può dimostrare che, per un microscopio a campo largo, valgono le:

$$f_{\text{taglio,laterale}}^{\text{convenzionale}} = \min(f_{\text{taglio,laterale}}^{\text{fotocamera}}, f_{\text{taglio,laterale}}^{\text{detector}}) \quad (2.5.3.3)$$

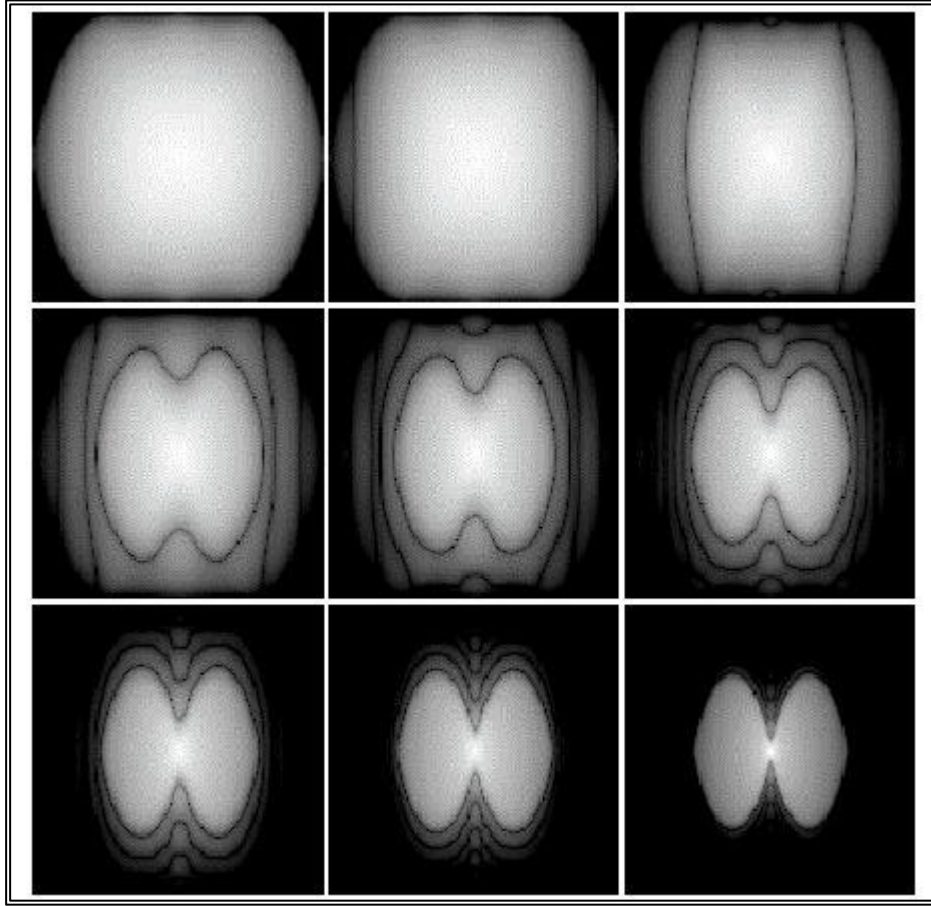
$$f_{\text{taglio,assiale}}^{\text{convenzionale}} = \max(f_{\text{assiale}} : |H_{WFM}(f_{\text{laterale}}, f_{\text{assiale}})| > 0) \quad \forall f_{\text{laterale}} \leq f_{\text{taglio,laterale}}^{\text{convenzionale}}$$

Da queste relazioni è poi possibile concludere anche che, assumendo  $I_{\text{emissione}} \cong I_{\text{eccitazione}}$ , e considerando quindi come dominante il contributo dato dalla diffrazione, la larghezza di banda nel caso confocale è doppia rispetto a quella nel caso ‘a campo largo’.

Il ruolo giocato dal pinhole nella risposta in frequenza per un sistema confocale è mostrato in figura 2.5.3a:

---

<sup>(1)</sup>  $h_{CFM}(x, y, z) = (A_{\text{pinhole}}(x, y) \otimes_{2D} h_{em}(x, y, z)) h_{ex}(-x, -y, -z)$  (2.4.3)



**Fig. 2.5.3a** sezione  $xz$  centrale della risposta in frequenza (simulata al computer con  $\lambda_{\text{eccitazione}}=488\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{emissione}}=520\text{nm}$ ,  $\text{NA}=1.3$ ) di un sistema confocale, al variare del diametro del pinhole (crescente dall'alto in basso in senso orario).

Come si può vedere, al crescere delle dimensioni del pinhole si ha una contemporanea diminuzione del supporto della OTF confocale, che tende, così, ad assumere via via una forma sempre più simile a quella che si è già teoricamente prevista per il caso convenzionale.

Nelle condizioni in cui, tipicamente, si opera in microscopia confocale ( $\lambda_{\text{eccitazione}}=488\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{emissione}}=520\text{nm}$ , obiettivo in olio con  $\text{NA}=1.3$ , ed un pinhole cui corrisponde un'immagine retroproiettata di  $280\text{nm}$ ), utilizzando le relazioni appena ricavate, si ha una larghezza laterale di banda pari a  $1/102\text{ nm}^{-1}$  ed una assiale pari a  $1/341\text{ nm}^{-1}$ .

Il criterio di Nyquist stabilisce, in questi casi, una frequenza di campionamento laterale non inferiore ai  $19.6\text{ pixel/nm}$  ed una assiale non inferiore ai  $5.86\text{ pixel/nm}$ .

## 2.6 Aspetti conclusivi

Da quanto visto finora circa il processo di formazione delle immagini e le problematiche ad esso connesse possiamo concludere che:

- ✓ La natura *incoerente* della radiazione fluorescente raccolta in emissione ci permette, sotto l'ipotesi di invarianza spaziale della risposta dello strumento, di modellare un microscopio a fluorescenza secondo la teoria dei sistemi LTI. In tal caso, l'immagine acquisita è data dalla convoluzione della funzione che descrive l'oggetto reale con la PSF dello strumento, alla quale contribuiscono, in prima approssimazione, fenomeni essenzialmente legati alla diffrazione.
- ✓ Una seconda distorsione dell'immagine osservata è dovuta (vedi paragrafo (1.6)) alla rilevazione di fotoni in un intervallo di tempo finito, misura, questa, intrinseca all'acquisizione dell'immagine stessa da parte dei vari sensori impiegati e fondamentalmente limitata da un rumore di tipo *poissoniano*.
- ✓ In ultimo, è esperienza piuttosto comune nell'ambito della microscopia a fluorescenza, la misura di un livello di radiazione di fondo non nullo, dovuto a fenomeni di auto-fluorescenza, ad un'inefficiente eliminazione di residui fluorescenti dal materiale d'immersione del campione, a riflessioni di varia natura o alla cattiva regolazione degli offset relativi ai dispositivi di rilevazione o ad altra elettronica eventualmente impiegata.

Tutto questo induce ad un modello ancora più generale di quello appena visto, che tenga in qualche modo conto delle diverse sorgenti rumorose escluse dalla precedente trattazione. Per la precisione, si può scrivere la seguente:

$$m(x, y, z) = N(h(x, y, z) \otimes f(x, y, z) + b(x, y, z))$$

ove  $m$  rappresenta l'immagine osservata,  $h$  la PSF del microscopio a fluorescenza utilizzato,  $f$  la funzione che descrive l'oggetto reale,  $b$  il segnale di background ed  $N$  un'opportuna dipendenza funzionale per tenere conto delle varie distorsioni introdotte dai fattori precedentemente elencati.

E' questa, di fatto, la formula che costituisce il punto di partenza di tutti gli algoritmi di deconvoluzione, intesi a recuperare, da quella osservata, l'immagine reale del campione.



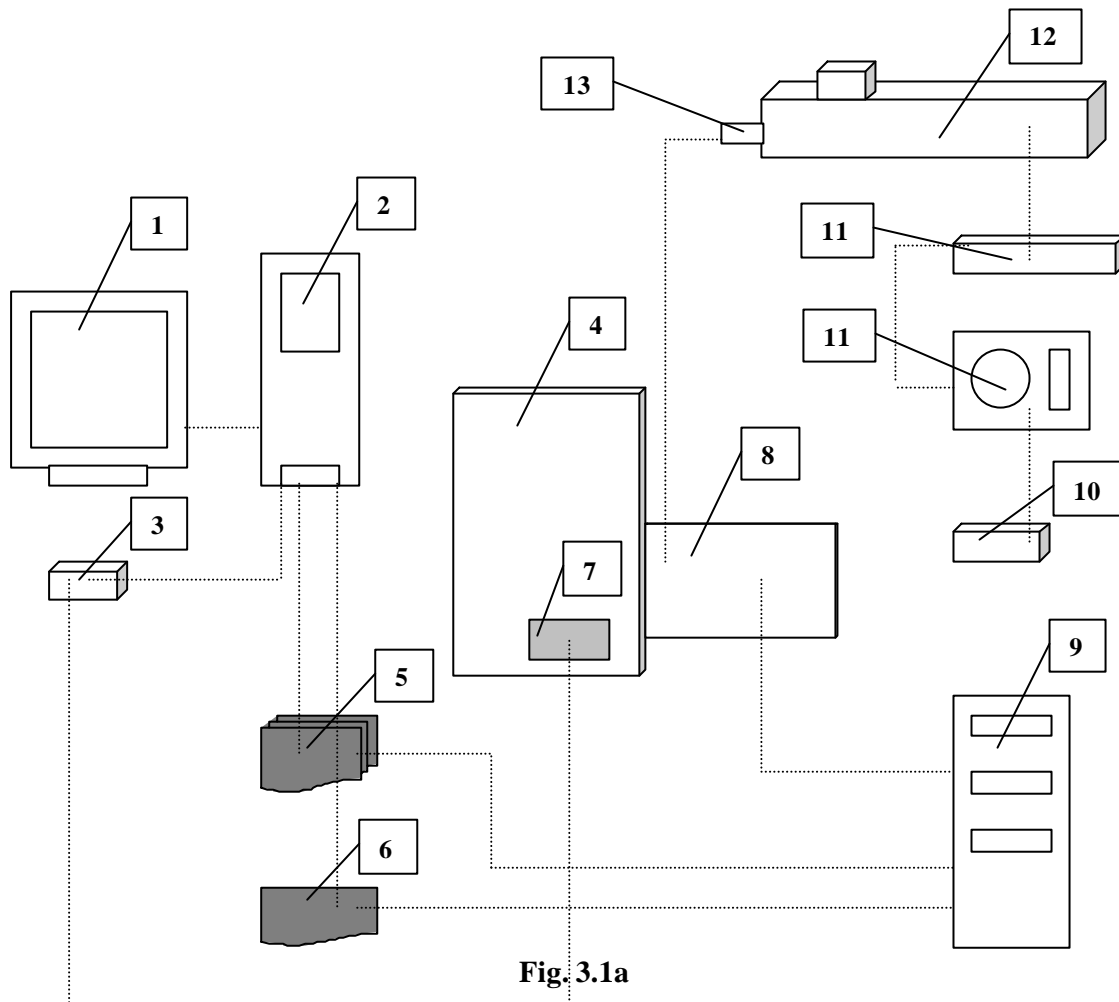
## CAPITOLO 3

### Descrizione dell'apparato sperimentale

*In questo capitolo, viene proposta una descrizione dettagliata dei dispositivi software ed hardware impiegati, nell'ambito di questa tesi, per la raccolta dei dati sperimentali necessari alla caratterizzazione dell'architettura confocale in esame. Questa trattazione ha lo scopo di familiarizzare il lettore con la reale forma dell'apparato strumentale impiegato e, quindi, con tutte quelle imprescindibili condizioni sottese, nella pratica, alla realizzazione delle esperienze descritte.*

### 3.1 Assetto operativo

In figura 3.1a è rappresentata una schematizzazione del sistema nella sua interezza, che mette in evidenza le connessioni tra i vari dispositivi di cui si compone :



**Fig. 3.1a**

1. **Monitor** : è l'interfaccia sulla quale vengono visualizzate, in tempo reale, le immagini e tutti i comandi necessari a pilotare *in remoto* via software il procedimento di acquisizione .
2. **Software** : l'acquisizione , la visualizzazione e la successiva rielaborazione delle immagini avviene tramite il pacchetto software EZ 2000, fornito in dotazione con lo strumento ed installato in ambiente Windows NT .
3. **Controller 1** : è un dispositivo che permette di controllare *manualmente* i movimenti del motorino passo-passo con il quale è effettuata la scansione lungo  $z$  .
4. **Microscopio ottico** : il dispositivo impiegato è il *NIKON Eclipse TE 300*, microscopio invertito dotato di un sistema convenzionale per *microscopia ottica in assorbimento, fluorescenza, riflessione*

e *contrasto di fase*. Su esso sono montati quattro obbiettivi<sup>(1)</sup> e filtri caratteristici per i fluorocromi più diffusi.

Mentre l'allineamento con le sorgenti laser viene effettuato direttamente sul modulo di eccitazione [13], secondo una ben precisa procedura descritta nelle specifiche del dispositivo, quello verso il microscopio viene realizzato controllando l'altezza di posizionamento della testa confocale [8] e richiede una successiva verifica di omogeneità effettuabile tramite l'acquisizione di oggetti fluorescenti uniformemente disposti sul piano *xy*.

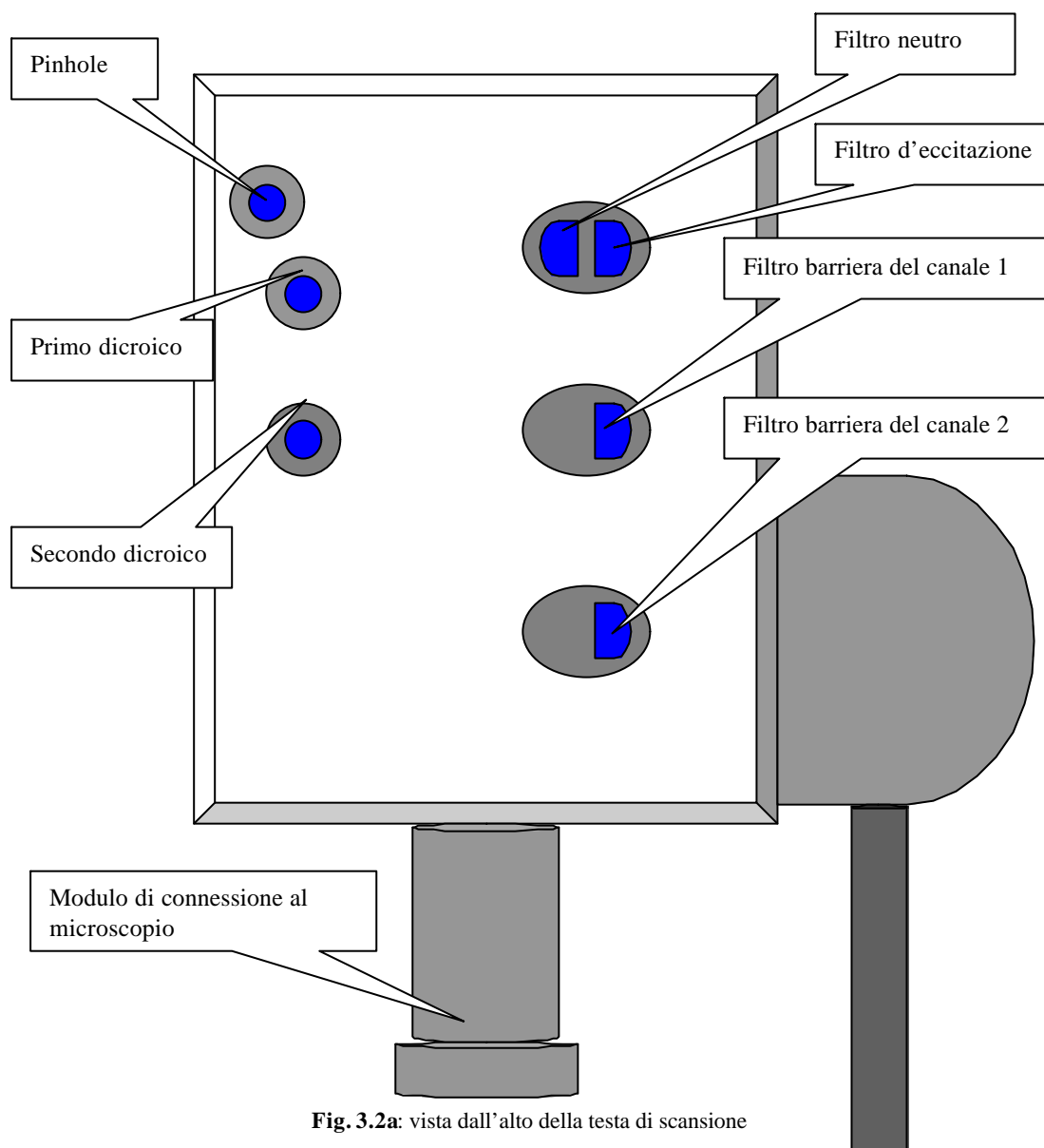
Nel corso del lavoro di tesi, tale verifica è stata occasionalmente realizzata tramite l'acquisizione di matrici bidimensionali di sfere fluorescenti.

5. **Scheda per la visualizzazione di immagini digitali** : questo device ha una composizione modulare (si compone di tre parti), è alloggiato all'interno del computer e provvede, essenzialmente, all'acquisizione ed alla visualizzazione delle immagini.
6. **Scheda di interfaccia seriale**: è alloggiata anch'essa all'interno del computer e costituisce l'interfaccia tra il computer ed il *controller 2* [9].
7. **Motorino passo-passo per la scansione lungo l'asse *z***
8. **Modulo di scansione** : la testa di scansione *NIKON PCM 2000* è notevolmente compatta e leggera: le sue dimensioni sono 5.6x10.4x13.6 cm ed il suo peso è inferiore ai 4 Kg. . E' realizzata su un mini tavolo ottico collegato via fibra ottica alla sorgente di illuminazione, con innesto a tubo alla porta laterale del microscopio ottico.  
Al suo interno sono montati i componenti ottici ed elettro meccanici che attuano la scansione ed alcuni filtri per la fluorescenza, in perfetta analogia a quanto avviene per un microscopio convenzionale. Tutti i componenti ottici di cui è munita sono direttamente controllabili a piacimento dall'utente, tramite sistemi a scorrimento pilotati da manopole (si veda il paragrafo successivo per una più dettagliata descrizione).
9. **Controller 2** : comprende i due circuiti fotomoltiplicatori per la conversione della radiazione emessa dal campione in segnale elettrico, l'unità di alimentazione e una scheda circuitale in grado di controllare i due specchi galvanometrici per la scansione. L'accoppiamento con la testa confocale avviene via fibra ottica.
10. **Modulo controllo del laser** : permette di controllare in remoto l'uscita del laser ad Argon.
11. **Alimentazione del laser** : questo modulo costituisce l'alimentazione delle sorgenti laser impiegate. La potenza richiesta per il laser ad Argon è 20 mW, quella richiesta per il laser ad Elio-Neon è di 5 mW.
12. **Modulo di eccitazione** : l'illuminazione del sistema confocale si avvale di un modulo che alloggia due laser: uno ad Argon (raffreddato ad aria), che copre le lunghezze d'onda in eccitazione a 488 nm e a 514 nm , ed uno ad Elio-Neon, che eccita alla lunghezza d'onda di 543 nm.  
Sul cammino ottico del laser ad Argon sono inseriti un filtro di eccitazione, che offre la possibilità di tagliare lunghezze d'onda maggiori di 488 nm ed un filtro neutro ( ND, *Neutral Density Filter*) che permette di variare l'intensità del fascio.  
Si dispone, inoltre, di un otturatore che consente, eventualmente, di escludere una delle due sorgenti.
13. **Dispositivo di accoppiamento in fibra** : è installato all'interno del modulo di eccitazione ed assicura la connessione in fibra ottica a singolo modo al modulo di scansione.

---

<sup>(1)</sup> Più precisamente: 100X (NA=1.3 ; WD = 0.20mm) ; 60X (NA=0.85 ; WD=0.30mm) ; 20X (NA=0.75 ; WD=1mm) ; 4X (NA=0.13 ; WD=17.1mm).

### 3.2 Descrizione della testa confocale



**Fig. 3.2a:** vista dall'alto della testa di scansione

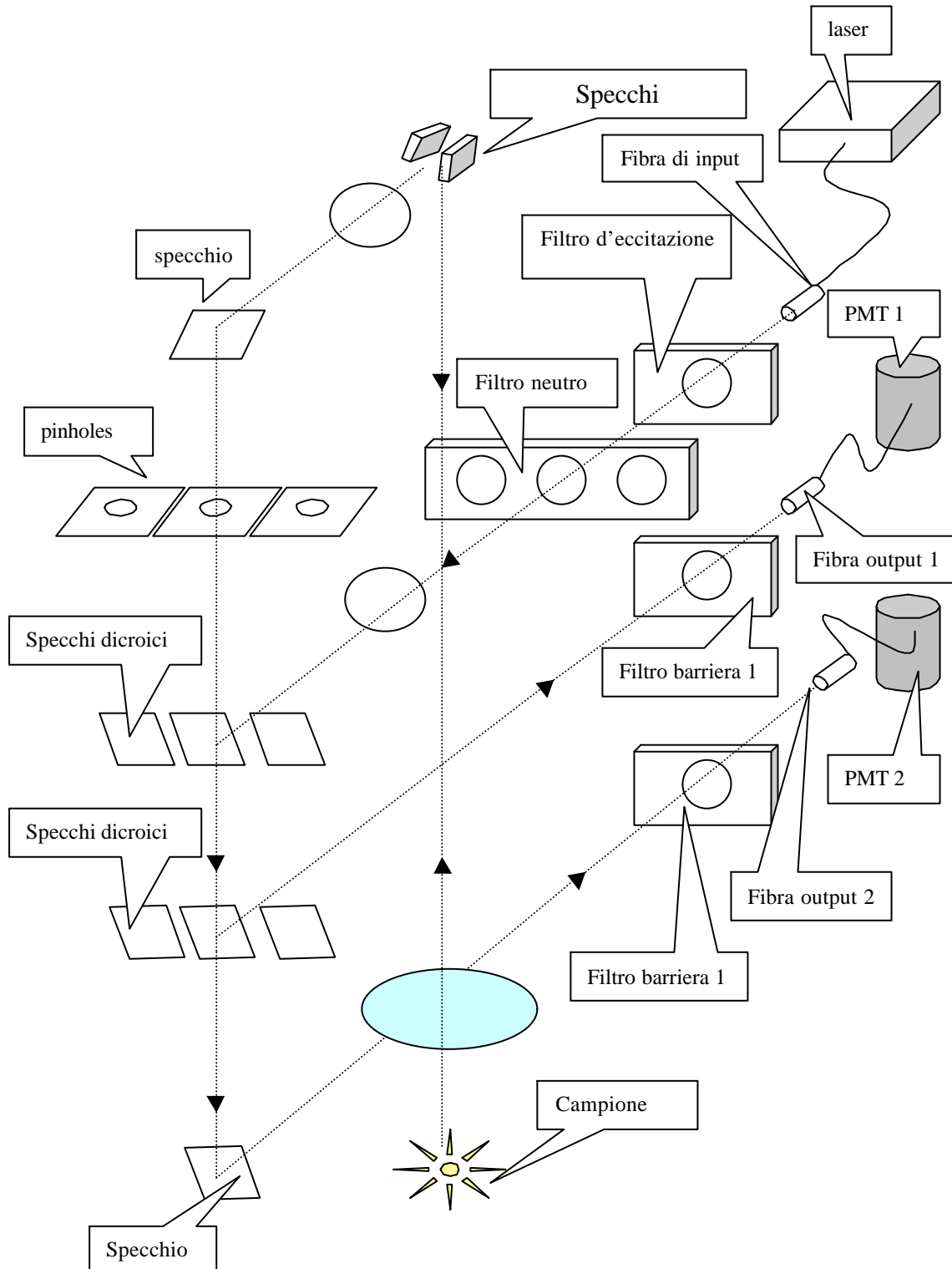
La struttura esterna del modulo di scansione è riportata in figura 3.2a : da essa risulta evidente la particolare versatilità di assetto di cui si può disporre, regolando a piacimento i parametri d'acquisizione. Subito in ingresso alla testa confocale sono collocati due filtri:

- ✓ il primo (*filtro d'eccitazione*) è ad alta precisione ed ha essenzialmente il compito di selezionare la lunghezza d'onda della radiazione da inviare in eccitazione al campione, eliminando così una prima fonte di rumore nelle acquisizioni portata da effetti di cromatismo della sorgente laser ;
- ✓ il secondo (*filtro neutro, ND filter = Neutral density filter*) consente di variare ulteriormente l'intensità della radiazione giocando sul livello di estrazione dell'apposita levetta . <sup>(2)</sup>

<sup>(2)</sup> I valori di trasmissione del filtro ND sono i seguenti:

100% (filtro fuori) ; 10% (prima posizione) ; 3% (seconda posizione) ; 1% (filtro completamente inserito)

Per quello che riguarda l'apertura confocale (*pinhole*), è anch'essa regolabile su tre posizioni a scatto che ne definiscono con precisione il raggio:  $10\mu\text{m}$  (leva tutta inserita),  $25\mu\text{m}$  (leva tutta disinserita), condizione di non confocalità (leva a metà). Nella pratica, tali valori sono solitamente convertiti nello spazio del campione andando a calcolare il raggio dell'immagine dell'apertura retroproiettata: ciò può essere agevolmente ottenuto dividendo il raggio del pinhole per la magnificazione totale del sistema.



**Fig. 3.2b** schema del cammino ottico della radiazione in emissione ed in eccitazione all'interno del modulo di scansione PCM 2000.

Si ottiene allora la seguente:

$$r_{retrop} = \frac{r_{pinhole}}{m_{totale}} = \frac{r_{pinhole}}{m_{obbiettivo} \cdot m_{sistema}} \quad (3.2.1)$$

nella quale  $m_{sistema}=0.85$ , per il PCM2000 nella configurazione corrente.

Utilizzando la (3.2.1) si può calcolare, ad esempio, nel caso di un obbiettivo 100X, che l'immagine retroproiettata per il pinhole di raggio  $10\mu m$  ha  $r_{retrop}=118nm$ , mentre quella relativa al pinhole di raggio  $25\mu m$  ha  $r_{retrop}=294nm$ . Vale qui la pena di notare che, come risulta chiaro dalla figura (3.2b), l'architettura del PCM 2000 utilizza un unico pinhole : quest'accorgimento permette un autoallineamento tra i raggi in eccitazione e quelli in emissione. Inoltre, le dimensioni fisse dei pinhole garantiscono, rispetto a quelli a variazione continua, un'estrema ripetibilità di effetto una volta selezionati. E' tuttavia sempre possibile modificarne i diametri montando particolari dischi di otturazione negli appositi alloggiamenti.

Dopo aver attraversato i primi due filtri di cui si è già detto, la radiazione in eccitazione incontra un primo specchio dicroico che ha il compito di separarne il cammino ottico da quello dell'emissione fluorescente. Il raggio viene quindi convogliato verso l'apertura confocale e da questa, a mezzo di uno specchio riflettente, verso i due specchietti galvanometrici attraverso i quali viene attuata la scansione del campione nel piano  $xy$ .

La radiazione in emissione percorre quindi il cammino inverso fino ad incontrare un secondo specchio dicroico, responsabile dell'ulteriore suddivisione del cammino ottico della fluorescenza.

Più precisamente, le possibilità sono le seguenti:

- ✓ tutta in corrispondenza del primo filtro barriera (*posizione Rf*) : è questa la configurazione che si sceglie, tipicamente, per le acquisizioni a singola colorazione
- ✓  $\lambda < 565nm$  sul primo filtro barriera e  $\lambda > 565nm$  sul secondo (*posizione DM 565*)
- ✓ suddivisione dell'intensità della fluorescenza al 50% tra i due filtri barriera (*posizione HM*).

In particolare, queste ultime due configurazioni vengono solitamente impiegate nell'ambito dell'acquisizione contemporanea di fluorescenze differenti dovute a colorazioni multiple.

Al termine di questo percorso sono infine posizionati i cosiddetti filtri barriera che permettono di selezionare le lunghezze d'onda che si intendono acquisire su cammini ottici separati.

Nel corso dei lavori di questa tesi, si sono tipicamente impiegati come filtri l'*HQ 515/30* (*passa banda, piccato in  $\lambda=515nm$  con larghezza di banda pari a  $30nm$* ) sul primo canale ed un *LP 650* (*passa alto con frequenza di taglio  $\lambda=650nm$* ) sul secondo.<sup>(3)</sup>

La fluorescenza uscente dai due filtri barriera viene quindi convogliata, via fibra ottica multimodo, ai fotomoltiplicatori (PMT) alloggiati, come detto, direttamente nel *controller* del sistema.

Questo è reso possibile dalla scelta di particolari fotomoltiplicatori di tipo *side-on*, la cui entrata *sensibile* si trova sulla faccia curva anziché su una delle basi, riducendone l'ingombro. In questo modo sono ridotti i fenomeni di disturbo elettromagnetico e le problematiche di schermatura che tipicamente affliggono questo tipo di misure e viene inoltre migliorata la compattezza della testa di scansione.

Per finire, l'uscita analogica è collegata ad appositi convertitori analogico-digitali per la relativa conversione del segnale da acquisire.

<sup>(3)</sup> Le specifiche di questi filtri sono riportate in appendice.

### 3.3 Software e modalità di acquisizione

Il pacchetto software impiegato per l'acquisizione e la visualizzazione delle immagini è costituito dal programma EZ 2000, installato in ambiente Windows NT.

Le possibilità che esso offre sono molteplici, sia per l'elaborazione in tempo reale del processo di imaging in corso (essenzialmente attraverso procedimenti di media ) sia per la sua analisi off-line.

Innanzitutto, prima di avviare un'acquisizione vera e propria è conveniente individuare al microscopio ottico la migliore immagine possibile per l'oggetto, tipicamente quella 'a fuoco', in fluorescenza o in trasmissione.

Ciò è funzionale, oltre che da un punto di vista strettamente pratico, anche per via di fenomeni di fotodecadimento della fluorescenza (descritti nei capitoli precedenti) legati alla continua eccitazione dei fluorocromi: è per questo opportuno utilizzare, in questa fase, radiazioni a bassa intensità associate al minor tempo possibile di esposizione.

Una volta individuato il campione, è possibile procedere alla vera e propria acquisizione pilotata via software.

Sono possibili, a questo punto, due modalità:

l'acquisizione della singola sezione a fuoco (file in formato *.tiff*) oppure il sezionamento dell'oggetto lungo l'asse ottico  $z$  (file formato *.ics/.ids*)<sup>(4)</sup>, onde procedere ad una sua successiva visualizzazione tridimensionale. Quest'ultima possibilità è di particolare rilevanza in ambito biologico, visto che permette di risalire alla forma del campione e quindi, imprescindibilmente, alle sue funzionalità specifiche.

In entrambi i casi, l'acquisizione consiste sostanzialmente nella visualizzazione su monitor, attraverso l'associazione di un falso colore ad ogni fluorescenza presente, di un'immagine la cui intensità varia, punto per punto, in base al conteggio dei fotoni provenienti da ogni singola regione scansionata.

Attraverso un'interfaccia grafica piuttosto intuitiva (si veda figura 3.2c), occorre innanzitutto impostare una giusta soluzione di compromesso tra il valore dei guadagni dei fototubi ed il tempo di scansione (quantificato dal parametro *speed*, associato al tempo di eccitazione della porzione di oggetto associata al singolo pixel) : ciò è ancora una volta necessario al fine di prevenire i soliti fenomeni di fotodanneggiamento.

Per quello che riguarda il sezionamento ottico, occorre impostare anche un set di parametri che definisca il range lungo  $z$  da scansionare (*bottom* e *top*) ed il passo (*step*) di tale scansione.

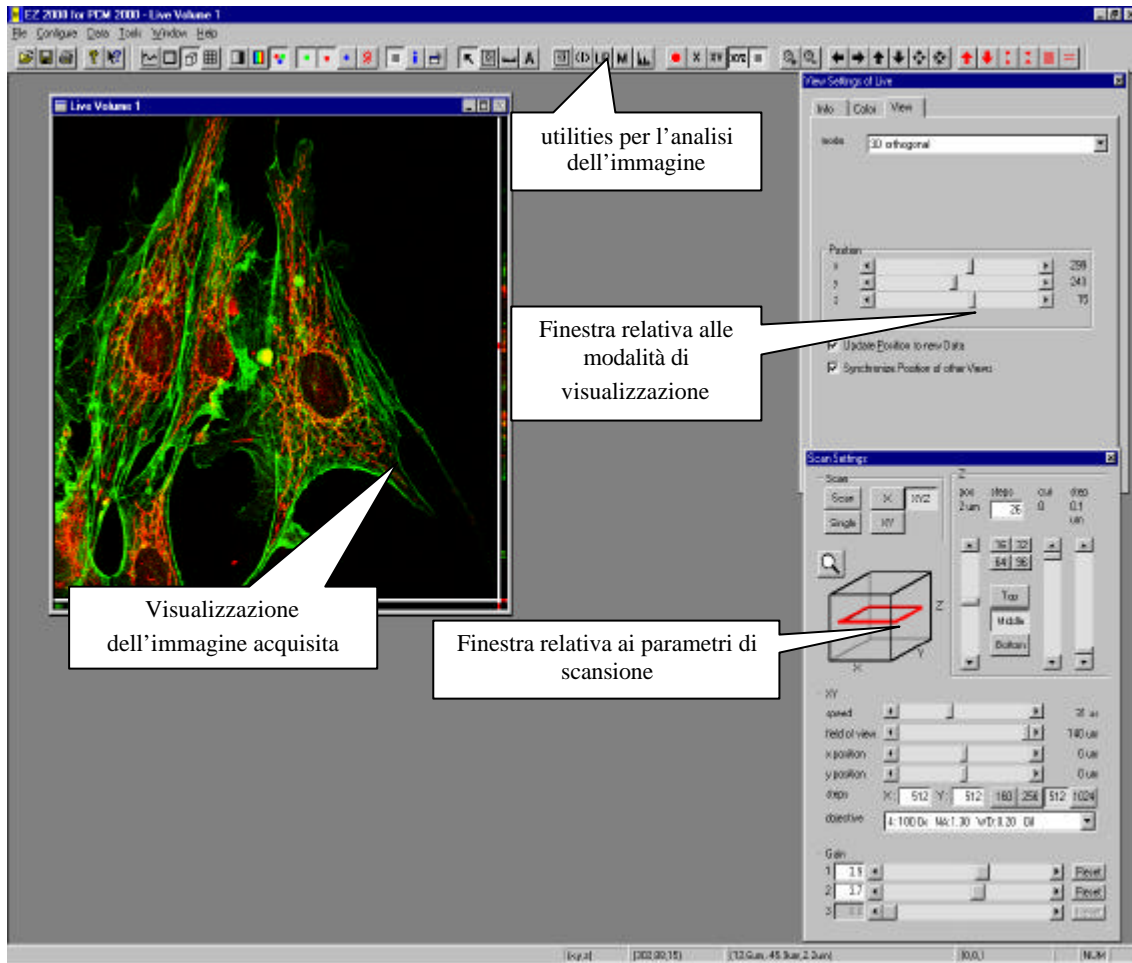
E' inoltre possibile usufruire di un utile funzionalità di zoom che permette di selezionare, all'interno del campo visivo, una regione di interesse entro la quale limitare il procedimento di imaging.

Una volta terminata l'acquisizione è possibile una sua prima analisi off-line: si possono applicare filtri specifici per la riduzione dei contributi rumorosi, recuperare informazioni sulla distribuzione dei valori d'intensità, effettuare misure morfometriche (attraverso una utility appositamente calibrata) o procedere ad una preliminare visualizzazione tridimensionale dell'oggetto (nel caso si sia effettuato un sezionamento ottico) attraverso l'opzione *volume renderer* : chiaramente, in questa fase, il valore della ricostruzione tridimensionale è, in generale, puramente indicativo della reale distribuzione spaziale dell'oggetto, visto che questa utility non si basa su alcun algoritmo particolare di deconvoluzione né tiene in alcun modo conto delle aberrazioni ottiche lungo  $z$  che, come si vedrà più dettagliatamente nel seguito,

---

<sup>(4)</sup> Ciascuna immagine viene immagazzinata in due file. Uno di essi (*.ics*), scritto in codice ASCII, contiene le informazioni circa il formato dell'immagine ed altre informazioni opzionali che vanno eventualmente precisate di volta in volta. L'altro file (*.ids*), di tipo binario, contiene i dati relativi all'acquisizione vera e propria.

intervengono pesantemente nei procedimenti di imaging in presenza di un forte mismatch tra gli indici di rifrazione.





## CAPITOLO 4

### Aberrazione ottica in presenza di mismatch degli indici di rifrazione

*In questo capitolo, sono riportati i risultati degli studi compiuti nell'ambito di questa tesi, volti a rilevare e a quantificare gli effetti del mismatch tra l'indice di rifrazione del mezzo d'immersione del campione e quello d'immersione dell'obbiettivo nella formazione di immagini in microscopia confocale.*

*Nella prima parte, l'analisi è svolta impiegando campioni noti di microsfere fluorescenti opportunamente preparati per simulare condizioni sperimentali in cui sia diversamente rilevante il fenomeno sotto osservazione.*

*Nella seconda parte, viene mostrata l'importanza di una conoscenza preventiva delle condizioni di mismatch nelle quali avrà luogo il procedimento di imaging, attraverso un'analisi comparata delle informazioni morfometriche (dimensioni, superficie, volume) ottenibili da un preparato biologico (oocita di *Xenopus laevis*).*

#### 4.1 Descrizione teorica

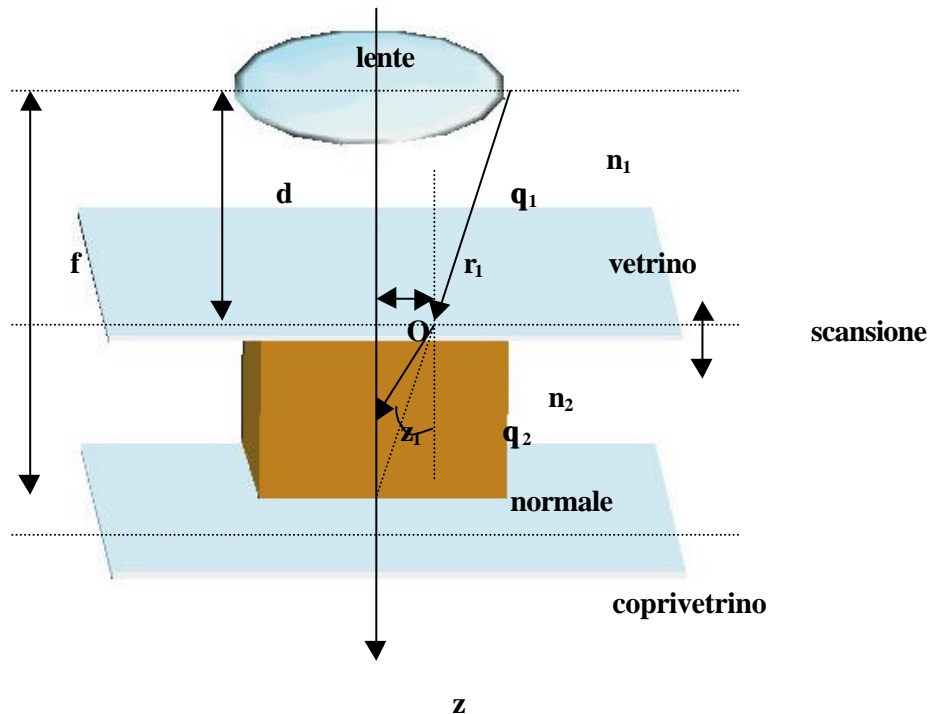
Alla base di un qualsiasi procedimento di imaging, sia esso condotto nell'ambito della microscopia cosiddetta *convenzionale* o meno, sono essenzialmente riconoscibili due distinte motivazioni: quella di produrre immagini dalle quali ricavare informazioni qualitative sull'oggetto osservato e quella di produrre immagini sulle quali compiere, in un secondo tempo, un'analisi di tipo quantitativo (conteggio di oggetti, rilevamento di proprietà metriche, ricostruzione della struttura tridimensionale ecc.).

Sebbene questi due diversi approcci siano, non di rado, tra loro imprescindibili, le problematiche sperimentali che essi pongono sono talvolta contrastanti e richiedono l'impiego di algoritmi o tecniche di misura appositamente studiate per l'occasione.

In quello che segue, verrà preso in considerazione proprio uno dei fattori limitanti della microscopia ottica in generale e di quella confocale in particolare: l'effetto del mismatch di indici di rifrazione tra campione ed obiettivo.

Questa condizione sperimentale, per molti aspetti inevitabile nei casi di interesse pratico, ha diretto effetto non solo sull'analisi quantitativa (come verrà diffusamente illustrato in questo capitolo), ma pure sulle potenzialità di imaging di un sistema confocale (come si vedrà successivamente), degradandone le prestazioni legate alla focalizzazione di oggetti in profondità e quindi alla possibilità di darne un'affidabile ricostruzione tridimensionale tramite l'impiego di appositi algoritmi di deconvoluzione.

La tipica situazione, in cui ci si trova ad operare nelle pratiche di laboratorio, può essere efficacemente visualizzata facendo riferimento alla figura 4.1a.



**Fig. 4.1a** geometria del sistema.

Il campione è disposto tra un vetrino ( $n=1,5$ ) ed un coprivetrino ( $n=1,5$ ) ed è immerso in un mezzo che può essere una soluzione fisiologica di mantenimento nel caso di preparati biologici (in questo caso  $n$  è, in generale, variabile da punto a punto e di difficile valutazione) oppure un semplice mezzo di 'supporto' quale glicerolo ( $n_2=1,47$ ), olio (nei casi considerati nel seguito  $n_2=1,52$ ) o acqua distillata ( $n_2=1,33$ ).

A ciò si aggiunga che il campione stesso avrà un indice di rifrazione  $h$ , che può differenziarsi anche di molto da quelli delle altre componenti in gioco, contribuendo così a complicare ulteriormente ogni trattazione formale del fenomeno.

Nel seguito, salvo diverso avviso, non si terrà in alcun modo conto di  $h$ , assumendo, con questo, che esso abbia un valore prossimo a quello degli altri  $n$  in gioco o che, comunque, le dimensioni dell'oggetto siano tali da giustificare, almeno in prima approssimazione, una tale ipotesi semplificativa.

Come si vede, la lente dell'obbiettivo, il cui mezzo d'immersione sia caratterizzato da  $n_1$ , è accoppiata al vetrino tramite una *goccia* dello stesso: questo accorgimento fa sì che un raggio luminoso uscente da essa non subisca alcuna apprezzabile rifrazione fino a che non giunga in prossimità del vetrino. Trascurando, in prima approssimazione, la rifrazione causata dal vetro (ipotesi, questa, verificata nel caso, ad esempio, dell'obbiettivo 100X in olio usato nella maggior parte delle misure di questa tesi), la discussione può essere ristretta agli effetti prodotti dal mismatch all'interfaccia tra il vetrino ed il mezzo d'immersione del campione.

Più precisamente, possono presentarsi le seguenti eventualità:

- Il raggio viene rifratto in prossimità dell'interfaccia vetro-campione. A seguito di ciò, la sua traiettoria viene cambiata secondo un certo angolo  $q_2$  con un conseguente spostamento del suo punto di focalizzazione sull'asse ottico  $z$  rispetto alla condizione ideale di perfetta assenza di mismatch. In particolare, nel caso in cui sia  $n_1 > n_2$  (risp.  $n_1 < n_2$ ), il raggio si focalizza più (risp. meno) in profondità, con una conseguente deformazione delle dimensioni reali dell'oggetto osservato lungo la direzione  $z$ .
- Tale rifrazione, come è noto dalla teoria generale dell'ottica, è accompagnata da una riflessione. Poiché, d'altra parte, si ha una rifrazione solo quando l'angolo d'incidenza è minore dell'angolo di totale riflessione interna, ciò determina una diminuzione dell'effettiva apertura numerica del sistema.
- Un perfetto procedimento di imaging si ha solo quando il fronte d'onda rimane sferico in tutto lo spazio: la presenza di un forte mismatch all'interfaccia tra i due mezzi è, a sua volta, accompagnata da una progressiva deviazione da questa condizione ideale, cosa, questa, che si riflette in una conseguente perdita di risoluzione.
- L'immagine dello spot focalizzato tende, inoltre, ad essere via via meno localizzata, con una conseguente diminuzione della radiazione emessa che viene rilevata dal pinhole ed un peggioramento delle prestazioni del sistema, dovuto alla diminuzione delle intensità rilevate.

Studi recenti hanno portato alla progettazione e fabbricazione di speciali obbiettivi ad immersione in acqua, appositamente concepiti per ovviare, almeno in linea di principio, a questo problema nell'osservazione di preparati biologici *in vivo*, il cui indice di rifrazione è prossimo a quello dell'acqua.

Nella pratica, però, questo tipo di dispositivi non ha avuto, ad oggi, larga diffusione, sia per questioni di costo, sia per l'attuale scarsa attitudine da essi mostrata nella visualizzazione di molti dei campioni biologici comunemente oggetto di studio.

Risulta per questo di notevole importanza un'analisi accurata dei fenomeni connessi al mismatch negli indici di rifrazione, onde tenere conto, ove sia il caso, degli opportuni fattori di correzione.

La trattazione teorica dei fenomeni di aberrazione osservati lungo l'asse di sfuocamento può essere condotta [T.D. Visser and J.L. Oud, 1992], in buon accordo con i risultati sperimentali, nell'ambito dell'ottica geometrica.

Con riferimento sempre alla figura 4.1a, definiamo le seguenti quantità <sup>(1)</sup>:

$n_1$  = indice di rifrazione del mezzo d'immersione dell'obbiettivo e del mezzo di accoppiamento tra obbiettivo e vetrino ;

$n_2$  = indice di rifrazione del mezzo d'immersione del campione ;

$\mathbf{q}_1$  = angolo formato con la normale all'interfaccia tra i due mezzi da un generico raggio luminoso nel *primo* mezzo ;

$\mathbf{q}_2$  = angolo formato con la normale all'interfaccia tra i due mezzi da un generico raggio luminoso nel *secondo* mezzo ;

$z_1$  = distanza tra l'interfaccia ed il punto in cui il raggio luminoso viene effettivamente focalizzato ;

$r_1$  = raggio del cono di luce in prossimità dell'interfaccia ;

$d$  = distanza tra l'interfaccia e la lente dell'obbiettivo ;

$f$  = fuoco della lente ;

In accordo con la *legge di Snell* si può scrivere:

$$n_1 \sin \mathbf{q}_1 = n_2 \sin \mathbf{q}_2 \quad (4.1.1)$$

inoltre, dalla figura 4.1a, risulta evidente la seguente relazione:

$$r_1 = z_1 \tan \mathbf{q}_2 \quad (4.1.2)$$

Uguagliando (4.1.1) e (4.1.2) si ottiene la :

$$z_1 = (f - d_1) \frac{\tan \mathbf{q}_1}{\tan \mathbf{q}_2} = (f - d_1) \frac{n_2 \cos \mathbf{q}_2}{n_1 \cos \mathbf{q}_1} \quad (4.1.3)$$

Si supponga ora che la posizione del campione venga variata spostando il portaoggetti di una quantità  $\Delta_s$  lungo l'asse verticale.

A seguito di ciò, la distanza tra l'interfaccia e la lente vale ora in modulo:

$$|d_2 - d_1| = \Delta_s \quad (4.1.4)$$

Più precisamente, questo comporta che il nuovo punto  $z_2$  in cui si focalizza il raggio luminoso è legato a quello vecchio secondo la relazione:

$$\Delta_f = z_1 - z_2 = \Delta_s \frac{n_2 \cos \mathbf{q}_2}{n_1 \cos \mathbf{q}_1} \quad (4.1.5)$$

ossia, ad uno spostamento  $D_s$  del portaoggetti corrisponde uno spostamento misurato dallo strumento pari a  $D_f$  che differisce da  $D_s$  per un fattore  $C$  dato da:

---

<sup>(1)</sup> Vengono qui di seguito considerati trascurabili gli effetti dovuti all'indice di rifrazione del campione e a quello del vetro.

$$C = \frac{n_2 \cos \mathbf{q}_2}{n_1 \cos \mathbf{q}_1} \quad (4.1.6)$$

Questo significa che, per ricavare la profondità *realmente* sondata durante una scansione, occorre tenere conto del fattore correttivo  $C$  dato dalla (4.1.6).

In particolare, l'entità dell'errore che si commetterebbe altrimenti nella stima della distanza tra due punti collocati lungo l'asse  $z$ , cresce con il mismatch tra gli indici di rifrazione.

La (4.1.6) può essere anche riscritta, per maggiore comodità d'uso, come :

$$C = \frac{n_2}{n_1} \frac{\sqrt{1 - \left( \frac{n_1}{n_2} \sin \mathbf{q}_1 \right)^2}}{\cos \mathbf{q}_1} \quad (4.1.7)$$

ove si è tenuto conto della:

$$\cos \mathbf{q}_2 = \sqrt{1 - \left( \frac{n_1}{n_2} \sin \mathbf{q}_1 \right)^2} \quad (4.1.8)$$

ricavata a partire dalla *legge di Snell*.

Analogamente, volendo introdurre la dipendenza dall'apertura numerica NA dell'obiettivo utilizzato, si perviene alla forma equivalente per la (4.1.5) :

$$\Delta_f = \frac{\tan \left( \sin^{-1} \left( \frac{NA}{n_1} \right) \right)}{\tan \left( \sin^{-1} \left( \frac{NA}{n_2} \right) \right)} \Delta_s \quad (4.1.9)$$

Limitandoci all'approssimazione parassiale ( $\mathbf{q}_1 @ 0$ ), la (4.1.7) assume la forma semplificata:

$$\Delta_f = \Delta_s \frac{n_2}{n_1} \quad (4.1.10)$$

dalla quale risulta immediatamente che, nel caso in cui sia  $n_1 > n_2$  (risp.  $n_1 < n_2$ ) si ha pure  $\mathbf{D}_f < \mathbf{D}_s$  (risp.  $\mathbf{D}_f > \mathbf{D}_s$ ), ossia l'estensione assiale dell'oggetto apparirà *superiore* (risp. *inferiore*) alle sue dimensioni reali, visto che lo spostamento compiuto ( $\mathbf{D}_s$ ) apparirà *superiore* (risp. *inferiore*) a quello realmente effettuato ( $\mathbf{D}_f$ ) dal punto su cui ci si sta focalizzando.

Supponendo, quindi, di utilizzare come obiettivo un 100X in olio ( $n_1 @ 1.52$ ) con NA=1.30 per focalizzare un qualsiasi campione in acqua ( $n_2 @ 1.33$ ), si ottengono, a partire dalla (4.1.7) i seguenti fattori di scalamento, a seconda che si consideri l'approssimazione parassiale ( $\mathbf{q}_1 = 0^\circ$ ) o quella relativa ai raggi più esterni in grado di attraversare la lente ( $\mathbf{q}_1 = 60^\circ$ ):

$$\begin{array}{ll} C=0.32 & \text{per } \mathbf{q}_1 = 60^\circ \\ C=0.88 & \text{per } \mathbf{q}_1 = 0^\circ \end{array}$$

Questo significa che le dimensioni dell'oggetto, misurate lungo l'asse di scansione, appariranno, nell'ambito di questa trattazione teorica semplificata, sovrastimate di un fattore compreso tra 1.14 e 2.73 rispetto a quelle reali. In particolare, maggiore è l'apertura numerica dell'obiettivo utilizzato, maggiori saranno le conseguenze di tale fenomeno.

Un'altra conseguenza della presenza di mismatch all'interfaccia tra i due mezzi, che può essere qualitativamente illustrata dal modello sin qui sviluppato, è quella relativa al decadimento delle

prestazioni del sistema in termini di risoluzione, a seguito dello ‘sparpagliamento’ della regione di fuoco (*aberrazione sferica*).

Infatti, la focalizzazione dei raggi luminosi in punti diversi lungo l’asse ottico per effetto della rifrazione, fa sì che non ci sia più un singolo spot a fuoco fortemente localizzato, ma che, piuttosto, ci si trovi in presenza di una regione più estesa, diffusamente illuminata, nella direzione dell’asse ottico. Più precisamente, si può parlare di una focalizzazione dei raggi parassiali in posizioni via via distinte rispetto ai raggi marginali: ciò assume particolare rilievo (come verrà illustrato dai risultati sperimentali riportati nei capitoli successivi di questa tesi) qualora si tenti di mettere a fuoco oggetti situati in profondità in un mezzo ad indice di rifrazione significativamente diverso da quello del mezzo d’immersione dell’obiettivo. In tal caso, infatti, la presenza di mismatch accresce gli effetti della diffrazione, portando ad un progressivo sparpagliamento della PSF con conseguente diminuzione del potere risolutivo dello strumento.

Vale ancora la pena notare che non è prevista alcuna aberrazione nelle direzioni perpendicolari a quella di scansione e che, pertanto, le dimensioni misurate nel ‘piano  $xy$ ’ risultano indipendenti dalla presenza o meno di mismatch.

Finora si è trascurata la presenza del vetrino e gli effetti del suo indice di rifrazione (in generale diverso da quello degli altri mezzi presenti) sul procedimento di imaging. Complicando un poco il modello sin qui sviluppato ed indicando con  $n_3$  l’indice di rifrazione del vetro, si ottiene, con conti del tutto analoghi a quelli appena svolti, la seguente relazione:

$$\Delta_f = \frac{n_2}{n_3} \frac{\sqrt{1 - \left(\frac{n_1}{n_2} \sin \mathbf{q}_1\right)^2}}{\sqrt{1 - \left(\frac{n_1}{n_3} \sin \mathbf{q}_1\right)^2}} \Delta_s \quad (4.1.11)$$

generalizzazione della (4.1.7) nel caso di tre mezzi con  $n$  significativamente diversi.

Va comunque tenuto presente che, come si legge in letteratura [T.D. Visser, J.L. Oud and G.J. Brakenhoff, 1992], questa semplice trattazione geometrica del problema non può, da sola, rendere *quantitativamente* conto dei fattori di scalamento riscontrati nelle varie condizioni sperimentali in cui ci si può trovare ad operare. In altre parole, occorrerebbe introdurre nel modello anche altri parametri (quali le dimensioni del campione, il suo indice di rifrazione ecc.) che possono assumere, di volta in volta, un ruolo non più trascurabile. Nella pratica, data le complicazioni computazionali cui si può andare incontro nell’affrontare un conto formale del fattore di scalamento più opportuno, è preferibile, ove si renda necessaria la conoscenza di  $C$ , cercare di darne una stima per via sperimentale, attraverso la valutazione dell’aberrazione assiale osservata su oggetti di dimensioni note nelle condizioni volute, come verrà diffusamente illustrato dai risultati riportati nel seguito.

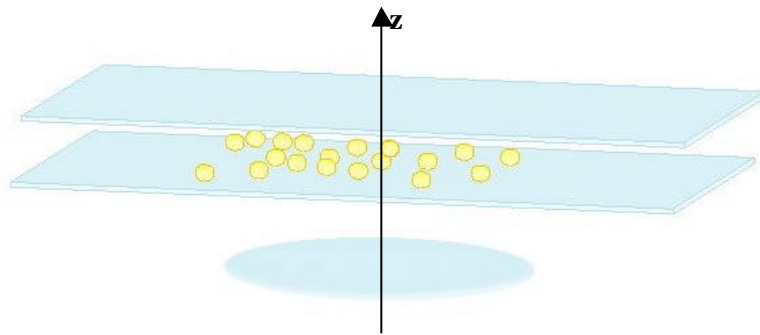
## 4.2 Analisi sperimentale

Come primo esperimento per la verifica e l'analisi dell'aberrazione prodotta lungo l'asse ottico da mezzi a diverso indice di rifrazione, si è scelto di analizzare uno standard tipicamente impiegato nelle procedure di calibrazione di sistemi ottici a fluorescenza, costituito da campioni (di dimensioni nominali variabili) di *microsfere* in *polistirene* (Polysciences).

Innanzitutto, si procede ad un'opportuna diluizione in acqua distillata del campione in modo da evitare fenomeni di aggregazione o eccessiva dispersione, che, per motivi evidentemente diversi, risultano poco desiderabili ai fini del sezionamento ottico.

Si preleva quindi una goccia del preparato e la si lascia asciugare su un vetrino ( $n=1.5$  ; spessore  $0.17\text{mm}$ ) opportunamente collocato sotto una campana a vuoto ad una pressione di alcuni millibar: questa fase è necessaria al fine di rimuovere il solvente e, per quanto possibile, ogni residuo di umidità, permettendo alla fine di avere una situazione ideale in cui le microsfere si trovano a contatto con la superficie del vetrino, più o meno uniformemente distribuite.

A questo punto è possibile inglobare il campione entro mezzi a diverso indice di rifrazione, semplicemente depositando una goccia della sostanza prescelta sul vetrino e sigillando il tutto con un altro vetrino di uguali caratteristiche, ottenendo così la situazione rappresentata in figura 4.2a.



**Fig. 4.2a** vetrino preparato con microsfere

Le acquisizioni, condotte seguendo la procedura descritta nel precedente capitolo, sono state effettuate su tre diversi campioni di microsfere, impiegando un obiettivo Nikon 100X in olio ( $NA=1.30$  ;  $WD=0.20\text{mm}$ ) e, occasionalmente, un Nikon 60X in aria ( $NA=0.85$  ;  $WD=0.30\text{mm}$ ) in modo da poter confrontare i risultati ottenuti in diverse condizioni critiche.

Il settaggio dei vari parametri d'acquisizione è stato mantenuto, per quanto possibile, costante nel corso di tutta la sessione di misure.

I risultati ottenuti sono riportati nelle tabelle allegate di seguito.

**100X in olio**

<b>I<sub>ecc</sub> nm</b>	<b>Mezzo (n)</b>	<b>Æ<sub>nominale</sub> (µm)</b>	<b>Æ<sub>x</sub> (µm)</b>	<b>Æ<sub>y</sub> (µm)</b>	<b>Æ<sub>xz</sub> (µm)</b>	<b>Æ<sub>yz</sub> (µm)</b>
488	Olio (1.518)	2.76±0.06	2.74±0.19	2.74±0.19	2.75±0.21	2.75±0.21
488	Glicerolo (1.475)	2.76±0.06	2.75±0.20	2.75±0.20	3.73±0.18	3.74±0.17
488	Aria (1)	2.76±0.06	2.74±0.14	2.75±0.14	8.45±0.34	8.50±0.41
488	NOA (1.527)	2.76±0.06	2.75±0.08	2.75±0.08	2.28±0.15	2.27±0.16
488	Olio (1.518)	21.99±2.69	20.75±0.60	20.80±0.68	21.01±0.61	21.17±0.68
488	Glicerolo (1.475)	21.99±2.69	21.92±1.44	22.02±1.71	28.02±2.03	27.42±1.98
488	Aria (1)	21.99±2.69	20.88±0.74	20.80±0.76	41.56±0.96	41.54±0.68
488	NOA (1.527)	21.99±2.69	22.5±0.67	22.42±0.81	19.61±0.82	19.51±0.91
488	Ovocita (?)	21.99±2.69	21.69±2.91	21.93±2.63	27.02±3.42	27.61±3.03

**60X in aria**

<b>I<sub>ecc</sub> nm</b>	<b>Mezzo (n)</b>	<b>Æ<sub>nominale</sub> (µm)</b>	<b>Æ<sub>x</sub> (µm)</b>	<b>Æ<sub>y</sub> (µm)</b>	<b>Æ<sub>xz</sub> (µm)</b>	<b>Æ<sub>yz</sub> (µm)</b>
488	Olio (1.518)	21.99±2.69	22.09±0.68	22.11±0.54	16.18±1.03	16.09±1.12
488	Glicerolo (1.475)	21.99±2.69	22.20±1.70	22.19±1.68	17.50±2.60	18.05±2.14
488	Aria (1)	21.99±2.69	21.92±0.86	21.25±0.83	21.42±0.49	21.34±0.62
488	NOA (1.527)	21.99±2.69	22.31±1.81	22.38±1.86	15.84±1.35	15.69±1.43

**100X in olio**

<b>I<sub>ecc</sub> nm</b>	<b>Mezzo (n)</b>	<b>Æ<sub>nom.</sub> (µm)</b>	<b>Æ<sub>x</sub> (µm)</b>	<b>Æ<sub>y</sub> (µm)</b>	<b>Æ<sub>xz</sub> (µm)</b>	<b>Æ<sub>yz</sub> (µm)</b>
488	Olio (1.518)	15.24±1.22	14.97±0.19	14.80±0.28	14.75±0.21	14.91±0.11
488	Glicerolo (1.518)	15.24±1.22	15.12±0.20	15.08±0.25	19.64±0.18	19.65±0.17
488	Aria (1)	15.24±1.22	14.99±0.14	14.98±0.23	26.32±0.34	26.57±0.41
488	NOA (1.527)	15.24±1.22	15.21±0.08	15.18±0.18	13.12±0.15	13.24±0.22
543	Olio (1.518)	15.24±1.22	14.77±0.29	14.56±0.13	14.48±0.22	14.35±0.15
543	Glicerolo (1.475)	15.24±1.22	15.08±0.15	15.02±0.15	19.22±0.21	19.36±0.17
543	Aria (1)	15.24±1.22	14.75±0.24	14.67±0.33	25.87±0.29	26.06±0.10
543	NOA (1.527)	15.24±1.22	15.12±0.11	15.09±0.14	12.98±0.11	12.88±0.23

I campioni relativi alle prime due sessioni di misura sono marcati con una sonda fluorescente che assorbe nel *blu* ( $\lambda = 488 \text{ nm}$ ) ed emette nel *verde* ( $\lambda = 543 \text{ nm}$ ), per cui si è utilizzata come sorgente eccitante il laser elio-neon.

Per quello che riguarda l'ultima acquisizione, si tratta di un campione di *sfere bicromatiche* del diametro nominale di  $(15.24 \pm 1.22) \mu\text{m}$ .

La peculiarità di questi oggetti risiede nella diversa colorazione della superficie (*verde*) rispetto all'interno (*rosso*), ottenuta attraverso una specifica marcatura in fluorescenza delle due regioni: questo accorgimento permette di ottenere informazioni sulla loro struttura impiegando entrambe le sorgenti laser disponibili in eccitazione (elio-neon con  $\lambda = 488 \text{ nm}$  ed argon con  $\lambda = 543 \text{ nm}$ ).

I valori riportati nelle tabelle si riferiscono alle misure effettuate su un set di circa 30 microsfele per ciascuna situazione sperimentale.

Quello che si ottiene è in buon accordo, almeno da un punto di vista qualitativo, con i comportamenti previsti dalla teoria precedentemente esposta: non si osserva alcuna aberrazione nel piano  $xy$  perpendicolare all'asse ottico  $z$ , mentre le dimensioni degli oggetti valutate lungo  $z$  risultano riscalate secondo un fattore  $C$  tanto più grande quanto più significativo è il mismatch tra gli indici di rifrazione in gioco.

In figura 4.2b è riportato il caso di una sfera ( $\lambda = 2.7 \mu\text{m}$ ) acquisita in olio con obiettivo 100X in olio. Come si vede, il campione non presenta alcuna aberrazione imputabile al disaccoppiamento degli indici di rifrazione.

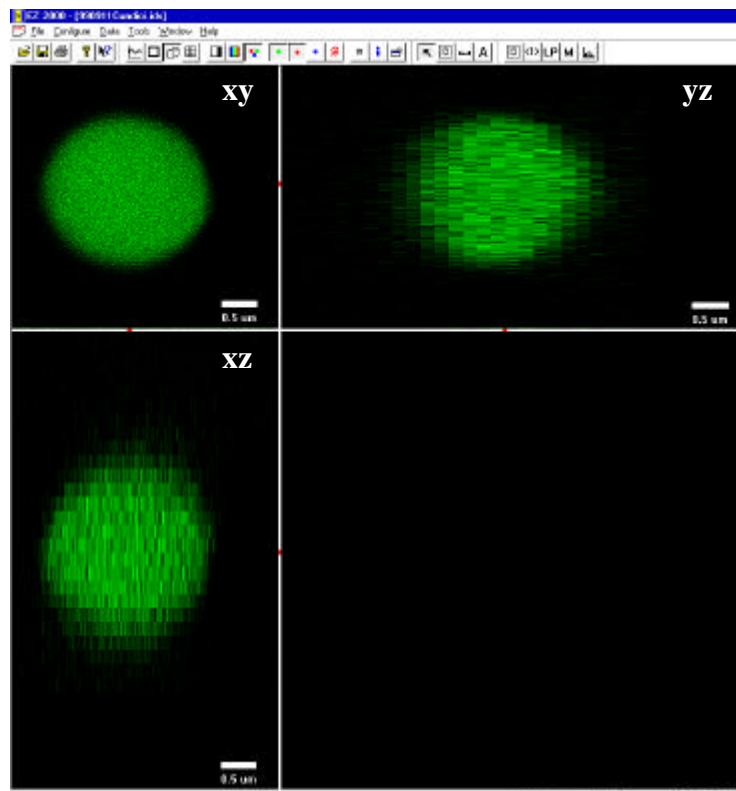


Fig. 4.2b

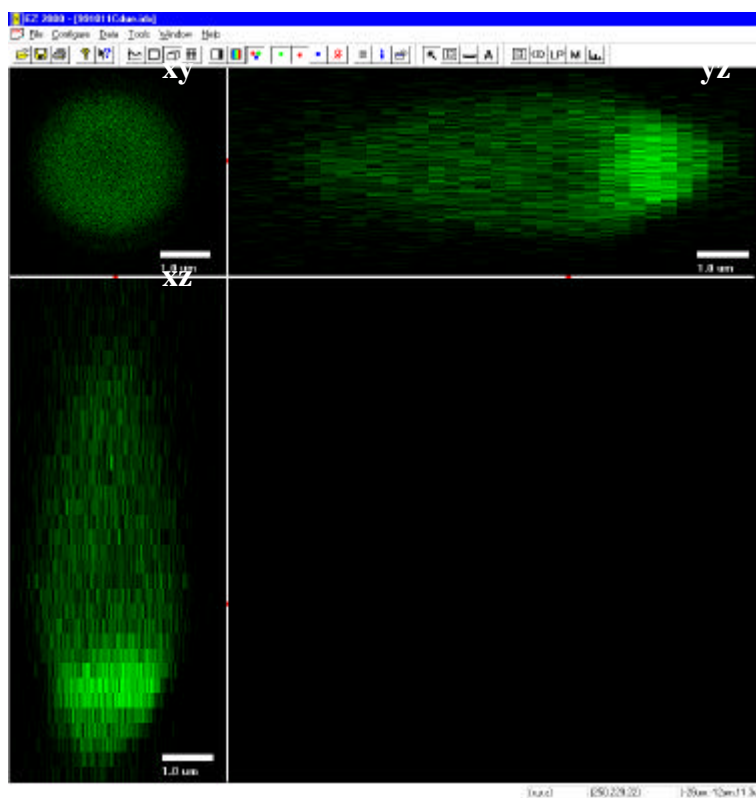


Fig. 4.2c

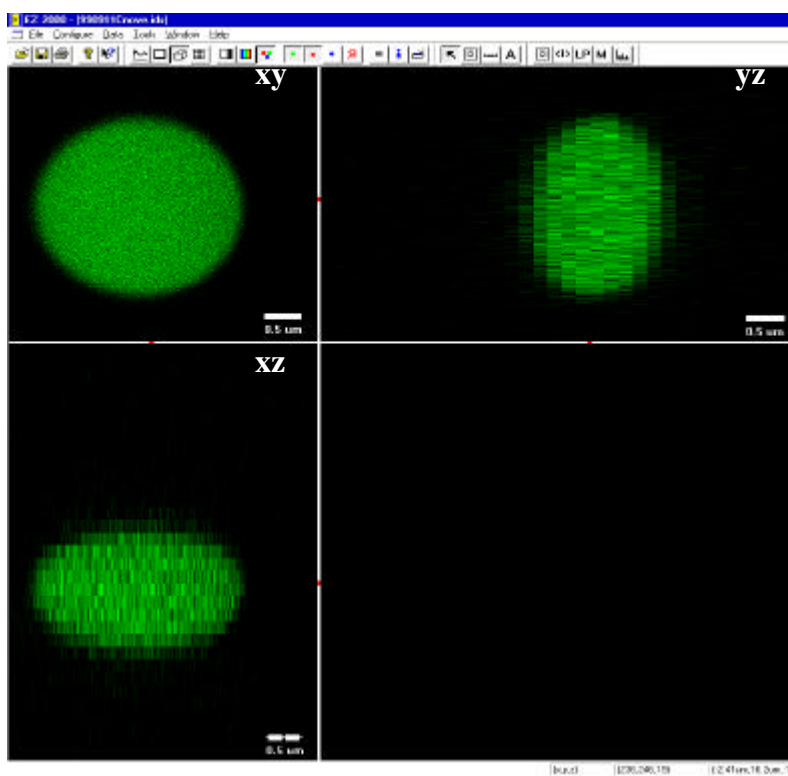


Fig. 4.2d

In figura 4.2c (caso di microsfera in aria) e 4.2d (caso di microsfera in colla NOA), viceversa, risultano evidenti gli effetti di tale mismatch e precisamente, si ha un allungamento nella direzione  $z$  nel caso dell'aria (indice di rifrazione minore di quello dell'olio) ed un accorciamento nel caso della colla NOA (indice di rifrazione maggiore di quello dell'olio), proprio come previsto dalla teoria generale.

Questo diverso comportamento si ripercuote direttamente anche su qualsiasi procedimento di ricostruzione tridimensionale dell'oggetto sotto esame. In particolare, come documentato dalle immagini allegate qui di seguito, ottenute montando 'semplicemente' le sezioni acquisite tramite la utility *volume renderer* di EZ2000, risulta ancora una volta evidente la deformazione assiale in presenza di mismatch.

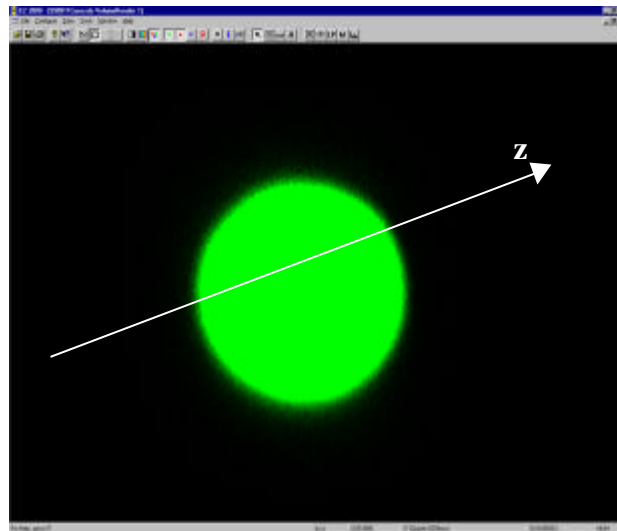


Fig. 4.2e: ricostruzione di una microsfera fluorescente in olio.

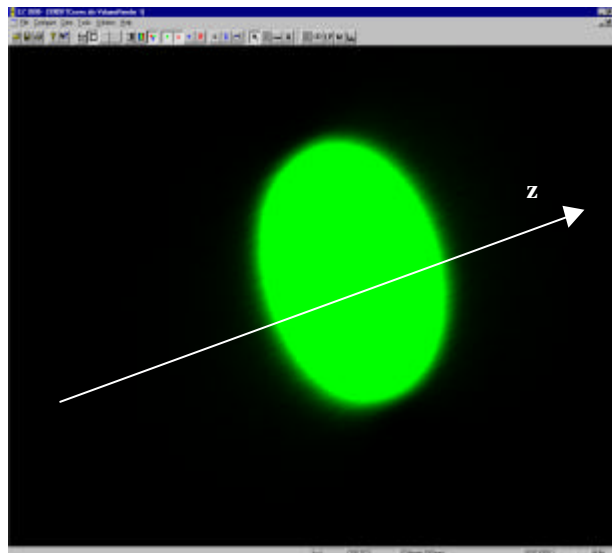
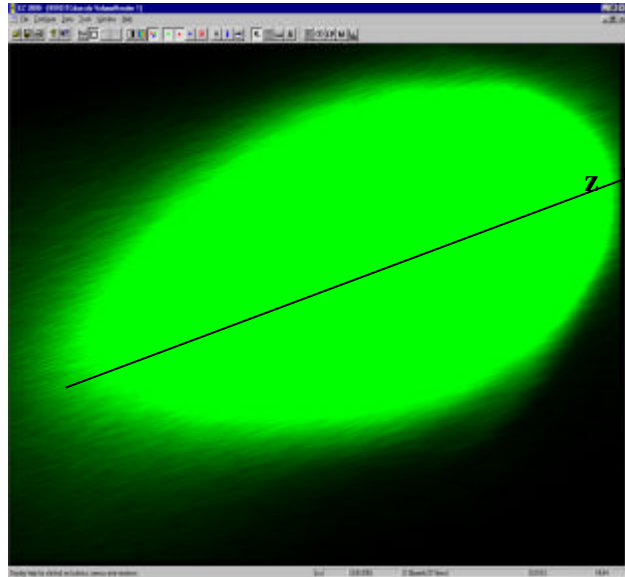


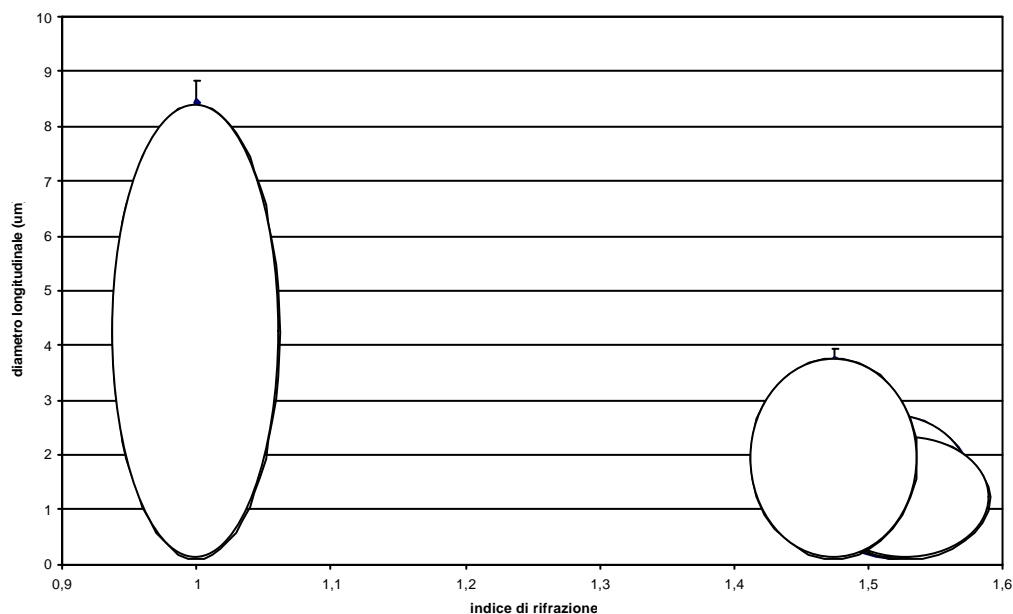
Fig. 4.2f: ricostruzione di una microsfera fluorescente in colla NOA.



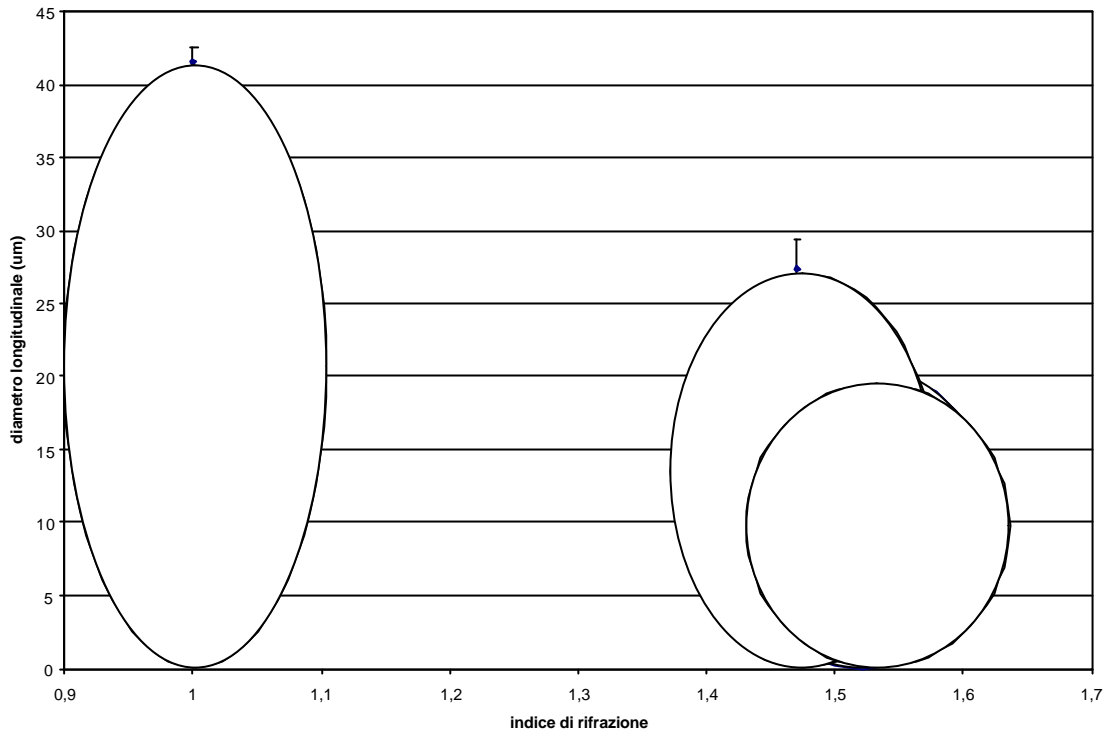
**Fig. 4.2g:** ricostruzione di una microsfera fluorescente in aria.

Dai grafici allegati, nei quali è riportato l'andamento delle dimensioni assiali al variare dell'indice di rifrazione d'immersione del campione, si deduce che il comportamento del sistema è lo stesso sia nel caso di obiettivo 100X in olio che 60X in aria.

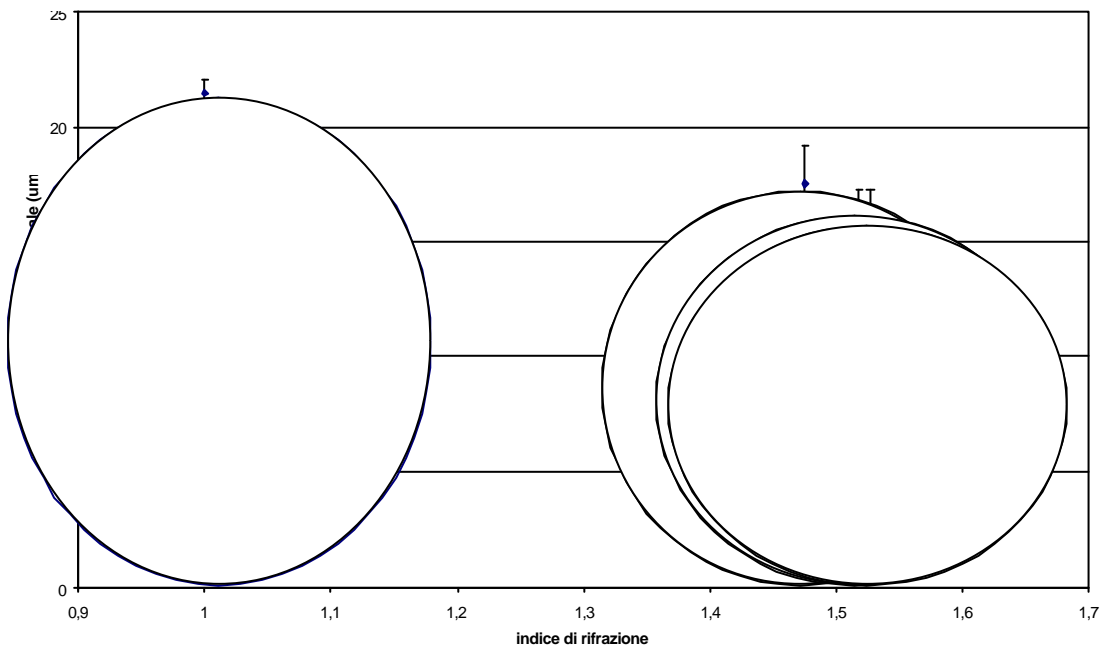
In particolare, la focalizzazione di microsfere in aria attraverso l'utilizzo del 60X non risulta affetta da aberrazione assiale, cosa, questa, a priori non del tutto prevedibile vista la presenza, comunque, di un'interfaccia di mismatch in corrispondenza del vetrino, il cui indice di rifrazione è significativamente diverso da quello dell'aria. Si può tenere conto di questa nuova circostanza facendo riferimento ad un parametro (lo spessore delle regioni a diverso  $n$ ) non inglobato esplicitamente dalla teoria sin qui sviluppata. Sono, in tal senso, reperibili numerosi studi in letteratura [J.G. McNally, C. Preza and J.A. Conchello, 1994] nei quali si fa ampiamente riferimento all'influenza dello spessore  $d$  del vetrino sulle prestazioni del sistema, quantificate in termini di risposta all'impulso (PSF). I risultati mostrano come, al crescere di  $d$  al di sopra del valore per il quale sono tipicamente progettati molti obiettivi ( $d = 0.15-0.17$  mm) si assiste ad un progressivo aumento dell'aberrazione sferica della radiazione luminosa con conseguente peggioramento dell'affidabilità dello strumento nei procedimenti di imaging.



**Fig. 4.2h:** andamento delle dimensioni assiali misurate con obiettivo 100X in olio per un campione di microsfere ( $\varnothing \cong 3\mu\text{m}$ ) in presenza di mismatch di indici di rifrazione.



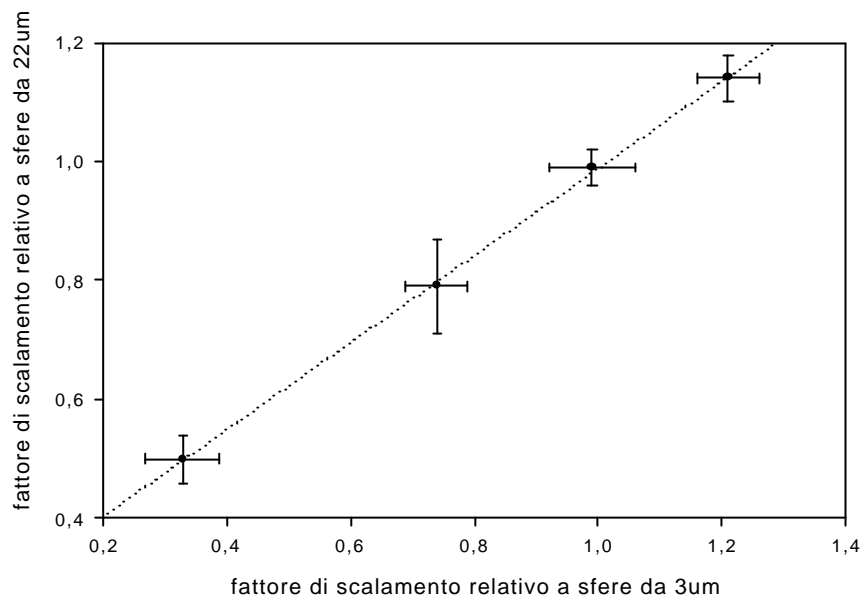
**Fig. 4.2i:** andamento delle dimensioni assiali misurate con un obiettivo 100X in olio per un campione di microsferre ( $\varnothing \cong 22\mu\text{m}$ ) in presenza di mismatch degli indici di rifrazione.



**Fig. 4.2l:** andamento delle dimensioni assiali misurate con un obiettivo 60X in aria per un campione di microsferre ( $\varnothing \cong 22\mu\text{m}$ ) in presenza di mismatch degli indici di rifrazione.

E' possibile, a questo punto, procedere ad una valutazione del ruolo che assumono, nelle condizioni sperimentali sopra descritte, le dimensioni dell'oggetto analizzato.

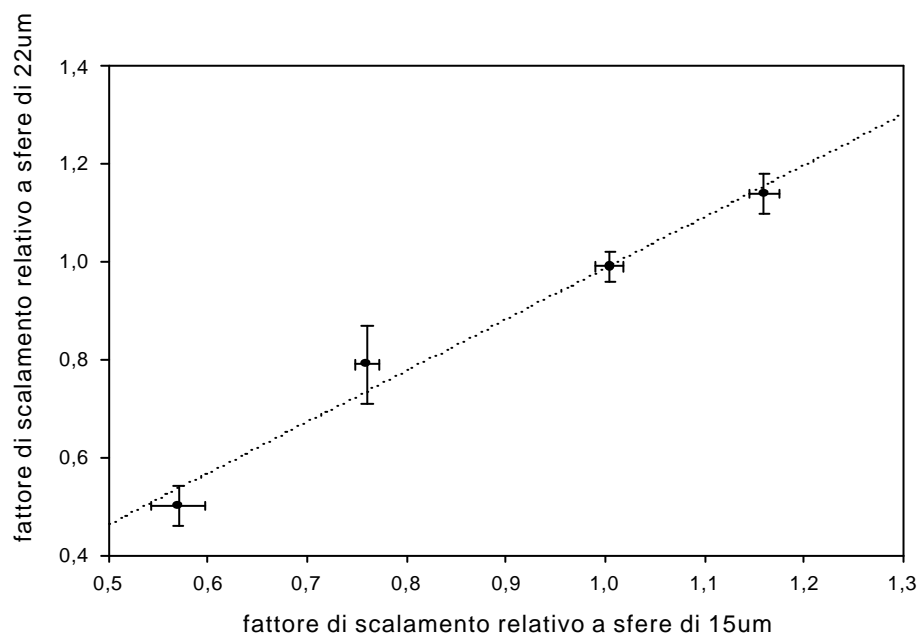
Ciò può essere fatto attraverso un grafico del tipo riportato in figura 4.2m ove si confrontano, a parità di obbiettivo (100X) e di indice di rifrazione del mezzo d'immersione, i fattori di scalamento, ottenuti per via sperimentale, relativi a campioni di diversa grandezza (rispettivamente  $\mathcal{AE} @ 22\mu m$  e  $\mathcal{AE} @ 2.7\mu m$ ).



**Fig. 4.2m**

Attraverso un fit lineare, si trova che, la miglior retta passante per i punti in questione ha equazione  $y = 0.73x + 0.26$  con un coefficiente di correlazione pari a 0.99.

Confrontando, viceversa, i risultati ottenuti impiegando le sfere di McNally con quelli relativi a sfere di 22 µm di diametro, si perviene all'andamento riportato in figura 4.2n.



**Fig. 4.2n**

In questo caso, la miglior retta è della forma  $y = 1.05x - 0.062$  con un coefficiente di correlazione pari a 0.98.

Alla luce di questo risultato, si può concludere che le dimensioni dell'oggetto incidono sul valore di  $C$  nella misura in cui detto andamento si discosta dalla bisettrice  $y = x$  che, viceversa, indicherebbe perfetto accordo tra i fattori di correzione a parità di indice di rifrazione ed indipendentemente dalla grandezza del campione.

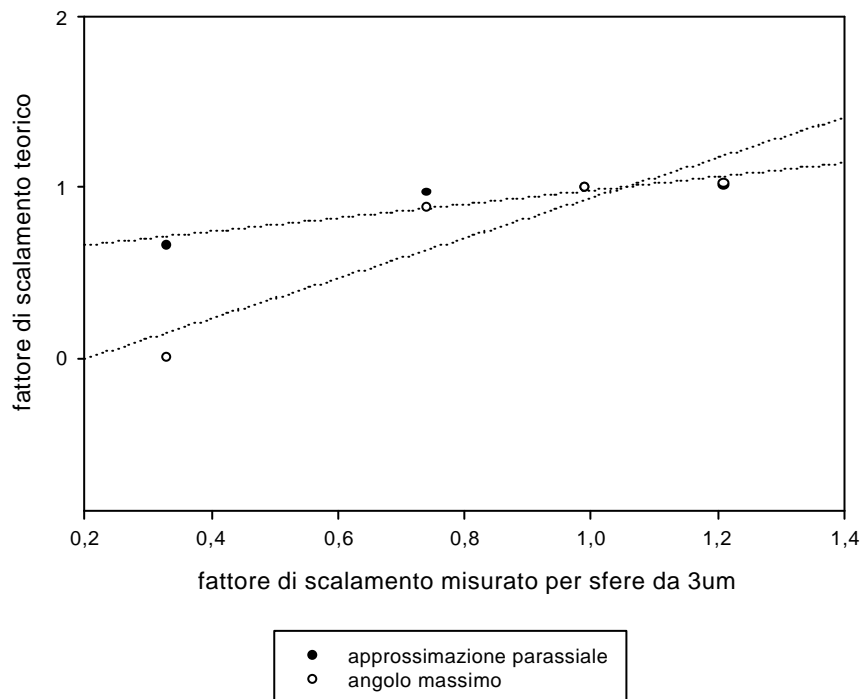
Possiamo quindi ritenere che, operando in identiche condizioni sperimentali, per campioni di uguale forma e sostanza le cui dimensioni assiali variano al più del 50%, il valore di  $C$  si mantiene ragionevolmente costante.

Per quanto riguarda la previsione teorica di  $C$  fornita dal modello precedentemente sviluppato nell'ambito dell'ottica geometrica, si può mostrare come vi sia una dipendenza (di cui però, per semplicità, non si è tenuto conto) sia dallo spessore del vetrino (come già detto), sia dalla profondità cui si focalizza il campione nel mezzo in cui è immerso.

Di quest'ultimo aspetto e delle pesanti ripercussioni che esso ha su tutto il procedimento di imaging e, quindi, sull'analisi quantitativa che gli è strettamente connessa, torneremo ampiamente nel prossimo capitolo di questa tesi.

Sta di fatto che le acquisizioni cui si fa riferimento nel presente lavoro sono state compiute, per quanto possibile, focalizzando il campione in regioni prossime alla superficie del vetrino e quindi in condizioni in cui minimo dovrebbe essere il fattore di aberrazione introdotto dalla penetrazione in profondità in un mezzo a diverso indice di rifrazione.

L'accordo tra i fattori di scalamento misurati e quelli previsti dalla teoria varia sensibilmente a seconda che si prenda in considerazione l'approssimazione parassiale per i raggi uscenti dall'obiettivo o quella associata all'angolo di massima apertura della lente, come documentato nel grafico seguente:



**Fig. 4.2 o**

Dal fit lineare dei punti si trova che, nel caso parassiale la miglior retta è  $y = 0.4x + 0.58$  con coefficiente di correlazione pari a 0.82, mentre nel caso in cui si prenda in esame l'angolo di apertura massima dell'obiettivo, si ottiene  $y = 1.18x - 0.24$  con coefficiente di correlazione pari a 0.84.

Concludendo, si può dire che il modello geometrico sin qui sviluppato permette di prevedere gli andamenti dell'aberrazione assiale prodotta dalla presenza di mismatch tra gli indici di rifrazione. Tuttavia, l'accordo numerico tra i dati sperimentali e quelli teorici non è tale da permettere un uso delle relazioni ricavate per una correzione *fine* dei risultati ottenuti nel corso di un'acquisizione. A tal fine è preferibile inglobare un oggetto fluorescente di dimensioni note all'interno del mezzo entro cui si vuole compiere un procedimento di imaging in modo da poter ricavare direttamente il valore di  $C$  con cui calibrare successivamente le distanze tra i punti lungo l'asse ottico [T.D. Visser, J.L. Oud and G.J. Brakenhoff, 1992].

### 4.3 Analisi di un preparato biologico

L'analisi morfometrica delle componenti strutturali di organi, tessuti o singole cellule costituisce uno dei prerequisiti fondamentali della ricerca in ambito biofisico e biomedico. Ciò è principalmente dovuto al legame tutto particolare che, in natura, si stabilisce tra le caratteristiche geometriche di un qualsiasi oggetto e la sua specificità *in vivo*.

E' per questo che, in un approccio che non sia esclusivamente qualitativo alla *problematica biologica* in esame, si ha, non di rado, a che fare col problema di valutare quantità legate alla distribuzione del campione (o di parti di esso) nello spazio (calcolo di volumi, superfici, conteggio di oggetti ecc.) avendo però a disposizione solo un numero *finito* di sezioni o proiezioni che lo riguardano.

Si possono, a questo punto, adottare tre diversi approcci alla questione a seconda della conoscenza *a priori* che si ha del campione o del grado di affidabilità richiesto dal tipo di analisi che si sta compiendo:

- Si può, in prima approssimazione, pensare di assimilare l'oggetto sotto esame al più semplice ente geometrico (sfera, ellissoide ecc.) che ne fornisca una rappresentazione verosimile e di riferire, quindi, la propria analisi quantitativa al modello teorico così costruito. Sebbene questo atteggiamento sia, per la sua semplicità e la sua immediatezza, di largo uso nelle pratiche sperimentali, esso può essere causa di valutazioni più o meno errate sia in campo biologico, ove si ha tipicamente a che fare con oggetti difficilmente assimilabili a forme geometriche regolari, sia quando non si voglia ricavare dalla propria analisi una semplice informazione morfometrica media, ma una stima, caso per caso, della quantità in esame.
- Attraverso l'utilizzo di appositi algoritmi, è possibile procedere ad una preventiva ricostruzione tridimensionale via software del campione dalla quale ricavare tutte le informazioni desiderate. Si può, ad esempio, note le condizioni di acquisizione, dare una stima del volume sommando i *voxel* contenuti all'interno dell'oggetto, oppure procedere al calcolo della sua superficie approssimandola, con precisione arbitraria, tramite opportuni elementi geometrici di area nota.

Il limite maggiore di una tale trattazione del problema è costituito dall'enorme sforzo computazionale che, in generale, è richiesto dalle procedure di ricostruzione e regolarizzazione. Per questo, un simile approccio è, di norma, consigliabile solo quando il principale interesse della ricerca che si sta compiendo è quello di visualizzare

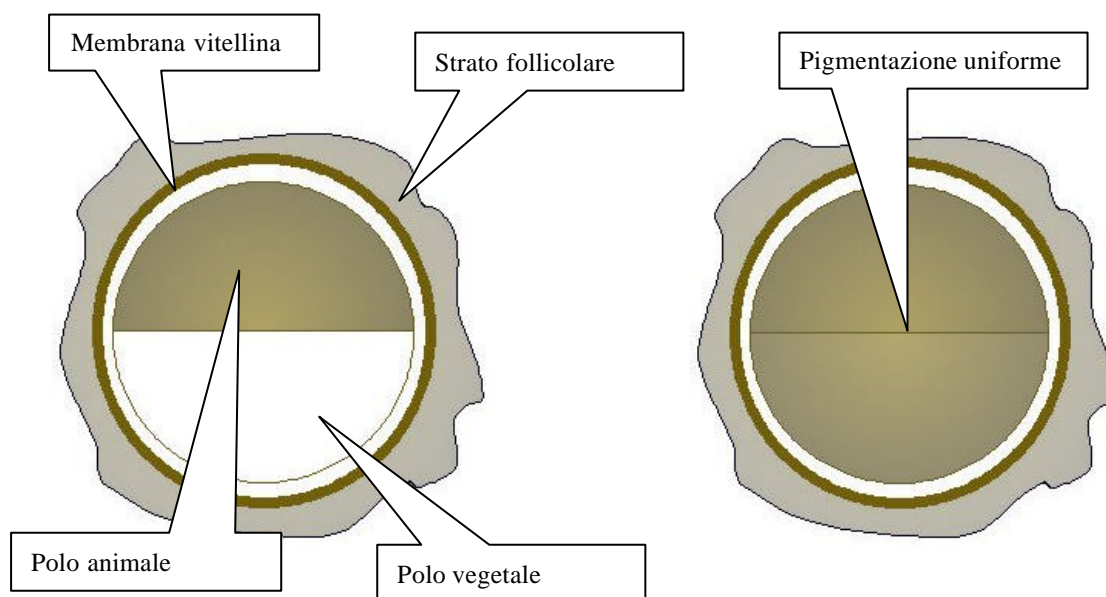
tridimensionalmente la struttura del campione onde metterne in risalto particolari configurazioni strutturali, senza alcun riferimento a questioni puramente morfometriche.

- Un ultimo approccio alla questione, è quello di tipo *stereologico*, che, per mezzo di tecniche giustificate da un'opportuna teoria matematica, permette un'accurata stima delle proprietà geometriche di un oggetto tridimensionale, 'semplicemente' a partire da misure condotte su sezioni bidimensionali di esso.

E' questa, in particolare, la tecnica che verrà impiegata, nell'ambito di questa tesi, per l'analisi quantitativa dei preparati biologici osservati, vista la sua perfetta compatibilità con le modalità di acquisizioni impiegate, costituite, per l'appunto, da un insieme di sezioni piane ottenute tramite scansione lungo l'asse ottico.

La sessione di misure cui si fa riferimento nel seguito del presente capitolo è stata organizzata in modo da mettere in risalto gli effetti pratici della presenza di mismatch degli indici di rifrazione nell'ambito dell'analisi di un particolare preparato biologico *in vivo*, costituito da popolazioni di oociti di rane *Xenopus*, appartenenti a stadi differenti di maturazione ed opportunamente preparati per l'analisi in fluorescenza.

Schematicamente, un oocita di *Xenopus* può essere pensato come in fig. 4.3a.



**Fig. 4.3a** schema di oociti di *Xenopus* al V-VI stadio di maturazione (sinistra), il cui diametro si aggira tra i 1000µm ed i 1300µm e al III stadio di maturazione (destra), il cui diametro si aggira tra i 450µm ed i 600µm.

Dall'interno verso l'esterno, la superficie è costituita dalla *membrana plasmatica* ricoperta da uno strato fibroso a matrice glicoproteica detto *membrana vitellina* che conferisce all'intera struttura la caratteristica forma tondeggiante e ne garantisce la rigidità.

Immediatamente a ridosso di essa si trova un monostrato di cellule follicolari contenente nervi, vasi sanguigni e fibroblasti chiamato *teca* e l'epitelio ovarico interno che costituisce parte della parete ovarica.

Affinché l'oocita possa essere impiegato, è necessaria una sua preventiva preparazione, consistente nella rimozione degli strati cellulari più esterni (strato follicolare), ottenuta attraverso l'impiego dell'enzima *collagenasi*, e nella successiva marcatura con sonda fluorescente.

Per quest'ultima fase si è sfruttata la proprietà del complesso WGA-TRITC costituito da una particolare molecola (WGA: *wheat germ agglutinin*), in grado di legarsi alla membrana esterna,

munita di un'opportuna componente fluorescente (TRITC: *tetramethylrhodamine-5-isothiocyanate*) che, eccitata nel verde (laser elio-neon con  $\lambda_{\text{ecc}} = 543\text{nm}$ ) emette nella regione spettrale del rosso.

Le acquisizioni sono state effettuate in condizioni di confocalità 'stretta' ( $r_{\text{pinhole}}=10\mu\text{m}$ ) e, viste le dimensioni considerevoli del campione (da  $450\mu\text{m}$  ad oltre  $1300\mu\text{m}$ ), si è ritenuto opportuno l'impiego di un obiettivo 4X in aria ( $\text{NA}=0,13$  ;  $\text{WD}=17,1\text{mm}$ ). Tutti gli altri parametri relativi al sezionamento sono stati tenuti, per quanto possibile, costanti nel corso dell'intera sessione di misure.

Prima di passare alla discussione dei risultati, vale la pena soffermarsi su una problematica emersa proprio in fase di acquisizione e di cui si trova già traccia in diversi lavori presenti in letteratura [Colin L. Smithpeter et al., 1998 ; L.V. Wang and G. Liang, 1999]: i limiti della penetrazione *in vivo* in presenza di mezzi *torbidi*, come nel caso del materiale contenuto all'interno di un oocita, altamente disomogeneo, ricco di organelli citoplasmatici e, per sua intrinseca natura, tendenzialmente opaco alla radiazione luminosa.

Una delle proprietà fondamentali di un sistema confocale è legata alla sua capacità di rilevare selettivamente quei fotoni che, a seguito dell'emissione fluorescente, provengono da regioni prossime a quella di fuoco dell'obiettivo. Di fatto, però, in mezzi nei quali si manifestino non trascurabili fenomeni di scattering, l'efficacia del sistema nei procedimenti di imaging si misura nella sua capacità di rigettare quei fotoni che, provenienti da regioni fuori fuoco, subiscono uno scattering multiplo.

Diversi studi sono stati condotti in proposito, nel tentativo di individuare un criterio utile a stabilire la massima profondità di penetrazione entro un mezzo torbido, prima che il segnale d'interesse resti seppellito nel rumore di fondo generato da fenomeni di scattering associati all'emissione fluorescente delle regioni fuori fuoco.

Senza entrare nel dettaglio dei diversi approcci tentati, molti dei quali essenzialmente basati sull'analisi simulata al calcolatore dello sparpagliamento subito da un pacchetto d'onde entro un modello semplificato del mezzo torbido, si può mostrare [Colin L. Smithpeter et al., 1998] come l'intensità del segnale rilevabile decada con legge esponenziale al variare della profondità di focalizzazione, cosa questa, che sembra proprio confortare le difficoltà incontrate ad acquisire un sezionamento completo di un oocita. In particolare, i risultati presenti in letteratura permettono di legare questo fenomeno, non solo alle proprietà del mezzo entro cui è immerso il campione, ma anche alle dimensioni del pinhole.

Alla formazione di un segnale di fondo in grado di schermare quello realmente proveniente dalla regione a fuoco potrebbero, in linea di principio, contribuire infatti due distinti fenomeni:

- i. Singolo *backscattering* del fotone in prossimità della regione focale
- ii. Scattering multiplo del singolo fotone, proveniente in prevalenza da una regione al di fuori del piano di fuoco, che lo fa affiorare in superficie in una posizione e con una 'traiettoria' proprie di un fotone originato, invece, dall'emissione della regione a fuoco.

In entrambi i casi, a parità di tutte le altre condizioni, il segnale di background crescerebbe linearmente (come documentato dal lavoro di L.V. Wang e G. Liang, op. cit.) con il coefficiente di scattering del mezzo. Tuttavia, se vi fosse realmente un contributo dominante del tipo (i), esso dovrebbe decadere, come detto, con legge esponenziale a prescindere dalle dimensioni del pinhole impiegato. L'osservazione sperimentale mostra, invece, come l'attenuazione del segnale di background avvenga secondo una legge esponenziale più lenta di quella che regola l'attenuazione del segnale e precisamente con una costante di smorzamento dipendente sia dal coefficiente di scattering del mezzo che dal raggio del pinhole.

I risultati ottenuti suggeriscono quindi un'origine del tipo (ii) per il background ed una crescita della sua intensità media di pari passo con l'aumento del coefficiente di scattering e del raggio del pinhole.

Il risvolto più immediato di una simile constatazione è legato proprio alla possibilità di limitare l'ampiezza del background diminuendo il raggio del pinhole al fine di rendere più rapido il suo smorzamento esponenziale e permettendo così una più efficace penetrazione in profondità.

Nel nostro caso, pur lavorando nella condizione di confocalità più stretta, non è stato però possibile mettere a fuoco l'oocita attraverso un procedimento di sezionamento completo.

Ciò ha richiesto di formulare un'ipotesi di lavoro semplificativa, biologicamente compatibile col campione e che permettesse di trarre il massimo delle informazioni dai sezionamenti 'parziali' acquisiti. Si è, in altri termini, deciso di considerare l'oocita come un oggetto dotato di simmetria e di limitare tutte le considerazioni morfometriche del caso alla metà di esso che si riusciva, di volta in volta, ad acquisire, estendendo poi i risultati all'altra metà per simmetria.

Questa assunzione non è in contrasto con quello che si può trovare in letteratura sugli oociti ed è anche statisticamente accettabile, visto che tutte le informazioni che si vogliono qui ottenere sono essenzialmente intese ad individuare il valore medio delle grandezze geometriche considerate, al variare delle condizioni sperimentali e per una popolazione di trenta-quaranta esemplari per ciascuno stadio di maturazione.

A seguito di ciò, data una certa, inevitabile arbitrarietà nell'individuazione della sezione centrale, per ogni campione si sono effettuate ripetute misurazioni della grandezza in questione, corrispondenti, in generale, ad una collocazione della sezione centrale di riferimento di volta in volta leggermente diversa.

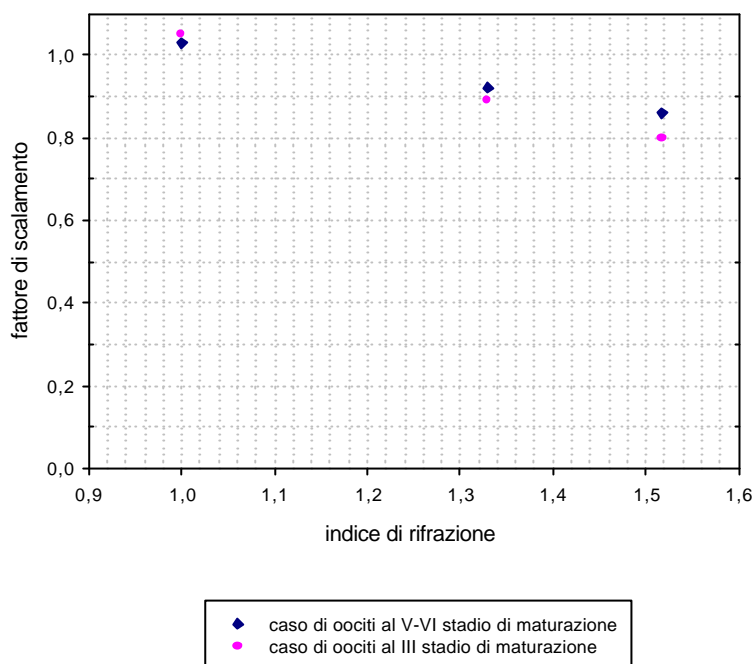
Si è poi assunto come valor vero per ogni singolo campione, il valor medio ottenuto da tale procedura.

I dati riportati nella tabella allegata qui di seguito, si riferiscono alla valutazione del diametro dell'oocita lungo l'asse ottico al variare del mezzo d'immersione (aria, olio, acqua distillata).

Per poter quantificare l'aberrazione lungo  $z$  al variare delle condizioni sperimentali, non disponendo di campioni tra loro nominalmente identici (come nel caso delle microsfeere precedentemente considerato) e non potendo effettuare la stessa misura su ciascun oocita immerso via via nei diversi mezzi impiegati (vista la relativa vulnerabilità del campione), si è convenuto di confrontarne l'estensione assiale con il valore medio ottenuto a partire dai diametri lungo  $x$  e lungo  $y$  nel piano della sezione centrale.

In pratica, si tratta di schematizzare un oocita come essenzialmente sferico, ipotesi, questa, che, come detto, è biologicamente sensata e la cui affidabilità verrà ulteriormente discussa nel seguito.

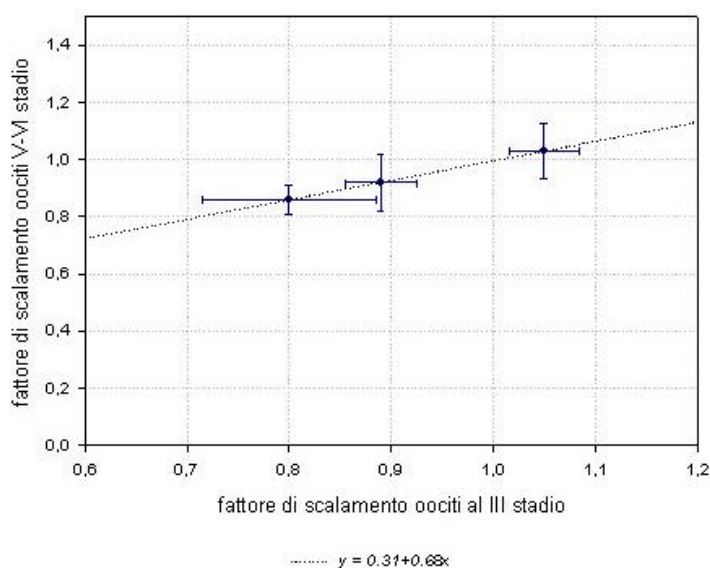
Stadio	$\overline{EX}_{\text{medio}} \text{ (um)}$	$\overline{EY}_{\text{medio}} \text{ (um)}$	$\overline{EZ}_{\text{medio}} \text{ (um)}$	$\overline{EZ}_{\text{aria}} \text{ (um)}$	$\overline{EZ}_{\text{acqua}} \text{ (um)}$	$\overline{EZ}_{\text{olio}} \text{ (um)}$
V-VI	1008,3 $\pm$ 103,7	1087,5 $\pm$ 153,6	1047,9 $\pm$ 136,9	1079,5 $\pm$ 104,7	960,0 $\pm$ 128,0	900,0 $\pm$ 53,0
III	538,4 $\pm$ 55,2	580,8 $\pm$ 55,2	559,6 $\pm$ 57,4	588,0 $\pm$ 20,0	500,0 $\pm$ 19,0	448,0 $\pm$ 48,0



**Fig. 4.3c:** andamento del fattore di scalamento ( $Z_{\text{misurato}}/Z_{\text{medio}}$ ) al variare dell'indice di rifrazione del mezzo d'immersione del campione.

Come si può osservare dal grafico qui riportato, i risultati ottenuti rispecchiano gli andamenti già osservati in precedenza nel caso di un campione di microsfere: il fattore di scalamento  $C$ , che rende conto dell'aberrazione assiale, tende ad assumere valore unitario via via che il mismatch tra l'indice di rifrazione del mezzo d'immersione dell'obiettivo e quello del mezzo d'immersione del campione diminuisce.

Un altro risultato in linea con quanto già visto nel caso delle microsfere, è quello relativo ad una certa dipendenza di  $C$  dalle dimensioni dell'oggetto osservato.



**Fig. 4.3d:** confronto tra i valori di  $C$  al variare delle dimensioni del campione ed a parità di tutte le altre condizioni sperimentali.

Il fit lineare indica con chiarezza come la miglior retta si discosti nettamente da un andamento tipo  $y=x$ , che indicherebbe, viceversa, una sostanziale invarianza di  $C$  in presenza di campioni di dimensioni ragguardevolmente differenti. Nel nostro caso, poi, il quadro si complica ulteriormente a causa della particolarità del preparato biologico sotto esame, caratterizzato da una membrana di rivestimento a composizione prevalentemente oleosa (indice di rifrazione non noto) e da un contenuto citoplasmatico di densità variabile punto per punto (indice di rifrazione non noto).

A questo punto, si sono studiati gli effetti del mismatch sulla valutazione di volumi e superfici, ottenuti impiegando alcuni algoritmi tipici dell'analisi stereologica: questo ha permesso di mettere in evidenza l'importanza del fattore correttivo  $C$  nell'analisi morfometrica di strutture biologiche in vivo ed anche di quantificare la bontà dell'ipotesi semplificativa fatta in precedenza, assimilando l'oocita ad un oggetto a simmetria sferica.

Quest'ultimo aspetto, in particolare, assume notevole rilevanza nell'ambito di quelle procedure di *estrazione delle caratteristiche principali* largamente studiate in letteratura [R. Delorme et al., 1998] allo scopo di individuare, nell'ambito di specifiche procedure sperimentali, criteri in grado di minimizzare la quantità d'informazione necessaria a caratterizzare completamente un campione.

Nel caso in esame, ad esempio, un buon accordo tra la forma di un oocita e quella di un oggetto sferico di dimensioni opportune, renderebbe sufficiente la conoscenza del solo diametro massimo dell'esemplare sotto esame al fine di ottenerne una valutazione realistica di superficie e volume, evitando così di ricorrere ad algoritmi di maggior peso computazionale.

#### 4.4 Elementi di stereologia

L'introduzione ed il successivo sviluppo di tutte le tecniche oggi note nell'ambito dell'analisi stereologica è storicamente motivato dalla crescente necessità di ricercatori, operanti pure in settori della scienza apparentemente diversi, di fondare su solide basi teoriche la soluzione di tutti quei problemi che si incontrano nell'analisi morfometrica di un oggetto, avendo a disposizione solo un campionamento *finito* relativo alla sua distribuzione nello spazio.

Il problema del conteggio dei neuroni presenti in zone diverse del cervello umano ( $\approx 10^7$ ), a partire dalle informazioni ricavabili da un numero finito di sezioni ottiche, può servire come esempio della complessità di molte delle questioni con cui abitualmente si può avere a che fare.

I fondamenti matematici cui fanno riferimento gli algoritmi implementati per la risoluzione di problemi di questo tipo, vanno generalmente ricercati nella teoria della probabilità, nella statistica e nell'analisi matematica. Per effettuare l'analisi di superficie e volume dell'oocita, in particolare, si è fatto uso del cosiddetto *principio di Cavalieri*.

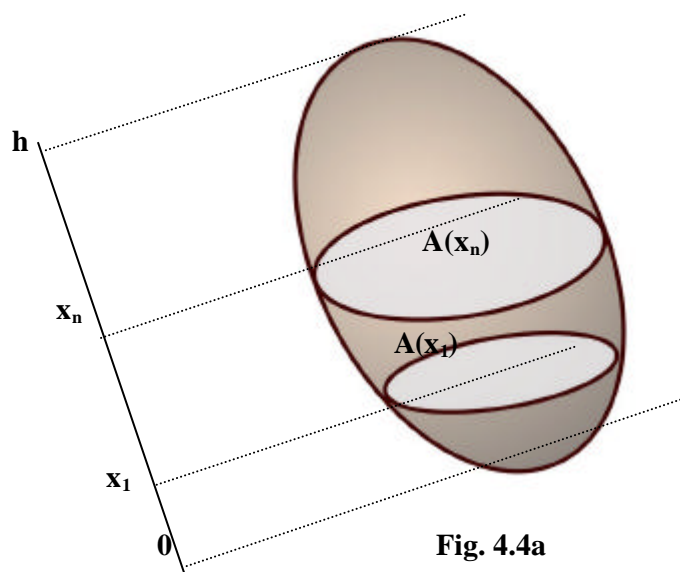


Fig. 4.4a

Come si può facilmente dedurre dalla figura 4.4a, il volume di un oggetto può essere espresso attraverso la seguente espressione integrale:

$$V = \int_0^h A(x)dx \quad (4.4.1)$$

ove  $A(x)$  è l'area della sezione dell'oggetto perpendicolare all'asse ottico nel punto  $x \in [0, h]$ .

Di fatto, è impossibile ottenere, per via sperimentale, un campionamento continuo dell'oggetto in esame: quella che si può dare è allora una stima, più o meno accurata, di  $V$  utilizzando opportuni metodi numerici (*metodo di Monte Carlo*).

Nel corso di questa sessione di misure si è scelto di campionare uniformemente l'oocita lungo  $z$  con passo costante  $T$ . Avendo quindi raccolto  $n$  sezioni ottiche del campione, detto  $A_j$  il valore dell'area corrispondente alla  $j$ -esima tra esse, si ottiene la seguente stima per  $V$ :

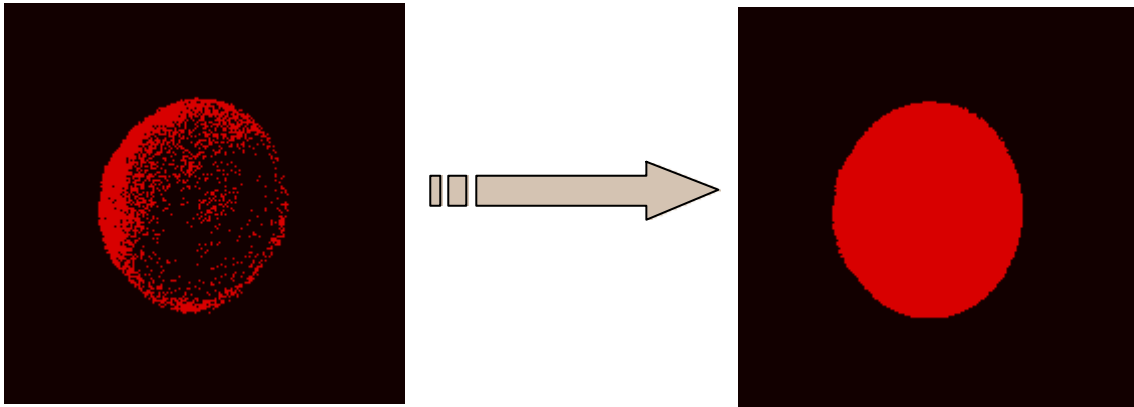
$$estV = T \cdot \sum_{j=1}^n A_j \quad (4.4.2)$$

Il problema è quindi spostato alla valutazione di  $A_j$ .

Tale valore può essere recuperato a partire dal conteggio del numero di pixel associati alla regione in questione, noto che sia il fattore di conversione del pixel nello spazio del campione.

Per risalire a detto numero di pixel si è seguita una particolare procedura di segmentazione dell'immagine: dopo aver salvato ogni singola sezione come file in formato tiff, attraverso un programma di fotoritocco la si è convertita nella specifica 'a due colori' in modo da avere un criterio di immediata lettura per poter discriminare tra punti interni e punti esterni alla regione d'interesse.

Individuato quindi il contorno appartenente all'oocita, si è sovrapposta ad esso una regione 'circolare' uniformemente colorata (figura 4.4b) e, sfruttando un'apposita utility del software impiegato, è stato a questo punto possibile risalire al numero di pixel associati a tale zona di ricoprimento e, con esso, ad una stima dell'area considerata.



**Fig. 4.4b:** immagine di una sezione di oocita nella specifica a due colori (a destra) e dopo la sovrapposizione della regione di ricoprimento.

Questa procedura di *segmentazione dell'immagine* introduce però una fonte di errore, a priori non quantificabile, legata alla difficoltà di individuare come sicuramente appartenenti alla sezione  $A_j$  i pixel che si trovano sul suo contorno.

Per ridurre il più possibile il contributo dato dall'errore sistematico, si è anche in questo caso, ripetuto diverse volte il calcolo di ciascuna superficie, assumendo poi come valor vero il valore medio risultante da un set di una decina di rilevazioni.

Ci si può, a questo punto, chiedere quale sia il grado di affidabilità di una simile tecnica di calcolo delle aree, basata 'semplicemente' sul conteggio dei pixel.

E' possibile, in proposito, convincersi che tale stima è *la migliore*, intendendo, con questo, che la sua varianza tende idealmente a zero al crescere della densità di campionamento [Jan T. Young, 1998].

Si consideri, ad esempio, la situazione schematizzata in figura (4.4c).

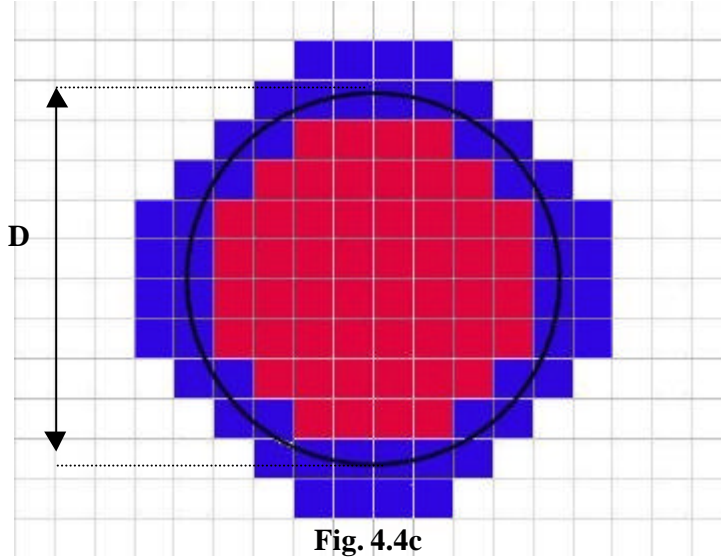


Fig. 4.4c

In essa viene esasperato il caso relativo all'acquisizione di una sezione di un oggetto circolare ed al suo successivo ricoprimento con un cerchio di diametro  $D$ .

Indicata con  $s$  la dimensione lineare del singolo pixel e con  $Q$  la densità di campionamento, si ha evidentemente la relazione :  $Q=D/s$ .

A seguito di piccole variazioni nella collocazione della regione di ricoprimento, i pixel indicati in rosso continueranno ad essere inclusi in essa (e quindi ad essere contati), quelli indicati in bianco a far parte del background, mentre, per quelli indicati in blu, la situazione varierà da caso a caso.

Andando a calcolare, nelle condizioni precisamente rappresentate in figura, l'area coperta dai 'pixel rossi' si trova che essa è data, con buona approssimazione, da:

$$A_r = \frac{P}{4}(D - 2s)^2 \quad (4.4.3)$$

Ne segue che il numero di pixel è calcolabile come:

$$N_r = \frac{A_r}{s^2} = \frac{P}{4} \left( \frac{D}{s} - 2 \right)^2 = \frac{P}{4}(Q - 2)^2 \quad (4.4.4)$$

Analoghe considerazioni svolte relativamente ai 'pixel blu' portano alle:

$$A_b = \frac{P}{4}(D + 2s)^2 - \frac{P}{4}(D - 2s)^2 \quad (4.4.5)$$

$$N_b = \frac{P}{4}(Q + 2)^2 - \frac{P}{4}(Q - 2)^2 = 2PQ \quad (4.4.6)$$

A seguito 'dell'arbitrarietà' con cui certi 'pixel blu' possono entrare a far parte (o meno) della regione di ricoprimento, il numero totale di pixel all'interno di essa può essere espresso, in tutta generalità, come:  $N_{tot} = N_r + n$ , ove  $n$  è una variabile stocastica introdotta per rendere conto di tale fenomeno.

Facciamo a questo punto l'ipotesi semplificativa che ciascun 'pixel blu', a prescindere dalla sua collocazione, venga contato in  $N_{tot}$  con probabilità costante  $p$  e sia, viceversa, associato al background con probabilità  $1-p$ .

Con questa assunzione, possiamo descrivere l'appartenenza dei pixel alla *regione d'indecisione* attraverso una distribuzione binomiale: pur non essendo questo del tutto realistico, visto che è presente un certo fattore di correlazione tra ciascun pixel ed i suoi primi vicini, il modello qui sviluppato è sufficiente a rendere conto dell'affidabilità del procedimento adottato per il calcolo delle aree.

Alla luce di tutte queste ipotesi, indicato con  $m$  il valor medio dei pixel associati alla regione di ricoprimento, calcolato a partire da un certo set di osservazioni ripetute, si può dare di esso la seguente stima teorica:

$$m = E(N_{tot}) = E(N_r + n) = N_r + E(n) = N_r + N_b p = \frac{p}{4}(Q-2)^2 + 2pQp \quad (4.4.7)$$

Analogamente, la sua deviazione standard può essere calcolata come:

$$s(N_{tot}) = \sqrt{s^2(N_r) + s^2(n)} = s(n) = \sqrt{N_b p(1-p)} = \sqrt{2pQp(1-p)} \quad (4.4.8)$$

A questo punto, si trova immediatamente per  $CV^{(1)}$  la seguente espressione:

$$CV = \frac{s}{m} = \frac{\sqrt{2pQp(1-p)}}{\frac{p}{4}(Q-2)^2 + 2pQp} \quad (4.4.9)$$

E' ora possibile studiare la convergenza di  $CV$  al crescere della densità di campionamento ( $s \rightarrow 0$ ):

$$\lim_{Q \rightarrow \infty} CV(Q) \propto \frac{Q^{1/2}}{Q^2} = Q^{-3/2} \quad (4.4.10)$$

Con conti del tutto analoghi a quelli sin qui svolti, la (4.4.9) può essere poi generalizzata al caso tridimensionale come:

$$CV = \frac{s}{m} = \frac{\sqrt{\left(2pQ^2 + \frac{8p}{3}\right)p(1-p)}}{\frac{p}{6}(Q-2)^3 + \left(2pQ^2 + \frac{8p}{3}\right)p} \quad (4.4.11)$$

da cui:

$$\lim_{Q \rightarrow \infty} CV(Q) \propto \frac{Q}{Q^3} = Q^{-2} \quad (4.4.12)$$

---

<sup>(1)</sup>  $CV = s/m$

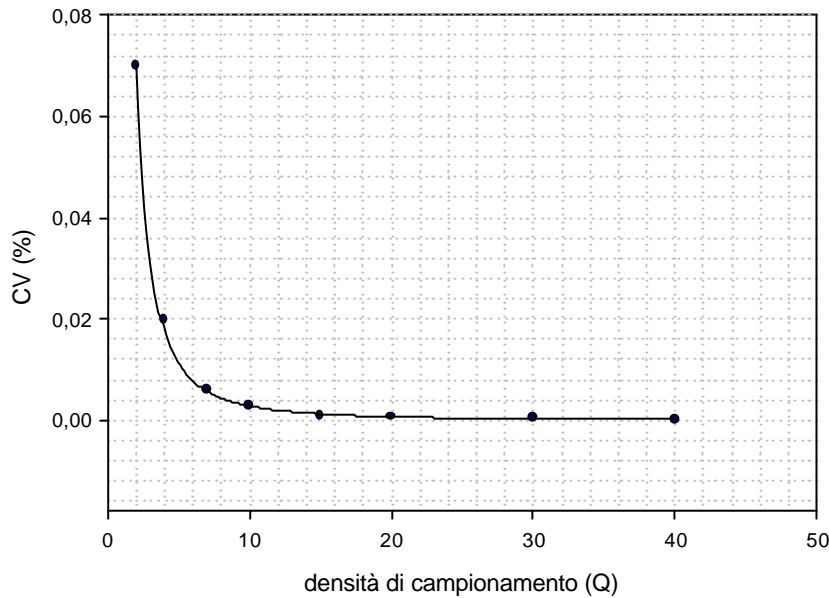
Infine, estendendo il tutto al caso N-dimensionale, la (4.4.12) assume la forma:

$$\lim_{Q \rightarrow \infty} CV(Q) \propto Q^{-(N+1)/2} \quad (4.4.13)$$

Concludendo, risulta evidente come, al crescere della densità di campionamento  $Q$ , cresca pure l'affidabilità della stima della quantità geometrica sotto esame.

Sebbene, come già detto, l'approssimazione binomiale qui impiegata non sia strettamente realistica, la trattazione svolta concorda con i risultati sperimentali raccolti in numerose pubblicazioni presenti in letteratura, sia per il tipo di convergenza, sia per la natura della dipendenza di  $CV$  da  $Q$  [I.T. Young, 1988; J.C. Mullikin, 1993; R.C. Gonzales, 1992; K.R. Castleman, 1979].

Come viene mostrato nel lavoro di I.T. Young (1988), andando a calcolare il volume di 16 microsferi attraverso il conteggio dei voxel da esse sottesi al variare di  $Q$  si ottiene l'andamento mostrato in figura (4.4d).



**Fig. 4.4d**

Il fit lineare con una funzione della forma (4.4.12) indica un eccellente accordo tra dati e teoria e, precisamente, si ha un coefficiente di regressione pari a 0,999 con  $y = 0,28x^{-2}$ .

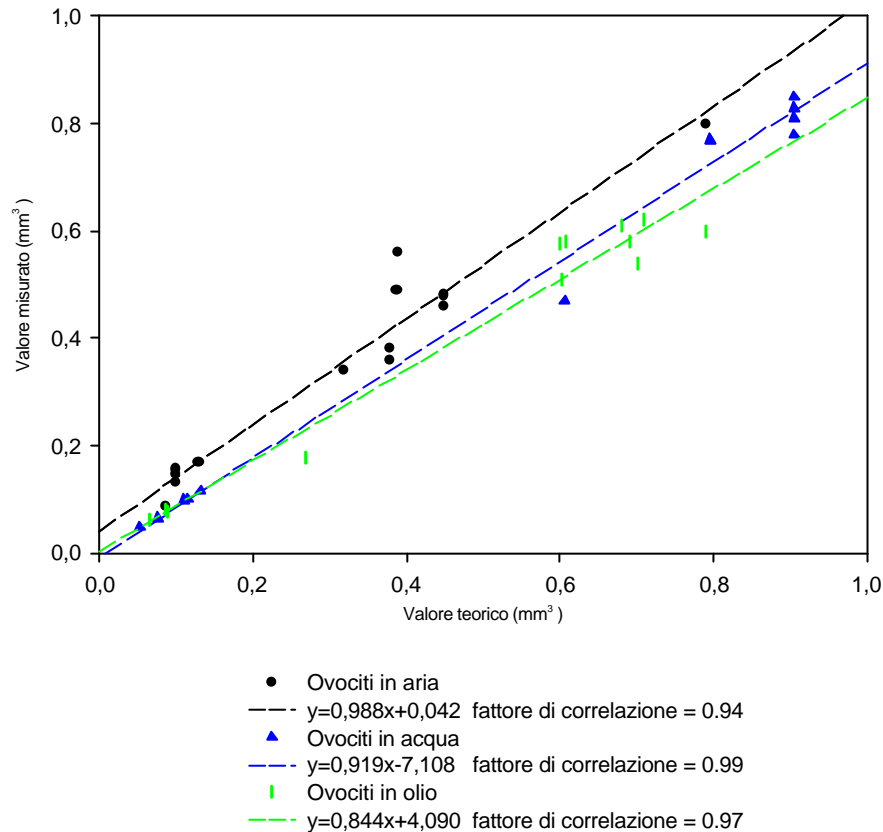
Ci si può allora chiedere come l'esposizione sin qui condotta circa la dipendenza di  $CV$  da  $Q$  si accordi con il *principio di Nyquist*, che fornisce, a sua volta, un criterio di scelta di  $Q$  apparentemente in contraddizione con quanto appena detto.

La questione, in questi termini, è mal posta.

Si può, infatti, concludere che la scelta dell'uno o dell'altro approccio sia parimenti lecita, ma si riveli diversamente conveniente a seconda del tipo di analisi che si vuole condurre. Più precisamente, se lo scopo ultimo del proprio lavoro è quello di focalizzare particolari dettagli all'interno della struttura del campione, o procedere ad una sua ricostruzione a mezzo di algoritmi di convoluzione, allora si rivela necessario operare nel rispetto della condizione di Nyquist, viceversa, se si intende procedere al calcolo di determinate proprietà geometriche sulla base del metodo descritto in precedenza, è preferibile scegliere un valore di  $Q$  compatibilmente con quanto espresso dalle (4.4.10) e (4.4.12).

#### 4.5 Risultati sperimentali

L'applicazione delle tecniche stereologiche, discusse nel precedente paragrafo, ha portato ai risultati sperimentali illustrati dal grafico (4.5a) allegato qui di seguito.



**Fig. 4.5a**

Come risulta chiaro dai fit lineari riportati, il caso di miglior accordo tra i valori sperimentali (ricavati secondo il principio di Cavalieri) ed i valori teorici (calcolati a partire dal diametro della sezione centrale) si ha in corrispondenza di campione in aria, cosa, questa, in linea con quanto già discusso in precedenza, visto che, avendo qui impiegato come obiettivo un 4X (NA=0.13) con montaggio in aria, la suddetta condizione è quella in cui viene minimizzato il mismatch tra gli indici di rifrazione.

Per il resto, pur riconoscendo in tutte le situazioni considerate un'ottima correlazione lineare dei dati, i valori assunti dai parametri della miglior retta indicano chiaramente la presenza di un mismatch, più pronunciato nel caso dell'olio, come mostra l'andamento dei punti, relativamente lontano dalla situazione ideale  $y = x$ .

Si è inoltre così ottenuta un'ulteriore prova indiretta della bontà dell'approssimazione fatta assimilando un oocita ad un corpo essenzialmente sferico. Si può dunque stabilire che, salvo casi estremi, è sufficiente la conoscenza del diametro della sezione centrale di un oocita per ricostruirne un modello geometrico verosimile.

Nel grafico riportato in figura (4.5c) sono illustrati i risultati relativi al calcolo della superficie laterale dell'oocita, ottenuta, in prima approssimazione, a partire dalle superfici laterali degli elementi cilindrici aventi come altezza il passo  $h$  della scansione e come base  $S_i$  la sezione di volta in volta considerata (4.5b).

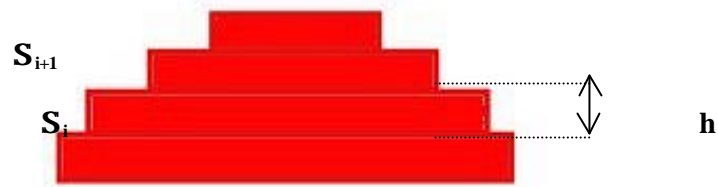


Fig. 4.5b

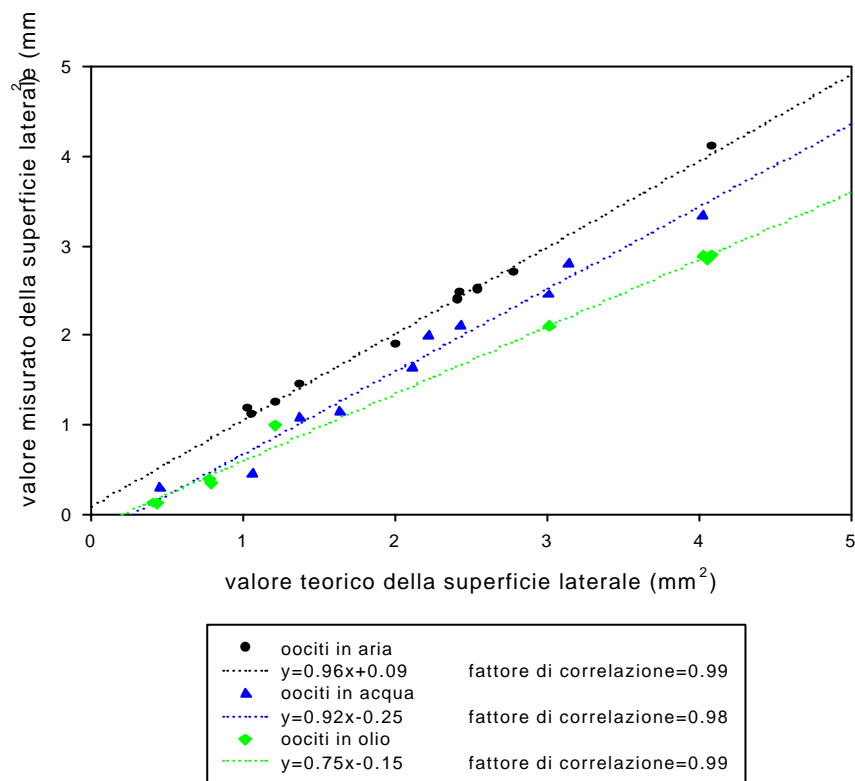


Fig. 4.5c

Gli andamenti ottenuti per i fit lineari confermano, anche in questo caso, quanto già detto a proposito degli effetti del mismatch sul calcolo dei volumi.

Un'ulteriore analisi, condotta, per praticità, solo sulla sezione centrale di ciascun oocita è quella riportata nel grafico in figura (4.5d).

In esso, si confrontano i valori dell'area calcolata con la procedura di conteggio dei pixel con quelli ricavati, assumendo per il campione una simmetria di tipo sferico, a partire dal diametro misurato attraverso un'apposita utility del software di acquisizione.

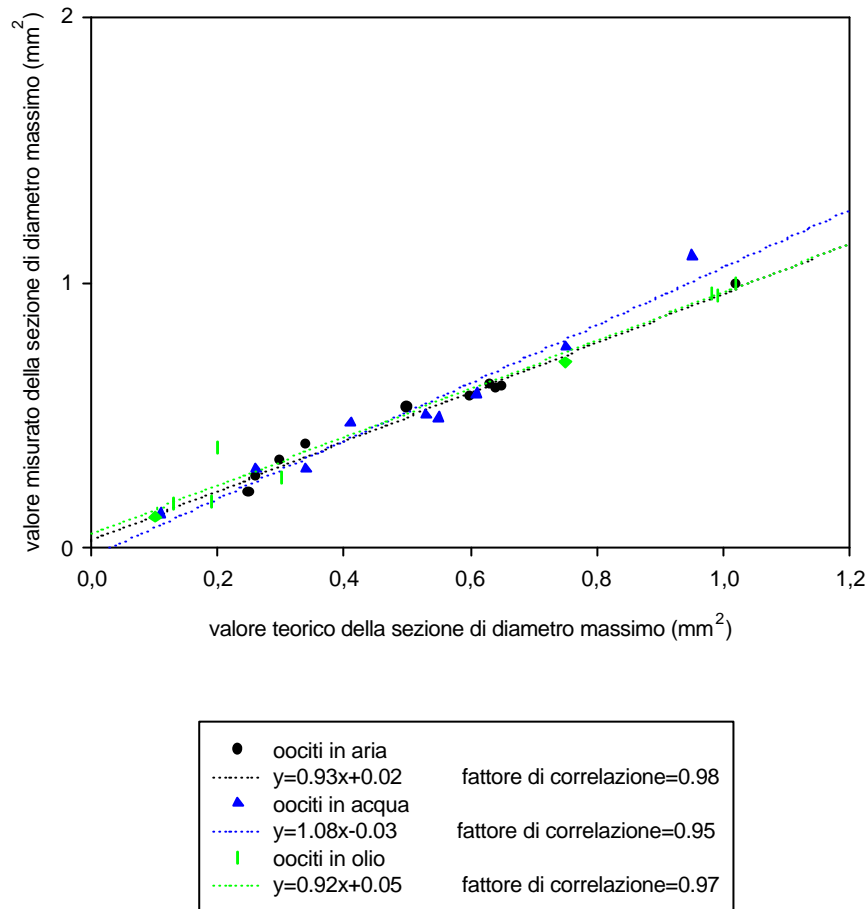


Fig. 4.5d

Da ciò seguono sia l'assenza di aberrazione da mismatch nei piani ortogonali all'asse ottico, come è evidenziato dai fit lineari che bene approssimano, in tutti i casi, la condizione ideale rappresentata da  $y = x$ , sia un'ulteriore comprova dell'essenziale sfericità del campione considerato.

#### 4.6 Stima dell'indice di rifrazione di una sostanza ignota

Nei paragrafi precedenti, si è affrontato il problema legato all'analisi sperimentale dell'aberrazione assiale introdotta dalla presenza di mismatch tra l'indice di rifrazione del mezzo di immersione del campione e quello dell'obiettivo.

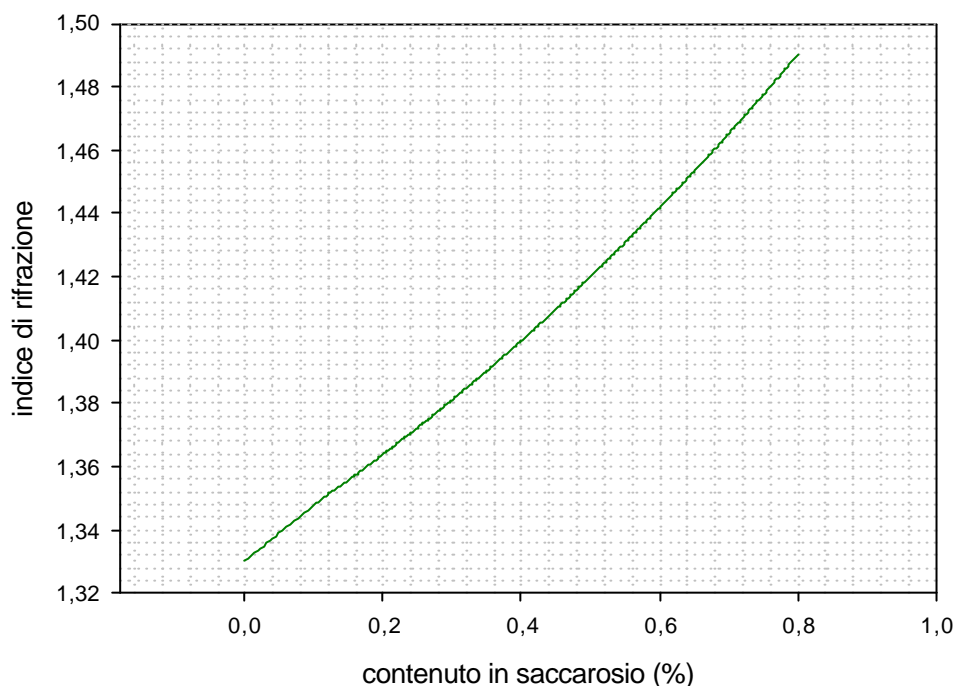
In quello che segue, verrà proposto, sulla falsa riga di quanto già discusso, un possibile metodo sperimentale per la stima dell'indice di rifrazione  $n$  di un mezzo sconosciuto a partire dall'aberrazione assiale misurata su oggetti di forma e dimensioni note.

L'idea di fondo è quella di costruire, a partire da una sostanza *di riferimento* di cui sia noto il valore di  $n$  al variare della concentrazione, una *curva di taratura* ottenuta graficando, in funzione di  $n$ , i valori trovati per il fattore di scalamento  $C$ , definito come  $\mathcal{A}_{\text{misurato}}/\mathcal{A}_{\text{vero}}$ .

Tentando, quindi, un opportuno fit, si può ottenere un'espressione analitica che permetta, noto che sia il valore di  $C$ , di risalire ad  $n$ .

Naturalmente, questa procedura è valida a patto di impiegare, per il calcolo di  $C$ , oggetti analoghi, per dimensioni e forma, a quelli usati per costruire la curva di taratura ed a patto di considerare mezzi le cui proprietà ottiche (assorbimento, scattering ecc.) non si discostino in maniera significativa da quelle del mezzo di riferimento.

E' stata, innanzi tutto, recuperata in letteratura la curva relativa all'andamento di  $n$  con la concentrazione nel caso di soluzioni di *saccarosio* in acqua distillata (fig.4.6a), in corrispondenza di una temperatura di 20°C e per una lunghezza d'onda  $\lambda=589\text{nm}$ .



**Fig. 4.6a**

Si è quindi preparato un numero conveniente di soluzioni, in modo da coprire l'intervallo dei valori di  $n$  compresi tra 1.33 (acqua distillata) ed 1.4651 (soluzione con saccarosio al 70%).

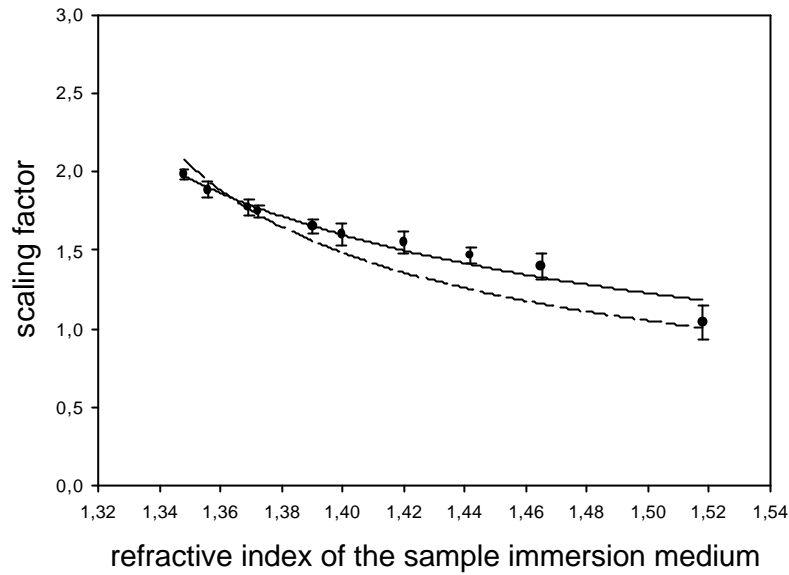
Il campione scelto per la misura sperimentale di  $C$  è costituito, come già in altre circostanza, da microsferi fluorescenti ( $\varnothing = (2.762 \pm 0.057) \mu\text{m}$ ), dotate di una componente rossa in emissione, in corrispondenza di un'eccitazione a  $\lambda=543\text{nm}$ .

I vetrini sono stati preparati secondo la procedura standard descritta nei paragrafi precedenti, con la sola variante di provvedere alla sonicazione, tramite l'immersione in un bagno ad ultrasuoni, di ciascuna soluzione prima del suo utilizzo, in modo da agevolare lo scioglimento del saccarosio nell'acqua distillata.

In tabella sono riportati i risultati ottenuti per il valore di  $C$  nelle diverse condizioni considerate.

Concentrazione nominale (%)	Indice di rifrazione	$C = \mathcal{E}_{\text{misurato}} / \mathcal{E}_{\text{vero}}$
10	1.3479	$1.98 \pm 0.13$
15	1.3557	$1.89 \pm 0.18$
20	1.3690	$1.78 \pm 0.16$
25	1.3723	$1.75 \pm 0.12$
35	1.3902	$1.66 \pm 0.12$
40	1.3997	$1.60 \pm 0.17$
50	1.4200	$1.55 \pm 0.17$
60	1.4418	$1.47 \pm 0.11$
70	1.4651	$1.39 \pm 0.16$

Si pone, a questo punto, il problema di confrontare i dati sperimentali con un qualche andamento analitico.



**Fig. 4.6b:** andamenti del fattore di scala  $D_s/D_f$  al variare dell'indice di rifrazione per soluzioni a diversa concentrazione di saccarosio.

Ogni punto in figura 4.6b si riferisce al valor medio del fattore di scala (calcolato su un set di circa 20 microsfele) corrispondente alla particolare condizione di mismatch considerata.

I fit sono stati condotti sul modello della 4.6.1 (linea tratteggiata) e della 4.6.2 (linea continua), entrambe mutate direttamente dalla 4.1.7:

$$\frac{\Delta_s}{\Delta_f} = \frac{1.52 \cdot a}{x \cdot \sqrt{1 - \frac{1.52^2}{x^2} (1 - a^2)}} \quad 4.6.1$$

$$\frac{\Delta_s}{\Delta_f} = \frac{1.52 \cdot a}{x \cdot \sqrt{1 - \frac{1.52^2}{x^2} b}} \quad 4.6.2$$

I parametri così ottenuti sono riportati in tabella:

equazione	a	b	Correlazione
(4.6.1)	0.527±0.007	-	85%
(4.6.2)	0.678±0.033	0.668±0.015	97%

A partire dalla 4.6.1 e dalla 4.6.2 si possono quindi ricavare le seguenti espressioni, attraverso le quali è possibile dare una stima di un indice di rifrazione ignoto a partire dalla valutazione sperimentale del fattore di scalamento  $D_s/D_f$ :

$$x = 1.52 \cdot \frac{\Delta_f}{\Delta_s} \cdot \sqrt{a^2 + \left( \frac{\Delta_s}{\Delta_f} \right)^2 (1 - a^2)} \quad 4.6.3$$

$$x = 1.52 \cdot \frac{\Delta_f}{\Delta_s} \cdot \sqrt{a^2 + \left( \frac{\Delta_s}{\Delta_f} \right)^2 b} \quad 4.6.4$$

Al fine di testare l'affidabilità di questo metodo, si è fatto uso della 4.6.3 e 4.6.4 per dare una stima teorica di alcuni indici di rifrazione noti.

I risultati riportati in tabella si riferiscono al caso del glicerolo e di una soluzione al 30% di saccarosio in acqua distillata.

Mezzo	$n_{th.}$	$n_{exp. (4.6.3)}$	$n_{exp. (4.6.4)}$
Glicerolo	1.475	1.422±0.057	1.458±0.041
Saccarosio (30%)	1.381	1.376±0.042	1.384±0.038

Ne segue che, a dispetto della buona correlazione tra valori sperimentali e valori teorici, questo metodo non può essere impiegato che per ottenere una stima indicativa dell'indice di rifrazione di una sostanza ignota.

## CAPITOLO 5

### Effetti del mismatch di indici di rifrazione sulla risposta di un sistema confocale

*In questo capitolo, vengono indagati gli effetti del mismatch tra indici di rifrazione sulle proprietà di imaging di un'architettura confocale.*

*Nella prima parte, il problema è introdotto attraverso l'analisi sperimentale della risposta del sistema all'impulso in condizioni di diverso mismatch, per campioni in prossimità dell'interfaccia vetrino – mezzo d'immersione.*

*La seconda sessione di misure è, invece, orientata allo studio del progressivo deterioramento delle prestazioni a seguito della focalizzazione di un campione al variare della sua profondità nel mezzo d'immersione, in presenza (o meno) di mismatch.*

*Viene infine proposta un'indagine del problema in ambito biologico, attraverso lo studio della funzione di trasferimento del sistema all'interno di un mezzo molto particolare, costituito dal contenuto citoplasmatico di un oocita di *Xenopus laevis*.*

## 5.1 Introduzione

I continui sviluppi nell'ambito della microscopia a fluorescenza, dovuti sia al progressivo miglioramento delle singole componenti di cui ciascuna architettura si compone, sia a quello delle procedure via software di post-elaborazione delle immagini, hanno permesso di raggiungere risultati sempre migliori nell'imaging *in vivo* di preparati biologici e nella loro analisi quantitativa.

Nel corso del tempo, diversi sono stati i modelli teorici proposti per modellare i vari apparati di misura e poterne così valutare le condizioni d'impiego a seconda delle esigenze, eppure, specie nei casi d'interesse biologico, si riscontrano, non di rado, differenze piuttosto significative tra le attese teoriche ed i risultati dell'esperienza.

Questa discrepanza è essenzialmente dovuta all'impiego dello strumento in condizioni per le quali non era stato progettato e nelle quali può non essere noto il comportamento: basti pensare alla situazione, abbastanza frequente nelle pratiche di laboratorio, legata all'analisi di campioni immersi in ambiente acquoso attraverso obbiettivi progettati per lavorare in immersione in olio.

In dette condizioni, oltre all'aberrazione assiale illustrata nel capitolo precedente, si ha un deterioramento delle prestazioni del sistema che, come verrà mostrato nel seguito, cresce con l'entità del mismatch e con la profondità di focalizzazione del campione nel mezzo in cui è immerso.

Ecco allora che lo studio del comportamento delle diverse architetture, nelle condizioni sperimentali in cui saranno di volta in volta impiegate, va condotto ad un livello più fondamentale: nel caso di un microscopio a fluorescenza, potendo fare un'ipotesi di linearità, la conoscenza della PSF o della sua trasformata di Fourier (OTF) permette, in tal senso, una completa caratterizzazione dello strumento nelle condizioni considerate.

Tali funzioni descrivono, nell'ambito dei rispettivi formalismi, lo sparpagliamento dell'immagine di una sorgente puntiforme (assimilabile ad un *impulso di Dirac*  $\delta$ ) prodotto dallo strumento. L'importanza di una precisa conoscenza dei loro andamenti risiede nel ruolo centrale che esse ricoprono nell'implementazione degli algoritmi di deconvoluzione per mezzo dei quali è possibile ricostruire l'immagine 'vera' del campione a partire da quella acquisita.

Lo studio della forma tridimensionale dell'OTF di un microscopio a fluorescenza è stato affrontato, come visto nel capitolo 2 di questa tesi, sulla scorta di assunzioni semplificative (l'assenza di aberrazione cromatica, la presenza di soli fenomeni di tipo diffrattivo come fattori limitanti, l'invarianza traslazionale ecc.) che, se da un lato agevolano la valutazione numerica delle approssimazioni così ottenute, dall'altro non rispecchiano del tutto le condizioni reali della pratica sperimentale.

Se, ad esempio, un microscopio fosse, in tutte le situazioni in cui ci si può trovare ad operare nella pratica, realmente spazio – invariante, allora la forma della PSF prodotta da una sorgente puntiforme posta in una posizione qualsiasi nello spazio del campione dovrebbe essere, a meno di una traslazione, identica a quella della PSF prodotta da un'altra sorgente puntiforme, collocata in un qualsiasi altro punto nello spazio del campione e assunto come origine di un sistema di coordinate.

Distinguendo tra *invarianza assiale* (lungo l'asse ottico) ed *invarianza radiale* (relativamente ad un piano perpendicolare all'asse ottico), è possibile affermare che, in lenti piane ad alta qualità, la presenza di aberrazioni quali l'astigmatismo o la curvatura del campo è confinata ad un fenomeno di secondo piano, al punto da non incidere significativamente, nelle più tipiche condizioni di utilizzo, sull'invarianza radiale del sistema.

Per quello che riguarda la risposta del sistema lungo l'asse ottico, la dipendenza della PSF dalla posizione della sorgente nello spazio del campione dipende dalla proprietà generale secondo la quale qualsiasi sistema di lenti, che abbia simmetria cilindrica intorno al proprio asse ottico, possiede solo una coppia di superfici coniugate tali che ogni punto dell'una produce un'immagine priva di aberrazioni sull'altra.

Da ciò segue immediatamente che, un qualsiasi oggetto puntiforme nello spazio del campione, che non giaccia su tale superficie privilegiata, darà origine ad un'immagine affetta da aberrazione.

Nel caso di obbiettivo in olio, detta superficie si trova, di solito, immediatamente al di sotto del coprivetrino e, per poter lavorare in condizioni ottimali, questi deve avere spessore ed indice di rifrazione dei valori indicati nelle specifiche fornite dal costruttore. Inoltre, tra il coprivetrino e la lente dell'obbiettivo, va opportunamente collocata una goccia dell'olio d'immersione in modo da creare un ulteriore strato di separazione (di caratteristiche note) tra lente e campione: la distanza così creata tra l'oggetto da osservare e l'obbiettivo è caratteristica intrinseca dell'obbiettivo usato ed è nota come *distanza di lavoro* (WD).

Qualora queste condizioni non vengano verificate, l'immagine può essere soggetta ad aberrazione: nel caso degli obbiettivi ad alta apertura numerica NA tipicamente impiegati in microscopia confocale, la tolleranza di mismatch tra spazio del campione ed obbiettivo o di variazioni del valore della WD è relativamente bassa, come verrà illustrato in seguito dalle misure effettuate.

In condizioni *ideali*, l'immagine acquisita di una sorgente puntiforme è determinata dalla figura di diffrazione che si origina quando il fronte d'onda sferico, convergente sul piano del detector, viene limitato dall'apertura del sistema: si parla allora di immagine priva di aberrazione e limitata dalla sola diffrazione. E' questa la situazione discussa nel capitolo 2 di questa tesi, nel quale si sono ricavati gli andamenti teorici dei profili della PSF (assiale e laterale) senza tenere però conto della presenza di mismatch o di altri fattori di disturbo.

E' chiaro che, nelle pratiche di laboratorio, non è sempre possibile impiegare lo strumento in condizioni nelle quali è progettato per lavorare col massimo dell'affidabilità e che pure una qualche residua aberrazione è sempre presente nelle lenti con cui si ha a che fare.

Cellule e tessuti, ad esempio, hanno uno spessore (da qualche micron a qualche decina di micron) piuttosto elevato se confrontato con la profondità di fuoco di una lente ad alta apertura numerica (dell'ordine della frazione di micron) e l'indice di rifrazione del loro contenuto è più prossimo a quello dell'acqua ( $\approx 1.33$ ) che a quello dell'olio d'immersione ( $\approx 1.52$ ).

Questo comporta che, se nelle condizioni ideali il piano immediatamente al di sotto del coprivetrino nello spazio del campione si trova a fuoco nel piano in cui è collocato il detector, l'individuazione di un oggetto (una sorgente puntiforme, nel caso del calcolo della PSF), situato ad una certa profondità all'interno della cellula, richiede di avvicinare progressivamente l'obbiettivo al campione, in modo da collocare nel piano di fuoco l'oggetto desiderato: questo può portare a variare considerevolmente lo spessore dello strato d'olio tra coprivetrino ed obbiettivo (e quindi la WD), introducendo, così, un primo fattore di scostamento dalla condizione di lavoro ideale.

Inoltre, la radiazione emessa da regioni collocate in profondità nella cellula deve attraversare, prima di raggiungere il detector, zone di spessore ed indice di rifrazione diversi rispetto alla situazione ideale e questo è alla base di un progressivo impoverimento delle prestazioni del sistema, sia in termini di risoluzione, che di contrasto dell'immagine acquisita. Ecco allora che la misura della PSF in condizioni diverse da quelle ideali permette, sia di verificare di volta in volta le effettive potenzialità del sistema, sia di ricavare le informazioni necessarie alla ricostruzione del campione attraverso algoritmi di deconvoluzione.

## 5.2 Misura sperimentale della PSF in condizioni di diverso mismatch

Scopo di questa prima sessione di misure è quello di studiare la risposta del sistema all'impulso al variare dell'entità del mismatch tra l'indice di rifrazione del mezzo d'immersione del campione e quello d'immersione dell'obiettivo.

Le acquisizioni sono state effettuate in olio ( $n=1.52$ ), glicerolo ( $n=1.47$ ) ed aria ( $n=1$ ), utilizzando un obiettivo 100X in olio ( $NA=1.3$  ;  $WD=0.20\text{mm}$ ) ed un campione di microsfere fluorescenti (Polyscience, polistirene  $n=1.56$ ,  $\varnothing=(0.064\pm0.009)\mu\text{m}$ ) diluite in acqua distillata secondo una concentrazione risultante di  $\cong 10^{10}$  microsfere/ml, valore, questo, che si è rivelato adatto ad ottenere un vetrino di microsfere sufficientemente isolate da simulare, singolarmente, un impulso luminoso.<sup>(1)</sup>

La scelta di questo tipo di campione è stata dettata dalla necessità di utilizzare, per simulare una sorgente puntiforme, un oggetto *sottorisolto*, le cui dimensioni non fossero, cioè, superiori a metà del limite di diffrazione ( $0.61\cdot\lambda_{em}/NA$ ). In caso contrario, l'immagine acquisita sarebbe stata calcolabile tramite la convoluzione della PSF del sistema con la forma della sfera effettivamente utilizzata.

Di fatto, l'impiego di oggetti 'molto piccoli' impone stringenti richieste sulla sensibilità del rivelatore e sui tempi di acquisizione, che non devono essere troppo lunghi onde prevenire fenomeni di fotodanneggiamento (photobleaching).

Nel caso della strumentazione impiegata nel corso di questa tesi, la presenza di un efficiente sistema di fotorivelazione ha permesso l'utilizzo delle suddette microsfere, le cui dimensioni sono bene al di sotto del limite richiesto.

Il campione è marcato con *fluoresceina isocianato (FITC)*, una sostanza che presenta in emissione uno spettro con picco in corrispondenza di  $I=540\text{nm}$  ed in assorbimento in corrispondenza di  $I=458\text{nm}$ .

Le acquisizioni sono state per questo effettuate utilizzando, come sorgente d'eccitazione, il laser blu ad Argon ( $I=488\text{nm}$ ) e montando sulla testa confocale un filtro d'eccitazione passa basso con lunghezza d'onda di taglio pari a  $I=488\text{nm}$  ed un filtro di emissione di tipo passa banda centrato in corrispondenza di  $I=515\text{nm}$  con larghezza di banda pari a  $30\text{nm}$ .

Per impostare i parametri di scansione, quali il fattore di zoom ed il passo lungo  $z$ , si è dovuto tenere conto del *teorema di Nyquist* in base al quale, affinché l'immagine di un oggetto sia acquisibile senza perdita di informazioni da un sistema di microscopia a fluorescenza, che è, come visto in precedenza, un sistema a banda limitata, occorre effettuare il campionamento ad una frequenza spaziale che sia almeno il doppio della frequenza spaziale più elevata esibita dall'oggetto in esame.

Sotto queste ipotesi è quindi possibile una completa ricostruzione della funzione campionata, a patto che questa sia a *banda limitata*.

Nel caso in cui il segnale in ingresso sia a *banda illimitata*, come nel caso di un'immagine reale, il sistema determina una perdita di informazione dovuta proprio all'intrinseca limitatezza di banda che lo caratterizza. Pertanto, il rispetto del teorema del campionamento permette di limitare la perdita di ulteriori informazioni: nella pratica, è sufficiente scegliere valori dei parametri di scansione che consentano di avere una dimensione del pixel che sia almeno la metà di quella dell'oggetto.

Un problema che interviene, a questo punto, nell'analisi di un campione con un sistema confocale a scansione laser, è quello legato al fattore di ingrandimento: sebbene questi vari la dimensione dell'area effettivamente scansionata, esso, normalmente, non incide sul numero di pixel ad essa associati. Conseguentemente, le dimensioni dei pixel variano in modo

---

<sup>(1)</sup> La preparazione dei vetrini è stata, per il resto, effettuata secondo la procedura standard descritta nel capitolo precedente.

inversamente proporzionale al fattore d'ingrandimento: ne segue che, scegliendo fattori di ingrandimento maggiori di 1, si può incorrere in un *sovracampionamento* dei dati, con possibile fotodanneggiamento del campione legato al fatto che, nel medesimo tempo di scansione, il campo di osservazione si è notevolmente ridotto.

Se, viceversa, le modalità di acquisizione sono tali che le dimensioni del singolo pixel risultano maggiori di quelle prescritte dal teorema di Nyquist, non solo possono andare perdute alcuni dettagli di dimensioni minori, ma potrebbero pure apparire nei dati oggetti inesistenti, a causa del cosiddetto fenomeno dell'*aliasing*.

Nel corso di tutte le misure di PSF riportate nell'ambito di questa tesi, si sono acquisite sequenze, costituite da un numero di volta in volta variabile di immagini delle dimensioni di 512x512 (pixel), con passo di 100nm lungo l'asse ottico e con un fattore di ingrandimento (*field of view*) tale da selezionare sull'intero campo sotto osservazione, porzioni del campione delle dimensioni di 28 $\mu$ m x 28 $\mu$ m.

Grande cura si è avuta, in questa fase, nell'assicurarsi di non avere alcuna deriva del piano di fuoco durante la scansione, che potesse invalidare l'acquisizione in corso.

Di fatto, lavorando in condizioni limite per il motorino elettrico utilizzato, si è talvolta osservato il manifestarsi di questo spiacevole fenomeno e la misura è stata scartata.

Per quello che riguarda gli altri parametri di scansione, si è cercato di utilizzare, nel corso dell'intera sessione di misure, valori pressoché identici per i guadagni di fototubo (*gain*) e per il tempo di scansione (*speed*) della regione associata al singolo pixel: ciò è stato per lo più possibile agendo sui filtri neutri montati rispettivamente sulla testa di scansione e sul modulo del laser, in maniera tale da compensare l'eventuale debolezza del segnale dovuta, ad esempio, all'impiego di un pinhole più stretto.

Nelle tabelle allegate qui di seguito sono riportati, al variare delle dimensioni del pinhole e del mezzo di immersione del campione, i valori medi calcolati per l'ampiezza a metà altezza (FWHM) del profilo laterale e di quello assiale delle PSF sperimentali. Le statistiche sono state condotte su un database di circa quaranta acquisizioni per ogni assetto operativo considerato.

<b>Aria</b>	<b>Laterale (nm)</b>	<b>Laterale (nm)</b>	<b>Assiale (nm)</b>	<b>Assiale (nm)</b>
	Pinhole 20 $\mu$ m	Pinhole 50 $\mu$ m	Pinhole 20 $\mu$ m	Pinhole 50 $\mu$ m
	187 $\pm$ 8	217 $\pm$ 18	484 $\pm$ 24	564 $\pm$ 7
Teorica	180	210	480	560

<b>Olio</b>	<b>Laterale (nm)</b>	<b>Laterale (nm)</b>	<b>Assiale (nm)</b>	<b>Assiale (nm)</b>
	Pinhole 20 $\mu$ m	Pinhole 50 $\mu$ m	Pinhole 20 $\mu$ m	Pinhole 50 $\mu$ m
	186 $\pm$ 6	215 $\pm$ 5	489 $\pm$ 6	596 $\pm$ 4
Teorica	180	210	480	560

<b>Glicerolo</b>	<b>Laterale (nm)</b>	<b>Laterale (nm)</b>	<b>Assiale (nm)</b>	<b>Assiale (nm)</b>
	Pinhole 20 $\mu$ m	Pinhole 50 $\mu$ m	Pinhole 20 $\mu$ m	Pinhole 50 $\mu$ m
	183 $\pm$ 14	213 $\pm$ 15	495 $\pm$ 29	568 $\pm$ 12
Teorica	180	210	480	560

Il valore indicato come *teorico* si riferisce alla previsione, in assenza di mismatch, effettuata impiegando *Huygens 2*, un software commerciale appositamente concepito per questo tipo di studi e, in particolare, per la trattazione dei cosiddetti *problemi inversi*, mediante l'impiego di algoritmi di deconvoluzione.

Il calcolo dell'ampiezza a metà altezza è particolarmente indicativo del potere risolutivo dello strumento nelle condizioni considerate, potendo essere preso, in un certo senso, come parametro

indicativo del grado di sparpagliamento con cui una sorgente idealmente puntiforme viene ‘vista’ dal sistema.

La non perfetta coincidenza tra il valore previsto ed i valori medi misurati è ulteriore riprova di tutti quei fenomeni di aberrazione di cui si è detto in precedenza e che sono difficilmente controllabili a priori all’interno di qualsivoglia modello teorico.

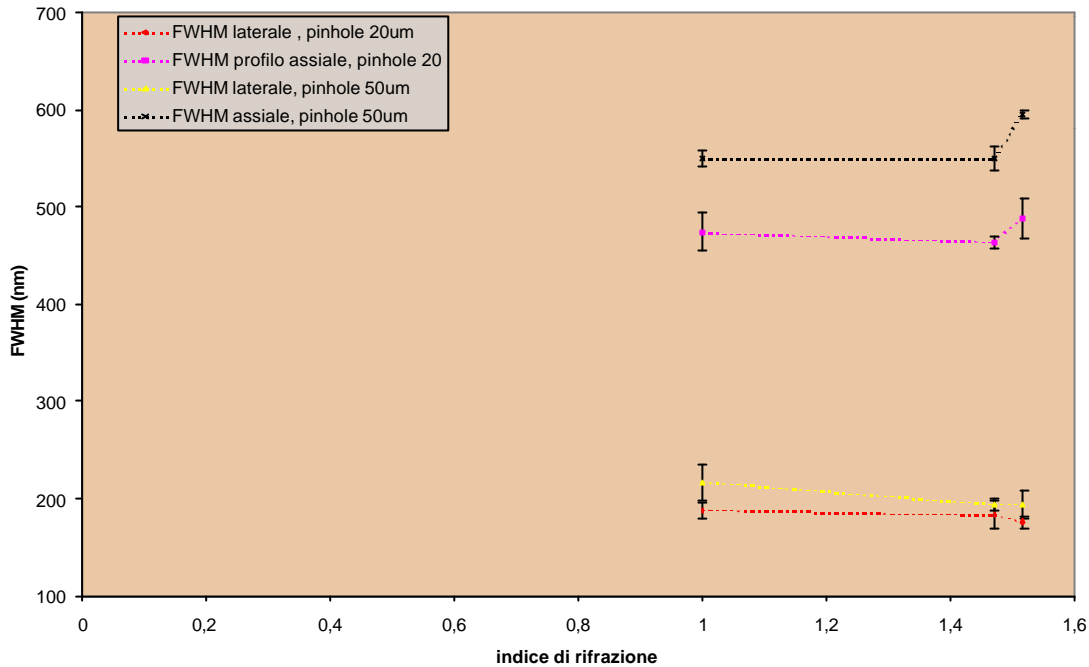


Fig. 5.2a

In figura 5.2b è graficato il valore della FWHM, al variare dell’indice di rifrazione del mezzo di immersione, nelle due condizioni di confocalità considerate.

Come si vede, gli andamenti sono qualitativamente gli stessi, a prescindere dalle dimensioni del pinhole utilizzato e risulta inoltre evidente il cambiamento, talvolta brusco, nell’ampiezza a metà altezza causato dalla presenza di mismatch e di altra residua aberrazione.

In quello che segue sono, invece, riportati i diagrammi a dispersione, relativi alle popolazioni di PSF acquisite nei diversi assetti sperimentali, ottenuti confrontando le ampiezze a metà altezza calcolate a partire dai profili laterali con quelle calcolate dai profili assiali.<sup>(2)</sup>

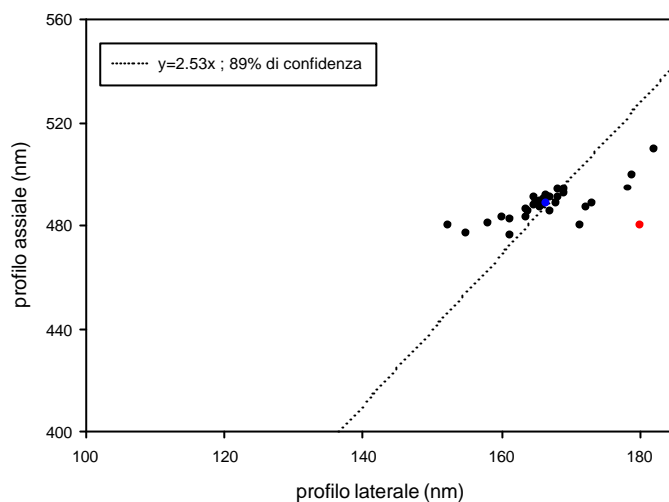
L’utilità di avere un quadro completo della distribuzione dei vari punti rispetto al loro valore medio risiede nella necessità di individuare, all’interno dell’intero set di acquisizioni, quella più rappresentativa della popolazione in questione. Si è convenuto, in proposito, di scegliere, tra tutte le PSF, quella che presentasse valori di ampiezza a metà altezza (laterale ed assiale) più prossimi al valore medio.

Per quello che riguarda l’interpolazione dei punti, essa è stata condotta sul modello lineare di una retta passante per l’origine degli assi.

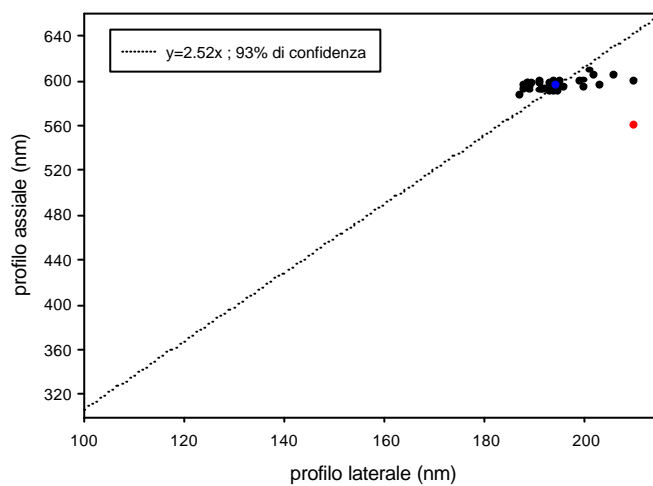
Lo scopo di tale analisi è quello di confrontare, al variare del mismatch tra indici di rifrazione, l’andamento sperimentale del rapporto  $G = (FWHM_{ass.})/(FWHM_{lat.})$  con quello teorico ( $\cong 2.67$ ), calcolato in assenza di mismatch.

<sup>(3)</sup> legenda: ● : valori misurati  
 ● : valore teorico  
 ● : valore medio misurato

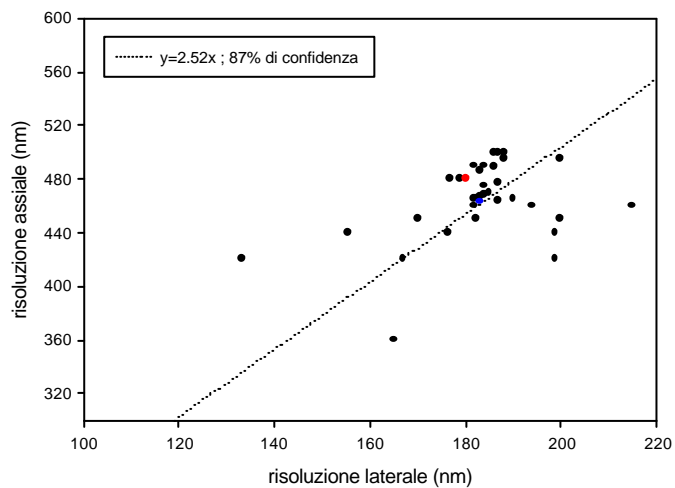
64nm,pinhole20,olio



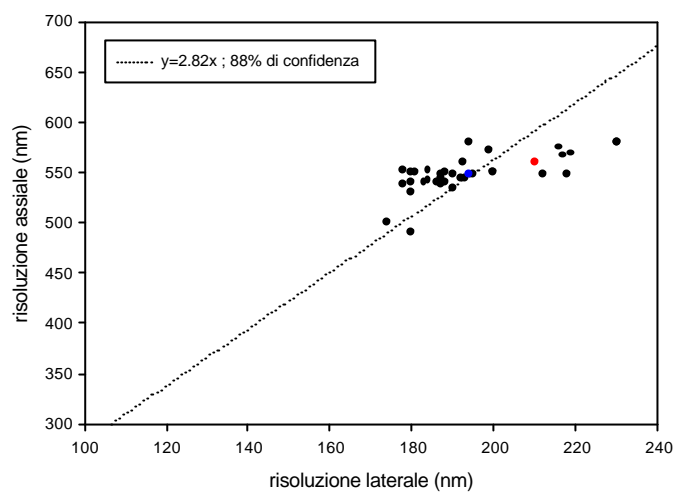
64nm,pinhole 50,olio



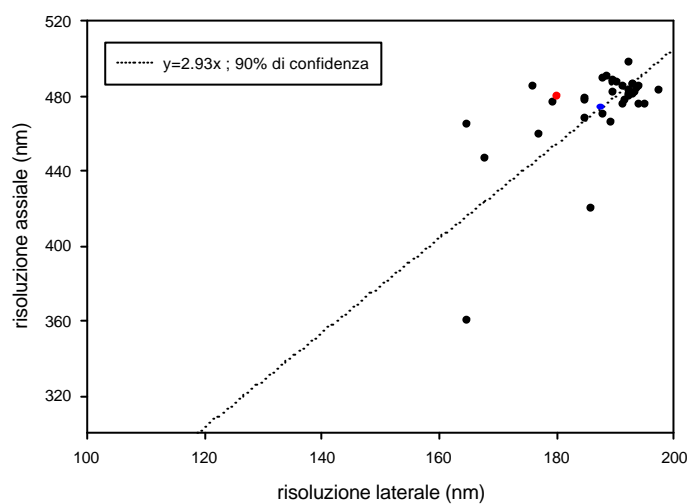
64nm,pinhole 20, glicerolo



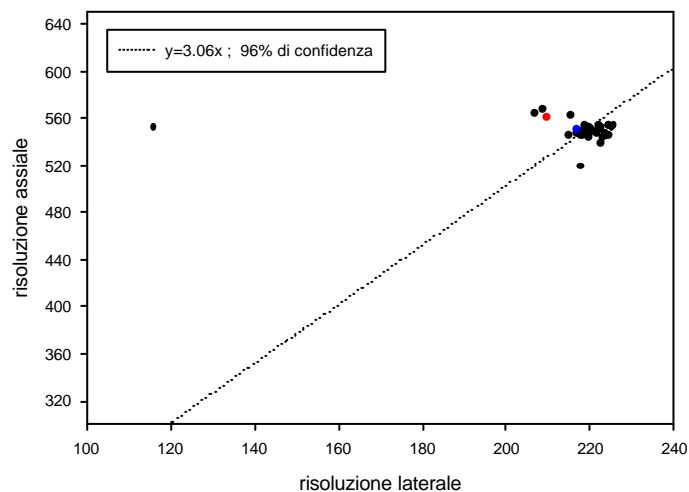
64nm,pinhole50,licerolo



64nm,pinhole20,aria



64nm,pinhole50,aria

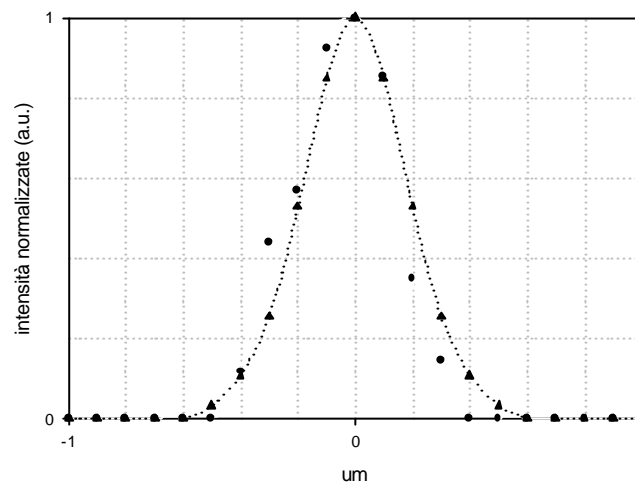


I valori calcolati per il coefficiente angolare della retta (che forniscono  $G_{sp.}$ ) confermano il progressivo discostarsi delle prestazioni del sistema dal caso ideale, all'aumentare del mismatch: al variare dell'indice di rifrazione, la situazione in cui migliore è l'accordo tra i dati dell'esperienza e quelli previsti dalla teoria, è, com'era lecito attendersi, proprio quella in cui il campione è immerso in olio.

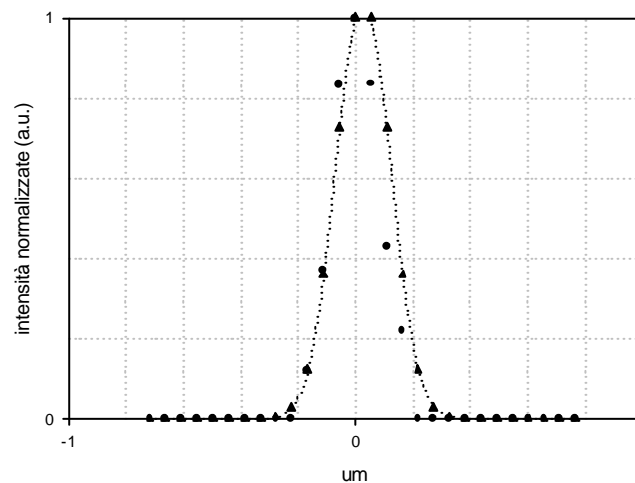
Qui di seguito sono allegati i plot della PSF 'più rappresentativa' di ciascuna delle popolazioni analizzate, scelta secondo il criterio di massima verosimiglianza con il valore medio.<sup>(3)</sup>

I risultati si confermano, in prima approssimazione, in buon accordo con la teoria (andamenti tratteggiati) e documentano, con precisione, la variazione della risoluzione (FWHM) dello strumento corrispondente alle diverse condizioni di confocalità e di mismatch considerate.

profilo assiale della PSF in aria (pinhole 20um)



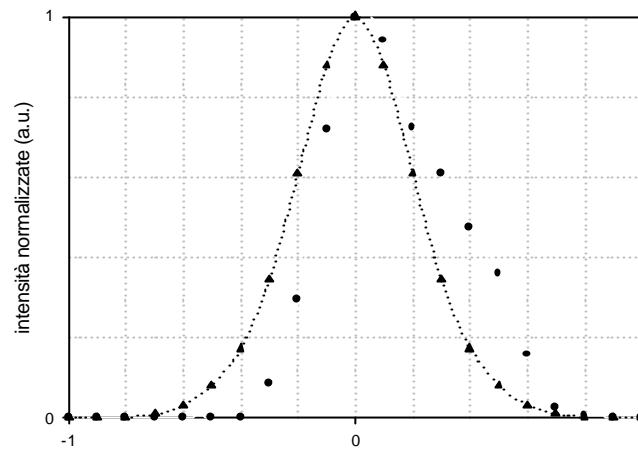
profilo laterale della PSF in aria (pinhole da 20um)



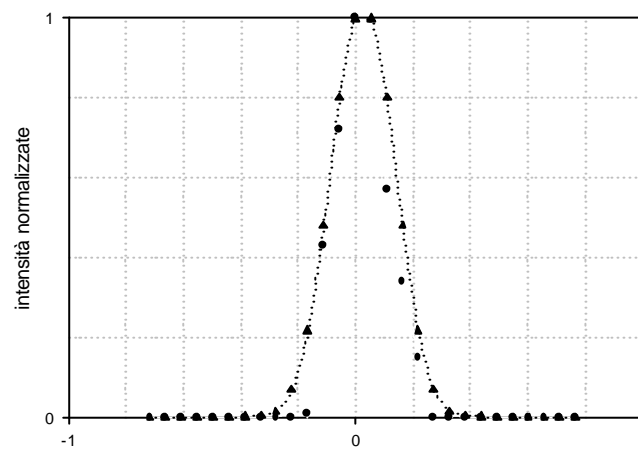
<sup>(3)</sup> legenda: • : valori sperimentali

...▲... : valore teorico calcolato tramite il software Huygens 2

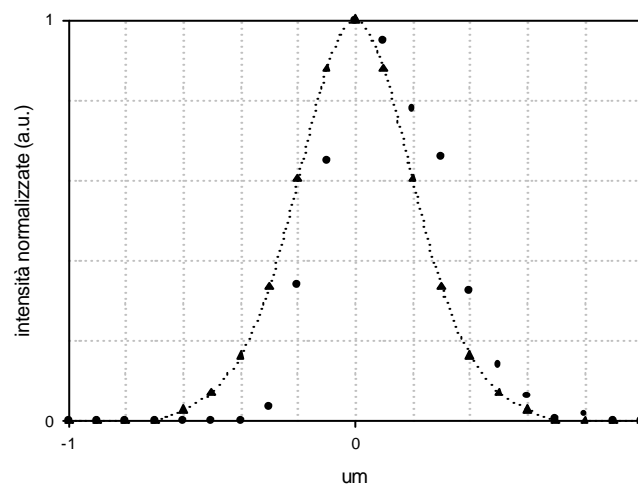
profilo assiale della PSF in aria (pinhole da 50 $\mu$ m)



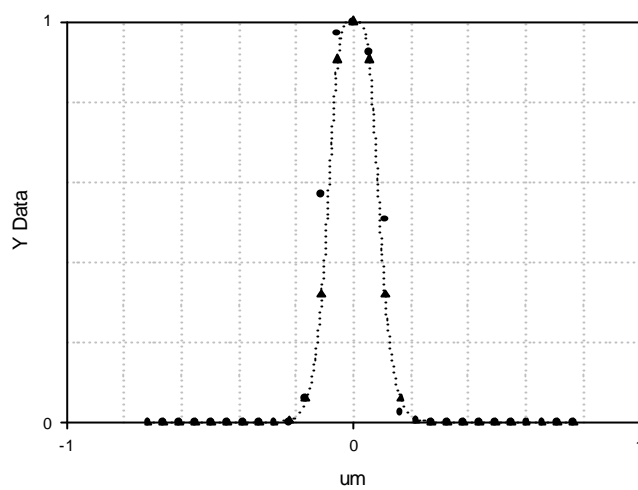
profilo laterale della PSF in aria (pinhole da 50 $\mu$ m)



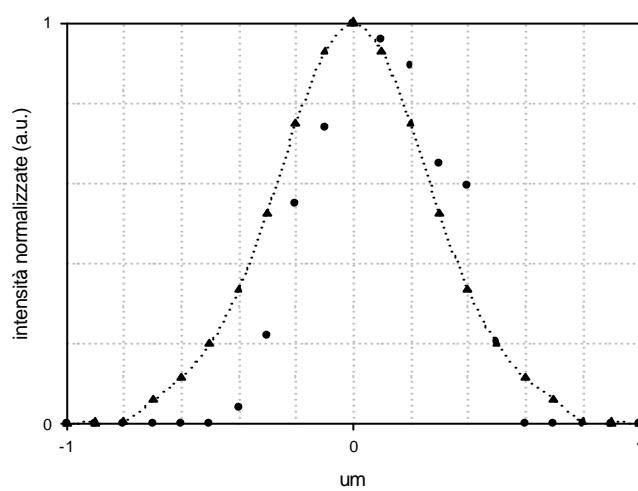
profilo assiale della PSF in glicerolo (pinhole da 20 $\mu$ m)



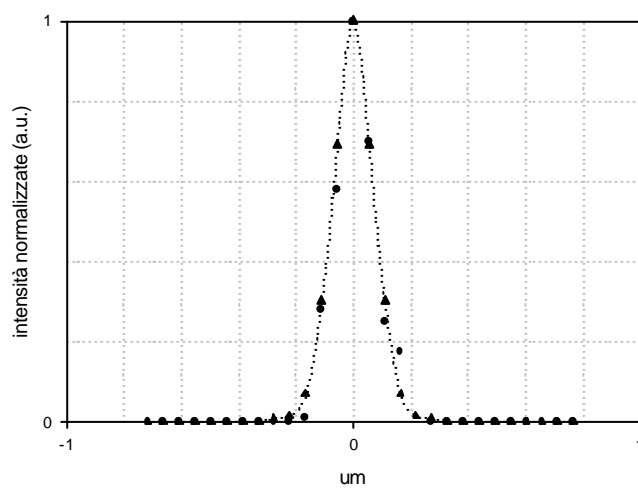
profilo laterale della PSF in glicerolo (pinhole da 20um)

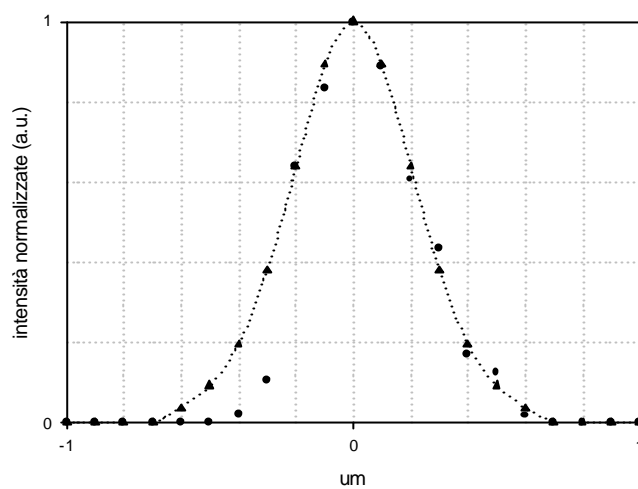
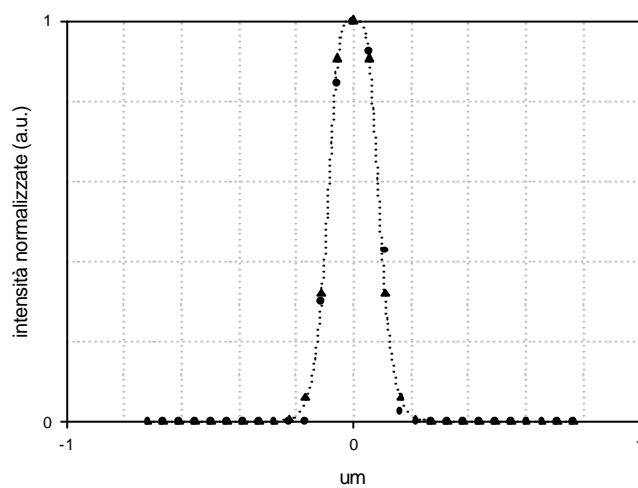
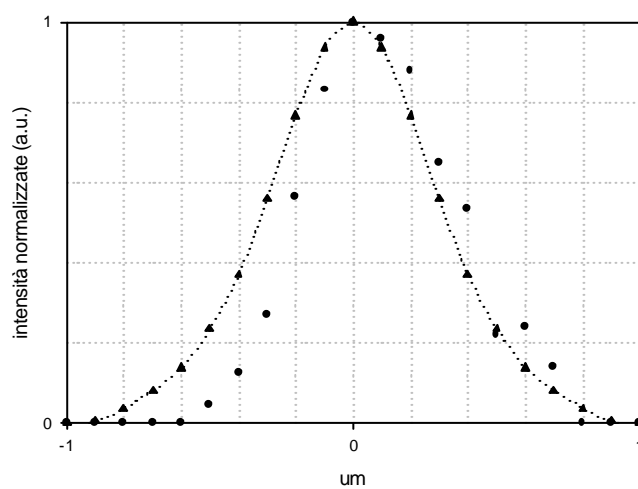


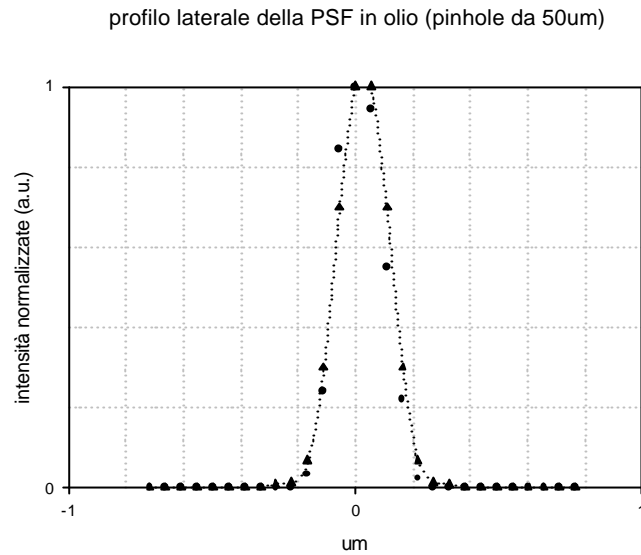
profilo assiale della PSF in glicerolo (pinhole da 50um)



profilo laterale della PSF in glicerolo (pinhole da 50um)



profilo assiale della PSF in olio (pinhole da 20 $\mu$ m)profilo laterale della PSF in olio (pinhole da 20 $\mu$ m)profilo assiale della PSF in olio (pinhole da 50 $\mu$ m)



E' possibile comunque notare come la presenza di aberrazioni si riveli, oltre che in un progressivo deterioramento delle prestazioni, nella sostanziale *asimmetria* degli andamenti ricavati sperimentalmente. In tal senso, la simmetria della risposta del sistema all'impulso costituisce uno dei fattori critici nell'accordo tra teoria e realtà sperimentale, via via più significativo con il crescere dell'apertura numerica delle lenti utilizzate e, come verrà mostrato nel seguito, con la profondità di focalizzazione dell'impulso luminoso nel suo mezzo d'immersione.

Diventa per questo importante la stima sperimentale della funzione di trasferimento del sistema in condizioni che rispecchino, per quanto possibile, quelle in cui si intende condurre il procedimento di *imaging*. In tal modo è possibile, da un lato verificare l'accordo tra i modelli teorici sviluppati e le effettive caratteristiche dello strumento impiegato, dall'altro di ottenere importanti informazioni, utili ai fini di un'attendibile ricostruzione del campione tramite procedimenti di deconvoluzione.

Diversi sono, in questo campo, i metodi sviluppati per tenere conto, nella successiva elaborazione delle acquisizioni, dei vari fenomeni che concorrono a rendere meno efficiente un procedimento di sezionamento ottico. Gran parte di essi è però testata solo attraverso simulazioni al calcolatore, cosa, questa, che si rivela per lo più inefficace a quantificare la reale flessibilità del metodo in questione, in vista di una sua applicazione in ambito biofisico.

Recentemente, si è assistito ad un crescente interesse verso questo tipo di problematica, testimoniato dai numerosi articoli comparsi in letteratura. Tra di essi vale la pena citare un lavoro [G. McNally et al., 1994] interamente dedicato all'analisi sperimentale dell'efficienza di un particolare algoritmo di deconvoluzione al variare delle condizioni di acquisizione.

L'idea di fondo ivi presentata, è quella di impiegare un campione di forma e caratteristiche note, costituito, nella fattispecie, da un set di microsferes fluorescenti del diametro di 10  $\mu\text{m}$ , e di valutare l'affidabilità del procedimento di ricostruzione utilizzato attraverso il confronto tra l'immagine ricostruita e la conoscenza che, a priori, si ha dell'oggetto osservato.

Gli esperimenti descritti riguardano la misura della PSF a diverse profondità nel mezzo d'immersione ed il suo successivo utilizzo per la ricostruzione di una microsfere acquisita in identiche condizioni. La discussione dei risultati ottenuti evidenzia un buon accordo tra l'andamento teorico e quello sperimentale, almeno limitatamente alle PSF situate in prossimità del coprivetrino.

Per quello che riguarda il procedimento di deconvoluzione, invece, l'impiego della PSF teorica risulta più efficiente e ciò è motivato attraverso la sostanziale assenza di rumore che la caratterizza.

A mano a mano che si procede nell'acquisizione di oggetti a profondità diverse nel mezzo d'immersione, si osserva, però, un progressivo peggioramento delle prestazioni dell'algoritmo utilizzato, soprattutto a causa dell'ipotesi di intrinseca invarianza spaziale sul quale esso è basato e che, al crescere della profondità, si rivela via via meno lecita. In tali circostanze, la PSF teorica diviene, per questo, meno affidabile ed i risultati migliori si ottengono con quella misurata sperimentalmente.

E' proprio a partire da queste considerazioni di ordine pratico reperite in letteratura che si è ritenuto opportuno, nel corso dei lavori di questa tesi, dare una vista ravvicinata di questo problema, tuttora in gran parte irrisolto, ed essenzialmente legato all'effetto combinato di mismatch e profondità di focalizzazione.

### 5.3 Diffrazione di una perturbazione elettromagnetica in un mezzo stratificato<sup>(4)</sup>

Lo studio della propagazione della radiazione luminosa attraverso mezzi stratificati riveste un ruolo di primo piano, specie nell'ambito della microscopia a fluorescenza, che spesso ha a che fare con campioni efficacemente assimilabili ad oggetti multistrato.

Scopo di questo paragrafo è quello di estendere la trattazione svolta nel capitolo 2 di questa tesi, nel quale si è ricavata la PSF di un sistema confocale, in assenza di mismatch tra indici di rifrazione, a partire dal calcolo della distribuzione del campo elettromagnetico prodotto, nei pressi della regione di fuoco, da una sorgente puntiforme.

Il punto di partenza era stato, a quel tempo, lo studio della propagazione, in un mezzo omogeneo, della perturbazione  $U(P)$  prodotta dalla radiazione di una sorgente puntiforme opportunamente focalizzata da una lente.

Si era, in conclusione, trovata per la PSF  $h_{CFM}(\mathbf{mn})$  di un sistema confocale, la relazione:

$$h_{CFM}(\mathbf{mn}) \equiv h^2(\mathbf{mn}) \quad (5.3.1)$$

ove  $h(\mathbf{mn})$ , rappresenta l'intensità del campo dovuta ai soli effetti della diffrazione, ed è data, in tutta generalità, da:

$$h(u, v) = |U(P)|^2 = \left| k \frac{a^2 A}{f^2} \right|^2 \left| \int_0^1 J_0(v\mathbf{r}) e^{-0.5iur^2} \mathbf{r} d\mathbf{r} \right|^2 \quad (5.3.2)$$

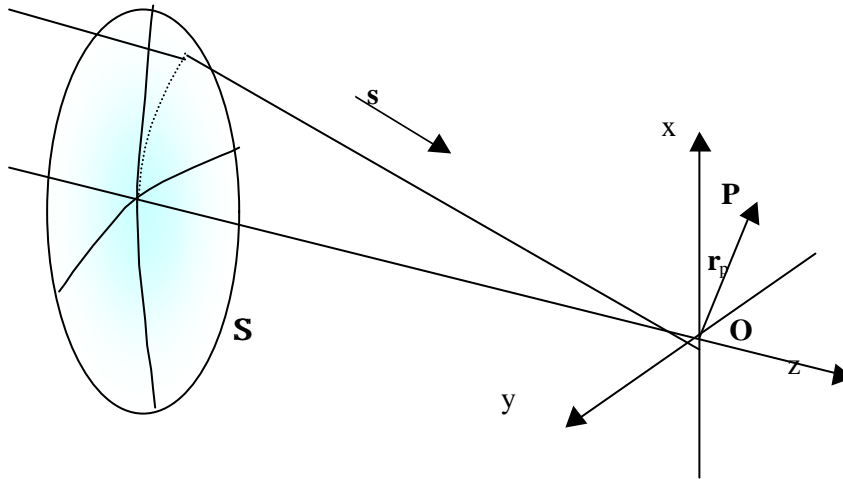
L'approccio che verrà adottato qui di seguito può essere così schematizzato:

- attraverso una trattazione del tutto analoga a quella seguita nel capitolo 2, si calcolerà, innanzi tutto, il campo elettromagnetico nei punti prossimi all'interfaccia tra i primi due mezzi incontrati;
- a questo punto, sfruttando la legge della rifrazione di Fresnel, verranno propagate le singole onde piane al di là di tale interfaccia ed il campo così determinato sarà utilizzato come condizione al contorno per le equazioni differenziali, che descrivono la propagazione della radiazione luminosa nel secondo mezzo;

<sup>(4)</sup> La trattazione qui riportata è basata sul lavoro di P. Torok e P. Varga, 1997.

- iterando il procedimento sarà così possibile, a parte questioni puramente formali, giungere ad un'espressione analitica del campo nel generico  $N$ -esimo mezzo, che costituisce il multistrato in esame.

Si consideri la situazione in figura 5.3a, nella quale è rappresentato un sistema ottico, dotato di simmetria cilindrica intorno al proprio asse.



**Fig. 5.3a** diagramma rappresentante la focalizzazione, attraverso una lente, della radiazione luminosa entro un mezzo omogeneo di indice di rifrazione  $n$ .

Una sorgente puntiforme, localizzata in  $z = -\mathcal{Y}$  nello *spazio del campione*, emette coerentemente una radiazione elettromagnetica monocromatica, polarizzata linearmente, che viene focalizzata da una lente di apertura  $\Sigma$ , priva di aberrazioni, nell'origine O di un sistema di assi cartesiani situati nello *spazio dell'immagine*.

Sia P il punto in cui si vuole calcolare il campo così prodotto.

Assumiamo che sia l'apertura  $\Sigma$ , sia la distanza di P dalla lente, siano grandi se confrontati con la lunghezza d'onda considerata.

Indicheremo con  $\mathbf{s}_N = (s_{Nx}, s_{Ny}, s_{Nz})$  il versore associato al generico raggio convergente in corrispondenza dell' $N$ -esimo mezzo attraversato.

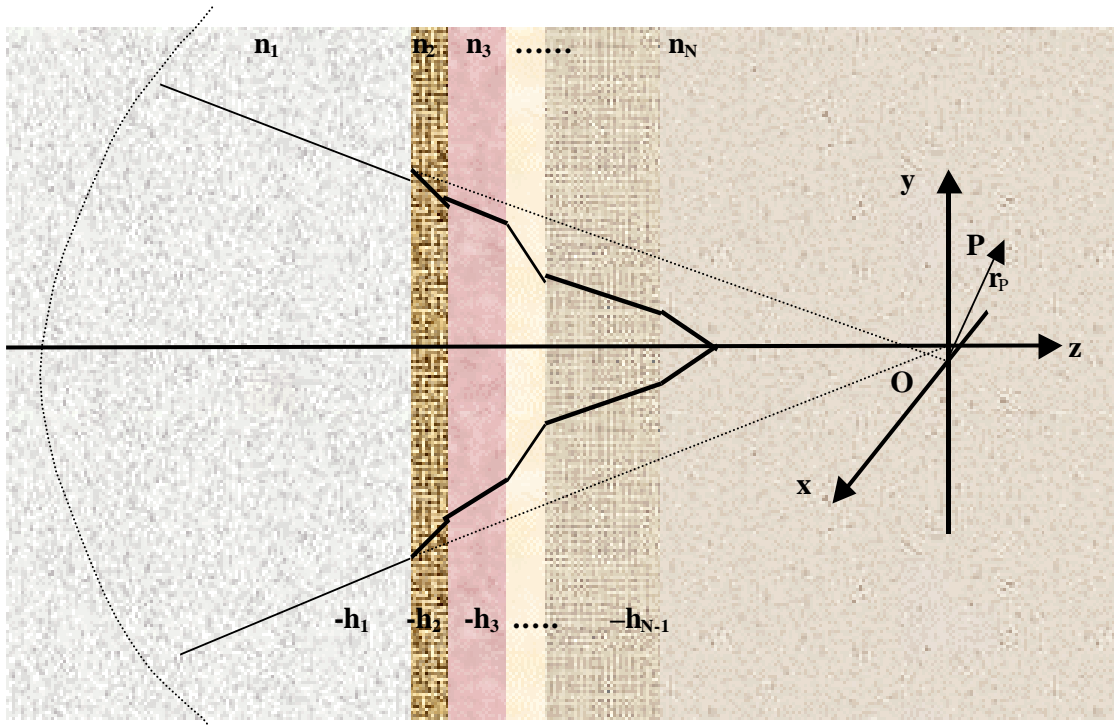
Con queste notazioni, ed omettendo per brevità di notazione l'usuale dipendenza dal tempo, la componente spaziale del campo elettrico, in un punto P appartenente ad una regione occupata da un mezzo omogeneo, può essere scritta come:<sup>(5)</sup>

$$\mathbf{E}(P) = -\frac{ik_l}{2\mathbf{p}} \iint_{\Omega} \frac{\mathbf{a}(s_{1x}, s_{1y})}{s_{1z}} \exp[ik_l \mathbf{s}_1 \cdot \mathbf{r}_p] ds_{1x} ds_{1y} \quad (5.3.3)$$

ove  $\mathbf{a}$  rappresenta il vettore elettrico del campo imperturbato all'uscita dell'apertura  $\Sigma$ ,  $k_l$  è il numero d'onda ed  $\Omega$  è l'angolo solido formato da tutti i raggi uscenti dalla lente.

La situazione descritta in figura 5.3a può essere agevolmente estesa al caso di un mezzo stratificato.

<sup>(5)</sup> si è usata la formula sviluppata da E. Wolf, "Electromagnetic diffraction in optical systems: an integral representation of the image field", Proc.R.Soc.London Ser., 349-357 (1959).



**Fig. 5.3a** diagramma che mostra la focalizzazione della radiazione luminosa attraverso un mezzo stratificato, ottenuta utilizzando una lente.

Siano  $k_1, k_2, \dots, k_N$  i numeri d'onda associati alla radiazione che attraversa i vari mezzi coinvolti. In perfetta analogia con la (5.3.3) si può scrivere:

$$\mathbf{E}_1(x, y, -h_1) = -\frac{ik_1}{2\mathbf{p}} \iint_{\Omega_1} \frac{\mathbf{a}(s_{1x}, s_{1y})}{s_{1z}} \exp[ik_1(s_{1x}x + s_{1y}y - s_{1z}h_1)] ds_{1x} ds_{1y} \quad (5.3.4)$$

che descrive il campo elettrico in corrispondenza della prima interfaccia ( $z = -h_1$ ), nel primo mezzo.

Per descrivere il campo all'interno dell' $N$ -esimo mezzo, assumiamo che ciascuna componente del tipo 'onda piana' sia rifratta all'interfaccia secondo la legge di Fresnel e che il campo risultante sia quindi costruito attraverso la sovrapposizione di tali onde.

Assumendo, infine, che l'ampiezza delle onde piane incidenti sia descritta dalla relazione  $\mathbf{W}(\mathbf{s}_1) = \mathbf{a}/s_{1z}$ , allora l'ampiezza delle onde piane trasmesse fino all' $N$ -esimo mezzo è descritta da una funzione lineare di  $\mathbf{W}(\mathbf{s}_1)$ , ossia da  $\mathbf{L}\mathbf{W}$ , ove l'operatore tensoriale  $\mathbf{L}$  è funzione degli angoli di incidenza, dello spessore dei singoli strati attraversati e dei numeri d'onda  $k_1, k_2, \dots, k_N$ .

Il campo trasmesso nell' $N$ -esimo mezzo, in prossimità dell'ultima interfaccia, è allora calcolabile come:

$$\mathbf{E}_N(x, y, -h_{N-1}) = -\frac{ik_N}{2\mathbf{p}} \iint_{\Omega_1} \mathbf{E}\mathbf{W}(\mathbf{s}_1) \exp[ik_N(s_{1x}x + s_{1y}y - s_{1z}h_{N-1})] ds_{1x} ds_{1y} \quad (5.3.5)$$

Per quello che riguarda, invece, il campo *all'interno* dell' $N$ -esimo mezzo, esso è nuovamente rappresentabile come sovrapposizione di onde piane, cosa, questa, formalmente lecita visto che si combinano linearmente tra loro soluzioni dell'equazione delle onde stazionaria.

Si perviene così alla:

$$\mathbf{E}_N(x, y, z) = -\frac{ik_N}{2\mathbf{p}} \iint_{\Omega_N} \mathbf{F} \exp[ik_N(s_{Nx}x + s_{Ny}y - s_{Nz}z)] ds_{Nx} ds_{Ny} \quad (5.3.6)$$

Occorre ora determinare la funzione  $\mathbf{F}$ .

Ciò può essere fatto sfruttando la (5.3.5), che costituisce una condizione al contorno per la (5.3.6).

Prima di tutto, però, è bene trovare la relazione che lega  $s_1, s_2 \dots s_N$ .

Applicando ripetutamente la legge della rifrazione, si trova che:

$$\begin{aligned} k_N s_{Nx} &= \dots = k_2 s_{2x} = k_1 s_{1x} \\ k_N s_{Ny} &= \dots = k_2 s_{2y} = k_1 s_{1y} \end{aligned} \quad (5.3.7)$$

Rielaborando, a questo punto, la (5.3.6), si perviene alla seguente espressione per il calcolo del campo elettrico all'interno dell' $N$ -esimo mezzo.<sup>(6)</sup>

$$\begin{aligned} \mathbf{E}_N(x, y, z) &= -\frac{ik_1}{2\mathbf{p}} \iint_{\Omega_1} \mathbf{\tilde{E}W}(s_1) \exp[ik_0(n_N h_{N-1} s_{Nz} - n_1 h_1 s_{1z})] \exp(ik_N s_{Nz} z) \times \\ &\times \exp[ik_1(s_{1x}x + s_{1y}y)] ds_{1x} ds_{1y} \end{aligned} \quad (5.3.8)$$

nella quale bisogna tener conto di:

$$s_{jz} = \sqrt{1 - \frac{k_1^2}{k_j^2}(s_{1x}^2 + s_{1y}^2)} \quad (5.3.9)$$

Ai fini del calcolo numerico, la (5.3.9) non può essere, di fatto, applicata direttamente dato che, in presenza di un mezzo stratificato, si possono presentare interfacce in corrispondenza delle quali non si ha ordinaria rifrazione, ma si presentano fenomeni di riflessione totale o comparsa di onde evanescenti. In tal senso, nell'eventuale implementazione numerica della (5.3.9), è opportuno procedere ad un calcolo progressivo delle diverse componenti, cioè:  $s_{1z} \textcircled{R} \dots \textcircled{R} s_{Nz}$ .

E' importante sottolineare che, dato che sia la (5.3.5) che la (5.3.6) sono *soluzioni esatte* delle equazioni di Maxwell, anche la (5.3.8), che rappresenta il vettore campo elettrico all'interno dell' $N$ -esimo mezzo, verifica le equazioni di Maxwell.

Ecco allora ottenuta un'estensione formalmente consistente della trattazione svolta nel capitolo 2 di questa tesi.

La (5.3.8) può, a questo punto, essere riscritta andando ad esplicitare il suo integrando.

Senza entrare nel dettaglio dei conti<sup>(7)</sup>, sotto l'ipotesi semplificativa di isotropia ed omogeneità dei vari strati, assumendo interfacce planari e perpendicolari all'asse ottico, si trovano, nel caso di onda piana incidente sulla lente, le seguenti espressioni per le componenti del vettore elettrico all'interno dell' $N$ -esimo mezzo:

$$\begin{aligned} E_{Nx} &= -iK(I_0^{(N)} + I_2^{(N)} \cos 2\Phi_p) \\ E_{Ny} &= -iKI_2^{(N)} \sin 2\Phi_p \\ E_{Nz} &= -2KI_1^{(N)} \cos \Phi_p \end{aligned} \quad (5.3.10)$$

nelle quali, introdotto un sistema di coordinate polari sferiche  $(r, \theta, \phi)$ , si ha:

$$K = \frac{k_1 f l_0}{2}, f \text{ è la lunghezza focale della lente, } l_0 \text{ è un opportuno fattore d'ampiezza e}$$

gli integrali  $I_0^{(N)}, I_1^{(N)}, I_2^{(N)}$  sono complicate espressioni date da:

<sup>(6)</sup> I dettagli del conto sono qui omessi per brevità, ma possono essere recuperati in :

P.Torok, P.Varga, Z.Laczik, G.R.Booker, "Electromagnetic diffraction of light focused through a planar interface between materials of mismatched refractive indices: an integral representation", J. Opt. Soc. Am. A **12**, 325-332 (1995).

<sup>(7)</sup> P. Torok, P. Varga, "Electromagnetic diffraction of light focused through a stratified medium", J. Opt. Soc. Am. A **36** (1997).

$$I_0^{(N)} = \int_0^a \sqrt{\cos \mathbf{q}_1} \sin \mathbf{q}_1 \times \exp(ik_0 \Psi_i) \times (T_s^{(N-1)} + T_p^{(N-1)} \cos \mathbf{q}_N) \times J_0(k_1 \sin \mathbf{q}_1 r_p \sin \mathbf{q}_p) \times \\ \times \exp(ik_N r_p \cos \mathbf{q}_p \cos \mathbf{q}_N) d\mathbf{q}_1 \quad (5.3.11)$$

$$I_1^{(N)} = \int_0^a \sqrt{\cos \mathbf{q}_1} \sin \mathbf{q}_1 \times \exp(ik_0 \Psi_i) \times T_p^{(N-1)} \times \sin \mathbf{q}_N \times J_1(k_1 \sin \mathbf{q}_1 r_p \sin \mathbf{q}_p) \times \\ \times \exp(ik_N r_p \cos \mathbf{q}_p \cos \mathbf{q}_N) d\mathbf{q}_1$$

$$I_2^{(N)} = \int_0^a \sqrt{\cos \mathbf{q}_1} \sin \mathbf{q}_1 \times \exp(ik_0 \Psi_i) \times (T_s^{(N-1)} - T_p^{(N-1)} \cos \mathbf{q}_N) \times J_2(k_1 \sin \mathbf{q}_1 r_p \sin \mathbf{q}_p) \times \\ \times \exp(ik_N r_p \cos \mathbf{q}_p \cos \mathbf{q}_N) d\mathbf{q}_1$$

ove:

$J_n$  rappresenta la *funzione di Bessel* del primo tipo di ordine  $n$ ;

$a$  è la semiapertura angolare della lente;

$T_{s,p}^{(N-1)}$  è il coefficiente di trasmissione associato all'attraversamento del mezzo (N-1)-esimo da parte, rispettivamente, della componente lungo  $s$  e lungo  $r_p$  del campo elettrico;

$\Psi_i$ , nota come *funzione d'aberrazione iniziale*, è data da:  $\Psi_i = h_{N-1} n_N s_{Nz} - n_1 h_1 s_{1z}$ ;

$\mathbf{q}_j$  indica l'angolo di incidenza in corrispondenza della  $j$ -esima interfaccia ( $j = 1 \dots N$ )

$(r_p, \mathbf{q}_p, \mathbf{F}_p)$  sono le coordinate polari di P.

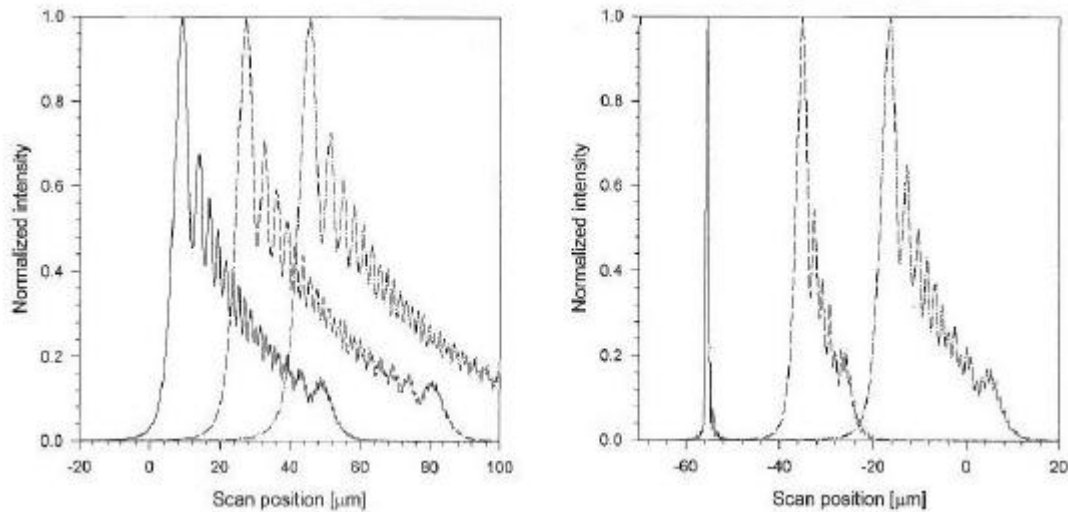
Senza dubbio, questa teoria ha grande rilievo in ambito biofisico, ove i campioni con cui si ha a che fare sono tipicamente costituiti da più strati di materiali ad indici di rifrazione differenti.

Gli obbiettivi utilizzati possono, poi, essere immersi in aria, in acqua o in olio e ciò, in presenza di un coprivetrino e di un mezzo d'immersione fisiologico per il campione, accresce, in misura diversa a seconda delle condizioni sperimentali in cui si lavora, i fenomeni di aberrazione di cui tenere conto.

Per rendere conto, almeno da un punto di vista strettamente teorico, di ciò che tutto questo significa in termini di prestazioni del sistema, è possibile far riferimento ai risultati numerici, riportati in letteratura [P.Torok, P.Varga, 1997], ottenuti tramite una simulazione al calcolatore basata sulle (5.3.10), (5.3.11).

In figura 5.3b sono riportati gli andamenti dell'intensità (normalizzata) al variare della profondità di focalizzazione<sup>(8)</sup>:

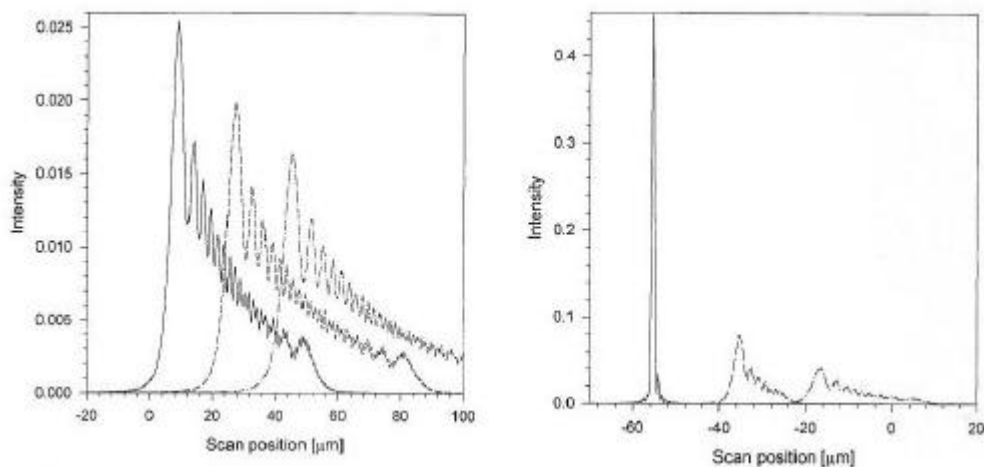
<sup>(8)</sup> Nei grafici riportati, l'ascissa corrisponde alla posizione (teorica) del piano di fuoco, valutata a partire dall'ultima interfaccia, in assenza di qualsiasi aberrazione.



**Fig. 5.3b** il grafico a sinistra rappresenta l'andamento teorico dell'intensità (normalizzata) della radiazione al variare della profondità di focalizzazione entro un mezzo acquoso di indice di rifrazione pari ad  $n_3=1.33$ , nel caso di una lente ( $NA=0.9$ ) in aria ( $n_1=1$ ). Le tre curve si riferiscono a tre diversi spessori per il coprivetrino ( $n_2=1.54$ ) e rispettivamente:  $120\mu\text{m}$  (linea continua),  $170\mu\text{m}$  (linea tratteggiata),  $220\mu\text{m}$  (linea punto-tratto). A destra è rappresentato l'andamento dell'intensità, in uguali condizioni sperimentali, ma riferito ad una lente corretta per un coprivetrino dello spessore di  $170\mu\text{m}$ .

Come si vede, l'aberrazione sferica introdotta dai diversi spessori del coprivetrino, ovvero, più genericamente, dalle dimensioni di uno degli strati presenti, causa consistenti variazioni negli andamenti delle intensità: in particolare, l'ampiezza a metà altezza delle curve considerate aumentano progressivamente con lo spessore del coprivetrino. Tradotto in termini di risposta del sistema all'impulso, come verrà meglio documentato in seguito, questo significa un peggioramento del potere risolutivo. Dalla figura (5.3c), nella quale sono, invece, rappresentati i plot non normalizzati dell'intensità, si nota un ulteriore effetto della stratificazione dei mezzi e, precisamente, una drastica diminuzione del picco principale al crescere dello spessore del coprivetrino.

Correggendo, viceversa, la lente per un valore di  $170\mu\text{m}$  del coprivetrino, si riscontra un generico miglioramento della situazione, sebbene permanga una forte asimmetria in tutti gli andamenti e le prestazioni del sistema risultino comunque drasticamente compromesse rispetto al caso ideale.



**Fig. 5.3c:** andamenti (non normalizzati) dell'intensità, al variare della profondità di focalizzazione. Le condizioni sperimentali sono identiche a quelle descritte nella didascalia della figura 5.3b.

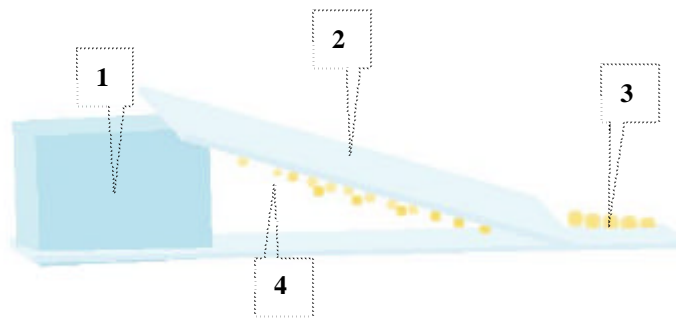
Naturalmente, la simulazione al calcolatore cui si è accennato e alla quale si riferiscono i risultati riportati nei due grafici precedenti, è puramente indicativa dei fenomeni che si osservano impiegando un sistema confocale a fluorescenza: essa è infatti relativa ad un sistema ottico elementare, costituito da una lente in grado di focalizzare, all'interno di un mezzo stratificato, la radiazione luminosa incidente.

Più semplicemente, la simulazione si riferisce alla generalizzazione della situazione precedentemente richiamata dalla (5.3.2), laddove, per il caso confocale, si ha, in prima approssimazione, un andamento del tipo (5.3.1).

#### 5.4 Effetti del mismatch tra indici di rifrazione nella focalizzazione di campioni a profondità diverse.

Al fine di analizzare il progressivo degradarsi delle prestazioni del sistema in presenza di mismatch tra gli indici di rifrazione ed a seguito della focalizzazione di oggetti in profondità nel mezzo d'immersione, si è organizzata una sessione di misure interamente incentrata sull'acquisizione di PSF sperimentali, in grado, quindi, di documentare direttamente i fenomeni precedentemente indagati da un punto di vista puramente teorico.

L'assetto operativo scelto è rappresentato in figura 5.4a.



**Fig. 5.4a** rappresentazione schematica (non in scala) dell'assetto operativo utilizzato per l'acquisizione delle PSF a profondità diverse.

Su un normale coprivetrino [2] (spessore 0,17mm;  $n=1.515$ ) è stata fatta asciugare una goccia di una soluzione acquosa contenente un campione di microsferre fluorescenti ( $\varnothing \cong 64\text{nm}$ ) identiche a quelle impiegate in precedenza per l'acquisizione di PSF.

Contemporaneamente, un altro coprivetrino [3] è stato preparato con un secondo campione costituito, questa volta, da microsferre delle dimensioni nominali di  $\cong 2.7\mu\text{m}$  e disposto secondo la geometria in figura 5.4a, utilizzando un distanziatore [1] delle dimensioni di 0.17mm.

Lo spazio [4], che si è così venuto a creare, è stato riempito, di volta in volta, con il mezzo d'immersione del campione.

Si sono quindi acquisiti, con il solito 100X in olio, con un passo di  $0.1\mu\text{m}$  lungo  $z$  e in condizioni di confocalità stretta ( $\varnothing_{\text{pinhole}}=20\mu\text{m}$ ), diversi set completi di quadri delle dimensioni (in pixel) di  $512 \times 512$ , corrispondenti, nello spazio del campione, a porzioni di  $28 \times 28 (\mu\text{m})^2$ .

Per evitare al campione un'eccessiva esposizione alla sorgente eccitante (laser ad Argon,  $\lambda_{\text{ecc.}} = 488\text{nm}$ ), si è utilizzato un filtro neutro che lasciasse passare il 10% dell'intensità effettiva del laser.

Gli altri parametri di acquisizione sono stati tenuti, per quanto possibile, costanti nel corso dell'intera sessione di misure.

Attraverso la particolare disposizione delle varie componenti descritta in figura 5.4a, ispirata ad altri lavori reperibili in letteratura, è stato possibile valutare la profondità, rispetto al coprivetrino [3], del quadro acquisito, misurando, via software, lo sfuocamento necessario, a mettere a fuoco il campione su [2] una volta messe a fuoco le microsfele in [3].

L'errore cui è soggetta una tale procedura, valutato attraverso la misura ripetuta della posizione di un singolo quadro, è di circa il 5%.

Nelle tabelle allegate qui di seguito, sono riportati le ampiezze a metà altezza, calcolate con la solita procedura descritta in passato, relativi alle PSF acquisite nei diversi mezzi ed a diverse profondità.

In particolare, i valori riportati per la profondità sono quelli già opportunamente corretti, attraverso il fattore di scalamento sperimentale, ricavato nell'ambito del capitolo 4 di questa tesi, per tenere conto dell'aberrazione assiale dovuta al mismatch tra indici di rifrazione.

<b>Aria</b>	<b>Profondità (mm)</b>	<b>FWHM laterale (nm)</b>	<b>FWHM assiale (nm)</b>
	0	$187 \pm 8$	$484 \pm 24$
	30	$244 \pm 10$	$623 \pm 9$
	60	$269 \pm 11$	$798 \pm 10$
	90	$277 \pm 5$	$1063 \pm 24$

<b>Olio</b>	<b>Profondità (mm)</b>	<b>FWHM laterale (nm)</b>	<b>FWHM assiale (nm)</b>
	0	$186 \pm 6$	$489 \pm 6$
	30	$197 \pm 10$	$497 \pm 21$
	60	$186 \pm 12$	$496 \pm 19$
	90	$191 \pm 9$	$484 \pm 12$

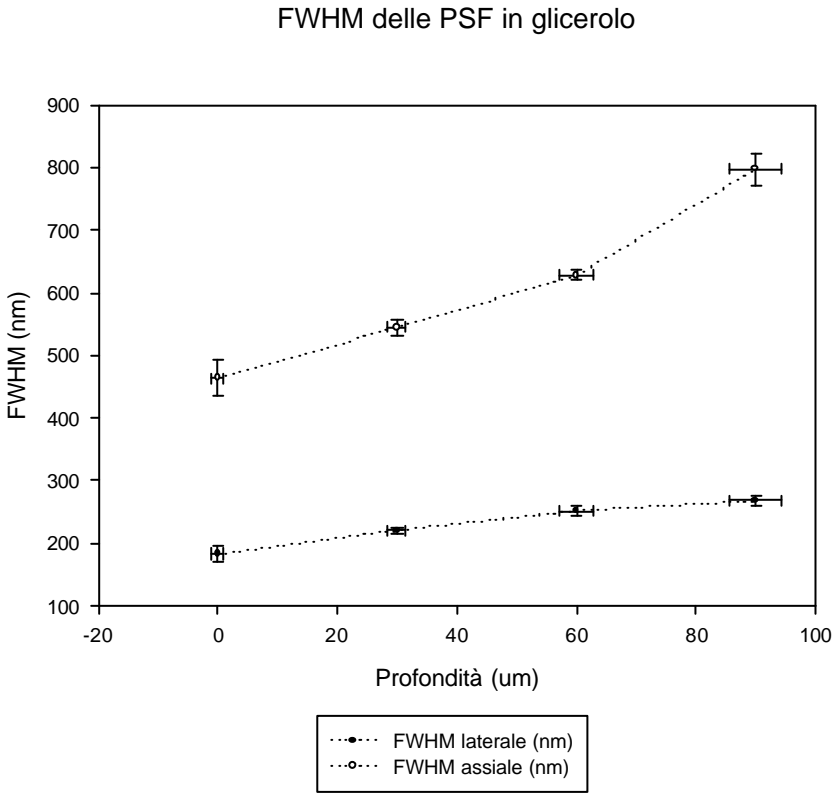
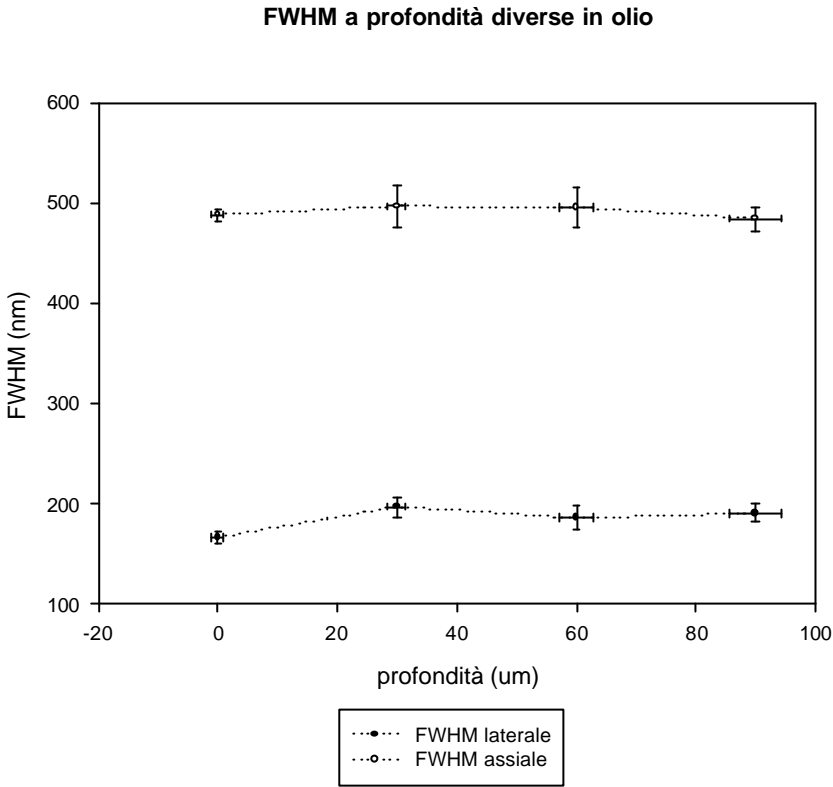
<b>Glicerolo</b>	<b>Profondità (mm)</b>	<b>FWHM laterale (nm)</b>	<b>FWHM assiale (nm)</b>
	0	$183 \pm 14$	$495 \pm 29$
	30	$221 \pm 5$	$545 \pm 12$
	60	$252 \pm 7$	$628 \pm 9$
	90	$268 \pm 8$	$797 \pm 26$

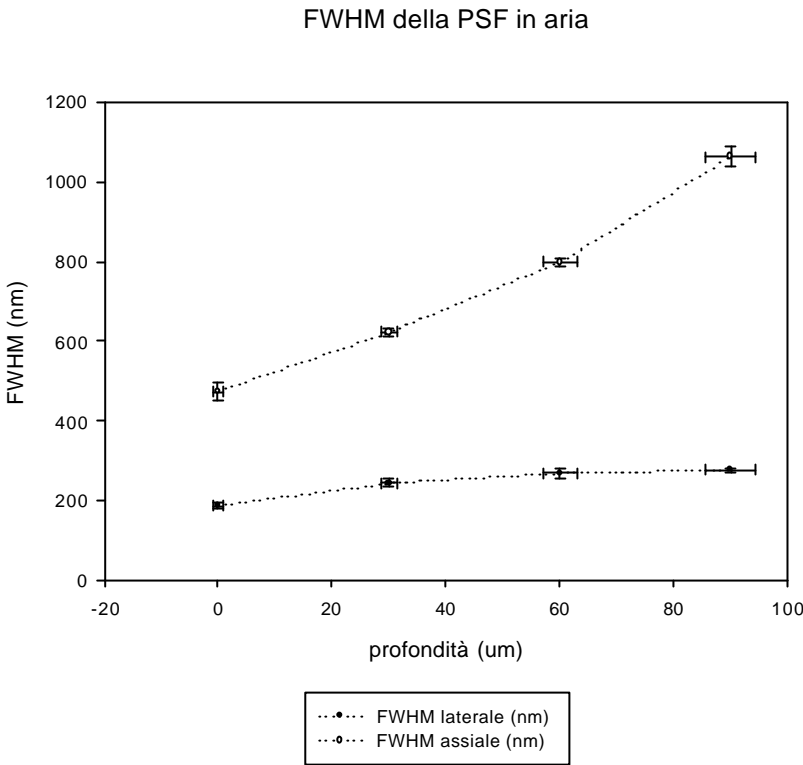
I risultati si riferiscono all'indagine statistica condotta, per ogni condizione sperimentale, su un set di una trentina di acquisizioni.

I grafici allegati qui di seguito documentano, invece, gli andamenti dell'ampiezza a metà altezza del profilo laterale e di quello assiale delle PSF, al variare delle profondità di focalizzazione e del mezzo d'immersione.

Quello che si può osservare è un diverso comportamento del sistema lungo l'asse ottico rispetto alle direzioni ad esso perpendicolari: lo sparpagliamento della risposta all'impulso, al variare della profondità, cresce infatti più rapidamente lungo  $z$ , causando, così, una spiccata diminuzione del potere risolutivo assiale rispetto a quello laterale.

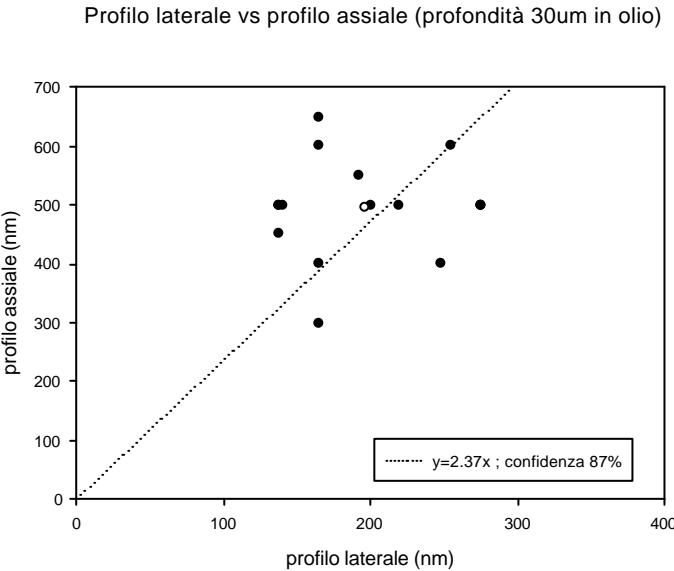
In termini numerici, la massima variazione percentuale dell'ampiezza a metà altezza laterale (rispetto al valore misurato sperimentalmente in corrispondenza di  $z = 0\text{mm}$ ) passa dal 6% (caso di campione in olio) fino al 48% (campione in aria), mentre, nel caso assiale, si arriva fino a variazioni dell'ordine del 130% (campione in aria).





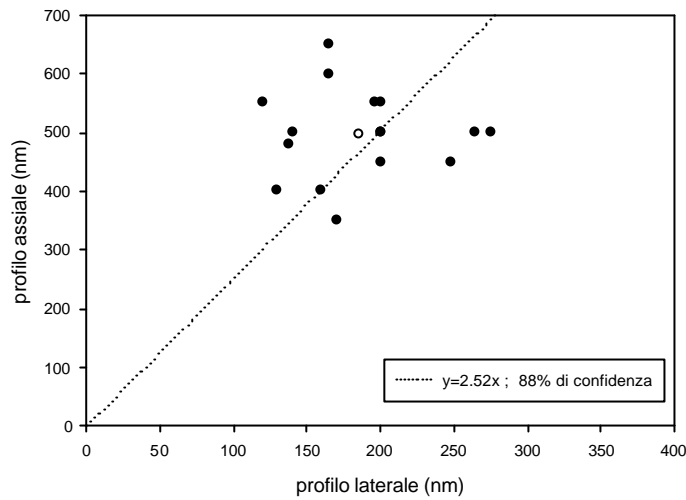
Questo comportamento risulta, poi, tanto più evidente, quanto maggiore è l'entità del mismatch tra gli indici di rifrazione.

I fit riportati qui di seguito<sup>(9)</sup>, relativi allo *sparpagliamento* delle diverse popolazioni di PSF rispetto ai valori di FWHM, permettono, in proposito, di mettere in risalto tale fenomeno.

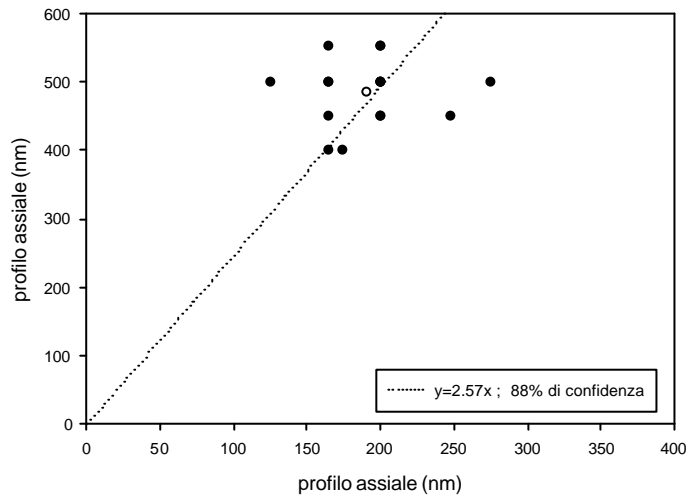


<sup>(9)</sup> legenda: • : valori sperimentali  
O: valore medio della popolazione

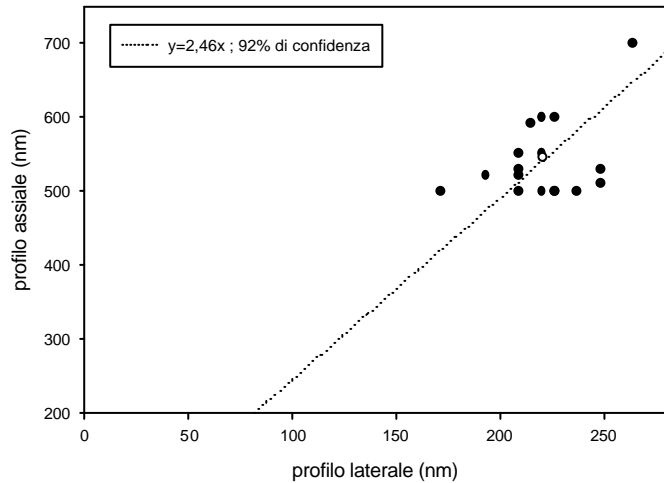
Profilo laterale vs profilo assiale (profondità 60um in olio)



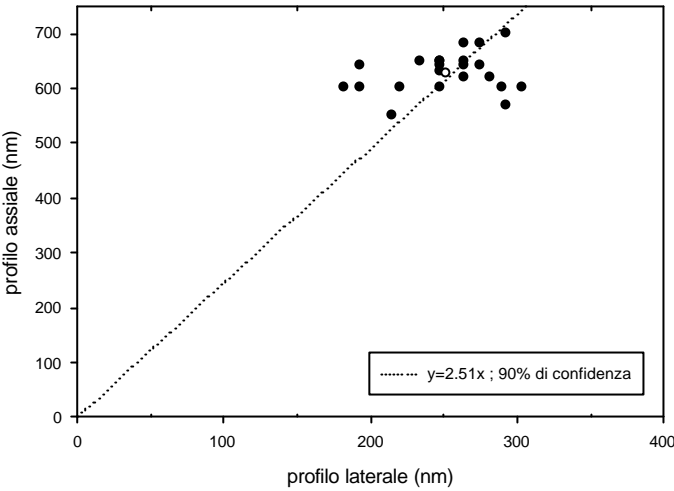
Profilo laterale vs profilo assiale (profondità 90um in olio)



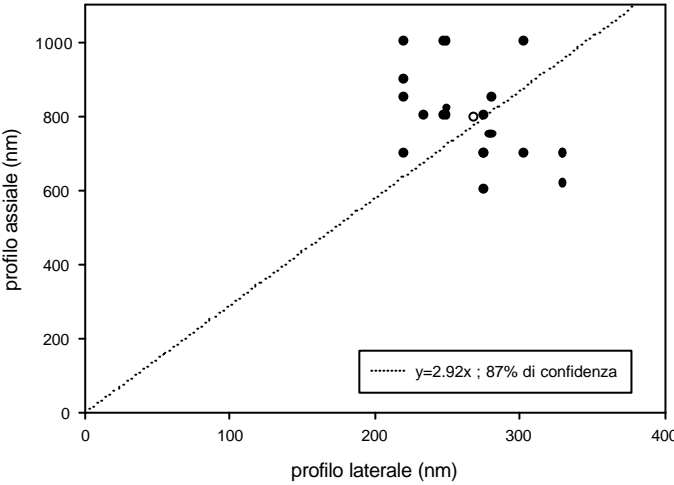
Profilo laterale vs profilo assiale (30um di profondità in glicerolo)



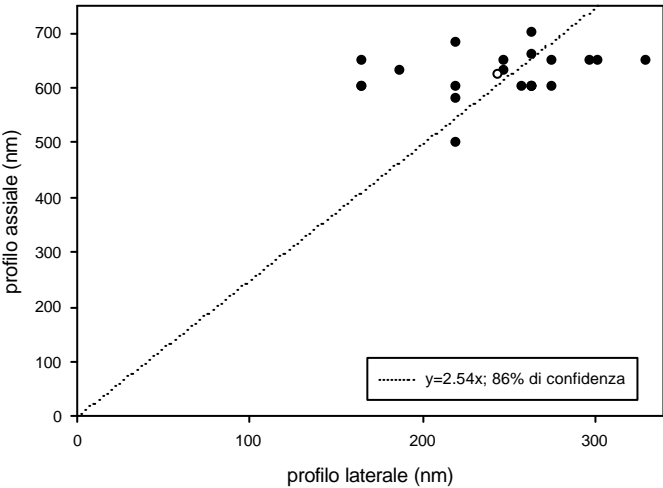
Profilo laterale vs profilo assiale (profondità 60um in glicerolo)



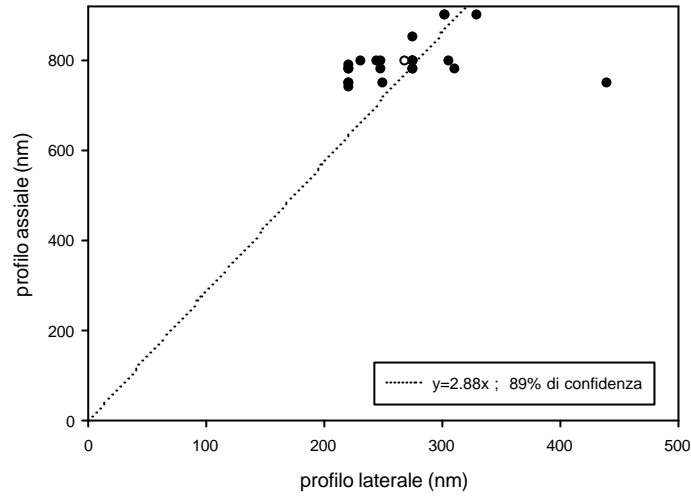
Profilo laterale vs profilo assiale (profondità 90um in glicerolo)



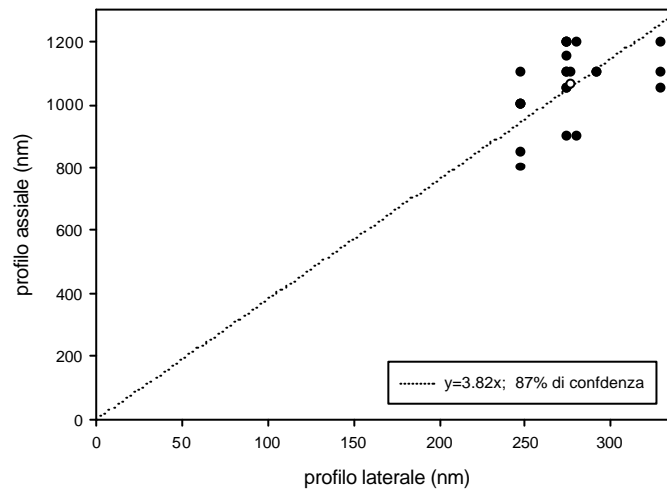
Profilo laterale vs profilo assiale (profondità 30um in aria)



Profilo laterale vs profilo assiale (profondità 60um in aria)



Profilo laterale vs profilo assiale (90um di profondità in aria)



Definendo, come fatto in precedenza, il parametro  $G = (FWHM_{ass.}) / (FWHM_{lat.})$ , il cui valore teorico è  $\cong 2.67$  (calcolato in corrispondenza di  $z=0$  ed in assenza di mismatch) è inoltre possibile ottenere, a partire dai precedenti fit lineari, ulteriori informazioni circa le prestazioni del sistema in presenza di mismatch ed al variare della profondità di focalizzazione.

Quello che si riscontra è una certa regolarità di comportamento nel caso di campione immerso in olio. Nelle altre situazioni sperimentali considerate, si ha, viceversa, una forte dipendenza dalla profondità di focalizzazione, cosa che rende conto dei risultati previsti dalla teoria sviluppata nel paragrafo precedente, secondo la quale, in presenza di mismatch ed al variare della profondità, oltre all'accentuarsi dell'asimmetria nella risposta del sistema all'impulso, si ha il manifestarsi di un progressivo sparpagliamento della PSF, principale responsabile dell'impoverimento delle prestazioni nei procedimenti di imaging.

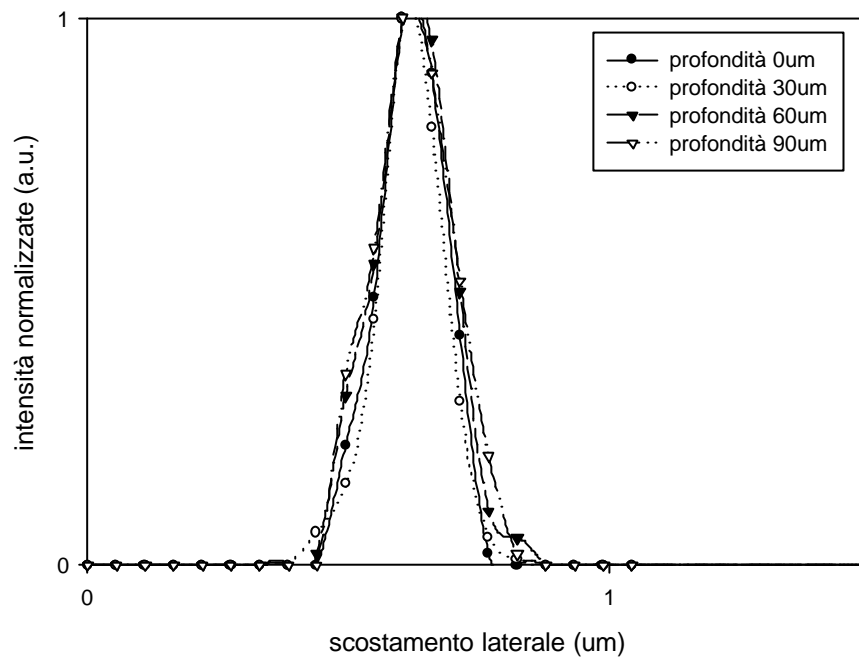
A partire dai grafici a dispersione allegati nelle pagine precedenti, è a questo punto possibile scegliere 'a vista', all'interno di ogni set di PSF acquisite, quella più rappresentativa dell'intera popolazione, in base alla verosimiglianza dei suoi parametri significativi con il valore medio in questione.

L'utilità di un tale procedimento è sia quella di visualizzare concretamente gli effetti delle aberrazioni di cui si è detto sinora, mettendo, così, in evidenza come la deformazione della risposta all'impulso comporti anche un'intrinseca asimmetria dei profili assiale e laterale, sia di compiere il primo, indispensabile passo necessario a chi voglia impiegare le acquisizioni raccolte, ai fini di un procedimento di deconvoluzione a partire dalla 'migliore' PSF sperimentale.

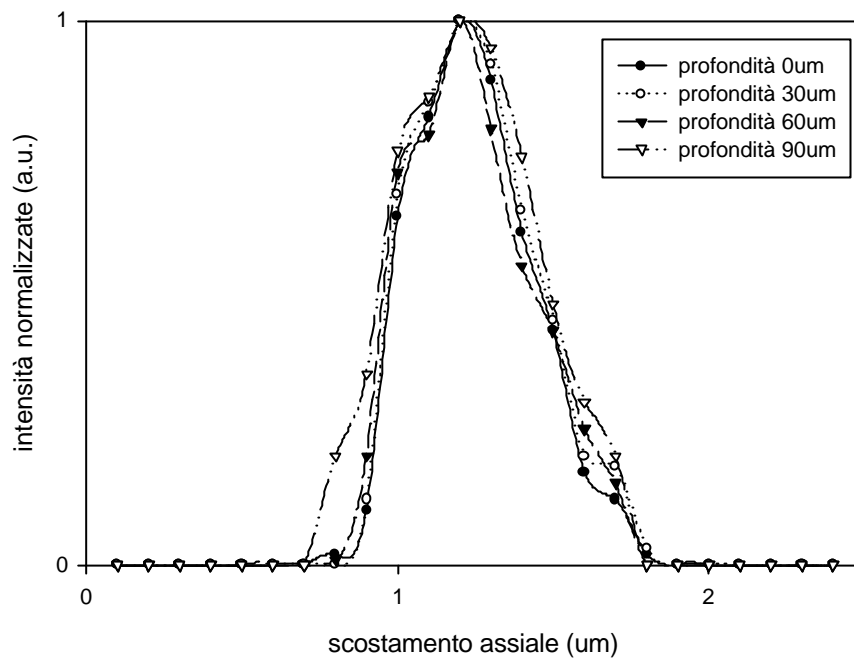
In quello che segue, sono riportati gli andamenti, normalizzati al valore massimo, delle PSF relative alle diverse condizioni considerate.

L'allineamento è stato compiuto a partire dal valore di picco ed è puramente funzionale allo scopo di confrontare visivamente gli effetti prodotti dall'aberrazione.

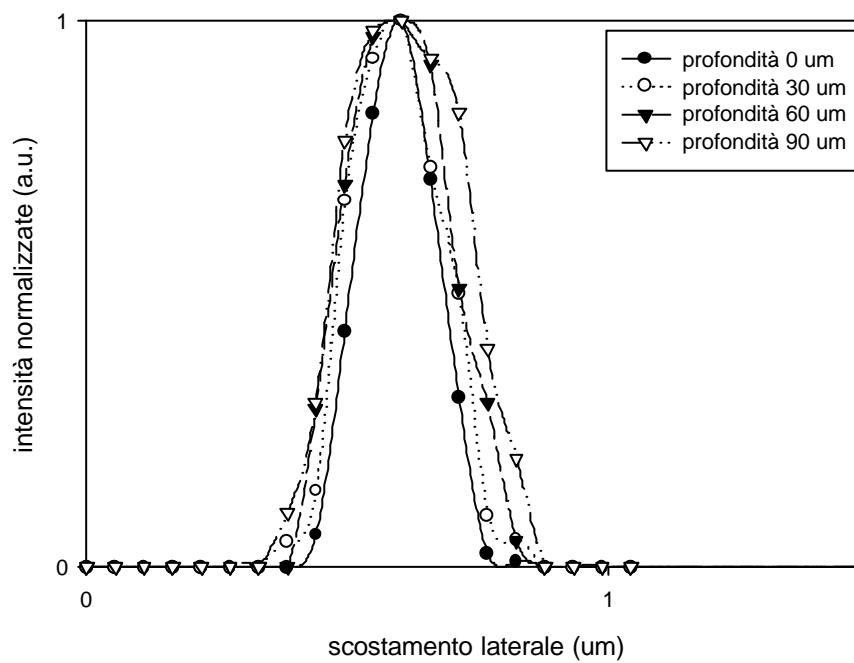
#### Profilo laterale a profondità diverse in olio



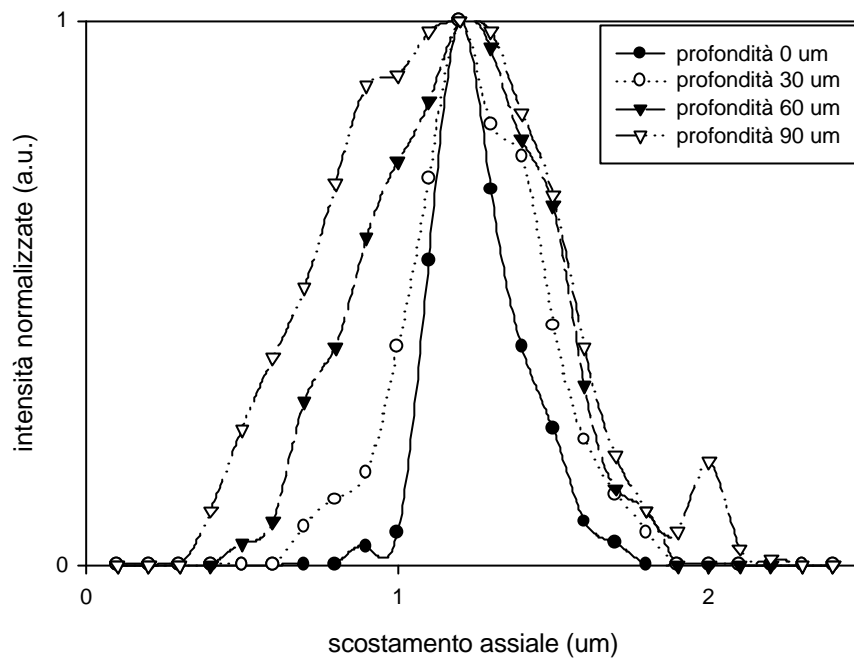
Profilo assiale a diverse profondità in olio



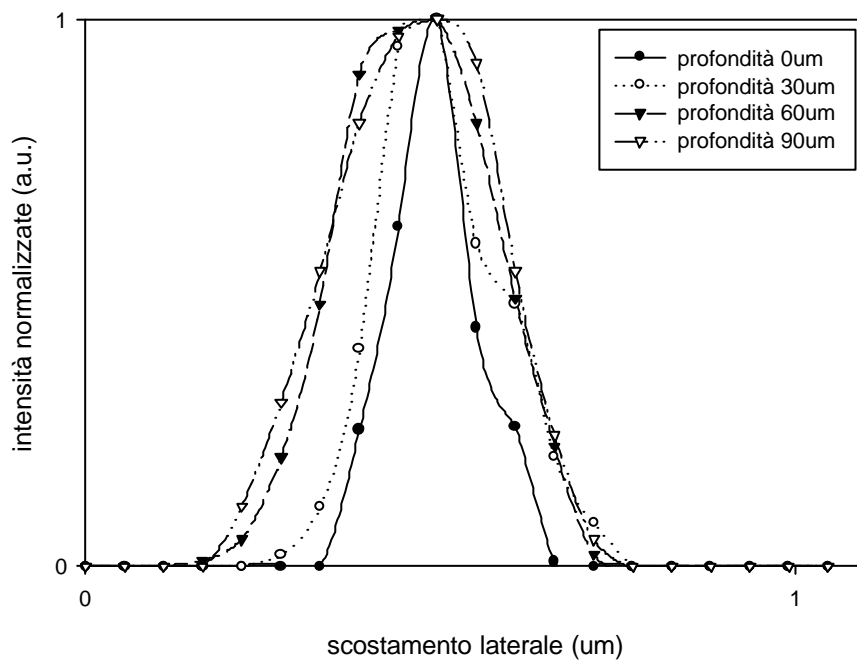
Profili laterali a diverse profondità in glicerolo



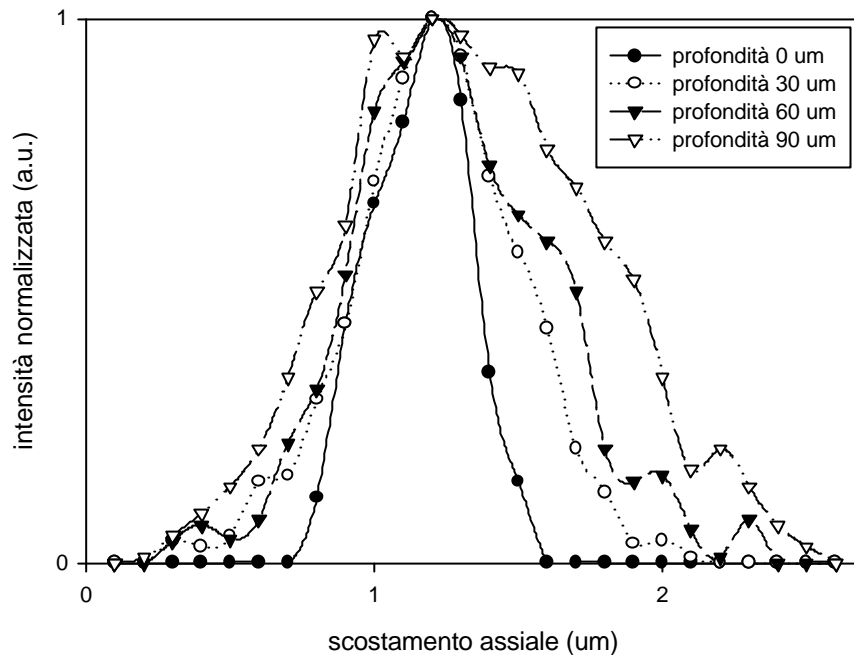
Profili assiali a profondità diverse in glicerolo



Profili laterali a diverse profondità in aria



Profilo assiale a diverse profondità in aria



Le evidenze sin qui riscontrate nell'analisi dell'architettura confocale a disposizione sono ragionevolmente in linea con quelle riportate nei lavori reperibili in letteratura.

A margine di ciò, vale la pena di osservare come l'accordo tra teoria ed esperienza sia, in generale, condotto sulla base di ben precisi parametri (FWHM), caratteristici degli andamenti delle PSF nelle diverse condizioni di acquisizione considerate.

Le interpolazioni presentate sono, tipicamente, fit polinomiali dei punti sperimentali e di quelli teorici generati, sulla scorta delle informazioni fornite dall'utente circa i parametri del campionamento finito che intende effettuare, da software appositamente concepiti, quali *Huygens 2*.

Tale fatto è principalmente giustificabile dalla pesantezza computazionale cui si andrebbe incontro volendo confrontare gli andamenti previsti da formule tipo (5.3.10) con quelli riscontrati nella pratica di laboratorio.

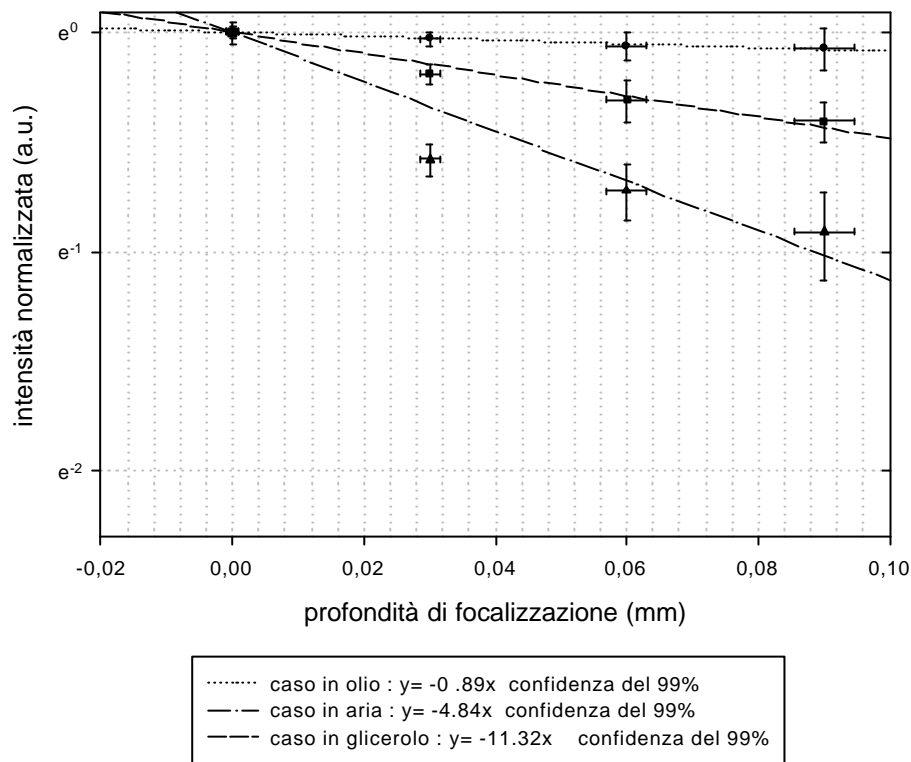
Per completare l'analisi sin qui condotta, resta da indagare la riduzione dell'intensità della radiazione emessa dal campione fluorescente al crescere della profondità.

Questo fenomeno, previsto dalla teoria sviluppata nel paragrafo precedente, si basa essenzialmente sull'ipotesi che, nei mezzi considerati, siano trascurabili fenomeni di *scattering* ed *assorbimento*, dei quali, infatti, non si è, sinora, tenuto in alcun modo conto.

Questi ultimi, in particolare, possono essere esclusi sulla scorta dell'analisi condotta allo spettrofotometro (riportata in appendice) circa le proprietà di assorbimento dei mezzi utilizzati, entro il range di lunghezze d'onda coinvolte in eccitazione ed emissione.

Il grafico riportato qui di seguito rappresenta l'andamento dei valori medi di picco (normalizzati al valore massimo, trovato in corrispondenza di  $z=0$ ) delle PSF al variare delle condizioni di mismatch e della profondità di focalizzazione.

andamento dell'intensità in emissione al variare della profondità



Il fit lineare, condotto, su scala semilogaritmica, sul modello di una retta passante per l'origine, presenta buon accordo con i dati sperimentali.

In particolare, risulta che, all'aumentare del mismatch tra gli indici di rifrazione, il valore del coefficiente di smorzamento esponenziale cresce in modulo.

Ciò indica come, a parità delle profondità di focalizzazione e di tutte le altre condizioni (dimensioni del pinhole ecc.), l'intensità della radiazione emessa, che viene effettivamente rilevata dal PMT, risente anche pesantemente degli effetti del mismatch, cosa, questa, che risulta lecita sulla scorta delle considerazioni teoriche precedentemente sviluppate.

Ecco allora che, potendo ragionevolmente trascurare, in prima approssimazione, fenomeni di scattering e di assorbimento, lo smorzamento subito dall'intensità massima rilevata può essere ascrivito allo sparpagliamento della PSF, descritto dagli andamenti riportati in precedenza.

Concludendo, questa sessione di misure ha permesso di verificare la bontà del modello teorico proposto nel paragrafo precedente, ritrovando gran parte delle previsioni fatte alla luce di esso, non attraverso una simulazione al calcolatore, ma per mezzo di esperimenti appositamente studiati.

Le problematiche emerse, indicano chiaramente alcuni dei limiti che si possono incontrare nei procedimenti di imaging, specie in ambito biofisico, ove più difficile è tenere sotto controllo tutti i gradi di libertà imposti dal campione (indici di rifrazione delle sostanze di cui si compone, spessore, forma ecc.).

Si possono, tuttavia, suggerire alcuni 'elementari' espedienti per minimizzare effetti indesiderati.

Poiché l'impiego di un obiettivo in *olio*, in presenza di mismatch tra indici di rifrazione, si riflette in una progressiva diminuzione del potere risolutivo dello strumento (dell'ordine dello sparpagliamento della PSF) qualora si tentino di focalizzare oggetti in profondità all'interno del

campione, risulta preferibile, nel caso di preparati biologici, l'utilizzo di obbiettivi in *acqua*, in modo da limitare sia il decadimento esponenziale dell'intensità rilevata, sia la perdita di risoluzione.

L'impiego di un obbiettivo in olio e la successiva rielaborazione delle acquisizioni attraverso algoritmi di deconvoluzione, oltre ad un enorme peso computazionale, può non di rado portare, come documentato da lavori presenti in letteratura, a risultati non del tutto soddisfacenti.

Qualora non sia disponibile un obbiettivo in acqua, una strategia può essere quella di tentare di correggere la soluzione fisiologica in cui è immerso il campione in modo da rendere meno pesante l'entità del mismatch e prestando, comunque, attenzione a non compromettere la stabilità biologica del preparato in esame.

Per quello che riguarda, invece, i coprivetrini, visto che il loro indice di rifrazione varia solitamente tra 1.47 ed 1.52, è bene, di norma, utilizzarne del tipo più sottile, così da limitare la presenza di un'ulteriore, pericolosa strato intermedio tra obbiettivo e campione. Nel caso di obbiettivi in acqua è poi possibile sia impiegare lenti appositamente corrette per tenere conto della presenza del coprivetrino, sia utilizzare coprivetrini in plastica, il cui indice di rifrazione (1.34) è assai prossimo a quello dell'acqua.

### 5.5 Studio delle prestazioni di un sistema confocale in presenza di mezzi torbidi

Uno degli aspetti rilevanti nell'ambito dell'imaging tridimensionale condotto in microscopia (convenzionale e non) è, come ampiamente discusso nel paragrafo precedente, la capacità dello strumento di penetrare all'interno di un qualsiasi mezzo per acquisire informazioni sugli oggetti in esso contenuti.

Più concretamente, è questo che succede quando si vanno a studiare le strutture interne di un preparato biologico, sfruttandone la capacità di legame con sonde fluorescenti appositamente studiate.

La prima e più ovvia limitazione a tale procedimento è di tipo *meccanico* ed è imposta dalla distanza di lavoro dell'obbiettivo: una volta 'venuti a contatto' con la superficie del campione è chiaramente impossibile, a meno di deformare lo stesso falsando, quindi, l'intera acquisizione, mettere a fuoco regioni che si trovino a profondità ancora maggiori. Di fatto, però, il contenuto opaco del mezzo entro cui si sta tentando di penetrare e le disomogeneità lungo il cammino ottico impongono limiti ancora più stringenti. Possono, infatti, intervenire fenomeni di assorbimento o di scattering, che impediscono alla radiazione eccitante di penetrare fino alla profondità che sarebbe teoricamente raggiungibile in presenza di un mezzo perfettamente trasparente, oppure che attenuano l'emissione fluorescente indebolendo significativamente il segnale vero e proprio rispetto al background.

Alcuni di questi fenomeni, dovuti principalmente all'effetto del mismatch tra indici di rifrazione, sono stati documentati nel paragrafo precedente.

Scopo di questa ulteriore sessione di misure è lo studio del comportamento dello strumento in una condizione particolarmente critica, nella quale non possono più essere trascurati né l'assorbimento né lo scattering: è il caso dell'imaging effettuato all'interno di un mezzo piuttosto eterogeneo, denso ed opaco, ottenuto prelevando il contenuto citoplasmatico di un oocita di *Xenopus laevis*.

L'importanza di studiare le capacità di focalizzazione all'interno dei cosiddetti *mezzi torbidi*, è legata al grande interesse che, in ambito biomedico, ha assunto recentemente la cosa, principalmente a fini terapeutici e diagnostici.

E' infatti possibile trattare in modo selettivo lesioni interne senza danneggiare i tessuti circostanti, sfruttando l'interazione fortemente selettiva tra siti specifici e radiazione luminosa. Tale selettività è riferita sia alla lunghezza d'onda in corrispondenza della quale si ha assorbimento, sia alla capacità di certi tessuti di trarre giovamento dallo stress termico cui sono sottoposti attraverso l'impiego di sorgenti laser pulsate e fortemente localizzate.

E' inoltre possibile diagnosticare, in modo non invasivo, determinate malattie, 'semplicemente' sfruttando le proprietà ottiche (indice di rifrazione, coefficiente di assorbimento, coefficiente di scattering ecc.) della materia biologica, naturalmente soggetta ad intrinseci cambiamenti al manifestarsi della patologia. Tali proprietà sono, infatti, intimamente legate alla conformazione molecolare del tessuto in questione, e ciò può quindi essere utilizzato come prezioso indicatore del suo stato fisiologico.

In quest'ambito, uno dei fini ultimi nello studio delle interazioni tra laser e campione è quello di capire e prevedere, attraverso simulazioni al calcolatore, la propagazione della radiazione luminosa all'interno di tali mezzi torbidi.

Nel corso di questa tesi, l'analisi è stata condotta in termini di risposta del sistema all'impulso: questo, oltre a fornire informazioni imprescindibili per chi voglia compiere procedimenti di imaging all'interno di siffatti mezzi, è comunque indicatore delle capacità di un'architettura confocale di focalizzare uno spot laser a diverse profondità.

Di fatto, modellare teoricamente l'andamento della PSF in un mezzo torbido è una questione piuttosto delicata: in quanto funzione di trasferimento, essa determina la risoluzione dello strumento ed è, quindi, naturalmente indipendente dall'oggetto osservato. Da ciò, sulla base delle considerazioni teoriche svolte nei capitoli introduttivi di questa tesi, nota che sia la PSF, l'immagine di un qualsiasi oggetto reale può essere prevista, a meno di questioni puramente di conto, attraverso un integrale di convoluzione.

Tuttavia, se il campione è immerso in un mezzo torbido, è difficile introdurre il concetto di risposta del sistema ad una sorgente puntiforme, senza chiamare per questo in causa le proprietà fisiche del mezzo stesso che può essere caratterizzato dalla presenza di particelle scatteranti di dimensioni variabili da qualche frazione di micron al micron, nei casi più svantaggiosi.

Una PSF, quindi, che includa esclusivamente le proprietà degli elementi ottici che costituiscono il microscopio si rivela per lo più inadeguata: occorre un'ulteriore generalizzazione in grado di includere nel modello teorico anche le proprietà scatteranti della materia utilizzata come mezzo d'immersione del campione.

In tal senso, si può seguire l'approccio seguito da X. Gan e M. Gu [1999].

L'idea di fondo del loro lavoro, è legata all'introduzione di un'*effective point spread function* (EPSF), definita come la distribuzione dei fotoni in prossimità della regione focale, che riusciranno effettivamente a propagarsi a ritroso fino a raggiungere il detector.

Si consideri, in proposito, la situazione schematizzata in figura 5.5a.

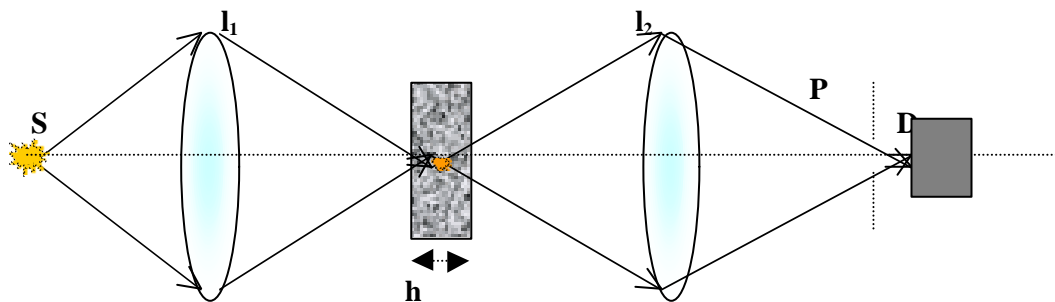


Fig. 5.5a

Attraverso una simulazione al calcolatore, condotta, ad esempio, applicando il metodo di *Monte Carlo* al processo di diffusione della radiazione luminosa all'interno del mezzo torbido T, è possibile determinare se il singolo fotone, emesso in corrispondenza di un punto  $(x,y,z)$  dal campione fluorescente inglobato in T, è in grado di attraversare la materia che lo separa da  $L_2$  e di essere poi rilevato dal detector D aldilà dell'apertura confocale P.

In caso affermativo, il suo contributo viene registrato nella distribuzione  $h$  di fotoni nel punto  $(x,y,z)$ , altrimenti è scartato.

Iterando questa procedura, si perviene infine ad una funzione  $h(x,y,z)$ , che può essere a diritto considerata l'EPSF del sistema.

Tale funzione riflette non solo le proprietà dello strumento (apertura numerica di  $l_1$  e di  $l_2$ , dimensioni del pinhole P ecc.), ma contiene, per come è stata costruita, anche tutti quei fattori correttivi (spessore h, lunghezza del libero cammino medio, eventuale fattore di anisotropia ecc.) propri della particolare natura del mezzo considerato.

Ci si può chiedere, a questo punto, se l'EPSF così ottenuta goda delle stesse proprietà convolutive della PSF.

E' possibile mostrare attraverso evidenze sperimentali dirette [X. Gan and M. Gu, 1999] come, nel limite di oggetti sottili, l'applicazione degli usuali algoritmi convolutivi porti a risultati soddisfacenti senza dover introdurre ulteriori ipotesi restrittive sul mezzo impiegato. Nel caso, invece, di oggetti di dimensioni assiali non trascurabili, l'EPSF si rivela utile a patto di poter trascurare scattering multiplo ed effetti del secondo ordine per la diffrazione.

In termini di FWHM, il comportamento che si riscontra è, anche in questo caso, qualitativamente simile a quello trovato nel caso di mezzi stratificati non torbidi, con la differenza che la risoluzione assiale è soggetta, a parità di profondità di focalizzazione, a variazioni più rapide.

Una trattazione rigorosa, basata sulla *teoria di Mie* dello scattering (multiplo) cui è sottoposto un fotone all'interno della regione occupata da un mezzo torbido risulta estremamente complicata, per via di articolate condizioni al contorno di cui si deve tenere conto, relativamente sia alle onde scatterate che al campo all'interno del mezzo.

La simulazione della propagazione del singolo fotone, invece, così come è stata condotta da C.M. Blanca e C. Saloma [1998], considera in prima approssimazione trascurabili effetti di interferenza e diffrazione tra le varie onde scatterate e può essere distinta in due fasi successive:

- il tragitto del fotone dalla sorgente, attraverso il mezzo torbido, fino al campione fluorescente
- il tragitto del fotone emesso, attraverso il mezzo torbido, fino al pinhole ed, eventualmente, al detector

Il modo di procedere è il seguente:

si assume che il libero cammino  $d$  tra due eventi successivi di scattering sia governato dalla densità di probabilità:

$$p_s(d) = \frac{\exp(-d/d_s)}{d_s} \quad (5.5.1)$$

nella quale  $d_s$  rappresenta il libero cammino medio.

Sotto questa ipotesi, il possibile valore di  $d$  per un fotone scatterato può essere scelto secondo la:

$$d = -d_s \ln \Xi \quad (5.5.2)$$

ove  $\Xi$  è una variabile casuale compresa tra 0 ed 1.

Il valore di  $d_s$  è dato da  $(N_s \mathbf{s}_s)^{-1}$ , con  $N_s$  il numero di centri di scattering nel mezzo e  $\mathbf{s}_s$  la cross section.

La propagazione del fotone è poi descritta introducendo l'angolo di scattering  $\mathbf{q}$  e quello azimutale  $\mathbf{j}$ .

In corrispondenza di ogni singolo evento, si assume  $\varphi = 2\pi\Xi$ , mentre  $\theta$  è scelto secondo la distribuzione di probabilità di Henvey-Greenstein:

$$\cos \mathbf{q} = [(1 + g^2)(2g)^{-1}] - [(2g)^{-1}(1 - g^2)^2(1 - g + 2g\Xi)^{-2}] \quad (5.5.3)$$

nella quale  $\mathbf{q} \in [0, 2\pi]$  e  $g$  è un parametro legato all'anisotropia del mezzo

I valori  $\mathbf{q}_0$  e  $\mathbf{j}_0$ , che definiscono lo stato del fotone in corrispondenza dell'interfaccia tra mezzo d'immersione ed obiettivo, sono estratti da una distribuzione uniforme, tenendo conto delle limitazioni:

$$0 < \mathbf{j}_0 < 2\pi$$

$$0 \leq \mathbf{q}_0 \leq \mathbf{q}_A = \sin^{-1}[r_l/2n(f^2 + r_l^2)^{1/2}]$$

nelle quali  $r_l$  è il raggio di  $l_l$  ed  $f$  la sua lunghezza focale.

Il valore di  $d_0$  è generato in accordo con la (5.5.2).

Per ognuno degli  $N_e$  fotoni che attraversano  $l_l$  per andare ad eccitare il campione, il processo di scattering viene terminato al verificarsi di una delle seguenti evenienze:

- il fotone viene scatterato al di fuori dell'intero sistema ottico;
- il fotone non è in grado di raggiungere il campione dopo un certo numero  $M$  di interazioni col mezzo torbido;
- il fotone, una volta emesso dal campione, non è in grado di raggiungere il detector dopo un certo numero  $M$  di interazioni col mezzo torbido;

Il 'punto di partenza'  $(x,y)$  del singolo fotone in corrispondenza di  $l_l$  è, infine, assegnato secondo una distribuzione gaussiana di probabilità:

$$x = A \cos \alpha \quad y = A \sin \alpha$$

nelle quali:

$\alpha$  è una variabile casuale uniformemente distribuita sull'intervallo  $[0, 2\pi]$

$A$  è una variabile casuale definita come  $A = [2\epsilon^2 \ln[1/(1-\Xi)]]^{1/2}$  e distribuita secondo la funzione:  $f(A) = [1 - \exp(-A^2/2\epsilon^2)]$  (per  $A \geq 0$ ) ed  $f(A) = 0$  per  $A < 0$ .

I dettagli software che implementa questa procedura sono qui omessi per brevità.

Quello che interessa per il seguito sono alcuni risultati di rilievo che permetteranno di rendere conto delle evidenze sperimentali riportate più oltre.

Innanzitutto, il numero  $N_E$  di fotoni che effettivamente riesce a raggiungere un campione ad una profondità  $h$  all'interno del mezzo torbido segue una legge del tipo:

$$N_E = N_e \exp\left(-\frac{h}{d_s}\right) \quad (5.5.4)$$

Questo si riflette, come conseguenza, sull'intensità media rilevata dal detector al variare di  $h$ .

L'andamento che si ritrova è, anche in questo caso, qualitativamente non dissimile da quello riscontrato, in assenza di scattering, nel corso delle acquisizioni discusse nei paragrafi precedenti e rende conto del progressivo impoverimento delle prestazioni del sistema.

La procedura sin qui descritta realizza, di fatto, gli assunti che stanno alla base della definizione dell'EPSF data a suo tempo e può, per questo, essere realizzata per dare una stima approssimata, noti che siano i parametri caratteristici del mezzo che si sta studiando, delle prestazioni del sistema confocale nelle condizioni sperimentali in cui verrà effettivamente impiegato.

## 5.6 Discussione dei risultati sperimentali

Le acquisizioni delle PSF all'interno del contenuto citoplasmatico di un oocita di *Xenopus laevis* sono state effettuate, con procedura identica a quella descritta nel paragrafo 5.4 di questa tesi, impiegando il solito obbiettivo 100X in olio.

Si è lavorato, per ragioni di uniformità con le altre sessioni di misura condotte, in condizioni di confocalità stretta ( $\varnothing_{\text{pinhole}}=20\mu\text{m}$ ), eccitando col laser ad Argon ( $\lambda=488\text{nm}$ ), con un filtro di eccitazione del 10% inserito ai fini di proteggere il campione di microsferi ed evitare repentini effetti di fotodanneggiamento.

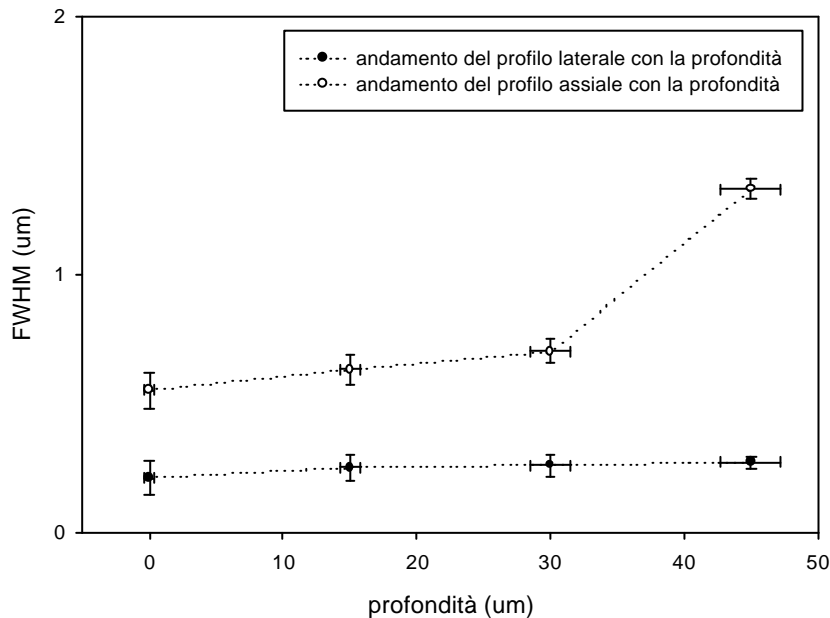
Nella tabella qui allegata, sono riportati i valori delle ampiezze a metà altezza dei profili laterale ed assiale delle PSF.

La profondità di focalizzazione indicata, valutata secondo la procedura di sfuocamento precedentemente descritta, è stata opportunamente corretta secondo il fattore di scalamento sperimentale ricavabile a partire dalle acquisizioni discusse nell'ambito del capitolo 4.

Profondità (um)	FWHM laterale (nm)	FWHM assiale (nm)
0	$210 \pm 4$	$555 \pm 23$
15	$255 \pm 6$	$627 \pm 23$
30	$262 \pm 8$	$700 \pm 29$
45	$271 \pm 6$	$1328 \pm 47$

Come prevedibile già a partire dalla teoria sviluppata per descrivere il comportamento del sistema in presenza di mezzi stratificati, si osserva un progressivo sparpagliamento della PSF, con conseguente diminuzione del potere risolutivo.

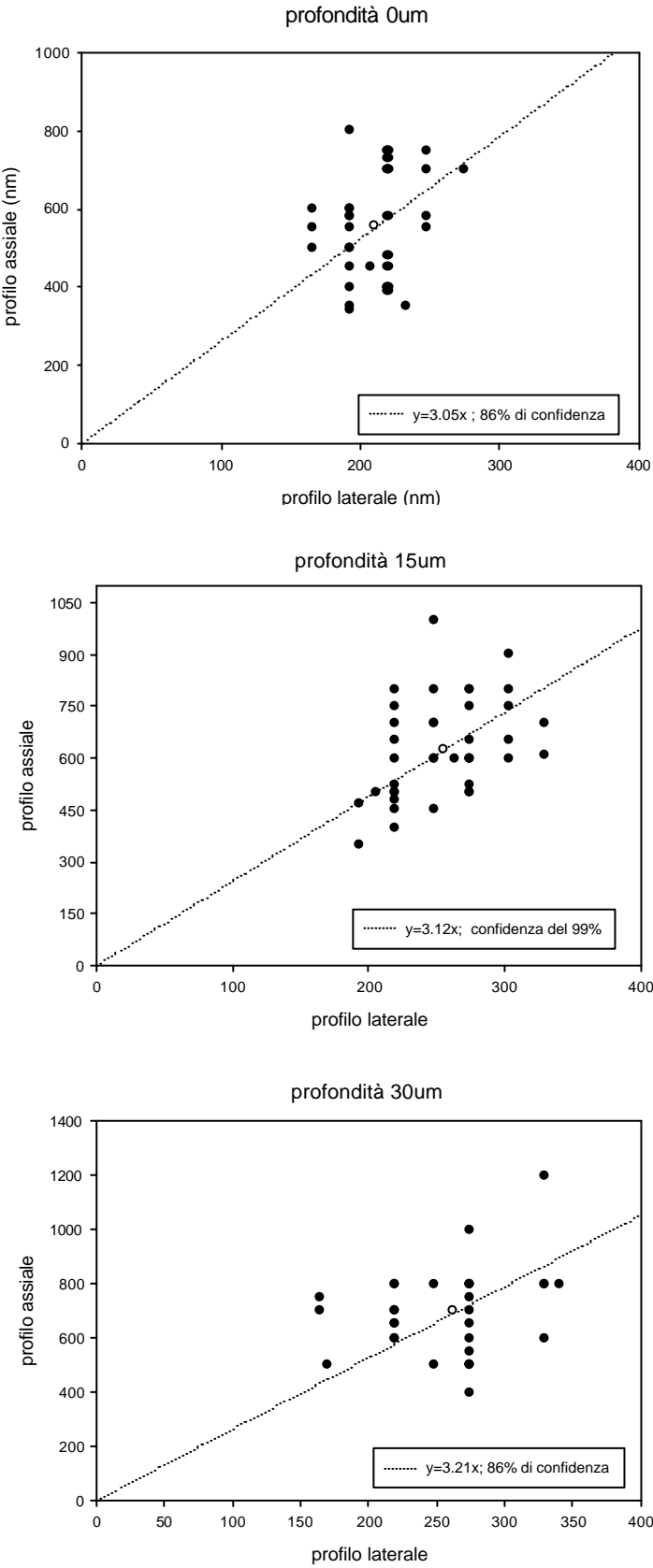
A differenza che in passato, però, la perdita di risoluzione si presenta, almeno inizialmente, pressoché uniforme (fig.5.6a) nelle due direzioni (lungo l'asse ottico e nel piano ad esso perpendicolare).



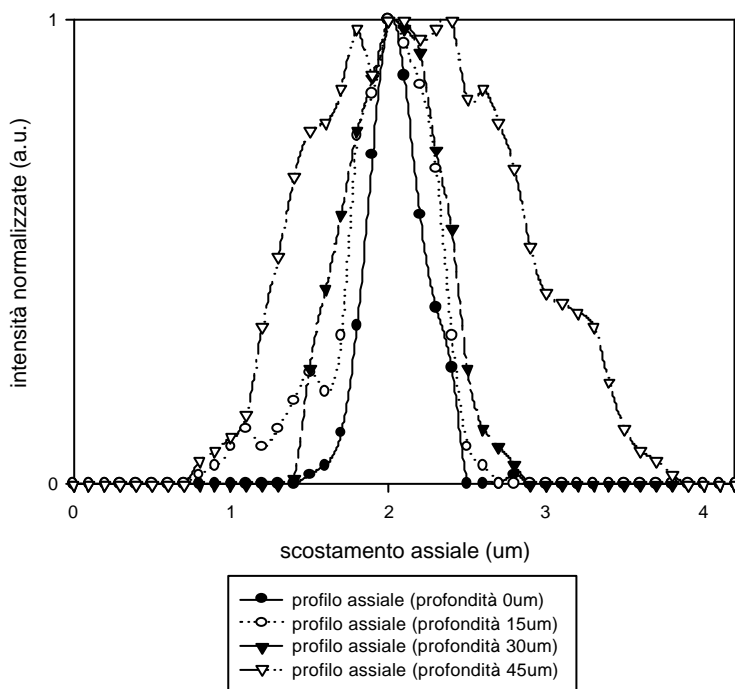
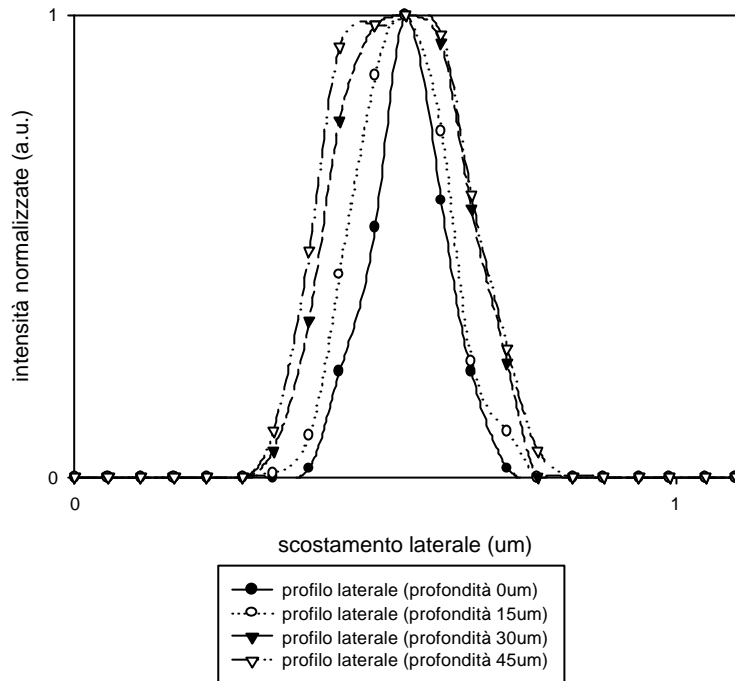
**Fig. 5.6a**

Questo si riflette, necessariamente, sul valore del parametro  $G=(FWHM_{ass.})/(FWHM_{lat.})$ , che, entro un range di  $30\mu\text{m}$ , non varia apprezzabilmente, come risulta dai fit lineari riportati qui di seguito, effettuati sui grafici a dispersione delle PSF acquisite a profondità diverse<sup>(10)</sup>.

<sup>(10)</sup> ) legenda: ● : valori sperimentali



Convenendo, a questo punto, di rappresentare ciascuna delle situazioni considerate attraverso la 'migliore' PSF, scelta in base alla sua verosimiglianza con il valor medio ed applicando una procedura di allineamento del tutto analoga a quella descritta nei paragrafi precedenti, si perviene ai risultati allegati qui di seguito.



Benché, come detto, l'aberrazione introdotta dalla presenza del mismatch tra gli indici di rifrazione e da fenomeni di scattering all'interno del mezzo, si manifesti, a differenza che in altre circostanze, in modo netto anche nelle direzioni perpendicolari all'asse ottico, il profilo assiale si rivela, comunque, il più rumoroso e meno simmetrico.

Questo si inserisce bene all'interno della teoria dei mezzi stratificati, alla luce della quale è possibile mostrare come la risposta all'impulso di un sistema confocale si degradi progressivamente con la profondità di focalizzazione, sia in termini di asimmetria che di sparpagliamento.

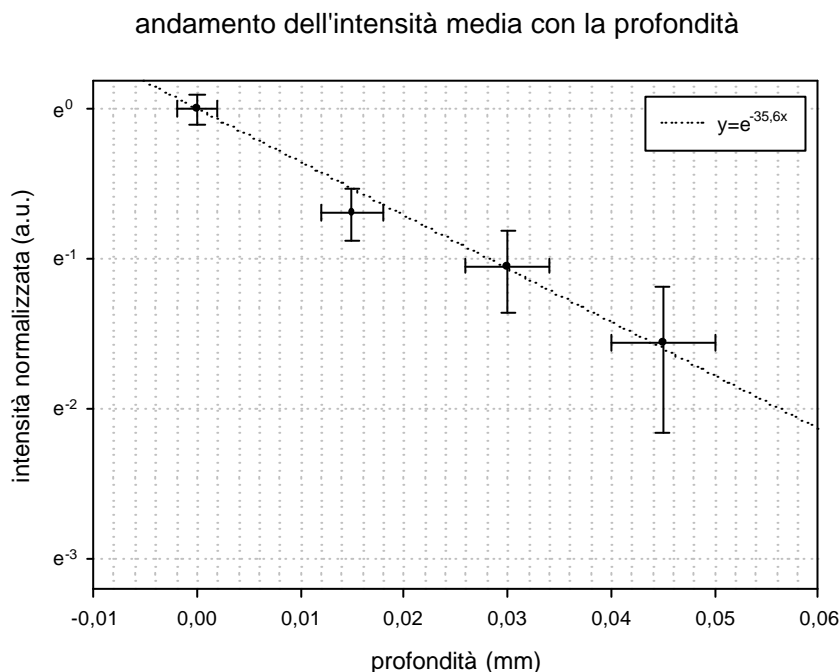
Un'ulteriore evidenza sperimentale che emerge da questa sessione di misure è legata alla minore capacità di penetrazione dello strumento. Mentre in presenza di mezzi d'immersione trasparenti, quali l'olio Nikon o il glicerolo, si era in grado di individuare il campione di microsferette sottomicroscopiche fino ad una profondità dell'ordine del centinaio di micron, l'impiego del contenuto citoplasmatico di un oocita ha drasticamente ridotto a meno della metà tale valore.

Tenendo pure conto che, vista l'intrinseca disomogeneità del mezzo, i risultati trovati hanno puramente valore indicativo, una prima, possibile spiegazione è da ricercarsi nell'ambito della teoria dei mezzi torbidi cui si è accennato nel paragrafo precedente.

Si possono allora individuare almeno due ulteriori fattori limitanti, connessi con fenomeni di scattering all'interno del mezzo:

- l'andamento esponenzialmente decrescente del numero effettivo di fotoni in grado di raggiungere il campione e di eccitarlo
- l'andamento, anch'esso fortemente smorzato (e nel quale è riconoscibile una chiara componente esponenziale), del numero di fotoni che, a seguito dell'emissione fluorescente, riescono a riattraversare la regione occupata dal mezzo torbido, a non essere sbarrati dal pinhole ed a raggiungere, quindi, il detector.

Calcolando quindi per ciascuno degli assetti sperimentali considerati, il valore medio di picco dell'intensità, si ottiene l'andamento (normalizzato al valore massimo e rappresentato su scala semilogaritmica) mostrato in figura (5.6b).

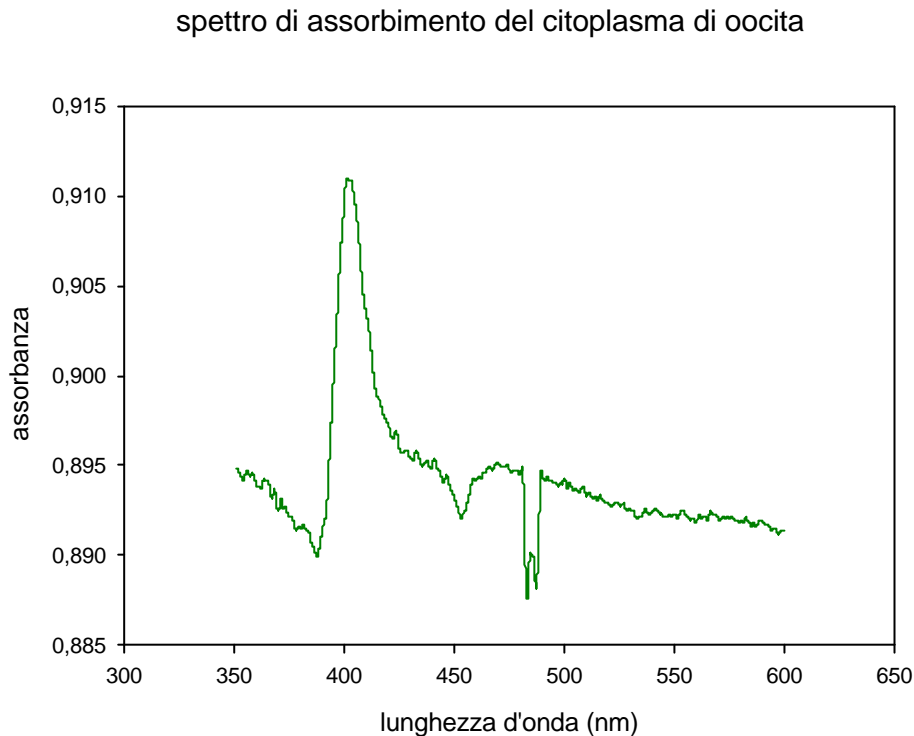


Il fit, condotto su una funzione della forma  $y = e^{-ax}$ , presenta un coefficiente di smorzamento **a** molto elevato, il cui valore risulta di gran lunga superiore a quelli trovati in precedenza per le PSF acquisite in altri mezzi.

Risulterebbe pertanto difficile ascrivere un tale comportamento alla ‘semplice’ presenza di mismatch tra indici di rifrazione in un mezzo stratificato e torna, per questo, utile fare riferimento allo smorzamento di tipo esponenziale che si riscontra a seguito di fenomeni di scattering.

E’ stata, a questo punto, condotta un’ulteriore analisi sperimentale per mettere in evidenza eventuali fenomeni di assorbimento del citoplasma (di cui non tiene formalmente conto la precedente teoria) in corrispondenza del range di lunghezze d’onda di eccitazione e di emissione.

Lo spettro ottenuto allo spettrofotometro, è riportato in figura 5.6c.



**Fig. 5.6c**

Da esso risulta la tendenza del mezzo ad assorbire le radiazioni che lo attraversano, a differenza di quanto si era precedentemente trovato per glicerolo ed olio Nikon, che risultavano, invece, fondamentalmente inattivi sotto questo aspetto.

E’ possibile allora concludere come, l’effetto combinato di scattering ed assorbimento, risulti in una sostanziale opacità del mezzo, che limita fortemente la capacità dello strumento di focalizzare oggetti fluorescenti al di là di una certa profondità.

Esperienze analoghe, documentate in letteratura e relative allo studio delle prestazioni di sistemi confocali nell’ambito dell’imaging di preparati biologici *in vivo*, confermano come, in molte circostanze d’interesse pratico, il decadimento esponenziale dell’intensità rilevata si riveli efficace a rendere conto del progressivo impoverimento delle prestazioni, legato al rapporto tra segnale di fondo e segnale effettivamente proveniente dal campione.

Uno dei possibili rimedi alla cosa riguarda la scelta delle dimensioni del pinhole.

E’ infatti possibile mostrare [C.L. Smithpeter et al., 1998] come condizioni di confocalità troppo spinte diventino, di fatto, fattori limitanti, specie in presenza di non trascurabili fenomeni di scattering ed assorbimento.

Diviene allora preferibile giocare (ove sia possibile) sull’apertura confocale in modo da raggiungere un assetto di ragionevole compromesso, che renda comunque possibile l’estrazione delle caratteristiche d’interesse del campione dal segnale di background.



## Conclusioni

Come è stato illustrato attraverso i continui rimandi a lavori già presenti in letteratura, le problematiche affrontate nell'ambito di questa tesi, legate principalmente agli effetti del mismatch tra gli indici di rifrazione su procedimenti di imaging attraverso un'architettura confocale, risultano di stretta attualità sia per la difficoltà di approntare un modello teorico di sicura efficacia e di pratica applicabilità, sia per la loro risonanza nel campo della microscopia ottica a fluorescenza ad *uno o più fotoni*.

Attraverso le diverse sessioni di misura condotte è stato possibile giungere ad un quadro organico dei diversi risvolti che la presenza di mismatch ha sulle prestazioni del sistema, sia descrivendone il progressivo deteriorarsi in termini di risposta all'impulso (PSF), sia attraverso l'indagine morfometrica di oggetti di forma e dimensioni note.

Ciò permette, da un lato di giungere ad una stima del potere risolutivo dello strumento nelle effettive condizioni sperimentali, dall'altro di disporre, eventualmente, dell'andamento sperimentale della PSF, utile per un più approfondito confronto tra la situazione reale ed i modelli teorici via via considerati o per l'implementazione di opportuni algoritmi di deconvoluzione.

Un'attenta analisi dei dati raccolti ha altresì permesso di suggerire alcuni pratici accorgimenti attraverso i quali minimizzare gli effetti del mismatch o, dove ciò non sia possibile per la particolare natura del campione, attraverso i quali tenere conto dei necessari fattori correttivi per un'accurata analisi quantitativa di distanze, superfici, volumi. L'efficacia di tali procedimenti è stata direttamente testata nel caso di un preparato biologico molto particolare (oocita di *Xenopus laevis*), giungendo a risultati in linea con la letteratura citata.

A margine di queste problematiche, legate al recupero di informazioni morfometriche al variare dell'indice di rifrazione del mezzo di immersione dell'oggetto osservato, si è tentato anche un approccio sperimentale al problema inverso, consistente nella stima dell'indice di rifrazione di un mezzo sconosciuto a partire dalla misura dell'estensione assiale di oggetti noti.

La procedura seguita ha fornito risultati soddisfacenti e mostra un legame piuttosto diretto con la teoria sviluppata in passato, basata essenzialmente su elementi di ottica geometrica.

Per quello che riguarda, viceversa, l'analisi della risposta del sistema nelle diverse condizioni sperimentali di impiego, la teoria di riferimento ha evidenziato come il problema dello sviluppo di modelli in grado di fornire ragionevoli previsioni sul comportamento di un sistema reale si presenti ancora, almeno da un punto di vista strettamente quantitativo, di difficile risoluzione.

Il confronto tra le evidenze raccolte e le simulazioni recuperate in letteratura, riguardanti lo sviluppo al calcolatore di modelli teorici più o meno semplificati, si è rivelato, come già documentato in altri articoli di rivista, qualitativamente buono, ma non abbastanza da suggerire l'impiego di tali modelli 'in sostituzione' della pratica sperimentale, visto anche l'estremo peso computazionale che li caratterizza.

In tal senso, una delle linee di sviluppo più fertili in prospettiva futura, sarà, nell'ambito della microscopia a fluorescenza, proprio quella più direttamente legata alla ricerca ed allo sviluppo di sistemi in grado di operare, via software ad esempio, opportune correzioni in base ai parametri impostati dall'operatore, per tenere conto delle diverse condizioni di utilizzo che, come ampiamente documentato nel corso di questo lavoro di tesi, possono falsare pesantemente i risultati di qualsiasi acquisizione.

Il crescente interesse poi che, in ambito biofisico e biomedico, si sta mostrando verso questo tipo di architetture, richiederà, al contempo, la progettazione di apparecchiature sempre più flessibili, adattabili alle peculiarità del campione e la realizzazione di pacchetti software di

simulazione sempre più completi in grado di offrire la possibilità, a partire dalle informazioni raccolte attraverso ripetuti procedimenti di *imaging*, di realizzare al calcolatore esperimenti attendibili e verosimili, permettendo, così, un risparmio in termini economici e di tempo. Come ultimo aspetto, si è indagata la capacità del sistema di focalizzare oggetti immersi in profondità all'interno di *mezzi torbidi*, fortemente diffondenti ed in presenza di mismatch attraverso la misura della risposta all'impulso.

L'importanza di tale studio risiede, principalmente, nei risvolti biomedici che può avere la conoscenza del comportamento di un raggio laser fortemente localizzato nella sua propagazione attraverso un siffatto mezzo, difficilmente riconducibile ad un modello teorico. Questo permette, ad esempio, di far uso di proprietà ottiche quali indice di rifrazione, coefficiente di assorbimento o di scattering per la diagnosi non invasiva di malattie o per la cura di particolari tipi di lesioni interne.

Nel nostro caso si è impiegato come mezzo torbido il contenuto citoplasmatico di un oocita di *Xenopus laevis*, per ragioni di praticità e di coerenza con il restante corpo della tesi.

I risultati documentano un forte decadimento delle prestazioni del sistema (sparpagliamento della PSF), accompagnato dalla contemporanea diminuzione dell'intensità del segnale (diminuzione del valore di picco medio della PSF), già in parte osservata nel corso dell'indagine morfometrica precedentemente condotta sullo stesso campione.

Concludendo, risulta che l'impoverimento della qualità delle immagini che tipicamente accompagna i procedimenti di imaging in presenza di mismatch, può difficilmente essere corretto in fase di rielaborazione delle acquisizioni attraverso gli usuali algoritmi di deconvoluzione (come documentato in letteratura), specialmente quando si cerchino di focalizzare oggetti situati in profondità nel mezzo di immersione.

Tale comportamento risulta ancora più evidente in presenza di un mezzo torbido, per il quale non sono più trascurabili fenomeni di scattering ed assorbimento.

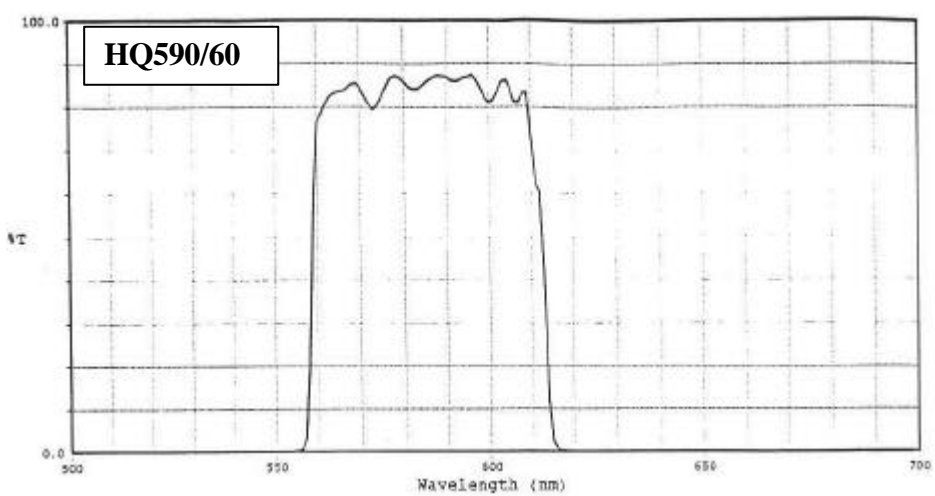
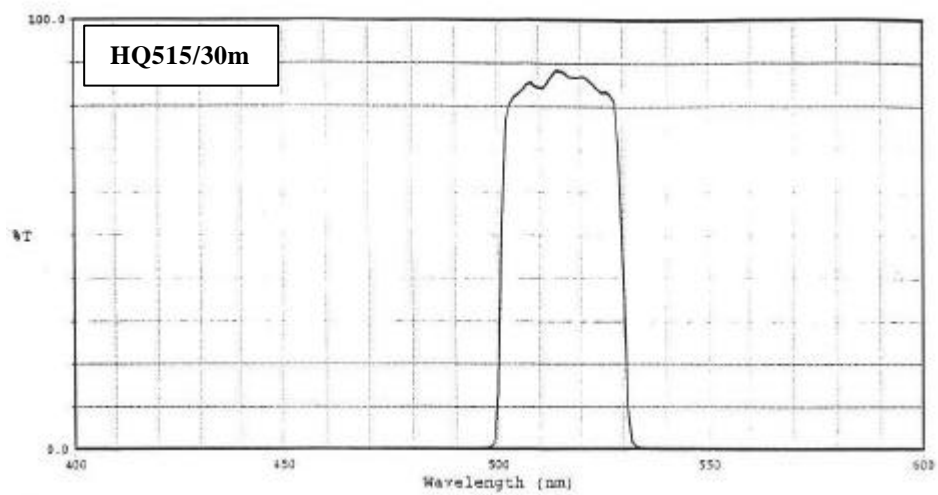
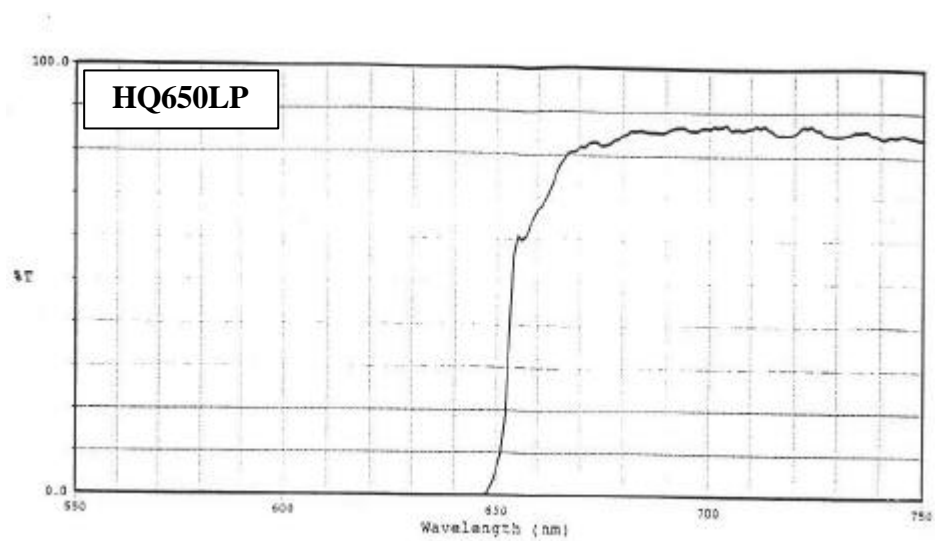
Se, da un lato, questa non uniformità di comportamento può portare al recupero di importanti informazioni sulla natura del mezzo (quali la stima dell'indice di rifrazione attraverso la valutazione della distorsione assiale di oggetti di forma e dimensioni note), dall'altro risulta in un pesante fattore limitante per tutti quei procedimenti di formazione di immagini che mirino allo studio della struttura tridimensionale di preparati biologici onde metterne in risalto la funzionalità specifica.

In tal senso, specie nelle condizioni critiche sopra citate, legate prevalentemente alla presenza di mismatch tra indici di rifrazione, risulta opportuna una preventiva correzione di tale disomogeneità (attraverso l'impiego di *appositi obbiettivi in acqua*) onde limitare, già a livello strettamente sperimentale, una componente di disturbo di cui può essere difficile tenere conto esclusivamente  
via  
software.

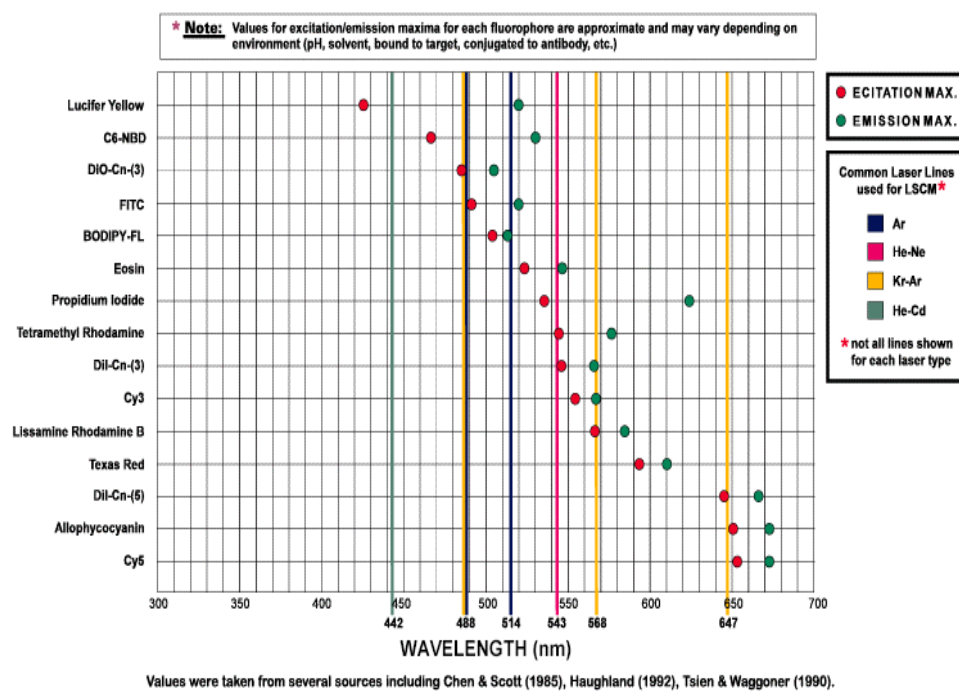


## **Appendici**

### Specifiche dei filtri barriera utilizzati

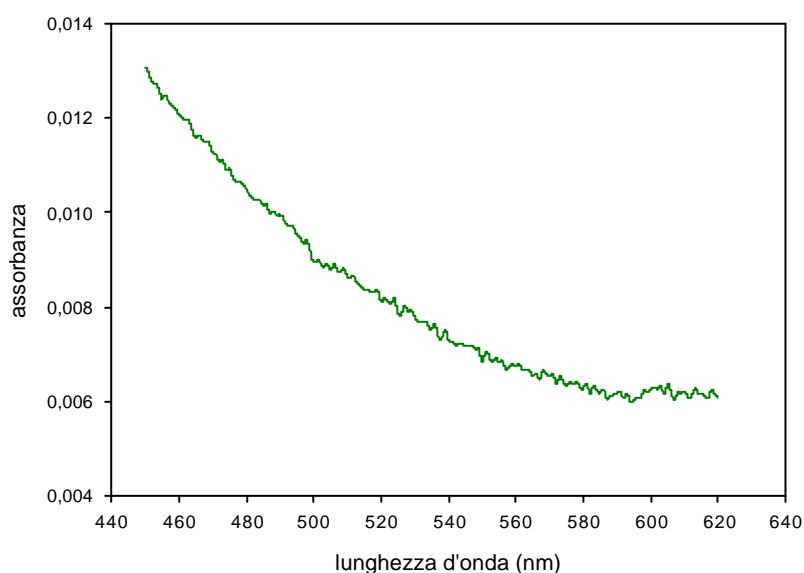


## Valori dei picchi di emissione (eccitazione) per i più comuni fluorocromi



## Spettro di assorbimento dell'olio NIKON

spettro di assorbimento dell'olio Nikon ( $n=1.518$ )



Spettro di assorbimento dell'olio Nikon da immersione, utilizzato per studiare la situazione di minimo mismatch tra indici di rifrazione. Andamenti analoghi (non riportati per brevità) si sono riscontrati, salvo diverso avviso, per gli altri mezzi utilizzati durante le acquisizioni.

## **Abbreviazioni**

**CLSM** : *Confocal Laser Scanning Microscope*

**EPSP** : *Effective Point Spread Function*

**FWHM** : *Full Width at Half Maximum*

**Mismatch** : utilizzato spesso nel corso di questo lavoro di tesi col significato di ‘*variazione tra l’indice di rifrazione del mezzo d’immersione del campione e quello d’immersione dell’obbiettivo*’

**NA** : *Numerical Aperture*

**NOA** : *Norland Optical Adhesive*

**OTF** : *Optical Transfer Function*

**PMT** : *PhotoMultiplier Tube*

**PSF** : *Point Spread Function*

**TRITC** : *tetramethylrhodamine-5-isothiocyanate*

**WD** : Working Distance

**WGA** : *wheat germ agglutinin*



## Bibliografia

### *Risorse online*

J.A.Conchello, J.G. McNally, C. Preza, J. Markham and F.U. Rosenberger, “*Tutorial: Image Restoration for 3-D microscopy*”, [www.ibt.wustl.edu/BCR/COSM-TUT/tut-viewgraphs.html](http://www.ibt.wustl.edu/BCR/COSM-TUT/tut-viewgraphs.html)

Ian T. Young, “*Quantitative microscopy*”, [www.ph.tn.tudelft.nl](http://www.ph.tn.tudelft.nl)

### *Testi e manuali*

M. Bertero, P. Boccacci , “*Introduction to inverse problems in imaging*”, IOP Publishing Ltd, UK

M. Born and E. Wolf “*Principles of optics*”, Oxford, Pergamon Press (1999).

J. W. Goodman, “*Introduction to Fourier optics*”, second edition San Francisco, McGraw-Hill Book Company (1968).

*Handbook of Biological Confocal Microscopy*, edited by J.B. Pawley. Plenum Press, New York,(1995):

S. Inoué, “*Foundations of confocal scanned imaging in light microscopy*” (1-18);

J.Pawley, “*Fundamental limits in confocal microscopy*” (19-38);

D.R. Sandison et al. “*Quantitative fluorescence confocal laser scanning microscopy*” (39-54);

T. Wilson, “*The role of the pinhole in confocal imaging system*” (167-182);

S.W. Hell and E.H.K. Stelzer, “*Lens aberrations in confocal fluorescence microscopy*” (347-353).

T. Wilson, “*Confocal Microscopy*” London, Academic Press (1990).

T. Wilson and C.J.R. Sheppard “*Theory and practice of scanning optical microscopy*”, London, Academic Press (1984).

I. T. Young, “*Image fidelity: Characterizing the imaging transfer function. Methods in Cell Biology*” (edited by D. L. Taylor), 1-45. Academic Press, San Diego, CA (1989).

*Lavori di tesi*

Peter J. Verveer, “*Computational and Optical Methods for Improving Resolution and Signal Quality in Fluorescence Microscopy*”, Delft University (1998).

J.M.Vroom, “*Two-photon excitation fluorescence lifetime imaging: development and biological applications*”, Utrecht University (1996)

G.M.P. van Kempen, “*Image restoration in fluorescence microscopy*”, Delft University Press (1999).

*Articoli di rivista*

C.M. Blanca and C. Saloma, “*Monte Carlo analysis of two photon fluorescence imaging through a scattering medium*”, Applied Optics **vol. 37, no. 34**, 8092-8102 (1998).

R. Delorme et al., “*Measurement accuracy in confocal microscopy*”, Journal of Microscopy, **vol. 192**, 139-150 (1998).

A.Diaspro, S. Annunziata, M. Raimondo and M. Robello, “*Three-dimensional optical behaviour of a confocal microscope with single illumination and detection pinhole through imaging of subresolution beads*”, Microscopy Research and technique 45: 130-131 (1999).

B. R. Frieden, (1967) *Optical Transfer of the Three Dimensional Object*. Journal of the Optical Society of America **57**, 56-67.

X. Gan and M. Gu, “*Effective point-spread function for fast image modeling and processing in microscopic imaging through turbid media*”, Optics Letters **vol. 24, no. 11**, 741-743 (1999).

S.F.Gibson and F. Lanni, “*Experimental test of an analytical model of aberration in an oil immersion objective lens used in three-dimensional light microscopy*”, Optcal Society of America A, **vol.8 no. 10**, 1601-1613 (1991).

C.J. de Grauw et al., “*Imaging properties in two-photon excitation microscopy and effects of refractive-index mismatch in thick specimens*”, Applied Optics, **vol. 38 no. 28**, 5995-6003 (1999).

S. Hell , G. Reiner , C. Cremer & E. H. K. Stelzer, “*Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index*”, Journal of Microscopy **vol. 16 no. 9**, 391-405 (1993)

- Y. Hiraoka et al., "*Determination of three dimensional imaging properties of a light microscope system*", Biophysical Journal, **vol. 57**, 325-333 (1990).
- H. H. Hopkins, "*The frequency response of a defocused optical system*", Proceedings of the Physical Society A **vol. 23 no. 1**, 91-103 (1955).
- L. Kubinova et al., "*Comparison of several digital and stereological methods for estimating surface area and volume of cells studied by confocal microscopy*", Cytometry **36**, 85-95 (1999).
- L. Kubinova, "*Advantages of stereological methods in biomedicine*", IEEE Engineering in Medicine and Biology, (1998).
- I. Krekule et al., "*Evaluation of geometry of three-dimensional objects rendered from serial sections and IBM PC implementation of appropriate stereological methods*", Acta Vet. Brno, **65**, 247-252 (1996).
- J.G. McNally et al., "*Artifacts in computational optical sectioning microscopy*", Journal of Optical Society of America A, **vol. 11 no. 3**, 1056-1067 (1994).
- M. Muller and G.J. Brakenhoff, "*Apodization and the point-spread autocorrelation function*", Applied Optics, **vol.36 no.13**, 2755-2762 (1997).
- C.J.R. Sheppard "*Imaging in optical systems of finite Fresnel Number*", Journal of the Optical Society of America **vol. 3**, 1428-1432 (1986).
- C.J.R. Sheppard, "*Aberrations in high aperture optical systems*", Optik **vol. 10 no. 5**, 29-33 (1997).
- C.J.R. Sheppard and P.Torok,"*Effects of specimen refractive index on confocal imaging*", Journal of Microscopy **vol. 18 no. 5**, 366-374 (1997).
- C.L. Smithpeter et al. "*Penetration depth limits of in vivo confocal reflectance imaging*", Applied Optics **vol. 37, no. 13**, 2749-2754 (1998).
- L. Tao and C. Nicholson,"*The 3-D point spread functions of a microscope objective in image and object space*", Journal of Microscopy **vol. 17 no. 8**, 267-271 (1995).
- P. Torok and P. Varga, "*Electromagnetic diffraction of light through a stratified medium*", Applied Optics, **vol. 36 no. 11**, 2305-2312 (1997).
- P. Torok, P. Varga and G. R. Booker,"*Electromagnetic diffraction of light focused through a planar interface between materials of mismatched refractive indices: structure of the electromagnetic field*", Journal of Optical Society of America A, **vol. 12**, 2136–2144 (1995a).
- P. Torok, P. Varga, Z. Laczik and G. R. Booker, "*Electromagnetic diffraction of light focused through a planar interface between materials of mismatched refractive indices: an integral representation*", Journal of Optical Society of America A, **vol. 12**, 325–332 (1995b).
- P. Torok, P. Varga, and G. Nemeth, "*Analytical solution of the diffraction integrals and interpretation of wave-front distortion when light is focused through a planar interface between materials of mismatched refractive indices*" Journal of Optical Society of America A, **vol. 12**, 2660–2671 (1995c).

- H. T. M. van der Voort and G. J. Brakenhoff, “3-D image formation in high-aperture fluorescence confocal microscopy: a numerical analysis”, *Journal of Microscopy*, **vol. 15 no. 8**, 43-54 (1990).
- H. T. M. van der Voort, and K. C. Strasters, “Restoration of confocal images for quantitative image analysis” *Journal of Microscopy*, **vol. 17 no. 8**, 165-181 (1995).
- H.T. M. van der Voort and G.J. Brakenhoff, “Determination of the 3-dimensional optical properties of a confocal scanning laser microscope”, *Optik*, **vol.78 no.2**, 48-53 (1988).
- T.D. Visser et al., “Refractive index and axial distance measurements in 3-D microscopy”, *Optik*, **vol. 90** (1), 17-19 (1992).
- T.D. Visser and J.L. Oud, “Volume measurements in three dimensional microscopy”, *Scanning*, **vol. 16**, 198-200 (1994).
- T. D. Visser and G. J. Brakenhoff, “The one-point fluorescence response in confocal Microscopy,” *Optik*, **vol. 87**, 39–40 (1991).
- T. D. Visser and S. H. Wiersma, “Electromagnetic description of image formation in confocal fluorescence microscopy”, *Journal of Optical Society of America A*, vol. 11, 599–608 (1994).**
- L.V. Wang and G. Liang, “Absorption distribution of an optical beam focused into a turbid medium”, *Applied Optics* **vol. 38, no. 22**, 4951-4957 (1999).
- T. Wilson and J. B. Tan, “Three dimensional image reconstruction in conventional and confocal microscopy” *BioImaging*, **vol.1**, 176-184 (1993).
- T. Wilson, “Optical sectioning in confocal fluorescent microscopes”, *Journal of Microscopy*, **vol. 15 no. 4**, 143–156 (1989).
- T. Wilson and S. J. Hewlett, “Optical sectioning strength of the direct-view microscope employing finite-sized pin-hole arrays”, *Journal Microscopy*, vol. 16 no. 3, 131–150 (1991).
- T. Wilson, R. Juskaitis, M. A. A. Neil and M. Kozubek, “Confocal microscopy by aperture correlation”, *Optics Letters*, **vol. 21**, 1879–1881 (1996).
- T. Wilson and J. B. Tan “Three dimensional image reconstruction in conventional and confocal microscopy”, *Bioimaging*, **vol. 1**, 176–184 (1993).



## SOMMARIO

### A

Abbreviazioni	132
Aberrazione ottica in presenza di mismatch degli indici di rifrazione	54
Analisi di un preparato biologico	69
Analisi sperimentale	60
Analisi teorica del procedimento di formazione delle immagini	24
Appendici	129
Aspetti conclusivi	43
Assetto operativo	46

### B

Bibliografia	134
--------------	-----

### C

Calcolo formale della PSF	27
Campionamento di un'immagine	38
Cenni storici e problematiche della microscopia confocale e convenzionale	6
Conclusioni	126

### D

Descrizione dell'apparato sperimentale	45
Descrizione della testa confocale	48
Descrizione teorica	55
Diffrazione di una perturbazione elettromagnetica in un mezzo stratificato	98
Dinamica dell'eccitazione fluorescente e fotodecadimento	15
Discussione dei risultati sperimentali	120

### E

Effetti del mismatch di indici di rifrazione sulla risposta di un sistema confocale	85
Effetti del mismatch tra indici di rifrazione nella focalizzazione di campioni a profondità diverse.	104
Effetti dovuti alla natura quantistica della luce	19
Elementi di stereologia	74

### G

Generalizzazione al caso tridimensionale	37
--	----

### I

Importanza dell'uso del laser in microscopia confocale	15
Introduzione	2
Introduzione alla microscopia confocale	5

### L

Larghezza di banda di un microscopio a fluorescenza	41
Larghezza di banda di un sistema lineare	39
Larghezza di banda di una PSF nel caso di sola diffrazione	38

**M**

Magnificazione	26
Microscopia a fluorescenza	9
Microscopia confocale a fluorescenza	12
Misura sperimentale della PSF in condizioni di diverso mismatch	88

**P**

Potere risolutivo di un microscopio confocale	21
---	----

**R**

Risultati sperimentali	79
------------------------	----

**S**

Sistema ottico e sistemi LSI	25
Software e modalità di acquisizione	51
Stima dell'indice di rifrazione di una sostanza ignota	81
Studio delle prestazioni di un sistema confocale in presenza di mezzi torbidi	116