

Candidato: Pietro Ricci

Relatore: Ludovico Silvestri (silvestri@lens.unifi.it)

Correlatore: Francesco Saverio Pavone (francesco.pavone@unifi.it)

Titolo: Implementazione di un sistema di illuminazione di Bessel in un microscopio a foglio di luce per l'*imaging* di interi cervelli di roditore

Riassunto dell'elaborato:

La ricostruzione tridimensionale dell'intero cervello con risoluzione subcellulare è uno dei grandi obiettivi che le neuroscienze oggi si pongono. Ciò permetterebbe di capire, con sempre più accuratezza, i processi biologici che caratterizzano il sistema nervoso centrale.

La microscopia in fluorescenza è una tecnica fondamentale in questo ambito di ricerca: infatti, è proprio la specificità nel selezionare solo gli elementi biologici desiderati, che rende questa tecnica tanto precisa, quanto estremamente utile in microscopia. Per riuscire poi a ricostruire tridimensionalmente il campione, si effettua su questo un sezionamento ottico. Per farlo abbiamo utilizzato un microscopio a foglio di luce che permette un'alta velocità di acquisizione rispetto ad altri metodi comunemente usati. In questa tecnica si illumina il campione ortogonalmente alla direzione di rivelazione, proiettando un sottile foglio di luce su di esso.

Nel mio percorso di tesi ho poi implementato un sistema per l'illuminazione del campione in microscopia a foglio di luce con fasci di Bessel, alternativo a quello gaussiano, ed il loro inserimento in un apparato sperimentale usato per l'*imaging* di cervelli interi di roditore. Questo tipo di illuminazione risulta utile per osservare la propagazione di un fascio in un mezzo non omogeneo grazie alla sua capacità auto-ricostruente. Inoltre permette di incrementare la risoluzione assiale, di dare maggiore uniformità all'illuminazione, di correggere una non omogeneità nella larghezza del foglio di luce e di superare una limitata profondità di fuoco dei fasci gaussiani. Procedendo ad un confronto tra i due tipi di illuminazione, ho osservato l'effettiva applicabilità dei fasci di Bessel su campioni macroscopici e ho analizzato le problematiche riscontrate, facendo costante riferimento alle immagini raccolte ed ai risultati. Seppur siano presenti forti aberrazioni nel cammino ottico, i fasci di Bessel danno comunque dei buoni risultati in termini di risoluzione assiale. Per quanto riguarda la qualità dell'immagine, i fasci di Bessel si sono dimostrati utili nella rimozione delle ombre, presenti nella microscopia a foglio di luce con fasci gaussiani. A farne le spese ne è il SNR, che risulta circa tre volte maggiore nell'illuminazione gaussiana, rispetto a quella di Bessel. Infine, da un'analisi su una zona esente da evidenti picchi di segnale neuronale, notiamo comunque una maggiore omogeneità nel profilo di intensità di un fascio di Bessel e un maggior rumore di back-ground per il fascio gaussiano.