

MICROSCOPIA CONFOCALE

La microscopia confocale è una tecnica ottica principalmente utilizzata per lo studio tridimensionale di strutture biologiche isolate o in situ.

Il sezionamento ottico di un sistema biologico consiste nella raccolta di una serie di immagini di piani paralleli, spostando il fuoco dell'obiettivo lungo un asse che generalmente coincide con l'asse di propagazione della luce.

Per ottenere una perfetta rappresentazione di un singolo piano del campione, si dovrebbe idealmente raccogliere soltanto la luce proveniente da quel particolare piano; poiché tuttavia, anche i piani sovrastanti e sottostanti emettono luce, vi è una perdita di nitidezza dell'immagine.

La chiave del successo della tecnica confocale consiste nella rimozione delle interferenze provenienti dai piani adiacenti a quello ove si è focalizzati, mediante l'uso del cosiddetto pinhole. La microscopia confocale usa, per eccitare le molecole, una sorgente luminosa molto intensa, il laser. La luce emessa dai fluorocromi eccitati dal laser viene catturata dalle lenti dell'obiettivo, attraversa lo specchio dicroico e raggiunge il fotomoltiplicatore, che trasforma l'intensità luminosa in un segnale elettrico di intensità proporzionale (*Fig. 8*). Tra lo specchio dicroico ed il fotomoltiplicatore, il fascio luminoso attraversa un diaframma, o pinhole, che impedisce alla luce proveniente dalle zone fuori fuoco di raggiungere il fotomoltiplicatore. In questo modo solo il segnale luminoso relativo al piano di fuoco viene registrato e utilizzato nella formazione dell'immagine finale. Il risultato è un'immagine poco disturbata dalla diffusione della luce delle zone non a fuoco.

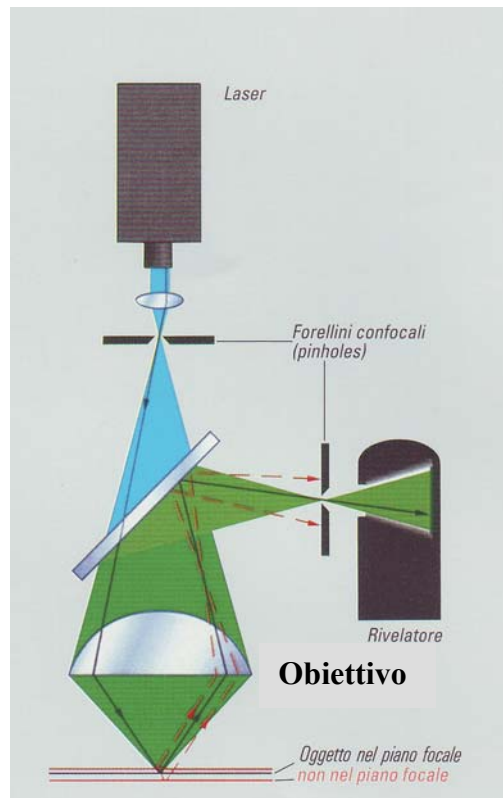


Figura 8. Rappresentazione schematica del principio di funzionamento del microscopio confocale.

Di fatto, oltre al pinhole per la luce emessa, viene utilizzato anche un pinhole per la luce di eccitamento, in modo da illuminare solo una porzione microscopica del campione, aumentando il contrasto. Per ottenere la rappresentazione non di una porzione microscopica del campione ma di un intero piano, si muove il fascio di luce lungo il campione di punto in punto, in modo che tutto il piano situato alla profondità voluta venga illuminata dal fascio di luce secondo una precisa sequenza. Questo processo viene detto scansione. Per aumentare la velocità di acquisizione delle immagini, alcuni microscopi muovono il fascio di luce mediante specchi mobili che dirigono la luce incidente verso il campione in una scansione regolare. Questi specchi rendono possibile la ricostruzione dell'immagine in meno di un secondo.

Il segnale elettrico in uscita dal fotomoltiplicatore viene quindi digitalizzato ed inviato ad un computer che registra i valori di intensità misurati per ogni punto. Questi valori vengono utilizzati per ricostruire l'immagine: ogni punto corrisponde ad un pixel dello schermo, e l'intensità luminosa del punto verrà rappresentata da una corrispondente tonalità di grigio. L'accostamento di tutti i singoli pixel corrispondenti a punti scanditi dal fascio laser nel campione darà così l'immagine finale. Spostando lungo l'asse verticale il campione dopo ogni scansione, è possibile eseguire una

serie di scansioni successive corrispondenti ai piani focali via via più profondi all'interno del campione.

Queste scansioni prendono il nome di sezioni ottiche e la loro sovrapposizione ordinata, eseguita via software, consente di ricostruire un'immagine complessiva dell'intero volume scandito, in cui tutti i piani sono contemporaneamente a fuoco.

L'archiviazione su computer di tutti i dati corrispondenti ai pixel delle singole sezioni ottiche consente di eseguire elaborazioni delle immagini, quali la visualizzazione tridimensionale dell'oggetto. (Fig. 9)

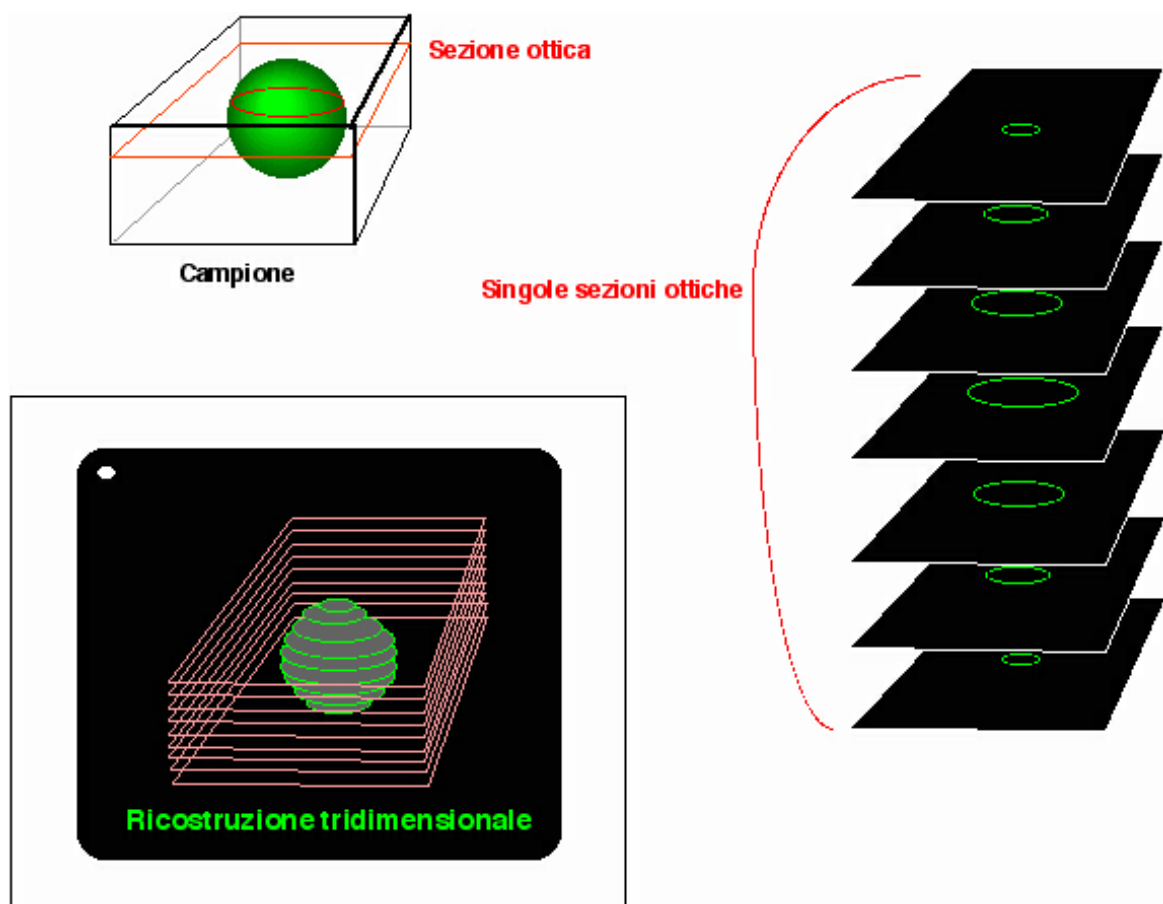


Figura 9. Ricostruzione tridimensionale del campione.

I programmi per l'elaborazione di immagini non registrano, quindi, soltanto la luminosità di ciascun punto, ma anche la sua localizzazione nel campione, cioè la sua posizione in un piano e la sua profondità: i punti definiti dalle tre coordinate, (x, y, z) , detti voxel, costituiscono l'equivalente tridimensionale dei pixel di un'immagine bidimensionale.

I programmi per l'elaborazione delle immagini possono combinare i voxel per produrre ricostruzioni tridimensionali di oggetti microscopici e possono manipolarli per ruotare le immagini ricostruite lungo un asse e vederle da una prospettiva più favorevole. In figura 10 è mostrata una suggestiva immagine ottenuta mediante un sistema confocale, che mostra il nucleo ed i pori nucleari.

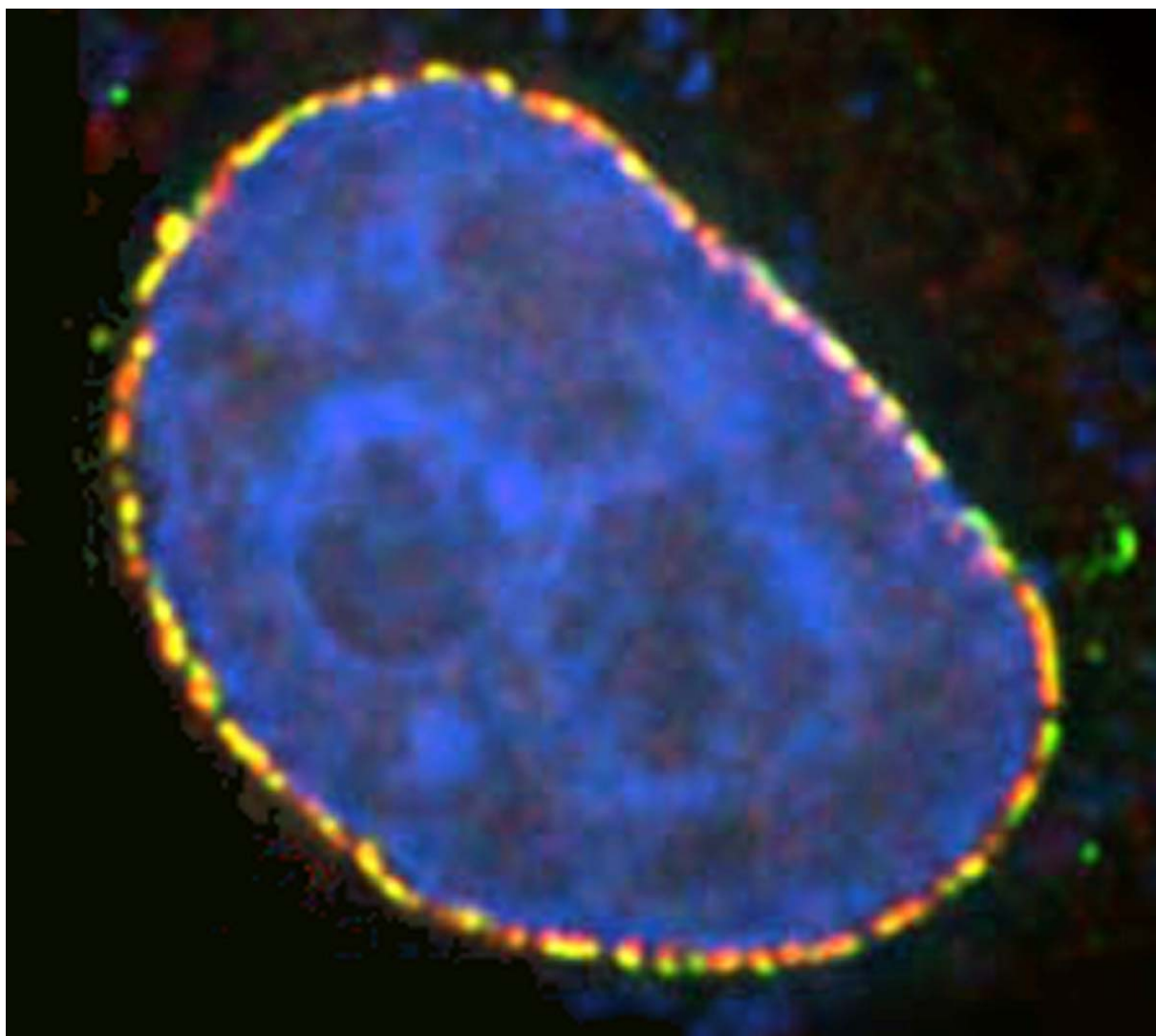


Figura 10. Pori nucleari visualizzati tramite microscopia confocale.