

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI BARI ALDO MORO**

DIPARTIMENTO INTERATENEO DI FISICA

CORSO DI LAUREA DI I LIVELLO IN FISICA

---

TESI DI LAUREA IN FISICA

***Principi Fisici  
di Microscopia Confocale e  
Applicazioni in Ambito Biologico***

**Relatore:**

Chiar.mo Prof. Maurizio DABBICCO

**Laureanda:**

Isabella DE BELLIS

---

ANNO ACCADEMICO 2012-2013

*A mio nonno Pasquale*

# ***Indice***

Indice i

Introduzione 1

- 1 Elementi di teoria della diffrazione 3
  - 1.1 Microscopio semplice 3
  - 1.2 Microscopio composto 4
  - 1.3 Diffrazione da apertura di forma generica 6
  - 1.4 Diffrazione da apertura di forma circolare 10
  - 1.5 Potere risolutivo di una apertura circolare e criterio di Rayleigh 12
  
- 2 Introduzione ai principi fisici di microscopia confocale 14
  - 2.1 Distribuzione tridimensionale di intensità in prossimità del fuoco 15
  - 2.2 Distribuzione tridimensionale di intensità nel piano focale e lungo l'asse ottico 20
  - 2.3 Profondità di campo 21
  - 2.4 Point Spread Function (PSF) 22
  - 2.5 Risoluzione laterale e assiale 25
  - 2.6 Contrasto 27
  - 2.7 Dimensioni del diaframma 28
  
- 3 Applicazioni in fluorescenza 32
  - 3.1 Microscopio confocale ad epi-illuminazione in fluorescenza 33
  - 3.2 Il diagramma di Jablonski 35
  - 3.3 Tempo di vita di fluorescenza e Resa Quantica 37
  - 3.4 Applicazioni in fluorescenza 38
    - 3.4.1 Trasferimento di energia per risonanza (FRET) 38
    - 3.4.2 Misura del tempo di vita medio di fluorescenza (FLIM) 41

Conclusioni 44

Bibliografia

# ***Introduzione***

La microscopia ottica, nelle sue diverse tipologie (campo scuro, contrasto di fase, contrasto interferenziale, a luce polarizzata, a fluorescenza), è una tecnica di osservazione che permette di ottenere immagini ingrandite di oggetti o di particolari di essi, troppo piccoli per essere osservati a occhio nudo. Gli strumenti utilizzati sono i microscopi ottici, caratterizzati da due fattori: ingrandimento e risoluzione. Quest'ultima comunemente intesa come la minima distanza di separazione tra due punti dell'oggetto per la quale essi risultano distinguibili.

In questo lavoro di tesi sono illustrati i principi di funzionamento dei microscopi ottici e i limiti fisici del loro potere risolutivo. Viene anche brevemente discusso il criterio di Rayleigh, comunemente utilizzato per quantificare il potere risolutivo, alla luce del fattore di contrasto tra i punti da risolvere. In particolare verrà esaminato il microscopio confocale, che consente di ottenere un notevole aumento del contrasto e della risoluzione rispetto ad un microscopio ottico tradizionale, eliminando semplicemente il contributo della luce diffusa proveniente dai piani "fuori fuoco".

Il primo microscopio confocale è stato realizzato da Marvin Minsky, il "padre" dell'intelligenza artificiale, che ha dato con questa invenzione un notevole contributo alla microscopia ottica tradizionale. Negli anni cinquanta, mentre lavorava come ricercatore ad Harvard, stava cercando di capire il funzionamento del cervello umano; era convinto che se fosse riuscito a tracciare una mappa delle diverse connessioni dei neuroni avrebbe potuto individuare i meccanismi che regolano l'attività celebrale, tuttavia, i microscopi ottici tradizionali presentavano un notevole problema tecnico: una grande regione del campione veniva illuminata e i contributi relativi alla radiazione diffusa, provenienti dai piani "fuori fuoco", andavano a sovrapporsi alla luce proveniente dalla sezione completamente "a fuoco" e che si voleva osservare, rendendo, quindi, l'immagine finale poco nitida e distinta.

Minsky risolse il problema facendo passare la luce che illuminava il campione attraverso una lente obiettivo, che la focalizzava su un unico punto del campione posizionato alla distanza desiderata.

La strategia di focalizzare la luce su un'area ristretta limitava la quantità totale di luce diffusa, ma non impediva del tutto che questa venisse riflessa e diffusa dagli strati del campione posti rispettivamente al di sopra e al di sotto di quello desiderato, pertanto pensò di inserire davanti al rivelatore un diaframma, che consentiva solo ai raggi luminosi provenienti dal

fuoco geometrico di raggiungere il rivelatore, creando in questa maniera immagini con un contrasto maggiore rispetto a quelle ottenute con un microscopio tradizionale.

L'acquisizione dell'immagine con questo metodo diventa di tipo puntuale, per questa ragione è necessario eseguire una scansione, ovvero muovere il campione o il fascio di luce in modo tale che tutti i punti posizionati alla profondità voluta possano essere illuminati secondo una precisa sequenza e, quindi, la luce da essi proveniente rilevata dal rivelatore.

Il microscopio confocale si è affermato negli ultimi anni come una potente tecnologia in grado di migliorare la tradizionale microscopia ottica, permettendo nuove indagini in differenti ambiti scientifici che spaziano dalla biologia cellulare alla fisica dei materiali.

L'interesse per questo strumento deriva dal fatto che nonostante le numerose analogie con un microscopio ottico tradizionale, può diventare un microscopio ottico ad alta risoluzione (in trasmissione, in riflessione o in fluorescenza), infatti, permette di migliorare il potere risolutivo tipico di un microscopio ottico tradizionale, di ottenere un notevole aumento della profondità di campo e di realizzare, mediante l'utilizzo di opportuni programmi per l'elaborazione dell'immagine, ricostruzioni tridimensionali del campione.

Con l'introduzione di sorgenti laser, che permettono di migliorare la qualità delle immagini grazie all'intensità e alla coerenza della luce emessa, la microscopia confocale è diventata una tecnica molto sofisticata, che combina laser, dispositivi ottici, scansione elettromeccanica ed elaborazione computerizzata delle immagini consentendo di ottenere risultati sorprendenti.

Nel presente lavoro di tesi verranno discussi i principi fisici di microscopia confocale e descritte alcune applicazioni in ambito biologico che si basano sulla fluorescenza come tecnica di contrasto; in particolare, nel primo capitolo verrà sottolineato come il massimo ingrandimento di un microscopio ottico venga limitato dal fenomeno della diffrazione, infatti, ciò che si oppone ad ingrandimenti maggiori è il potere di risoluzione dello strumento. Nel secondo capitolo verrà analizzata la distribuzione di intensità nel piano focale e lungo l'asse ottico e confrontata la distribuzione tridimensionale di intensità o *Point Spread Function* (PSF) nel caso di un microscopio ottico tradizionale e confocale, evidenziando come la risoluzione di un microscopio confocale risulti migliore rispetto a quella di uno tradizionale.

Il terzo capitolo è dedicato alla microscopia confocale in fluorescenza, ampiamente utilizzata soprattutto in ambito biologico e biomedico; in particolare, verranno approfondite due tra le tecniche più utilizzate in ambito biofisico: il trasferimento di energia per risonanza (FRET) e la misura del tempo di vita medio di fluorescenza (FLIM).

## ***Capitolo 1***

### **Elementi di teoria della diffrazione**

Al giorno d'oggi il microscopio confocale è un sistema ottico sofisticato e potente, ampiamente utilizzato in ambito biomedico per l'analisi di campioni biologici in vivo o in scienze dei materiali, ad esempio per individuare micro-difetti sulle superfici di semiconduttori, in quanto, rispetto ad un convenzionale microscopio a trasmissione o a riflessione, offre la possibilità di effettuare una ricostruzione tridimensionale del campione, di eliminare il *background* proveniente dai piani fuori fuoco e di controllare la profondità di campo.

Questi aspetti assieme all'aumento di risoluzione e contrasto tipici dello strumento verranno esaminati nel secondo capitolo.

In questo capitolo invece si focalizzerà l'attenzione sui principi fisici di un sistema ottico, in particolare verrà prima descritto un convenzionale microscopio composto per mezzo di concetti propri dell'ottica geometrica; il massimo ingrandimento è tuttavia limitato dalle leggi della diffrazione, che saranno oggetto dell'analisi successiva.

#### **1.1 Microscopio semplice**

Il microscopio semplice nella sua configurazione essenziale è costituito da un'unica lente sottile, biconvessa e convergente, avente solitamente una distanza focale piccola, tipicamente dell'ordine di qualche centimetro, quindi minore della distanza del punto prossimo o punto di visione distinta  $d_0$ , che rappresenta la minima distanza alla quale l'occhio umano è in grado di mettere perfettamente a fuoco un'immagine e che risulta pari a 250 mm.

In figura 1.1 l'oggetto è posto in prossimità del secondo fuoco del sistema ottico, mentre l'occhio si trova in una posizione intermedia tra il primo piano focale e la lente. In questa condizione la lente fornisce una immagine virtuale, dritta e ingrandita dell'oggetto, nonostante esso si trovi ad una distanza inferiore a quella di visione distinta.

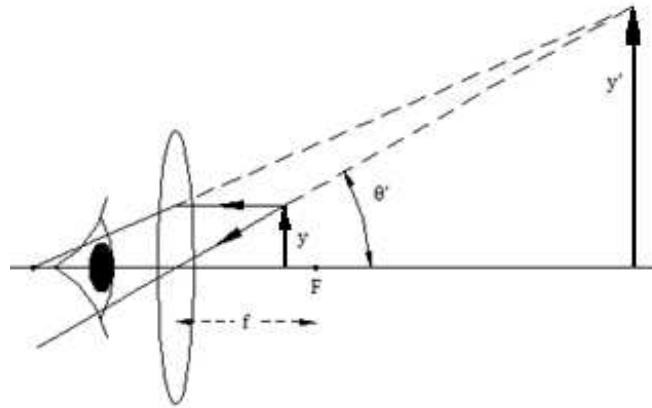


Figura 1.1: Microscopio semplice o lente d'ingrandimento.

Si definisce ingrandimento angolare  $M$  <sup>[1]</sup> di una lente convergente, il rapporto tra la tangente dell'angolo  $\theta'$  sotto cui viene vista dall'occhio rilassato l'immagine dell'oggetto formata dalla lente e la tangente dell'angolo  $\theta$  sotto cui l'occhio vedrebbe lo stesso oggetto, qualora non si facesse uso della lente ed esso fosse disposto ad una distanza pari a quella del punto prossimo. L'ingrandimento quindi risulta uguale a:

$$M = \frac{\text{tg}\theta'}{\text{tg}\theta} = \frac{y}{f} \frac{d_0}{y} = \frac{d_0}{f} = \frac{25 \text{ cm}}{f} . \quad (1.1)$$

È possibile aumentare l'ingrandimento angolare utilizzando lenti con distanza focale molto piccola, ma in tal caso intervengono fenomeni di aberrazione (coma, astigmatismo, curvatura di campo), pertanto, non si possono utilizzare lenti con distanza focale inferiore a 20-30mm. Il massimo ingrandimento risulta in tali condizioni di 8-10×.

Sostituendo la singola lente con un gruppo di lenti corretto al fine di limitare al massimo l'effetto delle aberrazioni, si possono raggiungere ingrandimenti che arrivano anche a 40×. Se si vuole un ingrandimento maggiore è necessario far ricorso a strumenti più sofisticati e complessi come il microscopio composto.

## 1.2 Microscopio composto

Il microscopio composto è un sistema ottico costituito da due lenti convergenti, dette rispettivamente obiettivo ed oculare. In figura 1.2 a) è schematizzato un microscopio composto a coniugata finita: l'oggetto da osservare è posto in prossimità del fuoco  $F_1$  della

lente obiettivo ad una distanza da questo maggiore della distanza focale, che è solitamente piccola (dell'ordine di qualche millimetro), in quanto per la (1.1) minore è  $f$  maggiore sarà l'ingrandimento. L'obiettivo fornisce una immagine intermedia reale, capovolta e ingrandita, in prossimità del fuoco della seconda lente e che risulta ingrandita di un fattore compreso tra  $4\times$  e  $100\times$ , ingrandimenti maggiori non sono possibili se si vogliono evitare i fenomeni di aberrazione; l'immagine intermedia viene poi vista dall'osservatore mediante l'oculare, che solitamente genera un ulteriore ingrandimento dell'ordine di  $8\times$ - $12\times$ , si cerca in ogni caso di fare in modo che l'osservatore veda l'immagine sotto un angolo  $\theta$  il più grande possibile, pertanto  $O''$  deve essere virtuale e notevolmente ingrandita rispetto a  $O'$ , requisito che viene realizzato se  $O'$  si trova tra l'oculare e il suo primo fuoco, il più vicino possibile a  $F'_1$ .

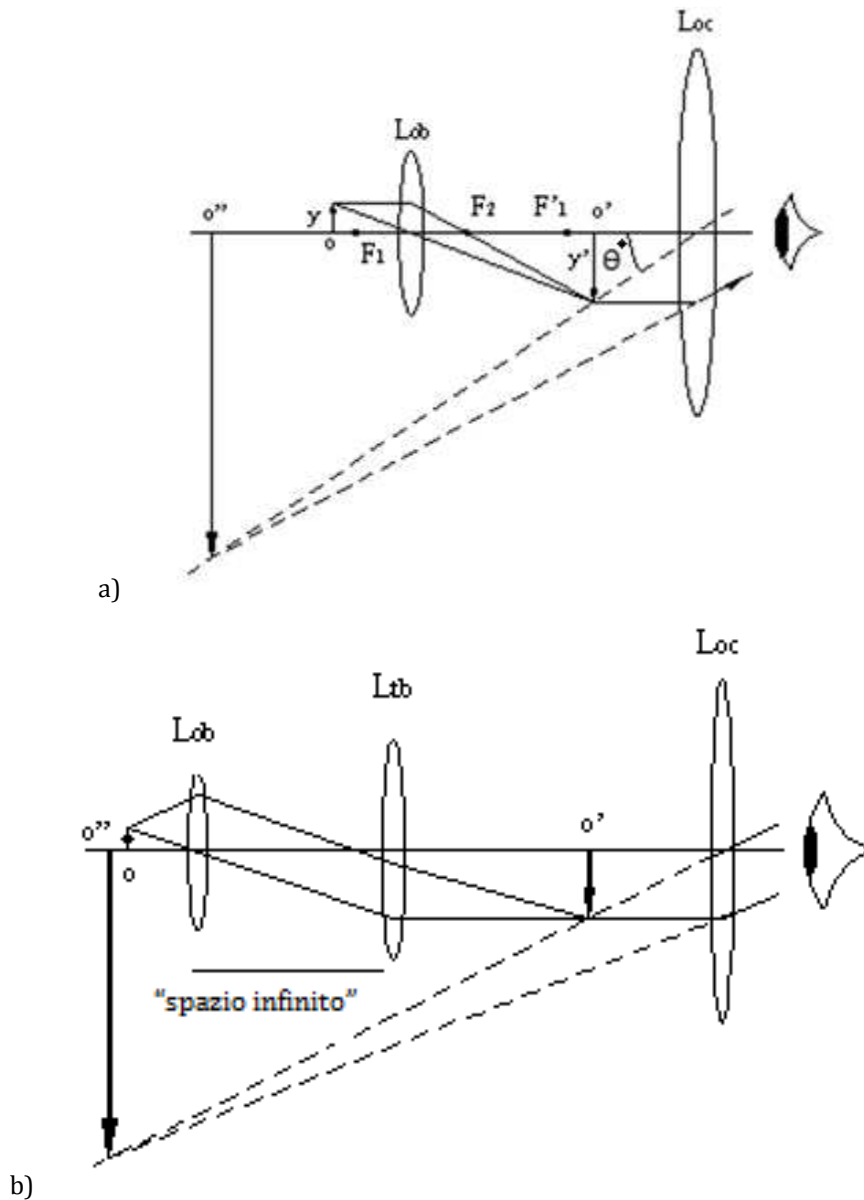


Figura 1.2: a) Percorso dei raggi ottici in un microscopio a coniugata finita.  
 b) Percorso dei raggi ottici in un microscopio corretto all'infinito.



Questo tipo di microscopio composto ha una lunghezza in genere compresa tra 160 mm e 210 mm, tuttavia verso la fine degli anni '80 è stata introdotta una nuova tipologia rappresentata in figura 1.2 b): si tratta del microscopio corretto all'infinito in cui l'oggetto viene posto esattamente nel fuoco dell'obiettivo, di conseguenza i raggi vengono rifratti dalla prima lente tutti paralleli: diventa possibile variare la lunghezza di quello che è definito come "spazio infinito", vantaggio che permette di inserire ulteriori oggetti, in particolare polarizzatori, senza modificare il processo di formazione dell'immagine. A qualche centimetro di distanza dall'obiettivo si pone, poi, un'ulteriore lente detta "lente di tubo" ( $L_{tb}$ ), con focale variabile fra 150 e 250 mm che rende convergente nel suo fuoco il fascio di raggi paralleli proveniente dall'obiettivo. Il sistema è completato dall'inserimento della lente oculare, che genera l'ulteriore ingrandimento finale.

L'ingrandimento angolare <sup>[1]</sup> del sistema composto, nel primo caso è definito come il prodotto dell'ingrandimento trasversale dell'obiettivo  $m_{ob}$  per l'ingrandimento angolare dell'oculare  $m_{oc}$ :

$$M = \frac{\text{tg}\theta'}{\text{tg}\theta} = \frac{y'}{f_{oc}} \frac{d_0}{y} = \frac{y'}{y} \frac{d_0}{f_{oc}} = m_{ob} m_{oc} \quad (1.2)$$

Dove  $y$  e  $y'$  nella (1.2) rappresentano rispettivamente le dimensioni dell'oggetto e dell'immagine fornita dall'obiettivo, mentre  $f_{oc}$  è la distanza focale dell'oculare.

Per il microscopio corretto all'infinito, l'ingrandimento finale <sup>[4]</sup> è dato dal rapporto tra la distanza focale di  $L_{tb}$  e quella di  $L_{ob}$ .

L'ingrandimento angolare massimo, in entrambi i casi, è dell'ordine di 2000 ed è principalmente limitato dal fenomeno della diffrazione.

Ciò che si oppone ad ingrandimenti maggiori è il potere di risoluzione del microscopio, definito nei dettagli in seguito, come il limite fino al quale due piccoli oggetti distinti vengono visti ancora separati.

### 1.3 Diffrazione da apertura di forma generica

Nota la distribuzione di campo in ogni punto  $P_1$  di una regione limitata dello spazio  $\Sigma$  posta nel piano oggetto  $X_1, Y_1$ , ad esempio un'apertura su uno schermo opaco (figura 1.3), <sup>[4]</sup> la *formula di Rayleigh per la diffrazione*:

$$\mathbf{E}(x_0, y_0, z) = \frac{1}{i\lambda} \int_{\Sigma} \mathbf{E}(x_1, y_1, 0) \frac{e^{ikr_{01}}}{r_{01}} \cos(\mathbf{n}, \mathbf{r}_{01}) dS \quad (1.3)$$

esprime in termini matematici il valore del campo in ogni punto  $P$  oltre l'apertura, in particolare la (1.3) definisce i valori del campo in ogni punto  $P_0$  di un piano di osservazione  $X_0, Y_0$ , posto a distanza  $z$  dal piano oggetto, dove  $\cos(\mathbf{n}, \mathbf{r}_{01})$ , detto fattore di obliquità, è il coseno dell'angolo formato da  $\mathbf{n}$ , la normale alla  $\Sigma$  (nel verso opposto all'asse  $z$ ) e il raggio vettore  $\mathbf{r}_{01}$  che congiunge  $P_0$  a  $P_1$ .

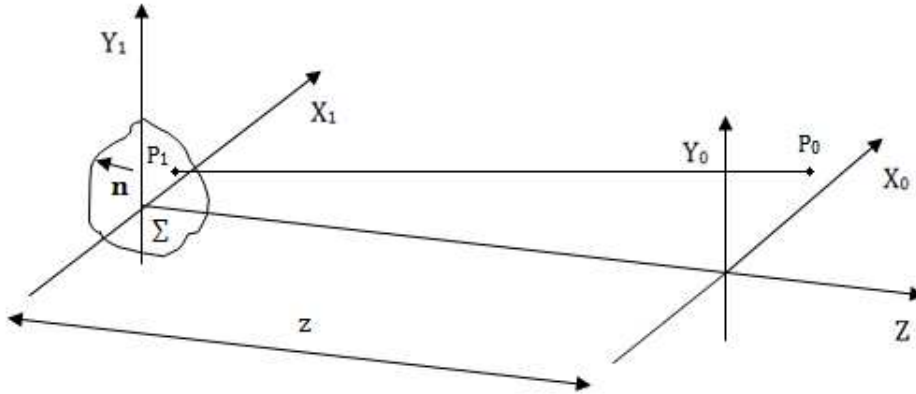


Figura 1.3

La (1.3) rappresenta l'espressione matematica del *principio di Huygens-Fresnel* secondo il quale il campo diffratto da una generica apertura si può considerare come la sovrapposizione delle onde elementari emesse da infinite sorgenti puntiformi in cui è possibile suddividere l'apertura stessa.

Si consideri una apertura finita  $\Sigma$  su uno schermo opaco caratterizzata da una trasmittanza  $t(x_1, y_1)$  e supponiamo venga illuminata da un'onda piana, monocromatica, polarizzata linearmente. L'ipotesi di onda piana è soddisfatta nella maggior parte dei casi pratici in quanto l'apertura è di solito posta ad una certa distanza dalla sorgente luminosa e interessa una zona del piano molto limitata.

Sia  $E_i(x_1, y_1)$  il campo scalare che rappresenta la radiazione che illumina l'apertura in un generico punto  $P_1$  nel piano  $Z=0$ . Il campo subito dopo l'apertura sarà dato da:  $E(x_1, y_1) = t(x_1, y_1) E_i(x_1, y_1)$ . È possibile descrivere la propagazione oltre l'apertura utilizzando la (1.3), facendo l'ipotesi che ciascun punto del piano  $(x_1, y_1, 0)$  illuminato sia sorgente di onde sferiche secondarie e la (1.3) definisce proprio il campo sul piano di osservazione  $X_0, Y_0$ , che rappresenta l'involuppo delle onde sferiche secondarie originate dai punti del piano  $(x_1, y_1, 0)$ .

Nei casi reali la regione di osservazione è spesso limitata e di dimensioni lineari sempre molto minori della distanza tra l'apertura e il piano immagine, ovvero  $|x_0|, |y_0| \ll z$  e  $|x_1|, |y_1| \ll z$ . Tali condizioni comportano una situazione di parassialità: si possono

considerare solo i raggi che formano angoli piccoli con l'asse ottico del sistema. In tal caso è possibile porre  $\cos(\mathbf{n}, \mathbf{r}_{01}) \approx 1 - \frac{\theta^2}{2} + \dots$ , i raggi sono con buona approssimazione paralleli, questo implica che è possibile trascurare la dipendenza dell'ampiezza dell'onda da  $r$  e si può porre  $r_{01} \approx z$ , mentre  $\cos(\mathbf{n}, \mathbf{r}_{01}) = \cos\theta \approx 1$ .

L'espressione del campo sul piano immagine (1.3) può essere scritta nella forma:

$$\mathbf{E}(x_0, y_0, z) = \frac{1}{i\lambda z} \int_{\Sigma} \mathbf{E}(x_1, y_1, 0) e^{ikr_{01}} dS. \quad (1.4)$$

Non è possibile effettuare la sostituzione  $r_{01} \approx z$  nell'esponentiale all'interno dell'integrale in quanto  $r_{01}$  è moltiplicato per  $k$  che è molto grande e potrebbe pertanto portare ad una variazione di fase non trascurabile.

È possibile fare un'ulteriore approssimazione, che deriva da semplici considerazioni geometriche e scrivere:

$$r_{01} = \sqrt{z^2 + (x_0 - x_1)^2 + (y_0 - y_1)^2} = z \sqrt{1 + \left(\frac{x_0 - x_1}{z}\right)^2 + \left(\frac{y_0 - y_1}{z}\right)^2}. \quad (1.5)$$

Se si tiene conto delle condizioni di parassialità e dello sviluppo binomiale  $(1 + x)^\alpha \approx 1 + \alpha x$  se  $|x| \ll 1$ , si può scrivere:

$$r_{01} \approx z \left[ 1 + \frac{1}{2} \left(\frac{x_0 - x_1}{z}\right)^2 + \frac{1}{2} \left(\frac{y_0 - y_1}{z}\right)^2 \right]. \quad (1.6)$$

Con tale approssimazione si ottiene l'integrale di diffrazione di Fresnel, che rappresenta il valore del campo elettrico nel piano immagine  $X_0, Y_0$  quando questo si trova nella regione di diffrazione detta di Fresnel o di "campo vicino", in particolare la (1.4) diventa:

$$\mathbf{E}(x_0, y_0) = \frac{e^{ikz}}{i\lambda z} e^{\frac{ik(x_0^2 + y_0^2)}{2z}} \int_{\Sigma} \mathbf{E}(x_1, y_1) e^{\frac{ik(x_1^2 + y_1^2)}{2z}} e^{-\frac{ik(x_0 x_1 + y_0 y_1)}{2z}} dx_1 dy_1. \quad (1.7)$$

La (1.7) dà buoni risultati nella regione molto vicina al piano di diffrazione; nel caso in cui il piano di osservazione si trovi a grande distanza è necessario introdurre l'approssimazione di Fraunhofer imponendo inoltre che tra la distanza  $z$  del piano immagine e le dimensioni dell'apertura sia soddisfatta la relazione:

$$z \gg \frac{k(x_1^2 + y_1^2)_{\max}}{2} = \frac{\pi(x_1^2 + y_1^2)_{\max}}{\lambda}.$$

Condizione ad esempio verificata nel caso di  $\lambda = 0.5 \mu\text{m}$  e aperture con diametro dell'ordine di qualche decina di millimetro; risulta in queste condizioni  $z \approx 1\text{m}$ .

In tal caso è possibile trascurare il termine quadratico nell'integrale (1.7), pertanto la distribuzione del campo nel piano immagine sarà data dal campo diffratto alla Fraunhofer:

$$\mathbf{E}(x_0, y_0) = \frac{e^{ikz}}{i\lambda z} e^{\frac{ik(x_0^2 + y_0^2)}{2z}} \int_{\Sigma} \mathbf{E}(x_1, y_1) e^{-\frac{ik(x_0 x_1 + y_0 y_1)}{2z}} dx_1 dy_1. \quad (1.8)$$

Il termine fuori dall'integrale è un fattore di fase che dipende solo dalla geometria dell'apertura, dalla posizione del piano immagine e dalla  $\lambda$  della radiazione.

Il campo che contribuisce alla (1.8) è solo quello corrispondente ai punti dell'apertura  $\Sigma$ , mentre in tutti gli altri punti del piano oggetto si può considerare identicamente nullo, per tale ragione è possibile estendere a tutto il piano gli estremi di integrazione e riscrivere la (1.8) come:

$$\mathbf{E}(x_0, y_0) = \frac{e^{ikz}}{i\lambda z} e^{\frac{ik(x_0^2+y_0^2)}{2z}} \iint_{-\infty}^{+\infty} \mathbf{E}(x_1, y_1) e^{-\frac{ik(x_0x_1+y_0y_1)}{2z}} dx_1 dy_1. \quad (1.9)$$

Introducendo due nuove variabili dette "frequenze spaziali", così definite:

$$\begin{aligned} f_x &= \frac{x_0}{\lambda z} = \frac{\tan\alpha}{\lambda} \approx \frac{\alpha}{\lambda}; \\ f_y &= \frac{y_0}{\lambda z} = \frac{\tan\beta}{\lambda} \approx \frac{\beta}{\lambda}; \end{aligned} \quad (1.10)$$

che a meno del fattore  $1/\lambda$  possono essere interpretate geometricamente come una direzione e, come si può osservare in figura 1.4 corrispondono agli angoli  $\alpha$  e  $\beta$  di diffrazione rispettivamente nei piani  $X_0, Z$  e  $Y_0, Z$ ; in particolare rappresentano le "direzioni angolari" lungo le quali si può osservare il fenomeno della diffrazione.

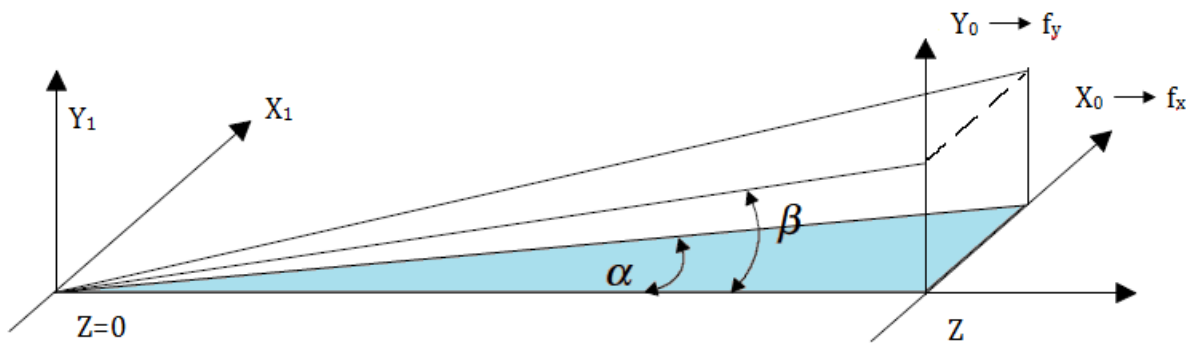


Figura 1.4: Grafico che mostra le direzioni angolari lungo le quali si osserva il fenomeno della diffrazione.

Si può, quindi interpretare la diffrazione come una redistribuzione della intensità lungo certe direzioni angolari, definite dalla geometria dell'oggetto e dalla distanza di osservazione. La  $f_0 = 0$  coincide con l'asse ottico del sistema ed i massimi e i minimi di diffrazione si trovano lungo certe particolari direzioni.

Introducendo le frequenze spaziali nell'integrale (1.9) si ha:

$$\mathbf{E}(x_0, y_0) = \frac{e^{ikz}}{i\lambda z} e^{\frac{ik(x_0^2+y_0^2)}{2z}} \iint_{-\infty}^{+\infty} \mathbf{E}(x_1, y_1) e^{-i2\pi(f_x x_1 + f_y y_1)} dx_1 dy_1, \quad (1.11)$$

che rappresenta la Trasformata di Fourier della funzione  $\mathbf{E}(x_1, y_1)$ , nelle variabili indipendenti  $f_x$  e  $f_y$ , la (1.11) si può riscrivere come:

$$\mathbf{E}(x_0, y_0) = \frac{e^{ikz}}{i\lambda z} e^{\frac{ik(x_0^2 + y_0^2)}{2z}} \mathfrak{F}\{\mathbf{E}(x_1, y_1)\}(f_x, f_y). \quad (1.12)$$

La (1.12) mostra che nell'approssimazione di Fraunhofer, la distribuzione del campo nel piano immagine a  $z$  costante è proporzionale, a meno di un fattore di fase quadratico, alla Trasformata di Fourier della distribuzione del campo sull'apertura.

Questo risultato è importante in quanto si può generalizzare ad ogni tipo di apertura, quindi nota la geometria di  $\Sigma$  è possibile stabilire a priori, applicando semplicemente l'operazione di trasformata, la distribuzione del campo in un piano a distanza  $z$  fissato.

### 1.4 Diffrazione da apertura di forma circolare

Si consideri la funzione  $\text{circ}(r)$  [3] così definita:

$$\text{circ}(r) = \begin{cases} 1 & \text{per } r \leq 1 \\ 0 & \text{altrimenti} \end{cases} \quad \text{dove } r = \sqrt{x^2 + y^2} \quad (1.13)$$

In questo caso particolare, la trasformata è detta di Bessel-Fourier e si dimostra essere una funzione di Bessel del primo ordine:

$$\frac{J_1(2\pi\rho)}{\rho} \quad \text{dove } \rho = \sqrt{f_x^2 + f_y^2}. \quad (1.14)$$

La figura 1.5 illustra la funzione  $\text{circ}(r)$  e la sua trasformata.

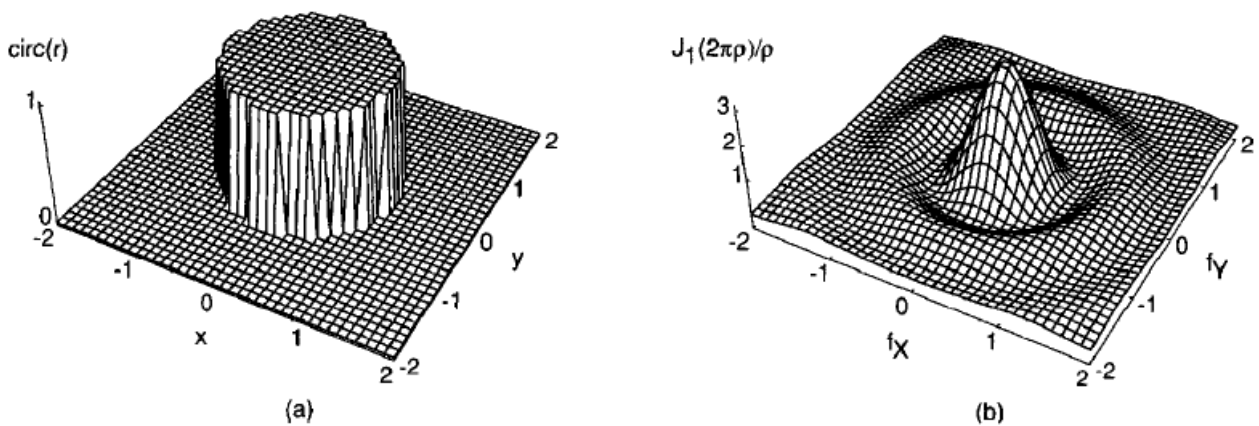


Figura 1.5: a) La funzione  $\text{circ}(r)$  e b) la sua trasformata.  
[Goodman, Introduction to Fourier Optics]

Supponiamo di introdurre nel piano  $Z=0$  uno schermo opaco infinitamente esteso con un'apertura circolare di raggio  $w$ , si definisce funzione trasmittanza dell'apertura il rapporto

tra l'ampiezza del campo trasmesso e quella del campo incidente; nel caso specifico di apertura circolare essa è definita come:

$$\text{circl}\left(\frac{r_1}{w}\right) = \begin{cases} 1 & \text{per } r_1 \leq w \\ 0 & \text{altrimenti} \end{cases} \quad \text{dove } r_1 = \sqrt{x_1^2 + y_1^2}.$$

Il campo diffratto nel piano  $X_0, Y_0$  è dato in base alla (1.12) dalla trasformata di Bessel-Fourier:

$$\mathbf{E}(x_0, y_0) = \frac{e^{ikz}}{i\lambda z} e^{\frac{ikr_0^2}{2z}} \mathfrak{F}\left\{\text{circl}\left(\frac{r_1}{w}\right)\right\} \Big|_{\rho=\frac{r_0}{\lambda z}}. \quad (1.15)$$

Nel caso in cui l'onda piana incidente sia monocromatica e con ampiezza unitaria, il campo trasmesso coincide con la funzione trasmittanza, pertanto:

$$\mathfrak{F}\left\{\text{circl}\left(\frac{r_1}{w}\right)\right\} = A \frac{J_1(2\pi w \rho)}{\pi w \rho} \quad \text{dove } A = \pi w^2 \quad (1.16)$$

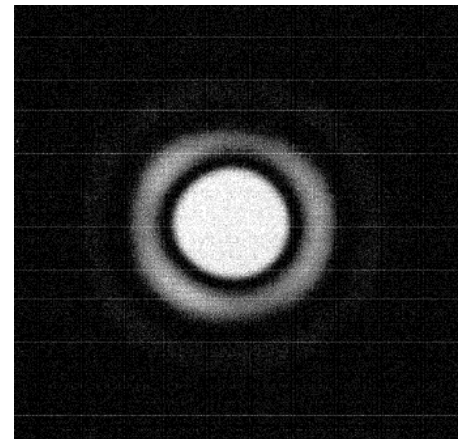
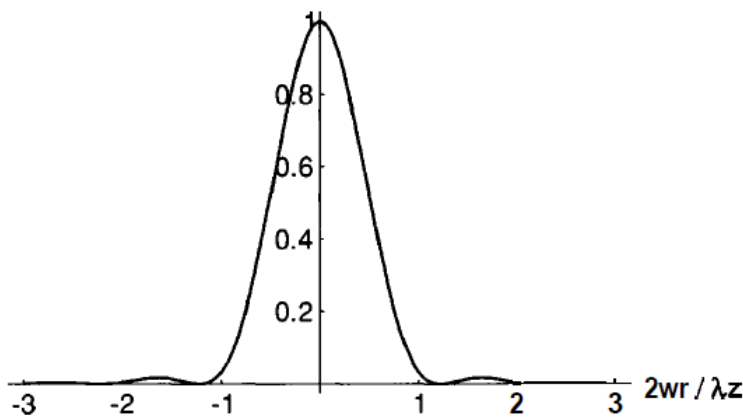
e (1.15) diventa:

$$\mathbf{E}(x_0, y_0) = \frac{e^{ikz}}{i\lambda z} e^{\frac{ikr_0^2}{2z}} \left[ A \frac{J_1(2\pi w \rho)}{\pi w \rho} \right] = \frac{e^{ikz}}{i\lambda z} e^{\frac{ikr_0^2}{2z}} \left[ A \frac{J_1(2\pi w \frac{r_0}{\lambda z})}{\pi w \frac{r_0}{\lambda z}} \right] = A \frac{e^{ikz}}{i\lambda z} e^{\frac{ikr_0^2}{2z}} \left[ 2 \frac{J_1(kw \frac{r_0}{z})}{kw \frac{r_0}{z}} \right]. \quad (1.17)$$

Mentre la distribuzione di intensità, data dal valor medio nel tempo del quadrato dell'ampiezza del campo, è pari a:

$$I(r_0) = \left(\frac{A}{i\lambda z}\right)^2 \left[ 2 \frac{J_1(kw \frac{r_0}{z})}{kw \frac{r_0}{z}} \right]^2. \quad (1.18)$$

Questa distribuzione di intensità è chiamata "pattern di Airy" [3], i valori dei massimi e dei minimi di questa funzione si possono trovare tabulati sui manuali. In Figura 1.6 è mostrata una sezione dell'andamento del pattern di Airy:



a)

b)

Figura 1.6: a) Pattern di Airy, b) Pattern di diffrazione alla Fraunhofer da apertura circolare. [Goodman, Introduction to Fourier Optics]

Nel caso specifico la larghezza del lobo centrale è pari a:

$$d = 1.22 \frac{\lambda z}{w} \quad (1.19)$$

e la posizione del primo minimo soddisfa la condizione:

$$\sin\theta_1 = 1.22 \frac{\lambda}{2w}. \quad (1.20)$$

Nel caso in cui  $2w \gg \lambda$ , valido per i casi reali, si può fare l'approssimazione  $\sin\theta_1 \approx \theta_1$ . Il fattore 1.22 deriva dall'integrazione su tutte le sorgenti secondarie dell'apertura, che per la sua simmetria può essere suddivisa in corone circolari concentriche, ciascuna sorgente di onde secondarie.

La relazione (1.19) ha una notevole importanza in quanto permette di definire il "potere risolutivo" di uno strumento ottico. Infatti tutti gli strumenti ottici, in particolare l'obiettivo di un microscopio avendo dimensioni finite, limitano il fronte d'onda, si ha per tale motivo nel fuoco dell'obiettivo una figura di diffrazione generata dall'apertura dell'obiettivo stesso, ovvero il suo disco di Airy circondato da anelli concentrici scuri alternati ad anelli luminosi di intensità rapidamente decrescente. Di conseguenza l'immagine di una sorgente puntiforme, anche in assenza di aberrazioni, non è mai puntiforme come prevede l'ottica geometrica.

Si dimostra che, per un'onda piana parassiale, circa l'84% dell'intensità trasmessa è concentrata nel suo disco di diffrazione.

## 1.5 Potere risolutivo di una apertura circolare e criterio di Rayleigh

La diffrazione costituisce un limite al potere risolutivo o separatore di uno strumento ottico in quanto è un fenomeno non eliminabile essendo strettamente connesso alla natura ondulatoria della luce, la principale conseguenza è che le immagini diffratte hanno dimensioni finite, che limitano la possibilità di distinguere due sorgenti puntiformi, se separate da una distanza angolare troppo piccola.

Il *criterio di Rayleigh* <sup>[1]</sup> stabilisce che due sorgenti puntiformi possono essere risolte se i centri dei rispettivi dischi di diffrazione sono separati da una distanza maggiore del raggio di Airy, pertanto l'angolo minimo di risoluzione è dato da  $\delta_R = \theta_1 \approx 1.22 \frac{\lambda}{2w}$  ed il rapporto:

$$\frac{1}{\delta_R} \approx \frac{2w}{1.22\lambda} \quad (1.21)$$

definisce il "potere risolutivo o separatore".

L'immagine di un oggetto puntiforme inferiore al limite di diffrazione, coincide con una serie di anelli concentrici (pattern di Airy), caratterizzati da una distribuzione spaziale d'intensità indipendente dalla sua dimensione fisica reale, ma dipendente esclusivamente dalla  $\lambda$  di eccitazione e dall'apertura numerica (NA) della lente rappresentata in figura 1.7, dove NA è un parametro così definito:

$$NA = n \sin\theta \quad (1.22)$$

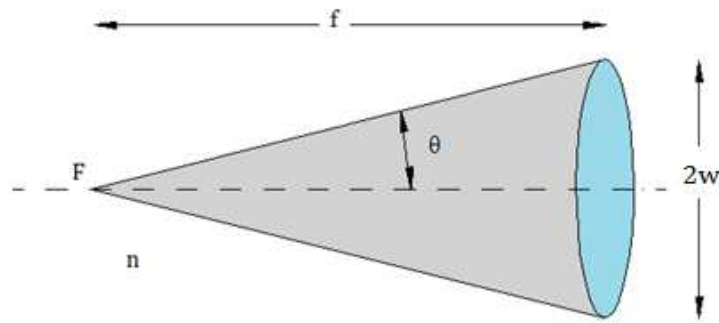


Figura 1.7: Apertura numerica di una lente.

con  $n$  indice di rifrazione del mezzo posto tra l'obiettivo e il campione, mentre  $\theta$  è pari alla metà dell'angolo solido del cono di luce generato dall'apertura della lente, che pertanto governa la formazione dell'immagine.

Dalla (1.21) è evidente che il potere risolutivo cresce con il diametro ( $2w$ ) del dispositivo e con il diminuire della lunghezza d'onda utilizzata. Per questo motivo si preferiscono obiettivi con grandi diametri e radiazioni con corte lunghezze d'onda.

In Figura 1.8 [4] sono rappresentati due dischi di Airy al limite della risoluzione e due talmente vicini da sovrapporsi.

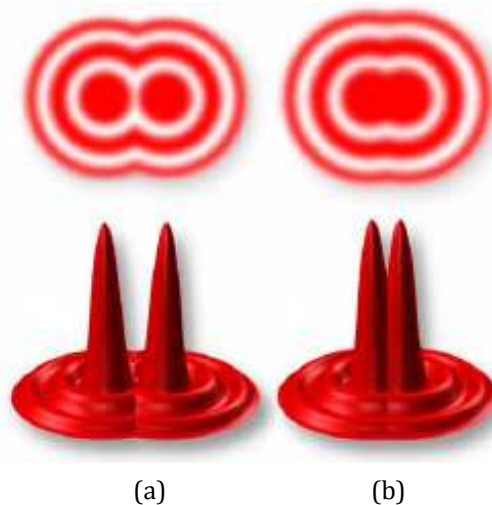


Figura 1.8: a) Dischi di Airy al limite della risoluzione. b) Due dischi di Airy vicini al punto di sovrapporsi. [Davidson, Abramovitz, Optical Microscopy]



## Capitolo 2

### Introduzione ai principi fisici di microscopia confocale

L'invenzione del microscopio confocale è attribuita a Marvin Minsky, il padre dell'intelligenza artificiale, che nel 1957 mosso dal desiderio di osservare eventi biologici in vivo, in particolare le complesse connessioni tridimensionali delle reti neurali del cervello umano, realizzò il primo microscopio. Tuttavia i primi risultati rilevanti si ebbero nel 1969 con l'introduzione di un fascio laser in grado di fornire la potenza luminosa necessaria per un corretto funzionamento dello strumento.

Nel microscopio confocale, rappresentato in figura 2.1, la luce proveniente da una sorgente puntiforme attraversa un diaframma regolabile posto nel piano oggetto, al fine di limitare le dimensioni del fascio di raggi luminosi che entra nel sistema ottico, questo viene poi focalizzato da una lente condensatore nel suo fuoco dove è posto il campione, la luce che passa attraverso di esso viene a sua volta focalizzata da una seconda lente obiettivo in un secondo diaframma confocale al primo, posto davanti al rivelatore. I due diaframmi e il campione sono collocati in piani coniugati.

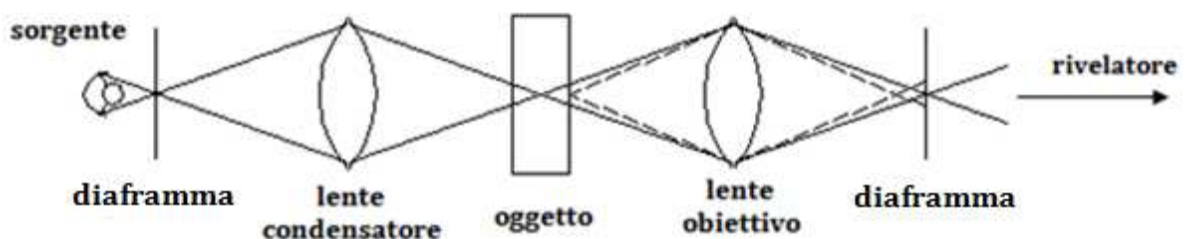


Figura 2.1: Configurazione di un microscopio confocale.

Le dimensioni del diaframma vengono scelte in maniera tale da permettere solo ai raggi provenienti dal piano focale, in cui è posto il campione, di raggiungere il rivelatore.

Questa semplice configurazione geometrica permette di ottenere due vantaggi:

- È possibile effettuare una ricostruzione tridimensionale dell'oggetto mediante il sezionamento ottico del campione, raccogliendo una serie di immagini di piani paralleli, trasladando semplicemente le singole sezioni del campione nel fuoco dell'obiettivo lungo un asse che generalmente coincide con l'asse di propagazione della luce. Questo non è possibile nella microscopia convenzionale.
- Si ha un aumento del contrasto dell'immagine in quanto solo i raggi provenienti dal piano focale vengono rilevati. Un microscopio confocale, infatti, risulta caratterizzato da una risoluzione leggermente maggiore di un microscopio tradizionale, ma il grande miglioramento in contrasto è la fonte principale del suo successo.

### **2.1 Distribuzione tridimensionale di intensità in prossimità del fuoco**

Nel capitolo 1.3 è stato dimostrato che nell'approssimazione di Fraunhofer, la distribuzione del campo nel piano immagine a  $z$  costante è proporzionale a meno di un fattore di fase quadratico alla Trasformata di Fourier della distribuzione del campo sull'apertura, mentre nel capitolo 1.4 è stato analizzato il caso particolare di un'apertura circolare, tale può essere considerata una lente. Tuttavia per una conoscenza completa della distribuzione d'intensità è necessario studiare non solo la distribuzione nel piano focale ma anche quella in prossimità del fuoco geometrico.

A partire dall'integrale di Huygens-Fresnel, già citato nella (1.3), Lommel è riuscito a risolvere il problema della distribuzione in termini di serie convergenti di funzioni di Bessel ed ha anche confermato sperimentalmente i fenomeni previsti sulla base di questi calcoli.

Nel discutere la distribuzione di intensità in prossimità del fuoco, si utilizzerà come punto di partenza l'analisi di Lommel e Struve, tuttavia risulta conveniente partire dalla rappresentazione integrale del campo mediante la formulazione utilizzata da Debye.

Si consideri <sup>[5]</sup> un'onda sferica monocromatica che emerge da un'apertura circolare e converge nel punto focale  $O$ . Sia  $P$  un generico punto molto vicino ad  $O$  ed  $\mathbf{R}$  il raggio vettore che individua la posizione di  $P$  rispetto ad  $O$ , come rappresentato in figura 2.2 e si consideri il campo elettrico valutato in questo punto  $\mathbf{E}(P)$ . Siano, inoltre, la distanza  $R=OP$  e il raggio  $a$  ( $\gg \lambda$ ) dell'apertura di molto inferiori rispetto alla distanza  $f=CO$ .

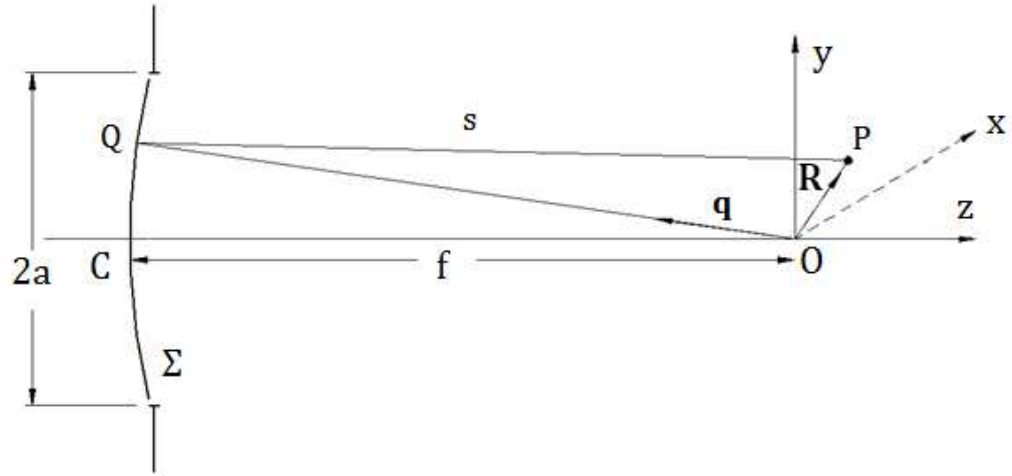


Figura 2.2

Se  $s$  indica la distanza tra il punto di osservazione  $P$  e il punto  $Q$  sulla superficie  $\Sigma$  e  $A/f$  è l'ampiezza dell'onda incidente in  $Q$ , per il principio di Huygens-Fresnel risulta:

$$\mathbf{E}(P) = -\frac{i A e^{-ikf}}{\lambda f} \iint_{\Sigma} \frac{e^{iks}}{s} dS \quad (2.1)$$

Nell'ipotesi di approssimazione parassiale il fattore di obliquità si può trascurare in quanto si considerano solo angoli piccoli rispetto all'asse ottico. Con  $\mathbf{q}$  si denota il vettore unitario che individua la direzione  $OQ$ , in queste condizioni la differenza tra  $s$  ed  $f$  si può con ottima approssimazione scrivere come:

$$s - f = -\mathbf{q} \cdot \mathbf{R} \quad (2.2)$$

L'elemento infinitesimo  $dS$  del fronte d'onda è invece dato da:

$$dS = f^2 d\Omega \quad (2.3)$$

dove  $d\Omega$  è l'elemento di angolo solido sotteso da  $dS$  rispetto ad  $O$ . Si può sostituire  $f$  al posto di  $s$  al denominatore della (2.1) senza introdurre un errore significativo, la (2.1) diventa:

$$\mathbf{E}(P) = -\frac{i}{\lambda} A \iint_{\Omega} e^{-ik\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}} d\Omega \quad (2.4)$$

Si noti come l'integrale sia esteso non più alla superficie  $\Sigma$  ma all'angolo solido  $\Omega$  sotteso dall'apertura rispetto al fuoco.

La (2.4) è definito integrale di Debye e rappresenta il campo nel punto  $P$  come una sovrapposizione di onde piane con differenti direzioni di propagazione ciascuna individuata

dal vettore  $\mathbf{q}$ . Tuttavia la (2.4) non rappresenta una soluzione al problema in quanto è necessario considerare non solo i contributi relativi alle onde piane che si propagano nella stessa direzione dei raggi incidenti ma tutti i contributi relativi a tutte le possibili direzioni, tuttavia, se  $f \gg a \gg \lambda$  e se è soddisfatta la condizione:  $a^2/\lambda f \gg 1$  l'integrale di Debye rappresenta una buona stima della distribuzione di intensità nella regione del fuoco.

Per valutare la (2.4) è utile esprimere l'integrando in una forma più semplice: si consideri il sistema di coordinate cartesiane con origine in O, siano  $(x, y, z)$  le coordinate di P e  $(\xi, \eta, \zeta)$  quelle relative al punto Q. Poniamo, inoltre:

$$\begin{aligned} \xi &= a \sin \theta, & x &= r \sin \psi \\ \eta &= a \cos \theta, & y &= r \cos \psi \end{aligned} \quad (2.5)$$

Q si trova sul fronte d'onda sferico  $\Sigma$ , quindi:

$$\zeta = -\sqrt{f^2 - a^2 \rho^2} = -f \left[ 1 - \frac{1}{2} \frac{a^2 \rho^2}{f^2} + \dots \right], \quad (2.6)$$

nell'ultimo passaggio è stata usata l'approssimazione binomiale. Allora:

$$\mathbf{q} \cdot \mathbf{R} = \frac{x\xi + y\eta + z\zeta}{f} = \frac{a \rho \cos(\theta - \psi)}{f} - z \left[ 1 - \frac{1}{2} \frac{a^2 \rho^2}{f^2} + \dots \right]. \quad (2.7)$$

A questo punto al fine di definire la posizione di P che dipende da  $\psi$  è utile introdurre le variabili adimensionali  $u$  e  $v$  dette unità ottiche, così definite:

$$\begin{aligned} \mathbf{u} &= \frac{2\pi}{\lambda} \left(\frac{a}{f}\right)^2 \mathbf{z} \\ \mathbf{v} &= \frac{2\pi}{\lambda} \left(\frac{a}{f}\right) \mathbf{r} = \frac{2\pi}{\lambda} \frac{a}{f} \sqrt{x^2 + y^2} \end{aligned} \quad (2.8)$$

Se nella (2.7) si trascurano rispetto all'unità i termini in  $a\rho/f$  con potenza superiore a 2 e si sostituiscono le espressioni di  $u$  e  $v$  della (2.8), allora la (2.7) diventa:

$$k \mathbf{q} \cdot \mathbf{R} = v \rho \cos(\theta - \psi) - \left(\frac{f}{a}\right)^2 u + \frac{1}{2} u \rho^2 \quad (2.9)$$

Poiché l'elemento di angolo solido è  $d\Omega = \frac{dS}{f^2} = \frac{a^2 \rho \, d\rho \, d\theta}{f^2}$ , la (2.4) diventa:

$$\mathbf{E}(P) = -\frac{i a^2}{\lambda f^2} A e^{i\left(\frac{f}{a}\right)^2 u} \int_0^1 \int_0^{2\pi} e^{-i[v\rho \cos(\theta - \psi) + \frac{1}{2}u\rho^2]} \rho \, d\rho \, d\theta. \quad (2.10)$$

L'integrale rispetto a  $\theta$  è uguale a  $2\pi J_0(v\rho)$  dove  $J_0(v\rho)$  è la funzione di Bessel di ordine zero, allora la (2.10) si può riscrivere nel seguente modo:

$$\mathbf{E}(P) = -\frac{2\pi i a^2}{\lambda f^2} A e^{i\left(\frac{f}{a}\right)^2 u} \int_0^1 J_0(v\rho) e^{-i\frac{1}{2}u\rho^2} \rho d\rho. \quad (2.11)$$

È utile a questo punto dividere l'integrale in parte reale e parte immaginaria, ovvero:

$$2 \int_0^1 J_0(v\rho) e^{-i\frac{1}{2}u\rho^2} \rho d\rho = C(u, v) - iS(u, v) \quad (2.12)$$

dove:

$$C(u, v) = 2 \int_0^1 J_0(v\rho) \cos\left(\frac{1}{2}u\rho^2\right) \rho d\rho$$

$$S(u, v) = 2 \int_0^1 J_0(v\rho) \sin\left(\frac{1}{2}u\rho^2\right) \rho d\rho \quad (2.14)$$

Se si introducono le funzioni di Lommel così definite:

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

$$V_n(u, v) = \sum_{s=0}^{\infty} (-1)^s \left(\frac{v}{u}\right)^{n+2s} J_{n+2s}(v) \quad (2.15)$$

e usando la relazione:

$$\frac{d}{dx} [x^{n+1} J_{n+1}(x)] = x^{n+1} J_n(x) \quad (2.16)$$

allora si può riscrivere  $C(u, v)$  come:

$$C(u, v) = \frac{2}{v} \int_0^1 \frac{d}{d\rho} [\rho J_1(v\rho)] \cos\left(\frac{1}{2}u\rho^2\right) d\rho = \frac{2}{v} [J_1(v) \cos\frac{1}{2}u + u \int_0^1 \rho^2 J_1(v\rho) \sin\left(\frac{1}{2}u\rho^2\right) d\rho] \quad (2.17)$$

Si noti che nell'ultimo passaggio della (2.17) è stata effettuata una integrazione per parti, se si usa nuovamente la (2.16) e si integra ancora una volta per parti e iterando il procedimento, alla fine si ottiene:

$$C(u, v) = \frac{\cos\frac{1}{2}u}{\frac{1}{2}u} U_1(u, v) + \frac{\sin\frac{1}{2}u}{\frac{1}{2}u} U_2(u, v) \quad (2.18)$$

Analogamente per  $S(u, v)$ :

$$S(u, v) = \frac{\sin\frac{1}{2}u}{\frac{1}{2}u} U_1(u, v) - \frac{\cos\frac{1}{2}u}{\frac{1}{2}u} U_2(u, v) \quad (2.19)$$

Le formule (2.18) e (2.19) sono valide per tutti i punti in prossimità del fuoco, che soddisfano la condizione  $|u/v| < 1$ , cioè per i punti di osservazione che interessano la regione di ombre geometriche. Se  $|u/v| > 1$ , ovvero per punti che si trovano nella regione direttamente illuminata, si integra per parti  $C(u, v)$  di (2.14) rispetto al termine trigonometrico e utilizzando la relazione:

$$\frac{d}{dx} [x^{-n} J_n(x)] = -x^{-n} J_{n+1}(x) , \quad (2.20)$$

si può scrivere:

$$C(u, v) = \frac{2}{u} \int_0^1 J_0(v\rho) \frac{d}{d\rho} \sin\left(\frac{1}{2}u\rho^2\right) d\rho = \frac{2}{u} [J_0(v)\sin\frac{1}{2}u + v \int_0^1 J_1(v\rho)\sin\left(\frac{1}{2}u\rho^2\right) d\rho] \quad (2.21)$$

Integrando ancora per parti e usando la (2.20) e l'equazione  $\lim_{x \rightarrow 0} \frac{J_n(x)}{x^n} = \frac{1}{2^n n!}$  si ottiene:

$$C(u, v) = \frac{2}{u} \sin \frac{v^2}{2u} + \frac{\sin \frac{1}{2}u}{\frac{1}{2}u} V_0(u, v) - \frac{\cos \frac{1}{2}u}{\frac{1}{2}u} V_1(u, v) \quad (2.22)$$

Procedendo in modo analogo si ha che:

$$S(u, v) = \frac{2}{u} \cos \frac{v^2}{2u} - \frac{\cos \frac{1}{2}u}{\frac{1}{2}u} V_0(u, v) - \frac{\sin \frac{1}{2}u}{\frac{1}{2}u} V_1(u, v) \quad (2.23)$$

La (2.22) e la (2.23) rappresentano le soluzioni del problema.

Infatti, se si considerano le (2.11), (2.12), (2.18), (2.19), (2.22), (2.23) e se si tiene presente che  $I = |\mathbf{E}(P)|^2$  si possono ottenere due espressioni equivalenti per la distribuzione di intensità in prossimità del fuoco:

$$I(u, v) = \left(\frac{2}{u}\right)^2 [U_1^2(u, v) + U_2^2(u, v)] I_0 \quad (2.24)$$

$$I(u, v) = \left(\frac{2}{u}\right)^2 \{1 + V_0^2(u, v) + V_1^2(u, v) - 2 V_0(u, v) \cos\left[\frac{1}{2}\left(u + \frac{v^2}{u}\right)\right] - 2 V_1(u, v) \sin\left[\frac{1}{2}\left(u + \frac{v^2}{u}\right)\right]\} I_0 \quad (2.25)$$

con 
$$I_0 = \left(\frac{\pi a^2 |A|}{\lambda f^2}\right)^2 \quad (2.26).$$

Dalle relazioni (2.15) segue, inoltre, che:

$$\begin{aligned} U_1(-u, v) &= -U_1(u, v), \\ U_2(-u, v) &= U_2(u, v), \\ V_0(-u, v) &= V_0(u, v), \\ V_1(-u, v) &= -V_1(u, v). \end{aligned} \quad (2.27)$$



$$\lim_{u \rightarrow 0} \left[ \frac{U_1(u, v)}{u} \right] = \frac{J_1(v)}{v} \text{ e } \lim_{u \rightarrow 0} \left[ \frac{U_2(u, v)}{u} \right] = 0 \quad (2.29)$$

Di conseguenza

$$I(0, v) = \left[ \frac{2J_1(v)}{v} \right]^2 I_0 \quad (2.30)$$

Si riottiene proprio il “pattern di Airy” già incontrato nella (1.18).

Se si considerano i punti lungo l’asse ottico per i quali è soddisfatta la condizione  $v=0$ , le funzioni  $V_n$  della (2.15) si riducono a:

$$V_0(u, 0) = 1 \text{ e } V_1(u, 0) = 0 \quad (2.31)$$

In definitiva la distribuzione di intensità lungo l’asse ottico risulta pari a:

$$I(u, 0) = \frac{4}{u^2} (2 - 2\cos\frac{1}{2}u) I_0 = \left[ \frac{\sin\frac{u}{4}}{\frac{u}{4}} \right]^2 I_0 \quad (2.32)$$

Il primo zero di intensità lungo l’asse ottico si ha quando  $u/4 \equiv \pi a^2 z / 2\lambda f^2 = \pm \pi$ , che corrisponde ad una distanza dal fuoco pari a  $z = \pm 2\lambda f^2 / a^2$ .

### 2.3 Profondità di campo

Solitamente, <sup>[5]</sup> è considerata ammissibile una perdita di intensità del 20% rispetto al centro dell’immagine. Poiché la funzione  $\left[ \frac{\sin\frac{u}{4}}{\frac{u}{4}} \right]^2$  diminuisce di questa quantità tra  $u=0$  e  $u \sim 3.2$ , allora è possibile definire la profondità di campo come la distanza lungo l’asse ottico, in un intorno del fuoco, la quale soddisfa la seguente condizione:

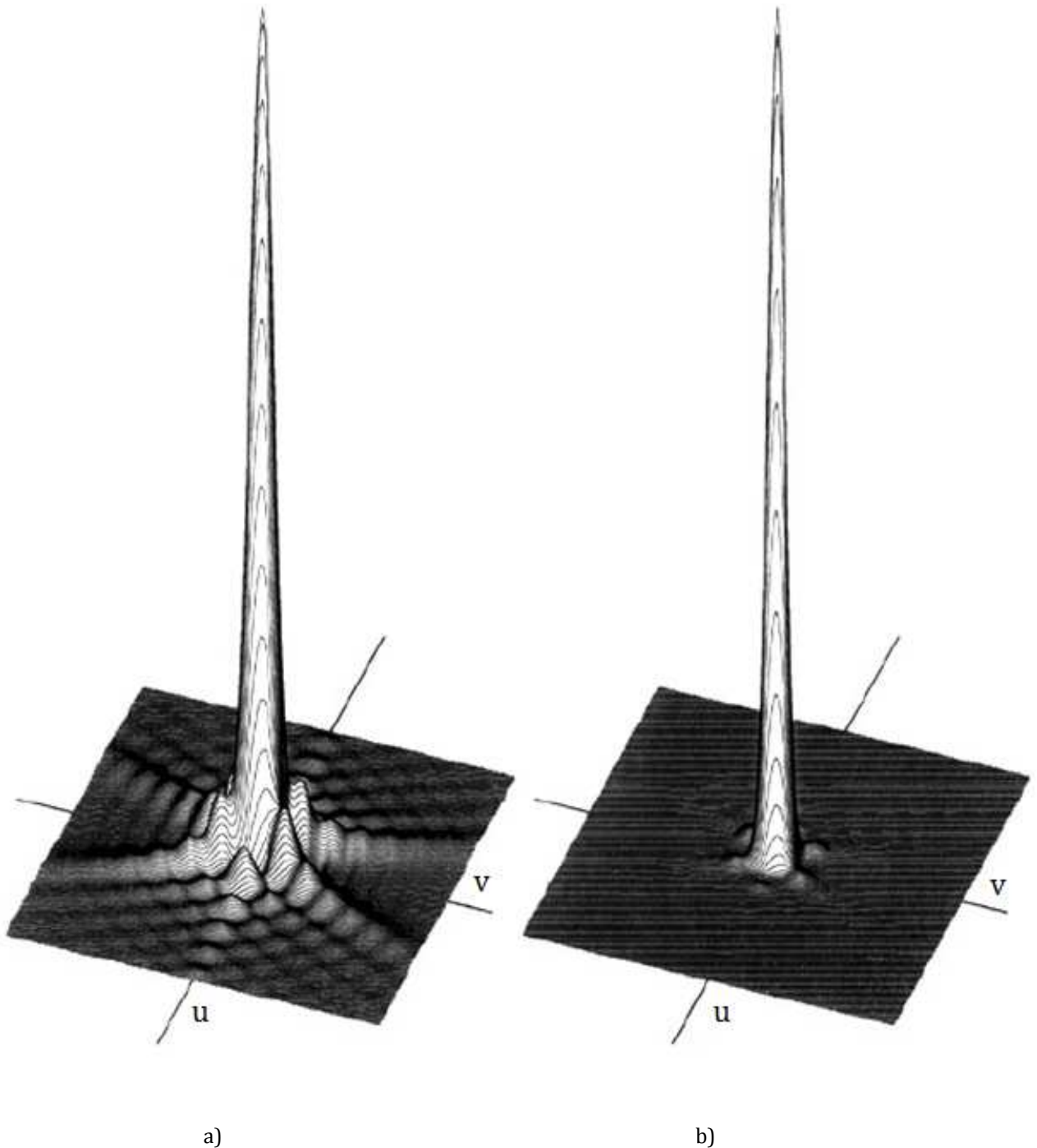
$$\Delta z = \pm 3.2 \frac{\lambda}{2\pi} \left( \frac{f}{a} \right)^2. \quad (2.33)$$

Nei microscopi ottici tradizionali, una misurazione accurata della profondità di campo è un compito difficile a causa della luce che viene diffusa dagli oggetti fuori fuoco e che però viene raccolta dal rivelatore. Questo problema, come vedremo in seguito, viene notevolmente ridotto utilizzando un microscopio confocale.



## 2.4 Point Spread Function (PSF)

La Point Spread Function (PSF) [6] è una funzione in tre dimensioni che rappresenta la distribuzione d'intensità nel piano immagine e descrive la risposta del sistema ottico ad un punto oggetto nello spazio reale, quindi più stretta è la PSF migliore risulta la risoluzione del sistema. In figura 2.4 è rappresentata la PSF tipica di un microscopio tradizionale a) e confocale b).



a) b)  
 Figura 2.4: a) La funzione  $PSF(u, v)$  tra  $u = \pm 24\pi$  e  $v = \pm 7\pi$ . b) La funzione  $PSF_{conf}(u, v)$  tra  $u = \pm 24\pi$  e  $v = \pm 7\pi$ . [Webb, Confocal optical microscopy]

Lungo l'asse ottico  $u$ , nell'ipotesi di approssimazione parassiale, dalle (2.30) e (2.32) si ha che la distribuzione di intensità ha una forma pari a:

$$\text{PSF}(u, 0) = \left[ \frac{\sin \frac{u}{4}}{\frac{u}{4}} \right]^2, \quad (2.34)$$

che è proprio la figura di diffrazione generata da una fenditura, mentre nel piano focale si ha:

$$\text{PSF}(0, v) = 2 \left[ \frac{J_1(v)}{v} \right]^2. \quad (2.35)$$

In figura 2.5 è rappresentata la distribuzione di intensità nel piano focale e in piani trasversi all'asse ottico sia nel caso di un microscopio tradizionale a) che di un confocale b).

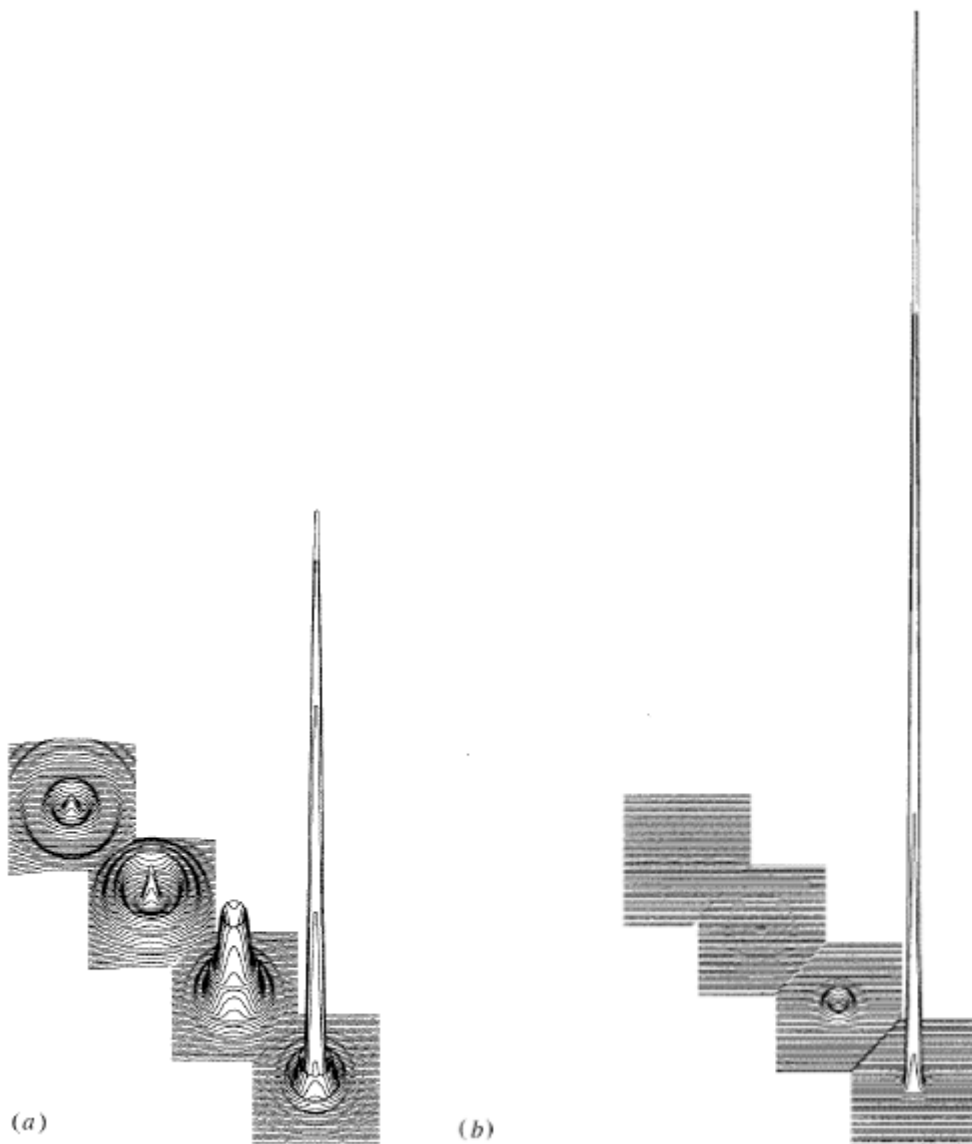


Figura 2.5:  $\text{PSF}(u, v)$  nel piano focale e in piani ad esso paralleli per un microscopio tradizionale a) e confocale b). [Webb, Confocal optical microscopy]

La PSF quindi, si può, pertanto, definire come la figura di diffrazione tridimensionale che si ottiene da un'apertura circolare come per esempio una lente.

In particolare

$$PSF(u, v) = a(u, v) a^*(u, v) = |a(u, v)|^2, \quad (2.36)$$

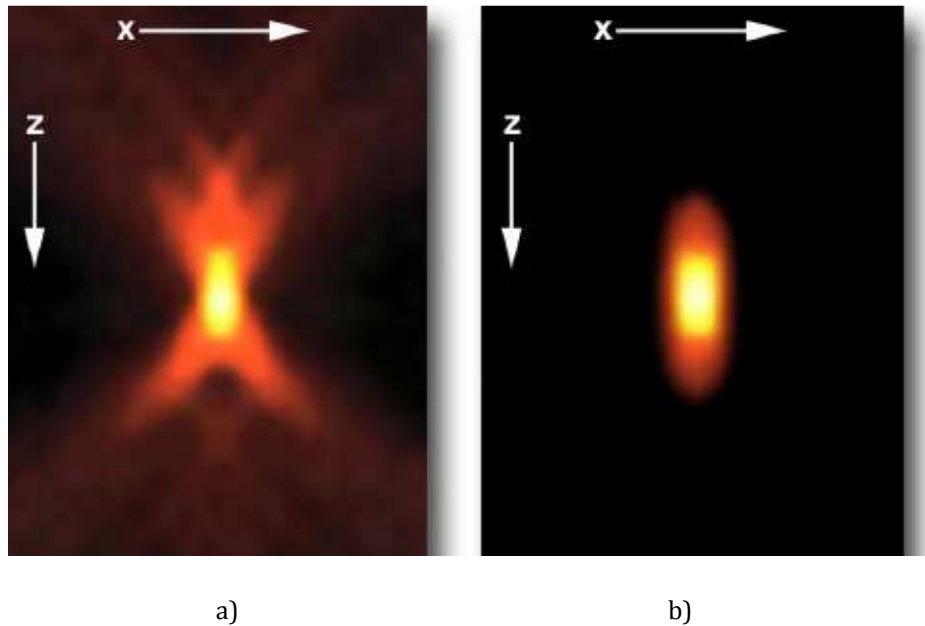
dove  $a(u, v)$  è la trasformata di Fourier dell'apertura della lente, definita come quella funzione che assume valore unitario per punti interni all'apertura, vale zero altrimenti.

Per una configurazione confocale si può dimostrare che la PSF è data dal prodotto delle *point spread functions* associate alle distribuzioni d'intensità di illuminazione e rilevazione:

$$PSF_{conf}(u, v) = PSF(u, v)_{ill} PSF(u, v)_{ril} \quad (2.37)$$

e poiché vale la (2.36), allora  $PSF_{conf}(u, v) = |a(u, v)|^4$  in quanto generalmente è soddisfatta la condizione:  $PSF(u, v)_{ill} = PSF(u, v)_{ril}$ . Quindi anche le (2.34) e (2.35) saranno elevate alla quarta potenza.

In figura 2.6 si può osservare la differenza tra la PSF di un microscopio tradizionale e quella di un confocale nel piano  $x, z$ : è evidente come il punto immagine risulti più nitido nel caso di figura b) in quanto i punti fuori fuoco non influenzano l'immagine finale essendo soggetti a limitazione spaziale.



a) b)  
 Figura 2.6: PSF in un microscopio tradizionale a) e confocale b).  
 [Claxton et al, Laser scanning confocal microscopy]

## 2.5 Risoluzione laterale e assiale

Il criterio di Rayleigh <sup>[1]</sup> stabilisce che la risoluzione nel piano del fuoco o risoluzione laterale, nel caso in cui l'immagine sia priva di significative aberrazioni, è pari a:

$$r = 0.6 \frac{\lambda}{NA} \quad (2.38)$$

dove NA è l'apertura numerica della lente; l'inverso di r rappresenta proprio il potere risolutivo (1.21) dell'obiettivo. Dalla (2.38) è possibile notare come la minima distanza risolvibile tra due punti possa essere ridotta aumentando l'apertura numerica, in particolare l'angolo di accettazione, oppure utilizzando mezzi con indice di rifrazione superiore all'unità in quanto NA dipende da n (si veda la 1.22). Tuttavia bisogna tener presente che quando  $\theta=70^\circ$  risulta  $\sin\theta\approx 0.94$ , quindi aumentando ulteriormente l'accettazione, l'apertura numerica non è soggetta a variazioni apprezzabili; in tal caso si preferisce porre tra l'obiettivo e il campione un mezzo con  $n>1$ , si usano per tale scopo lenti ad immersione in olio o in acqua.

La forma della *Point Spread Function* è determinata dall'apertura numerica della lente obiettivo, tuttavia, è possibile ridurre le dimensioni della PSF ponendo un diaframma davanti al rivelatore, posizionato nel piano focale della lente. Questa configurazione, tipica di un microscopio confocale, consente di aumentare la risoluzione laterale nel piano x, y di un fattore  $\approx 1.4$  rispetto a quella di un microscopio ottico tradizionale, condizione chiamata superisolazione.

Come si evince dalla figura 2.4 b) i lobi relativi ai massimi secondari e ai minimi risultano quasi del tutto soppressi per una configurazione confocale grazie all'utilizzo del diaframma: con un'apertura più piccola si ottiene una sezione ottica più sottile, tuttavia riducendo troppo le dimensioni del diaframma si rischia una perdita eccessiva di luminosità, pertanto è necessario trovare un buon compromesso. Normalmente <sup>[8]</sup> si variano le dimensioni dell'apertura in modo tale da raccogliere l'intero diametro del disco di Airy, tuttavia, se le sue dimensioni si riducono sino ad  $\frac{1}{4}$  del diametro del disco di diffrazione si ha una importante diminuzione della FWHM (larghezza a metà altezza) del pattern di diffrazione di un fattore pari proprio a 1.4.

La risoluzione laterale <sup>[7]</sup> di un microscopio confocale risulta, pertanto, pari a:

$$r_{\text{conf}} = 0.4 \frac{\lambda}{NA} . \quad (2.39)$$

In figura 2.4 si può osservare come la PSF confocale risulti una funzione più piccata proprio perché il limite di risoluzione imposto dalla (2.39) differisce dal valore definito da Rayleigh nella (2.38).

Sino ad ora è stata definita solo la risoluzione laterale, tuttavia, bisogna considerare anche la risoluzione lungo l'asse ottico, in quanto l'immagine di un punto non è perfettamente puntiforme ma ha una dimensione finita in tutte e tre le dimensioni in modo tale che l'immagine finale risulti una "macchia" sfocata tridimensionale.

La risoluzione assiale può essere definita come la minima distanza tra due punti lungo l'asse ottico, le cui immagini diffratte si possono ancora vedere come due punti distinti. E vale [7]:

$$r_{ax,conf} = \frac{1.4 n\lambda}{NA^2}, \quad (2.40)$$

dove  $n$  è l'indice di rifrazione del campione. La (2.40) rappresenta proprio la posizione in cui si forma il primo minimo della PSF lungo l'asse ottico. Pertanto due punti ugualmente luminosi lungo l'asse ottico e separati da una distanza pari a  $r_{ax,conf}$  sono risolti.

Dalla (2.40) è evidente anche una migliore risoluzione assiale si possa ottenere con grandi aperture numeriche e piccole lunghezze d'onda, tuttavia la dipendenza dall'inverso del quadrato dell'apertura numerica dell'obiettivo, mostra come sia proprio l'NA il parametro che offre il contributo maggiore nella definizione di risoluzione assiale, si noti inoltre, che questa dipendenza quadratica è dovuta a come è stato definito  $u$  nella (2.8), tale variabile è individuata dal rapporto  $(f/a)^2$ , che rappresenta proprio il quadrato dell'angolo  $\theta$  dell'apertura numerica della lente.

Sebbene la configurazione confocale determini un leggero miglioramento della risoluzione laterale rispetto ad un microscopio convenzionale, il vero vantaggio del confocale consiste nella possibilità di sezionamento ottico dovuta al fatto che la PSF, se valutata in funzione della profondità, presenta un massimo di intensità nel piano focale come si può osservare dalla figura 2.5. In particolare vale la proprietà seguente:

$$\int PSF_{conf}(0.6, v)vdv \approx 1/2. \quad (2.41)$$

Invece nel caso del microscopio tradizionale l'intensità integrata su ogni piano parallelo a quello focale è la stessa, ovvero:

$$\int PSF(u, v)vdv = \text{costante} \quad \forall u. \quad (2.42)$$

Condizione che rende impossibile la capacità di sezionamento ottico e che contribuisce alla diminuzione del contrasto.

## 2.6 Contrasto

Sino ad ora è stato oggetto di discussione il concetto di risoluzione di un microscopio e si è trascurato un altro aspetto importante che è il contrasto di un'immagine. L'occhio umano o i rivelatori artificiali, infatti, possono percepire le caratteristiche di un'immagine solo se registrano un contrasto.

Per generare contrasto il campione deve presentare una caratteristica intrinseca che determini variazioni dell'intensità rilevata, queste variazioni possono essere dovute alla presenza di strutture parzialmente o interamente opache o riflettenti o a variazioni di fase subite dalla radiazione che attraversa il campione o a meccanismi di fluorescenza.

Si definisce contrasto <sup>[9]</sup>, il rapporto tra la misura della massima variazione dell'intensità del segnale dell'immagine e il suo valore medio, ovvero:

$$C = \frac{\Delta I}{I} = \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max} + I_{min}} \quad (2.43)$$

$I_{max}$  e  $I_{min}$  rappresentano rispettivamente la massima e minima intensità rilevate.

Secondo il criterio di Rayleigh due punti sono risolti se tra questi esiste un contrasto del 26.5%, ovvero se il *dip*, come si può osservare in figura 2.7, assume un valore pari al 73.5% del massimo di intensità.

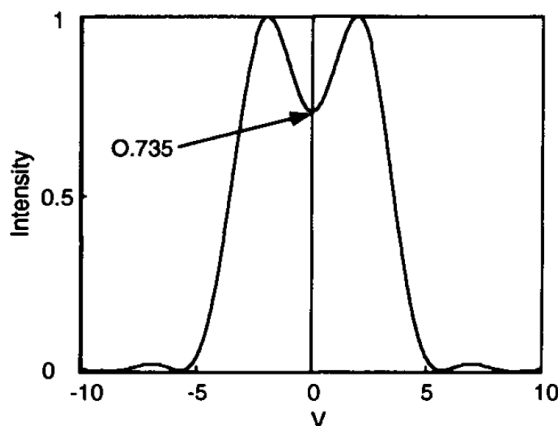


Figura 2.7: Il *dip* è il 73.5% della massima intensità, quindi tra i due punti esiste un contrasto del 26.5%.

[Corle, Kino, Confocal Scanning Optical Microscopy and Related Imaging Systems]

In figura 2.8 sono rappresentati due punti che si trovano alla stessa distanza di quelli di figura 2.7, ma caratterizzati da diversità intensità. Solo nel caso di illuminazione intensa è possibile distinguere i massimi secondari di diffrazione (figura 2.8 b)), in caso contrario non si è in grado di distinguere i due punti nonostante questi si trovino al limite di risoluzione. Pertanto è fondamentale che l'immagine presenti un contrasto definito.

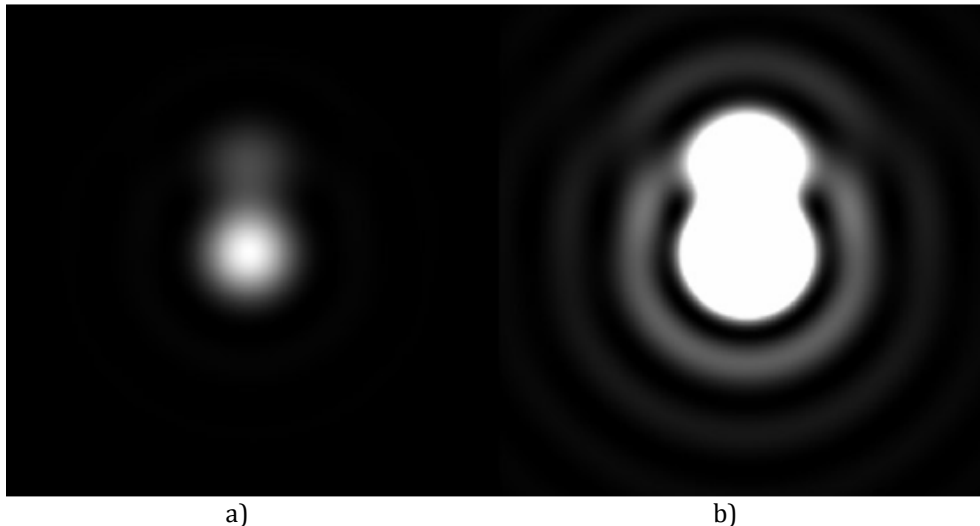


Figura 2.8: a) Due punti con diversa intensità al limite di risoluzione  
b) Due punti con diversa intensità al limite di risoluzione nel caso di illuminazione intensa.  
[Webb, Confocal optical microscopy]

Un microscopio confocale utilizza solo i raggi provenienti dal volume infinitesimo del campione posto nel piano coniugato a quello della sorgente e del rivelatore, davanti al quale vi è un diaframma regolabile, il contributo della luce diffusa viene in tal modo notevolmente ridotto, si ha pertanto un alto contrasto rispetto ad un microscopio tradizionale e si ottiene una piena risoluzione del sistema ottico.

## 2.7 Dimensioni del diaframma

Il diaframma, detto *pinhole*, <sup>[10]</sup> posto nel piano immagine del sistema è l'elemento fondamentale del microscopio confocale.

Questo semplice strumento, che svolge la funzione di filtrare i segnali che derivano dai piani fuori fuoco, è responsabile di diversi parametri tra cui lo spessore del piano focale, la risoluzione laterale (lungo l'asse  $x$ ), la luminosità dell'immagine, l'ipersensibilità al

fotodanneggiamento. È, pertanto, fondamentale fissare questo elemento all'interno del treno ottico e scegliere le dimensioni del diametro del foro nella maniera più opportuna.

Sia  $\Delta O$  la dimensione dell'oggetto ed  $M$  l'ingrandimento dell'obiettivo, la dimensione laterale dell'immagine è data da  $\Delta I = M \Delta O$  mentre la dimensione assiale, nell'ipotesi di lenti sottili risulta:

$$|\Delta I| \approx |\Delta O| M^2 \quad (2.44)$$

dove  $\Delta I \ll I$  ( $I$  = distanza dell'immagine) e  $\Delta O \ll O$  ( $O$  = distanza dell'oggetto).

Trascurando il limite di diffrazione, un oggetto con un'estensione assiale di 200 nm presenta una lunghezza di 2 mm nello spazio immagine con un ingrandimento pari a  $M=100$ . Se si considera la dipendenza di  $\Delta I$  dal quadrato di  $M$  allora la profondità di fuoco risulta grande, quindi la posizione assiale del diaframma non è particolarmente critica.

Se da una parte non è condizione necessaria porre il diaframma esattamente nel fuoco dell'obiettivo è importantissimo il suo allineamento laterale che deve presentare una precisione dell'ordine del micrometro.

Nel capitolo 2.5 si è detto che l'utilizzo di un'apertura regolabile consente di migliorare la risoluzione laterale in quanto, se opportunamente regolata, permette di sopprimere i lobi relativi ai massimi secondari e ai minimi, tuttavia diminuendo di molto le dimensioni del diaframma si rischia di non riuscire a distinguere l'immagine a causa di una eccessiva perdita di luminosità.

La massima dimensione del diaframma, definita in coordinate ottiche, non deve superare il valore di  $v_{P_{max}} = 2.5$  se non si vuole avere una diminuzione della risoluzione assiale, mentre per avere la massima risoluzione laterale le dimensioni del diaframma devono essere inferiori a  $v_{P_{max}} = 0.5$  come si può vedere in figura 2.9.

In pratica la dimensione del diaframma può raggiungere  $v_{P_{max}} = 4$  senza produrre cambiamenti significativi della risoluzione assiale, analogamente per valori sino a  $v_{P_{max}} = 2$  la risoluzione laterale non è alterata. In particolare, come si può osservare dalla figura 2.9, per valori di  $v_{P_{max}}$  superiori a 4 non si ha alcun aumento della risoluzione e il microscopio confocale si comporta come un microscopio tradizionale anche se il vantaggio derivante dal diaframma di filtrare i raggi provenienti dai piani fuori fuoco permane e rimane uno dei principali vantaggi rispetto alla microscopia tradizionale.



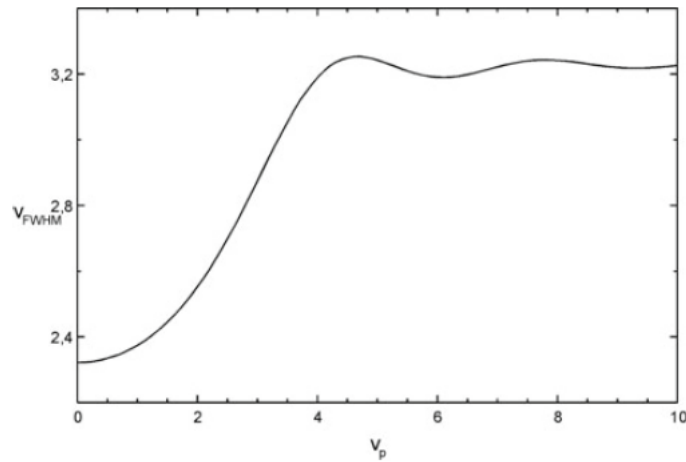


Figura 2.9: Risoluzione laterale di un punto oggetto in funzione del diametro del pinhole. [Thomas Dieing et al, Confocal Raman Microscopy]

È invece fondamentale che venga soddisfatta la condizione seguente:

$$\frac{M}{NA} \geq \frac{\pi d_0}{v_{P_{max}} \lambda} \quad (2.45)$$

dove  $M$  è l'ingrandimento,  $d_0$  il diametro del diaframma ed  $NA$  l'apertura numerica dell'obiettivo.

Il termine a sinistra della (2.45) è completamente definito dalla scelta dell'obiettivo e dal percorso del fascio. In tabella 2.1 il parametro  $M/NA$  è stato calcolato per alcuni tipici valori di obiettivi.

Objective	10/0.25	20/0.4	40/0.6	60/0.8	100/0.9	100/1.25	100/1.4
$M/NA$	40	50	67	75	111	80	71

Tabella 2.1: Valore di  $M/NA$  per differenti obiettivi. [Thomas Dieing et al, Confocal Raman Microscopy]

Il termine a destra della (2.45) è invece univocamente determinato dalla  $\lambda$  utilizzata e dal diametro del diaframma. In tabella 2.2 sono riportati i valori più frequenti di tale rapporto nel caso di  $v_{P_{max}}=2.5$ .

Wavelength (nm)	440	488	532	633	785
$d_0 = 10 \mu\text{m}$	29	26	24	20	16
$d_0 = 25 \mu\text{m}$	71	64	59	50	40
$d_0 = 50 \mu\text{m}$	142	129	118	99	80
$d_0 = 100 \mu\text{m}$	286	258	236	199	160
$d_0 = 200 \mu\text{m}$	571	515	472	397	320

Tabella 2.2: Valore di  $\frac{\pi d_0}{v_{P_{max}} \lambda}$  per differenti lunghezze d'onda e diametro del diaframma. [Thomas Dieing et al, Confocal Raman Microscopy]

Con l'aiuto di queste tabelle è possibile determinare la dimensione del foro più opportuna.

Ad esempio nel caso in cui si voglia utilizzare un obiettivo con un ingrandimento di 100× e una apertura numerica di 0.9 e una lunghezza d'onda di 633 nm, allora la dimensione ottimale del diaframma risulta pari a 50μm al fine di ottenere la massima risoluzione assiale e 10μm per la migliore risoluzione laterale.

Con un foro piccolo si ottiene una sezione ottica più sottile, migliora anche la risoluzione in profondità e il contrasto dell'immagine. Tuttavia, riducendo la dimensione del foro diminuisce anche l'intensità rilevata, è quindi necessario aumentare il tempo di esposizione del campione rispetto al caso di apertura con diametro maggiore. L'immagine acquisita con un foro più ampio è più luminosa. In ogni caso è necessario raggiungere un buon compromesso tra le dimensioni del diaframma e il valore dell'intensità che raggiunge il rivelatore.

In figura 2.10 è rappresentata l'intensità rilevata dal rivelatore normalizzata all'intensità totale, nel piano focale al variare del diametro del diaframma.

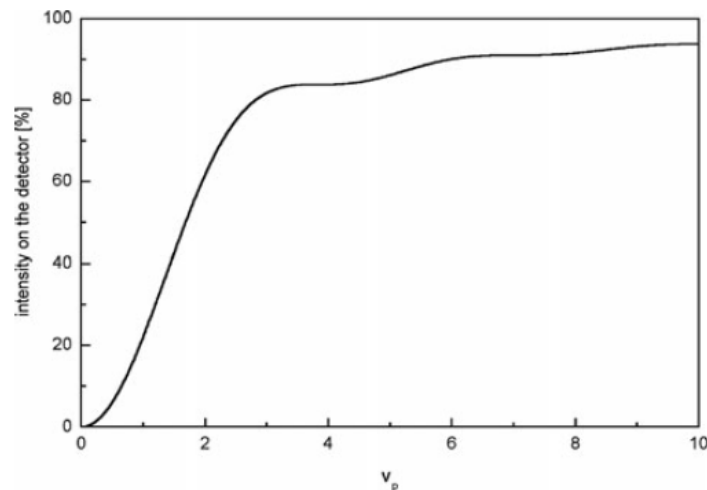


Figura 2.10: Intensità rilevata in funzione del diametro del pinhole.  
[Figura presa da Thomas Dieing et al, Confocal Raman Microscopy]

L'efficienza di rilevazione raggiunge il 75% per un  $v_{P_{max}} = 2.5$  (massima risoluzione assiale), mentre risulta pari a 6% per  $v_{P_{max}} = 0.5$  (massima risoluzione laterale).

## ***Capitolo 3***

### **Applicazioni in fluorescenza**

Nel capitolo precedente si è discusso di come il potere risolutivo di un microscopio confocale sia maggiore rispetto a quello di un microscopio ottico tradizionale, tuttavia, non è sufficiente che lo strumento abbia un elevato potere risolutivo, ma è necessario fare in modo che l'immagine finale risulti chiara, infatti, è importante riuscire a distinguere il campione dallo sfondo in cui si colloca, in quanto se il campione si confonde con lo sfondo non può essere visualizzato in modo appropriato.

Esistono differenti tecniche di contrasto: a campo chiaro, a campo scuro, contrasto di fase, contrasto di luce polarizzata, contrasto interferenziale, contrasto in fluorescenza.

In questo capitolo sarà descritta più dettagliatamente una tecnica di contrasto di intensità particolarmente diffusa in ambito biofisico.

La microscopia in fluorescenza con l'utilizzo di sonde fluorescenti in grado di interagire in modo altamente specifico con particolari target, permette di evidenziare con altissimo contrasto, le strutture o le molecole desiderate, consentendo di eseguire esperimenti con un'alterazione ridotta del campione biologico. Questa tecnica offre la possibilità di seguire l'evoluzione spazio-temporale di molecole, batteri, cellule o tessuti, ed ottenere importanti informazioni su campioni in cui l'indice di rifrazione è praticamente costante in tutti i punti del campione, fattore che non consente di utilizzare la tecnica alternativa del contrasto di fase. I campioni biologici vengono, pertanto, marcati con particolari molecole fluorescenti: i fluorofori, che contribuiscono ad un significativo aumento del contrasto dell'immagine.

Quando il preparato viene illuminato dalla sorgente le componenti fluorescenti del sistema emettono una radiazione di lunghezza d'onda maggiore rispetto a quella incidente, la differenza tra i due massimi è detta "*Stokes shift*" e varia a seconda della struttura molecolare da pochi nanometri a oltre diverse centinaia di nanometri.

Si noti, inoltre, che non è condizione necessaria l'eccitazione del fluoroforo ad una lunghezza d'onda che coincide esattamente con quella del massimo dello spettro di assorbimento.

Una sostanza fluorescente in un solvente omogeneo ha un solo spettro di fluorescenza indipendente dalla lunghezza d'onda di eccitazione.

### 3.1 Microscopio confocale ad epi-illuminazione in fluorescenza

Il microscopio utilizzato per l'osservazione di campioni naturalmente fluorescenti o legati a particolari sonde fluorescenti è rappresentato in figura 3.1 [8]. Si tratta di un microscopio confocale ad epi-illuminazione: sorgente e rivelatore sono entrambi nello stesso lato rispetto al piano del campione e separati da esso tramite una lente, che agisce sia come condensatore che come obiettivo.

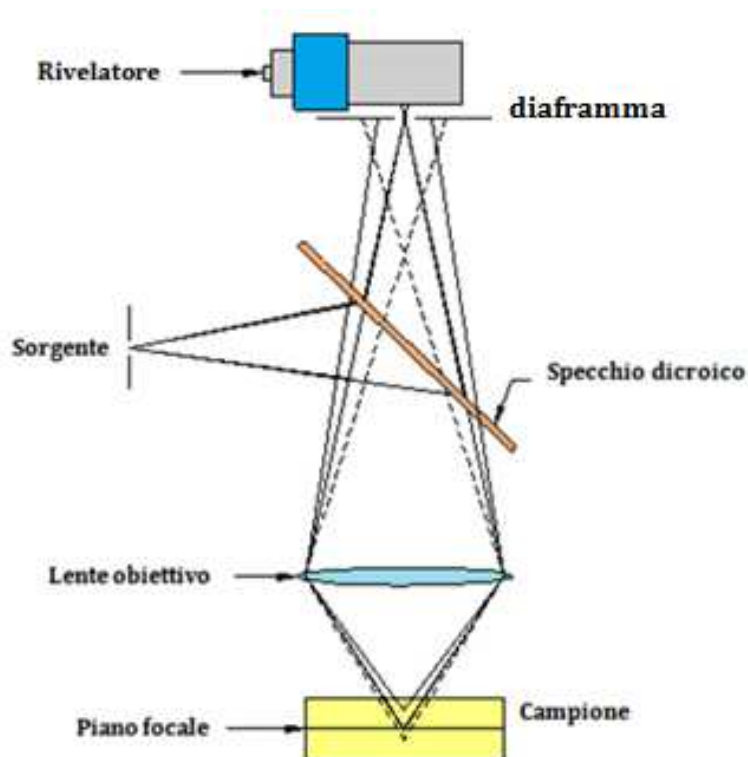


Figura 3.1: Microscopio confocale ad epi-illuminazione, solo i raggi provenienti dal piano focale raggiungono il rivelatore, tutti gli altri vengono filtrati dal pinhole.

Grazie a questa tipologia di microscopio non è più necessario sezionare fisicamente il preparato in sezioni sottili rischiando in tal modo di danneggiarlo o di perdere informazioni importanti.

Come sorgente luminosa può essere utilizzata una lampada alogena ad alta potenza, una lampada ad arco o scarica di gas, oppure diodi led o una sorgente laser. Il fascio di luce passa attraverso un filtro di eccitazione che seleziona la linea spettrale da utilizzare, viene in seguito deviato da uno specchio dicroico o *beam splitter*, infatti, questo se colpito a 45° riflette le lunghezze d'onda di eccitazione, risultando invece trasparente alle  $\lambda$  riemesse dal campione e caratterizzate da una lunghezza d'onda maggiore rispetto a quella del fascio incidente, la luce riflessa dallo specchio viene poi focalizzata dalla lente obiettivo.

Nella microscopia tradizionale, come si può osservare in figura 3.2 b), un ampio cono di luce investe una grande regione di volume del campione, di conseguenza l'emissione di luce da parte dei vari piani al di sopra e al di sotto di quello focale comporta una notevole diminuzione di contrasto dell'immagine. Questo problema viene quasi del tutto risolto nella configurazione confocale grazie all'utilizzo di un diaframma.



Figura 3.2: Confronto delle dimensioni del volume del campione illuminato da un obiettivo con stessa apertura numerica nel caso di microscopio tradizionale a) e microscopio confocale b).

A causa della ridotta area superficiale illuminata, l'acquisizione dell'immagine è di tipo puntuale, quindi al fine di ottenere una immagine di una intera sezione si può sia spostare il campione nel piano trasversale, sia spostare direttamente il fascio di luce in maniera tale da illuminare l'intero piano, posizionato alla profondità voluta.

Tale operazione è detta scansione ed è controllata da due specchi oscillanti guidati da un motore galvanometrico. Uno degli specchi sposta il fascio di luce da destra a sinistra lungo l'asse x, mentre l'altro trasla il fascio lungo la direzione individuata dall'asse y in modo tale da effettuare una scansione completa dell'intero piano focale. La velocità tipica degli specchi di scansione è di molto inferiore rispetto alla velocità della luce, pertanto l'emissione secondaria da parte del preparato segue un percorso lungo l'asse ottico che è identico al fascio di eccitazione originale.

Spostando, poi, il campione lungo l'asse verticale  $z$  al termine di ogni scansione, è possibile eseguire serie di scansioni successive corrispondenti a piani focali via via più profondi all'interno del campione stesso. Queste scansioni corrispondono alle differenti sezioni ottiche e la loro sovrapposizione ordinata, eseguita via software, consente di ricostruire un'immagine complessiva tridimensionale dell'intero volume soggetto all'operazione di scansione, in cui tutti i piani risultano contemporaneamente a fuoco.

Come rivelatore è solitamente utilizzato un fotomoltiplicatore, che trasforma le variazioni di intensità luminosa rilevate, in segnali elettrici di intensità proporzionale, infine il segnale analogico ad intervalli di tempo regolari viene convertito in un segnale digitale inviato ad un computer, che memorizza i valori di intensità misurati per ogni punto, successivamente utilizzati per ricostruire l'immagine sullo schermo.

### 3.2 Il diagramma di Jablonski

Il diagramma di Jablonski rappresentato in figura 3.3, schematizza i livelli elettronici di una molecola e i vari processi in cui può incorrere in seguito all'assorbimento di una radiazione di sufficiente energia.

Le molecole nello stato fondamentale si trovano quasi tutte in uno stato di singoletto, pertanto una molecola nello stato fondamentale  $S_0$ , a seguito dell'assorbimento di luce, viene eccitata ad uno dei suoi stati elettronici di singoletto ( $S_1, S_2, \dots$ ) in quanto l'eccitazione segue le leggi di selezione: sono permesse le transizioni in cui la differenza dei numeri quantici di spin totale dei due stati è pari a zero:  $\Delta S = 0$ .

In particolare l'assorbimento di un fotone con energia  $h\nu$ , pari alla separazione energetica tra i livelli accessibili agli elettroni della molecola stessa, porta alla transizione da uno stato di singoletto non eccitato  $S_0$  ad uno stato di singoletto eccitato  $S_1$  in un tempo dell'ordine di  $10^{-15}$  s. Quando gli elettroni passano, poi, da uno stato di energia maggiore ad uno stato di energia minore l'energia recuperata può venire emessa sotto forma di radiazione elettromagnetica. Questo fenomeno di tipo radiativo, tipico di molecole come i fluorofori, prende il nome di fluorescenza.

Lo stato di singoletto è uno stato elettronico caratterizzato da numero quantico di spin  $S = 0$ . Al numero quantico di spin totale contribuiscono solo gli elettroni di valenza, cioè quelli dello strato più esterno.

Un elettrone promosso ad uno stato eccitato, può avere lo spin parallelo o antiparallelo a quello dell'elettrone nello stato fondamentale, così ogni promozione può portare a due possibili stati, uno con spin totale  $S=1/2-1/2=0$  (stato di singoletto), l'altro con spin totale  $S=1/2+1/2=1$  (stato di tripletto), tuttavia, quest'ultima risulta una transizione proibita. Lo stato di tripletto ha energia di poco inferiore rispetto a quella di singoletto come si evince dalla figura 3.3.

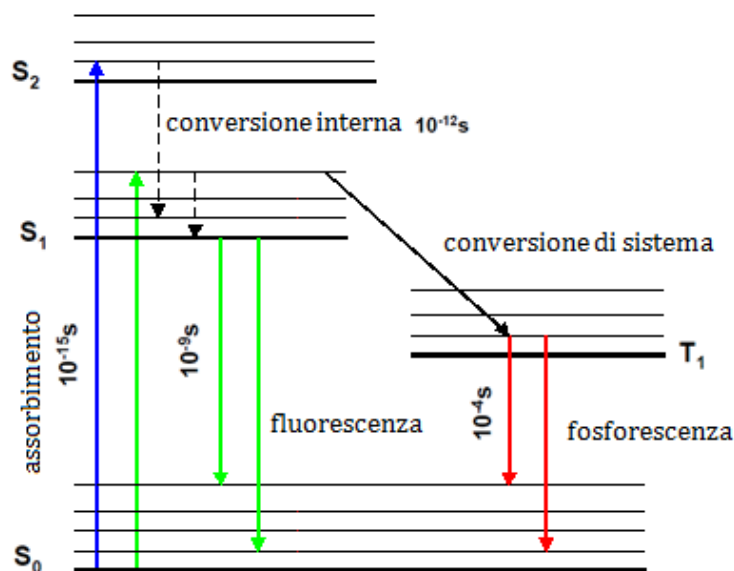


Figura 3.3: Diagramma di Jablonski.

Subito dopo l'assorbimento e il passaggio della molecola sullo stato eccitato, avviene una serie estremamente rapida di eventi non radiativi che rilassano l'energia cinetica in eccesso portando l'elettrone sul livello vibrazionale ad energia minore disponibile. Questo processo avviene in tempi dell'ordine di  $10^{-12}$  s.

Vi è inoltre la possibilità di un passaggio allo stato di tripletto (T<sub>1</sub>), altro processo non radiativo che è definito "conversione di sistema" (*Intersystem Crossing*) e che consiste in una inversione dello spin dell'elettrone determinata dalle interazioni con altre molecole o da processi intramolecolari.

Se la molecola emette un fotone ritornando dallo stato di singoletto eccitato S<sub>1</sub> a quello di singoletto fondamentale S<sub>0</sub> si ha fluorescenza. Questo processo avviene in tempi dell'ordine di  $10^{-9}$ - $10^{-8}$  s.

Si ha invece fosforescenza in seguito ad una transizione proibita tripletto-singoletto, che è caratterizzata da tempi di vita media dell'ordine di  $10^{-4}$  s.

### 3.3 Tempo di vita di fluorescenza e Resa Quantica

Il tempo di vita di fluorescenza  $\tau$  rappresenta il decadimento della distribuzione di intensità di fluorescenza.

Il rilassamento <sup>[2]</sup> da uno stato eccitato a quello fondamentale avviene mediante una legge di tipo esponenziale:  $I = I_0 e^{-kt}$ , dove  $I_0$  rappresenta l'intensità di fluorescenza all'istante iniziale, mentre  $k$  è una costante di decadimento, che presenta due contributi: una costante di decadimento radiativo  $k_r$  caratterizzata da un tempo di vita  $\tau_r$  e una costante di decadimento non radiativo  $k_{nr}$  caratterizzata da un tempo di vita  $\tau_{nr}$ , quindi:

$$k = k_r + k_{nr} = \frac{1}{\tau_r} + \frac{1}{\tau_{nr}} = \frac{1}{\tau} \quad (3.1)$$

Sperimentalmente viene misurato il tempo di vita media di fluorescenza  $\tau$  definito come il tempo in cui l'intensità di fluorescenza si riduce di  $1/e$ , ovvero del 37% circa. L'inverso del tempo di rilassamento è detto velocità di rilassamento  $1/\tau$ .

Si definisce "resa quantica di fluorescenza  $\Phi$ " (*quantum yield*) <sup>[2]</sup>:

$$\Phi = \frac{\tau_{nr}}{\tau_{nr} + \tau_r} = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (3.2)$$

In particolare,  $\Phi$  corrisponde al rapporto tra il numero di fotoni emessi  $N_e$  e il numero di fotoni assorbiti  $N_a$ :

$$\Phi = \frac{N_e}{N_a} \quad (3.3)$$

In assenza di decadimenti non radiativi  $\Phi$  vale 1, questo è il caso ideale in cui si ha solo emissione di fluorescenza, i fluorofori sono molecole in cui  $\Phi$  è circa uno, anche se il valore preciso è soggetto a variazioni dovute alla concentrazione di ioni, al valore del PH e alla polarità del solvente.

### 3.4 Applicazioni in fluorescenza

La posizione esatta e la natura delle interazioni tra le specifiche specie molecolari nelle cellule viventi è di grande interesse in molti settori della ricerca biologica, ma le indagini sono spesso ostacolate dalla limitata risoluzione degli strumenti impiegati per esaminare questi fenomeni. La microscopia tradizionale in fluorescenza consente la localizzazione di molecole



fluorescenti entro il limite ottico di risoluzione spaziale definito dal criterio di Rayleigh <sup>[11]</sup> (2.38), che risulta all'incirca pari a 200 nm. Questo è il valore calcolato per  $n=1.5$  (olio),  $\lambda=400$  nm (luce violetta) e per  $\theta=70^\circ$ ; se si usa come sorgente luminosa una fonte di luce ultravioletta ( $\lambda=280$ nm), la risoluzione scende a 0.1  $\mu\text{m}$ .

Tuttavia, la separazione tra due diverse molecole si può determinare con maggiore precisione rispetto ai tradizionali metodi ottici a fluorescenza, grazie alla variante confocale, introdotta sia per aumentare la risoluzione in generale, ma soprattutto per discriminare le informazioni a seconda della profondità, in modo tale da essere in grado di ricostruire immagini tridimensionali.

L'utilizzo di uno o più fluorofori per marcare punti precisi del campione contribuisce, inoltre, ad un notevole aumento del contrasto in campioni trasparenti con indice di rifrazione costante in tutti i punti.

Di seguito verranno presentate due tecniche molto diffuse: FRET e FLIM.

### 3.4.1 Trasferimento di energia per risonanza (FRET)

A partire dalla distribuzione di intensità di fluorescenza è possibile determinare l'organizzazione e la struttura più interna di cellule e tessuti, le cui sub-strutture possono essere marcate con più fluorofori di diverso colore.

Una <sup>[2]</sup> tecnica molto diffusa è quella del trasferimento di energia per risonanza (o FRET, dall'inglese *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), si tratta di un fenomeno di *quenching* che permette di caratterizzare con estrema precisione la distanza tra due molecole. Il principio fondamentale alla base di questo metodo sfrutta la presenza di due molecole fluorescenti, una detta donore D e l'altra accettore A: il donore viene eccitato ad una lunghezza d'onda specifica, tipicamente quella corrispondente al suo picco di assorbimento, l'energia di eccitazione viene trasferita in modo non radiativo alla molecola accettore vicina, che infine emette una radiazione alla sua lunghezza d'onda caratteristica e che viene rilevata dal microscopio.

Questo fenomeno del trasferimento di energia tra eccitazioni di singoletto è stato descritto nel 1959 da Theodor Förster: si assume che il trasferimento di energia avvenga tramite un'interazione di dipolo, ovvero l'eccitazione del donore D è descritta come un'oscillazione del dipolo elettrico D, se A è sufficientemente vicino sentirà il campo di dipolo di D ed il suo

dipolo entrerà a sua volta in oscillazione prima che un fotone venga emesso direttamente dalla molecola donore, emettendo quindi radiazione.

Si raggiunge il massimo trasferimento di energia se vi è una buona sovrapposizione dello spettro di emissione del donore e di quello di assorbimento dell'accettore, come mostrato in figura 3.4.

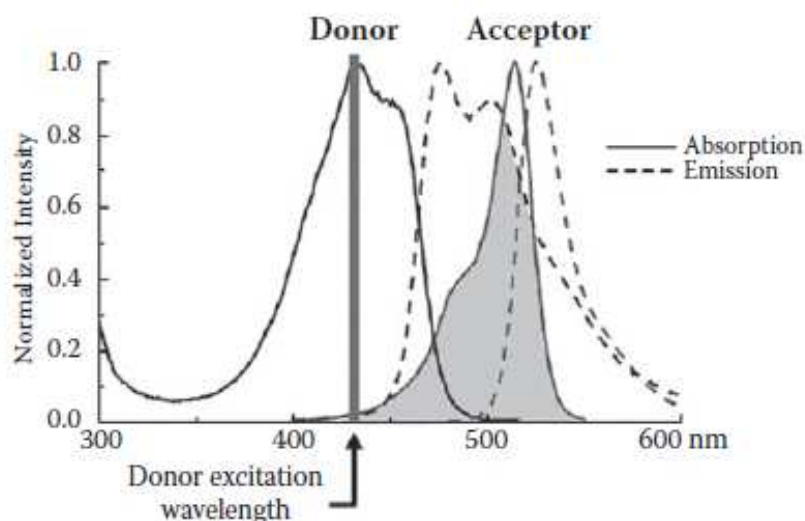


Figura 3. 4: Il trasferimento di energia per risonanza richiede che vi sia una significativa sovrapposizione tra lo spettro di assorbimento dell'accettore e lo spettro di emissione del donore. La freccia indica la lunghezza d'onda di eccitazione del donore. [Periasamy, Clegg, Flim Microscopy in Biology and Medicine]

Pertanto grazie ad un'opportuna scelta dei due fluorofori è possibile analizzare l'interazione tra macromolecole biologiche vicine (proteina-proteina, proteina-acido nucleico, proteina-lipide).

Poiché la distanza intermolecolare per la quale il trasferimento di energia può avvenire è limitata a qualche nanometro e l'efficienza di trasferimento è estremamente sensibile alla distanza di separazione tra i fluorofori, segue che misurazioni del trasferimento di energia per risonanza possono essere un valido strumento per sondare interazioni molecolari e definire i confini di separazione tra le due sub-strutture marcate con D e con A, con una risoluzione inferiore a quella consentita dallo strumento, poichè la risoluzione e il contrasto dipendono dalla differenza cromatica e non dalla diversa intensità emessa.

Si definisce distanza critica di Förster  $R_0$  [13], la distanza di massima separazione tra la molecola donore e accettore, per la quale si verifica ancora il trasferimento di energia di risonanza, in particolare corrisponde alla distanza donore-accettore in cui l'efficienza di trasferimento (3.5) si riduce del 50%. Il valore critico di questa distanza rientra solitamente nell'intervallo compreso tra 2 e 6 nm che corrisponde a diverse dimensioni biologicamente

importanti, come ad esempio lo spessore della membrana cellulare o alle dimensioni tipiche di molte molecole proteiche. Ad ogni modo il valore di  $R_0$  (in nanometri) può essere calcolato con la seguente espressione [12]:

$$R_0 = 2.11 \times 10^{-2} [\kappa^2 J(\lambda) \eta^{-4} Q_D]^{1/6} \quad (3.4)$$

in cui  $\kappa^2$  è un fattore che descrive il relativo orientamento nello spazio tra le transizioni di dipolo del donore e accettore,  $J(\lambda)$  rappresenta un integrale relativo alla regione di sovrapposizione degli spettri di emissione del donore e di assorbimento dell'accettore (con la lunghezza d'onda espressa in nanometri), mentre  $\eta$  rappresenta l'indice di rifrazione del mezzo, infine  $Q_D$  è la resa quantica del donore.

La distanza di separazione donore-accettore  $r$ , è data dall'equazione:

$$r = R_0 [(1/E_T) - 1]^{1/6} \quad (3.5)$$

dove  $E_T$  è l'efficienza del trasferimento di energia, che viene valutata come:

$$E_T = 1 - (\tau_{DA}/\tau_D) \quad (3.6)$$

con  $\tau_{DA}$  tempo di vita medio del donore in presenza di accettore, mentre  $\tau_D$  di quello del donore in assenza dell'accettore. Pertanto, tramite le misure di  $\tau_{DA}$  e  $\tau_A$  è possibile determinare immediatamente la distanza presente tra donore e accettore, infatti, sostituendo (3.6) in (3.5) si ottiene:

$$r = R_0 \left( \frac{\tau_{DA}}{\tau_D - \tau_{DA}} \right)^{1/6} \quad (3.7)$$

I fluorofori più usati nella FRET sono quelli della famiglia della GFP (Green Fluorescent Protein). La GFP è una proteina che è stata isolata da una medusa oceanica e che emette naturalmente un segnale fluorescente. Si tratta di molecole proteiche molto più maneggevoli dei classici fluorofori organici; la GFP, assieme alle molecole da essa derivate: RFP che emette nel rosso, BFP e CFP nel blu, YFP nel giallo, viene quindi fusa con la proteina da monitorare attraverso tecnologie di ingegneria genetica, viene quindi inserita in cellule di vario tipo al fine di rendere fluorescenti le cellule o i tessuti da esse composte o addirittura interi organismi. L'esistenza di differenti proteine fluorescenti (FP), che emettono a diverse  $\lambda$  permette, inoltre, di usarle in coppia (molto usate, in particolare, GFP in associazione con BFP).

Un fattore che contribuisce a migliorare la qualità della FRET è la concentrazione dei donori e degli accettori: i risultati migliori si ottengono, di solito, con una concentrazione limitata di

donori ed una molto maggiore di accettori (con la situazione limite di molti accettori che circondano un singolo donore).

### 3.4.2 Misura del tempo di vita medio di fluorescenza (FLIM)

Un'altra tecnica <sup>[2]</sup> ampiamente utilizzata è quella che si basa sulla misura del tempo di vita di fluorescenza (o FLIM, dall'inglese Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy).

Viene prodotta un'immagine sfruttando le differenze nel decadimento esponenziale della fluorescenza proveniente dai diversi punti del campione, quindi la FLIM dà informazioni importanti sull'ambiente cellulare da cui proviene il segnale. Ogni colorante fluorescente ha un proprio tempo di vita nello stato eccitato. Rilevando le differenze dei tempi di decadimento radiativo, è possibile distinguere anche coloranti aventi lo stesso colore fluorescente o identificare autofluorescenza.

Mentre nella FRET il contrasto è un contrasto cromatico, nella FLIM il contrasto nell'immagine è dato dal cambiamento della vita media di fluorescenza, che essendo uguale per le molecole dello stesso tipo è indipendente dalla concentrazione. Presenta, tuttavia, una dipendenza da fattori ambientali come la concentrazione di ossigeno, dalla concentrazioni di ioni idrogeno (PH), dal livello di idrofobicità, dall'interazione tra il fluoroforo e altre molecole, specialmente se queste danno vita al FRET.

Due <sup>[14]</sup> sono i metodi di misura tipici di questa tecnica: nel dominio del tempo e nel dominio della frequenza.

Nel primo caso, rappresentato in figura 3.5 b) il campione viene eccitato con luce impulsata molto più breve del tempo di vita di fluorescenza (<10ps) e si effettua direttamente una misura del tempo di decadimento della fluorescenza. Nel caso più semplice di decadimento esponenziale dell'intensità di fluorescenza,  $I(t)$  è data da:

$$I(t) = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}}, \quad (3.8)$$

con  $\tau$  che rappresenta il tempo di vita media di fluorescenza, generalmente dell'ordine di nanosecondi; questa tecnica consente di eliminare quasi del tutto il *background* dovuto allo scattering: basta introdurre un ritardo temporale tra l'impulso di eccitazione e l'istante in cui si inizia a rilevare la fluorescenza.

Nel secondo caso, raffigurato in figura 3.5 a) si eccita il campione con luce di intensità modulata e si misura lo sfasamento della emissione modulata di fluorescenza. In particolare

tra l'onda di risposta e la forma d'onda del segnale di eccitazione vi è uno spostamento pari a  $\Phi$ , che a sua volta è collegato al tempo di vita media di fluorescenza  $\tau$  dalla relazione [13]:

$$\tan\Phi = \omega\tau \quad (3.9)$$

Se invece si considera la modulazione di ampiezza  $M=(B/A)/(b/a)$  si può ottenere una misura di  $\tau$  dalla relazione:

$$\tau = \omega^{-1} (M^2 - 1)^{1/2} \quad (3.10)$$

con  $\omega$  frequenza di modulazione.

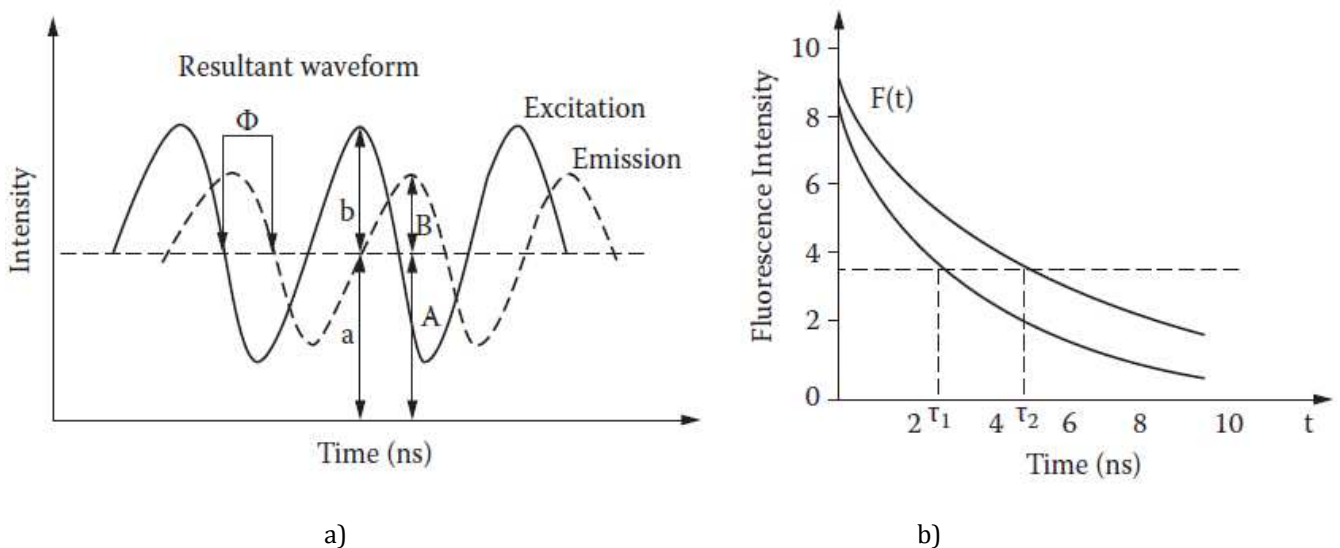


Figura 3.5: Metodi di misura usati nella FLIM: nel dominio della frequenza a) e nel dominio del tempo b). [Periasamy, Clegg, Flim Microscopy in Biology and Medicine]

Questa tecnica viene spesso utilizzata insieme alla tecnica FRET in quanto consente un'analisi simultanea del donore e dell'accettore.

In figura 3.6 sono rappresentate alcune immagini che mostrano evidenti differenze tra l'acquisizione avvenuta per mezzo di un microscopio ottico tradizionale in fluorescenza (riquadri superiori) e quelle ottenute utilizzando un microscopio confocale (riquadri inferiori).

Nel caso del confocale i contributi provenienti dai piani fuori fuoco vengono filtrati dal diaframma posto davanti al rivelatore, mentre l'utilizzo di fluorofori determina un notevole

aumento del contrasto. Questa combinazione di fattori rende le immagini dei campioni molto più nitide e ricche di dettagli distinti.

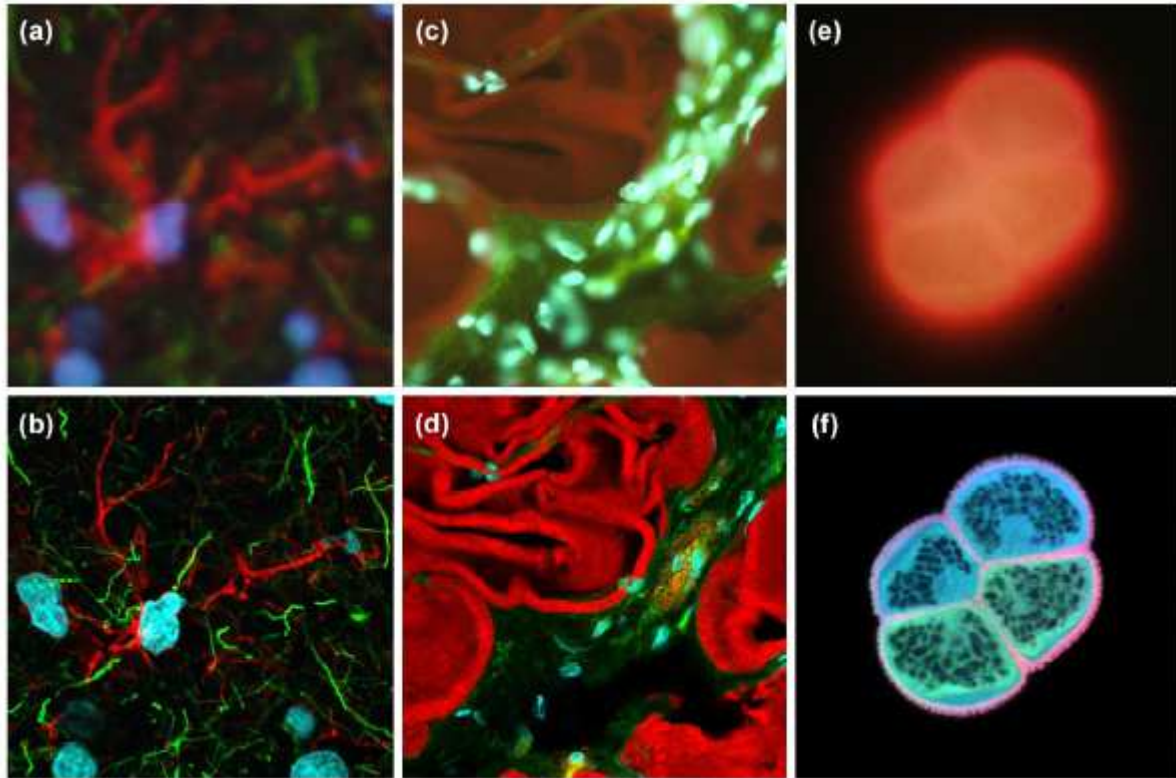


Figura 3.6: a) e b) Sezione spessa 16  $\mu\text{m}$  di ippocampo di topo.  
c) e d) Sezione di fibre di muscolo di topo.  
e) e f) Granello di polline di girasole.

[Claxton et al, Laser Scanning Confocal Microscopy]

## ***Conclusioni***

In questo lavoro di tesi si è discusso dei principi fisici della microscopia confocale.

In particolare, è stato evidenziato come il massimo ingrandimento di un microscopio ottico tradizionale venga limitato dalle leggi della diffrazione ed è stata descritta la distribuzione dell'intensità nel piano immagine. In seguito è stata presentata una descrizione dettagliata della distribuzione di intensità tridimensionale o *Point Spread Functions* (PSF) in prossimità del fuoco e lungo l'asse ottico e confrontate le differenti distribuzioni nel caso di un microscopio ottico tradizionale e confocale.

La configurazione confocale, grazie all'introduzione di un semplice diaframma, posto davanti al rilevatore, permette non solo di ottenere un leggero aumento della risoluzione, ma soprattutto comporta un notevole aumento del contrasto dell'immagine, in quanto consente di filtrare i contributi della luce diffusa, provenienti dai piani fuori fuoco del campione, infatti, in un microscopio ciò che più conta oltre al potere risolutivo è che l'immagine risulti chiara e distinta dal fondo. La capacità di discriminare le informazioni a seconda della profondità consente inoltre di effettuare una ricostruzione tridimensionale delle immagini.

Infine è stato evidenziato come l'introduzione del microscopio confocale in epi-illuminazione, abbia dato un notevole contributo a quel ramo della microscopia ottica che utilizza la fluorescenza come tecnica di contrasto, migliorando le indagini in ambito biologico e biomedico.

# ***Bibliografia***

- [1] M.T.Chiaiaia, L.Guerriero, G.Selvaggi, *Fisica II: Onde elettromagnetiche*, Capitolo 6, Editrice Adriatica,
- [2] P.Prasad, *Introduction to Biophotonics*, Capitolo 4; 7, Wiley Interscience
- [3] J.Goodman, *Introduction to Fourier Optics*, Capitolo 4, McGraw-Hill
- [4] M.W. Davidson<sup>1</sup> and M.Abramowitz<sup>2</sup>, *Optical Microscopy*
- [5] M.Born, E.Wolf, *Principles of optics*, Capitolo 8, Cambridge University press, 1999
- [6] Robert H Webb, *Confocal optical microscopy*, 1996 IOP Publishing Ltd
- [7] N.S. Claxton, T. J. Fellers, and M.W.Davidson, Laser scanning confocal microscopy
- [8] D. B. Murphy and M. W. Davidson, *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*, Second Edition, Capitolo 13, 2013 Wiley-Blackwell. Published 2013 by John Wiley & Sons, Inc
- [9] G.S.Kino, T.R.Corle, *Confocal scanning optical microscopy and related imaging systems*, Capitolo 1, Academic Press
- [10] T.Deing, O.Hollricher, J.Toporski, *Confocal Raman Microscopy*, Capitolo 1, 2011, Springer
- [11] D.B. Hovis & A.H. Heuer, The use of laser scanning confocal microscopy (LSCM) in materials science, *Journal of Microscopy*, Vol. 240, Pt 3 2010, pp. 173–180
- [12] <http://www.olympusfluoview.com/applications/fretintro.html>
- [13] A. Periasamy, R.M.Clegg, *Flim Microscopy in Biology and Medicine*, Capitolo 2, CRC Press
- [14] <http://www.olympusfluoview.com/applications/flimintro.html>



## ***Ringraziamenti***

Ogni lavoro prende forma e vita grazie a qualcuno. A un sostegno, a un suggerimento, a un semplice incontro. Ogni cammino si porta inevitabilmente dietro una scia di piccoli e grandi debiti e generosità che è giusto riconoscere.

Sento perciò di dover ringraziare innanzitutto il professor Maurizio Dabbicco per la sua professionalità, disponibilità e per avermi lasciato un'ampia autonomia nell'affrontare i vari argomenti.

Voglio ringraziare Katia per l'amicizia e complicità che mi ha dimostrato in questi anni, un grazie particolare va ad Annamaria per aver sopportato i miei altalenanti umori e per i suoi preziosi consigli. Desidero infine ringraziare Vito per la sua feroce trasparenza e infinita pazienza, per il suo puntiglio e rigore scientifico che mi ha consentito di risolvere ogni genere di dubbi e incongruenze permettendomi di arrivare fino alla fine di questo percorso. A lui vorrei esprimere la mia riconoscenza.