



Sunto proposta

Progetto di un microscopio ottico a scansione

Il microscopio ottico è uno strumento in cui l'osservazione dell'oggetto è realizzata utilizzando la luce emessa da un apparato illuminatore.

La tecnica che sfrutta tale strumento è da alcuni secoli considerata fondamentale in numerosi campi dell'analisi scientifica. Uno dei motivi che la rende così importante consiste nel fatto che il microscopio ottico è l'unico apparato (assieme al microscopio acustico) che permette l'osservazione in vivo di moltissimi fenomeni micro-biologici, che non sarebbero dunque osservabili con altri tipi di microscopi, i quali, pur garantendo una risoluzione migliore, basano il loro funzionamento su preparazioni dei campioni che provocano la denaturazione dei tessuti o degli organismi esaminati.

L'osservazione in vivo è talmente importante da aver costretto la continua evoluzione di questo apparato. Si è infatti passati, nel corso degli anni, dal microscopio ottico convenzionale al più efficiente, ma molto costoso, microscopio confocale, per giungere infine ai giorni nostri al microscopio con fluorescenza a due fotoni.

Nel microscopio ottico convenzionale l'intero campione viene illuminato uniformemente dalla radiazione incidente. La luce trasmessa attraverso il campione viene raccolta dall'obiettivo e va a formare un'immagine dell'oggetto sul piano immagine, quindi viene raccolta dall'oculare che la ingrandisce.

Il problema della microscopia ottica convenzionale è che sul piano immagine si trovano i contributi di punti provenienti da diversi piani del campione: quello a fuoco e quelli fuori fuoco. Il campione quindi deve essere sottile, o essere costituito da elementi "sparsi", in modo che l'immagine di un elemento non vada a confondersi con quella degli altri. L'immagine che si ottiene è ulteriormente degradata dal fatto che la luce proveniente da un piano a fuoco interno al campione può non arrivare all'obiettivo direttamente, ma dopo riflessioni e diffusioni ad opera delle strutture che si trovano lungo il cammino ottico verso l'obiettivo. L'osservazione al microscopio ottico, soprattutto a forti ingrandimenti, soffre quindi di una limitata profondità di campo. Per questo i campioni, anche quando si utilizzano mezzi trasparenti, devono essere finemente affettati o comunque disposti su un singolo strato.

Così facendo però, si perdono importanti informazioni sulle strutture tridimensionali.

Il microscopio confocale nasce negli anni '50 grazie a Marvin Minsky, il padre dell'intelligenza artificiale, che ha ideato questa tecnica con lo scopo di visualizzare le complesse connessioni tridimensionali dei neuroni nel cervello umano. La tecnica ha visto il suo completo compimento solo alla fine degli anni '60, quando è stato utilizzato come sorgente per il microscopio un laser, in grado di fornire la potenza luminosa necessaria al corretto funzionamento dell'apparato.

Rispetto al microscopio convenzionale, il confocale presenta un enorme vantaggio: permette di eliminare quasi completamente i punti del campione che si trovano al di fuori del fuoco e di conseguenza non si ha più la necessità di utilizzare campioni sottili e/o con pochi elementi sparsi.

In un microscopio confocale ad epi-illuminazione il campione viene illuminato un punto per volta mediante una maschera dotata di un forellino (detto pinhole) che lascia passare solo un piccolo fascio di luce. Tale luce viene focalizzata dall'obiettivo sul punto del campione situato alla profondità desiderata. La luce riflessa (o riemessa nei casi più moderni di microscopio a



fluorescenza) dal campione torna attraverso l'obiettivo, viene deviata rispetto al cammino dell'onda incidente da un separatore di fascio (da uno specchio dicromatico nel caso di fluorescenza), e infine attraversa un secondo pinhole, posto esattamente in corrispondenza del fuoco del fascio, prima di arrivare alla superficie di rivelazione. In questo modo si ottiene un'immagine pressoché perfetta della zona desiderata, non disturbata dalla diffusione della luce proveniente dalle aree non a fuoco. Poiché viene illuminato un solo punto del campione per volta, o il campione o il fascio devono essere spostati in modo da permettere l'illuminazione di tutto il campione, punto per punto (microscopio a scansione).

La ricostruzione tridimensionale può in questo microscopio senza distruzione e comunque senza la necessità di preparare campioni in modo molto complicato.

Il problema del microscopio confocale è che solo una parte minima della luce riflessa dal campione riesce a tornare indietro lungo la direzione giusta per rientrare nel pinhole, quindi bisogna illuminare con una forte intensità il campione per ottenere un segnale significativo sul rivelatore; è necessario che la sorgente sia quindi una sorgente laser. Così facendo, però, l'elemento di indagine viene investito da una potenza molto elevata, che lo può al limite danneggiare, o determinare fenomeni di accecamento (photobleaching) nei campioni trattati con fluorofori, fenomeni che interessano tutto il "doppio cono" del campione investito dalla radiazione incidente.

Non ultimo problema il costo elevato: questo limita la diffusione a pochi laboratori che si possono permettere la spesa di acquisto e manutenzione dell'apparecchiatura, nonché del personale in grado di operare su di essa.

Una successiva evoluzione dell'apparato microscopico confocale prevede l'eccitazione a due fotoni del preparato: due fotoni di energia appropriata che interagiscono con la molecola in un intervallo temporale brevissimo la portano in uno stato eccitato; il ritorno allo stato fondamentale avviene con l'emissione di un singolo fotone in tempi dell'ordine del nanosecondo.

L'intensità di fluorescenza in questo caso dipende in modo quadratico dalla intensità dell'illuminazione, ed è quindi maggiore in prossimità del fuoco: l'eccitazione della fluorescenza a due fotoni seleziona così in modo naturale e senza necessità di pinhole la sezione del campione che viene esaminata. Le sorgenti utilizzate devono essere laser ad impulsi ultracorti, che assicurano un'intensità di radiazione sufficientemente elevata da eccitare la risposta non lineare.

Un altro vantaggio è determinato dal fatto che, per eccitare una fluorescenza nell'ultravioletto-visibile, la radiazione incidente è nella regione dello spettro corrispondente al rosso o all'infrarosso; le lunghezze d'onda elevate di tale radiazione assicurano danni inferiori ai tessuti biologici ed una profondità di penetrazione più elevata.

La resa del processo (rapporto tra radiazione riemessa e radiazione incidente) è molto bassa. Inoltre, poiché la lunghezza d'onda della radiazione incidente è circa il doppio di quella che viene utilizzata per eccitare il fenomeno della fluorescenza a un fotone, le risoluzioni spaziali (sia in senso trasversale che in senso longitudinale rispetto alla direzione del fascio di luce) sono circa la metà di quelle ottenibili con la fluorescenza a un fotone. Questa minore risoluzione viene però compensata dalla non linearità del fenomeno di eccitazione, che contribuisce positivamente limitando la diminuzione del volume attivo.

I vantaggi dello sfruttamento della fluorescenza a due fotoni sono innegabili: il limite degli apparati attualmente in commercio è determinato dal fatto che spesso non sono progettati e costruiti ex-novo, ma sono un riadattamento (o una possibilità di utilizzo alternativa) di microscopi confocali, nei quali viene rimossa, esclusa o modificata la parte relativa al posizionamento dei pinhole. Si ha quindi a che fare con apparecchiature che hanno comunque un costo molto elevato e che richiedono



l'intervento di personale esperto in grado di adattare l'ottica alle differenti caratteristiche dei campioni da analizzare o delle sorgenti utilizzate.

Lo scopo della ricerca qui proposta è quello di realizzare un microscopio ottico non lineare con prestazioni analoghe ai sistemi attualmente disponibili, che presenti però caratteristiche di compattezza e costo che lo rendano competitivo per applicazioni industriali o medico biologiche.

Prevedendo di utilizzare il fenomeno della fluorescenza a due fotoni, non sono previsti pinhole nella struttura ottica, per cui l'apparecchiatura risulta semplificata rispetto a quella di un microscopio confocale. Il sistema può anche essere utilizzato sfruttando i fenomeni di riflessione e di fluorescenza ad un fotone, accettando in questo caso la risoluzione spaziale relativa.

Il microscopio nel suo complesso consta di un laser a impulsi ultracorti progettato ad hoc nel laboratorio Sorgenti Laser, di un'ottica di focalizzazione del fascio laser, di un sistema composto da due specchietti ad elevata riflettività montati su motori galvanometrici che permettono la scansione bidimensionale del campione, di un sistema in grado di movimentare il campione lungo l'asse focale con elevata precisione, di un sistema elettronico di controllo della scansione, acquisizione del segnale generato dal campione, gestione e visualizzazione dell'immagine.

Esiste già nel Laboratorio Sorgenti Laser dell'Università di Pavia un apparato prototipale in grado di illuminare un campione per righe e visualizzare l'immagine relativa a una sorgente HeNe (riflessione). L'apparato è in grado di movimentare il campione nel senso di propagazione del fascio con passi di 1 μm in modo da acquisire immagini di piani differenti. La risoluzione dell'apparato nel senso trasversale del fascio, su campioni microelettronici progettati appositamente, è pari a circa 0.6 μm .

Il nuovo apparato oggetto di questa ricerca si propone i seguenti scopi:

- progettazione della porzione ottica per garantirne la modularità rispetto alla scelta degli obiettivi
- progettazione della porzione ottica e meccanica in modo da analizzare campioni posti in modo orizzontale (il campione è allo stato attuale montato in modo verticale, il che non permette la scansione di campioni liquidi)
- progettazione della porzione meccanica in modo da garantire una movimentazione del piano a fuoco con passi inferiori all'attuale μm
- riduzione delle dimensioni dell'apparato (attualmente il volume occupato è circa 1 m^3)
- progettazione dell'elettronica di controllo dei motori galvanometrici in modo da poter scegliere la traiettoria del fascio sul campione (gli scopi che si vogliono raggiungere sono quelli di ottimizzare la velocità di scansione rispetto a quella massima ottenibile dai motori, e un maggior controllo da parte dell'utente, che può scegliere le porzioni di campione da visualizzare)
- progettazione del software per la ricostruzione dell'immagine in relazione con il controllo di scansione effettuato.

Un altro scopo dell'intero progetto è il costo stesso dell'apparato. In funzione di una successiva ingegnerizzazione/commercializzazione, al fine di garantirne la diffusione su un mercato più ampio rispetto agli attuali confocali, si prevede di porre particolare attenzione al costo complessivo dell'apparato.