

Riassunto

Correlatore: Prof. Francesco Saverio PAVONE

Relatore: Dott. Leonardo SACCONI

Candidato: Tommaso ALTERINI

In questa tesi è stato sviluppato e caratterizzato un microscopio a foglio di luce a fluorescenza per l'imaging *in vivo* di campioni animali con risoluzione cellulare. Nella microscopia a foglio di luce si seziona otticamente il campione confinando l'illuminazione in un foglio di luce con spessore ben definito e raccogliendo la fluorescenza emessa con un obiettivo posto ortogonalmente al piano illuminato. Questo sezionamento ottico porta ad un miglioramento del contrasto riducendo la luce fuori fuoco e ad una diminuzione del fotodanneggiamento illuminando solo una porzione ristretta del campione. Nell'apparato descritto in questa tesi ho sviluppato e caratterizzato due sistemi di illuminazione diversi: uno che sfrutta la scansione di un fascio gaussiano focalizzato e uno che sfrutta i fasci di Bessel. È stato dimostrato che l'utilizzo di quest'ultimi, in combinazione con un sistema di rivelazione confocale, migliora l'omogeneità dell'illuminazione e la risoluzione assiale del microscopio. L'apparato è stato caratterizzato teoricamente con delle simulazioni numeriche e sperimentalmente acquisendo immagini dei fasci di illuminazione e di biglie fluorescenti con dimensioni sotto il limite di diffrazione. Il microscopio è stato sviluppato prestando particolare attenzione alla sopravvivenza del campione e alla sua stabilità durante le acquisizioni di immagini. L'applicabilità dell'apparato su sistemi biologici viventi è stata dimostrata su larve di Pesce Zebra appartenenti ad una linea transgenica esprimente una proteina fluorescente all'interno dei neuroni. In particolare sono state acquisite immagini con risoluzione cellulare del sistema nervoso centrale a varie profondità. La caratterizzazione dell'illuminazione con i fasci di Bessel unita alla possibilità di acquisire immagini *in vivo* con rivelazione confocale, pone le basi per successive applicazioni dell'apparato nello studio della struttura e funzionalità del sistema nervoso centrale del Pesce Zebra.

Abstract

Assistant supervisor: Prof. Francesco Saverio PAVONE

Supervisor: Dott. Leonardo SACCONI

Candidate: Tommaso ALTERINI

In this thesis a light-sheet fluorescence microscope has been developed and characterized for *in vivo* animal imaging with cellular resolution. In light-sheet microscopy, samples are optically sectioned with a thin well-defined light sheet and the fluorescence is collected from an objective placed orthogonally regarding the illuminated plane. This optical sectioning leads to an improvement of contrast reducing out-of-focus-light and decreases the photodamage by illuminating only a narrow portion of the sample. In the apparatus described in this thesis I have developed and characterized two different illumination systems: one that exploits the scanning of a focused Gaussian beam and the other that exploits Bessel beams. It has been shown that the use of the latter, in combination with a confocal slit detection system, improves the homogeneity of the illumination and the axial resolution of the microscope. The apparatus was characterized theoretically and experimentally with numerical simulations and by acquiring images of the laser beams and fluorescent beads with dimensions below the diffraction limit respectively. The microscope was developed paying particular attention to the viability of the sample and its stability during image capture. The applicability of the apparatus in living biological systems was demonstrated on Zebrafish larvae. Specimens belong to a transgenic line expressing a fluorescent protein within neurons. In particular preliminary images of the central nervous system were acquired with cellular resolution at various depths. The characterization of Bessel beam illumination combined with a confocal detection of living samples allow further applications of this apparatus. In particular it could be applied for structural and functional studies of the Zebrafish central nervous system.