



## IL MICROSCOPIO ATOMICO E L'INTELLIGENZA ARTIFICIALE

di Alberto Diaspro\*

### 1. La materia è fatta di atomi

In una persona che pesa 70 kg ci sono circa 7.000.000.000.000.000.000.000.000 atomi di cui oltre il 99% sono atomi di idrogeno, ossigeno, carbonio e azoto, a cui si aggiungano magnesio, potassio, sodio e calcio. Sono questi i principali costituenti di cellule e molecole biologiche. Il microscopio ottico, diretto discendente dell'occhialino per vedere cose minime di Galileo Galilei, fa ritenere a Federico Cesi, fondatore dell'Accademia dei Lincei, che si possa realizzare un grande esperimento sviluppando un metodo per l'ordinamento scientifico di tutte le conoscenze sul mondo fino ad allora raggiunte e in costruzione, unendo il segno scritto e quello figurato<sup>1</sup>. Quello di Federico Cesi è il tempo di Galileo Galilei e qualche anno dopo, nel 1665, Robert Hooke, uno dei più grandi scienziati del Seicento nell'osservare al microscopio sezioni sottili di sughero, introduce il termine 'cellula', poiché quello che vedeva da sezioni di sughero gli ricordava le celle di un monastero. Così Robert Hooke, grazie allo strumento che ha tra le mani, si spinge ad affermare che «con l'aiuto dei microscopi, non c'è nulla di così piccolo da sfuggire alla nostra indagine»<sup>2</sup> (Fig. 1).

<sup>1</sup> CESI F., GUERRINI L. (a cura di) 2006, *Apiarium*, Accademia Naz. dei Lincei editore.

<sup>2</sup> HOOKE R. 1665, *Micrographia: or Some Physiological Descriptions of Minute Bodies Made by Magnifying Glasses. With Observations and Inquiries Thereupon*.

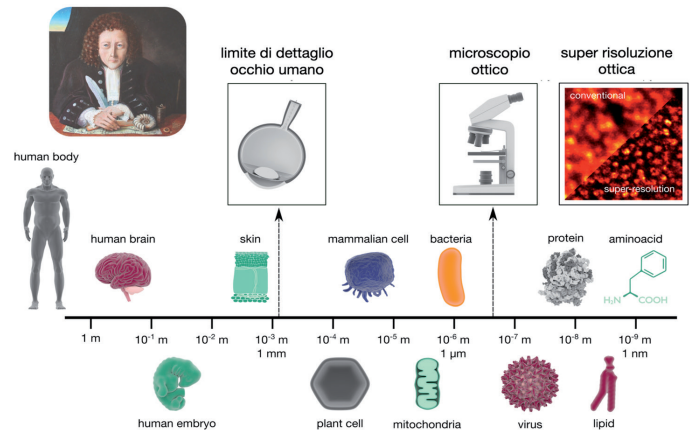


Fig. 1 – Robert Hooke e il dettaglio raggiungibile otticamente (lib. tratto da Andy Massey - <https://jphysplus.wordpress.com/2017/08/04/super-resolving-cell-biology-problems/>).

Richard P. Feynman, fisico teorico insignito del Premio Nobel per la Fisica nel 1965 insieme a Julian Schwinger e Sin-Itiro Tomonaga «per gli studi fondamentali nell'elettrodinamica quantistica, con conseguenze profonde per la fisica delle particelle elementari», suggerisce ai suoi studenti di ricordare per sempre che «la materia è fatta di atomi».

Oggi, le domande cruciali della biologia sono del tipo: Qual è la sequenza di basi nel DNA? Che succede quando avviene una mutazione? Che relazione esiste tra l'ordine delle basi nel DNA e quello degli aminoacidi nelle proteine? Qual è la struttura dell'RNA? Ha una sola catena o ne ha una doppia, e qual è la relazione tra l'ordine delle sue basi e il DNA? Come vengono sintetizzate le proteine? Dove va l'RNA? Dove risiede? Dove si trovano le proteine? Dove vanno a finire gli aminoacidi? Nella fotosintesi, dove è la clorofilla, come è distribuita, dove stanno i carotenoidi coinvolti

nel meccanismo? Qual è il processo per cui la luce si converte in energia chimica? A talune di queste domande sarebbe facile rispondere: basterebbe guardare! Sfortunatamente il microscopio ottico 'vede' a una scala un po' troppo alta. Migliorate la risoluzione un migliaio di volte e tanti problemi della biologia diventeranno molto più facili. Allora i biologi ve ne sarebbero grati e preferirebbero senz'altro questo alla critica che dovrebbero usare di più la matematica»<sup>3</sup>.

Dunque, per comprendere i meccanismi del vivente 'basta guardare'. Il microscopio ottico moderno, con la luce, ci permette di accedere a dettagli alla scala dell'Angstrom<sup>4</sup>. In questo scenario si incastona l'intelligenza artificiale (Fig. 2), che dagli anni '50 ad oggi evolve continuamente fino a guadagnare nel 2024 il riconoscimento Nobel, grazie ai lavori di John J. Hopfield e Geoffrey E. Hinton che hanno utilizzato strumenti della fisica e della biofisica, quelli cari ad Antonio Borsellino, Ruggero Pierantoni, Vincent Torre, Tomaso Poggio e altri scienziati italiani, per costruire metodi che hanno contribuito a gettare le basi dell'apprendimento delle macchine cambiando radicalmente il paradigma nell'accesso e memorizzazione dei dati: dalle memorie associative al *machine learning*, dalla *back-propagation* alla macchina di Boltzmann ([www.nobelprize.org/prizes/physics/2024/](http://www.nobelprize.org/prizes/physics/2024/)). La crescita dell'interesse e il numero crescente di approcci di intelligenza artificiale applicati alle immagini ottenute con precisione molecolare dal microscopio ottico sono incoraggianti e suggeriscono che questo rappresenta un passo importante e impegnativo per

<sup>3</sup> Lib. tratto da FEYNMAN R.P., *There's Plenty of Room at the Bottom: An Invitation to Enter a New Field of Physics*, intervento al convegno annuale della American Physical Society al Caltech il 29 dicembre 1959; traduzione italiana in: *Il piacere di scoprire*, Adelphi, Milano, 2002.

<sup>4</sup> DIASPRO A. 2024, *Oltre l'invisibile*, «Prometeo», 42 (168), pp. 16-25.

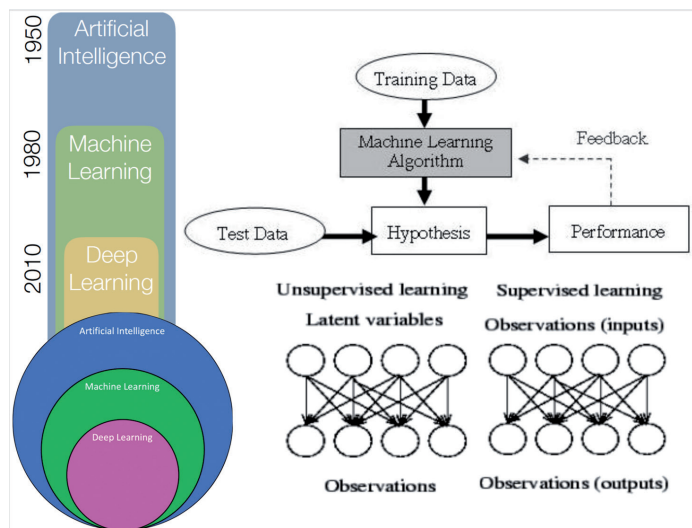


Fig. 2 - Dagli anni '50 ad oggi la crescita è legata all'avanzamento tecnologico dei dispositivi.

l'osservazione computazionale a livello molecolare<sup>5</sup>. Questo permette di immaginare un 'microscopio artificiale' che unisca la microscopia ottica a scala atomica, almeno in termini di precisione nella localizzazione di singole molecole, e gli algoritmi più avanzati sviluppati dall'intelligenza artificiale<sup>6</sup>.

## 2. Il microscopio ottico diventa atomico

Il microscopio ottico permette di studiare 'docilmente' il vivente grazie alle interazioni luce-materia al di fuori delle bande di assorbimento delle maggiori molecole biologiche come DNA e proteine, diventando uno strumento di elezione in biofisica cellulare e molecolare fino al recente 'sconfinamento' in biologia strutturale<sup>7</sup>. Con il riconoscimento Nobel del 2014, assegnato congiuntamente a Eric Betzig, Stefan W. Hell e William E. Moerner per lo «sviluppo della microscopia a fluorescenza super-risolta», la microscopia ottica ha ampliato in modo sorprendente la molteplicità e specificità di metodi ottici in-

<sup>5</sup> LIU S. et al. 2022, *Super-Resolution Microscopy for Structural Cell Biology*, «Annu Rev Biophys», May 9;51, pp. 301-326.

<sup>6</sup> DIASPRO A. 2023, *The Artificial Microscope*, «EPJ Web Conf.», 287 13012.

<sup>7</sup> LIU et al. 2022.

troducendo una fondamentale distinzione tra gli sviluppi riguardanti le sonde fluorescenti e quelli riguardanti le soluzioni 'ottiche'<sup>8</sup>.

La fluorescenza viene utilizzata come meccanismo di contrasto per visualizzare in modo specifico componenti cellulari e subcellulari a cui le molecole fluorescenti si legano con elevata affinità biologica e biochimica<sup>9</sup> (Fig. 3).

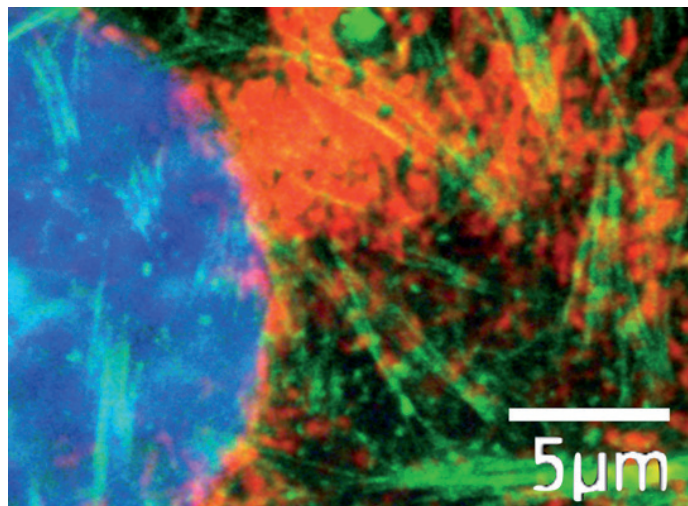


Fig. 3 – La specificità che si ottiene attraverso una elevata affinità biochimica delle molecole fluorescenti con componenti cellulari e subcellulari permette di evidenziare, attraverso una emissione luminosa diversificata per lunghezza d'onda, il DNA (blu), elementi del citoscheletro (verde) e unità funzionali (rosso).

In questo scenario vengono anche sviluppati metodi *label-free* che, nonostante la trasparenza alla radiazione visibile delle cellule biologiche, permettono di ottenere contrasto senza necessità di marcatura. I metodi sfruttano la fase e la polarizzazione delle onde elettromagnetiche associate alla luce visibile a fronte dell'interazione con quelle stesse molecole etichettate in modo specifico con la fluorescenza<sup>10</sup>. Il

<sup>8</sup> DIASPRO A. 2020, *Quello che gli occhi non vedono*, Hoepli.

<sup>9</sup> MONDAL P.P., DIASPRO A. 2013, *Fundamentals of Fluorescence Microscopy. Exploring Life with Light*, Springer.

<sup>10</sup> DIASPRO A. et al. 2023, *Emerging Mueller matrix*

panorama offerto oggi dai metodi *label-free* mostrati in Fig. 4 è particolarmente vasto. In questo contesto, il termine super risoluzione, introdotto dal fisico fiorentino Giuliano Toraldo di Francia<sup>11</sup>, riguarda la possibilità di superare il limite di risoluzione spaziale del microscopio ottico posto dalle leggi della fisica a circa 200 nanometri in termini di dettaglio ovvero di capacità di distinguere due punti o due oggetti come separati entro una distanza  $d$ .

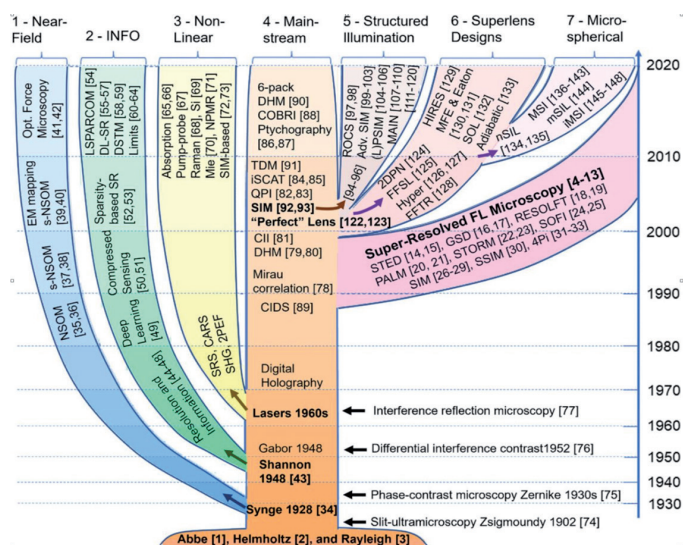


Fig. 4 – Un affresco della microscopia ottica moderna ricco di soluzioni in fluorescenza (FL) e label-free, per le referenze specifiche si veda Astratov V.N. et al. 2023, Roadmap on Label-Free Super-Resolution Imaging, «*Laser Photonics Rev*», 17, 2200029.

Classicamente la quantità  $d$  dipende da  $\lambda$ , la lunghezza d'onda della radiazione luminosa, dall'indice di rifrazione  $n$  del mezzo attraverso cui si propagano le onde e da  $\alpha$ , il semiangolo di apertura della lente<sup>12</sup>. Senza violare le leggi della fisica, l'aggiunta di informazioni a priori oltre a quelle raccolte con la lente permette di

*microscopy applications in biophysics and biomedicine*, «*Riv. Nuovo Cim.*» 46, pp. 473–519.

<sup>11</sup> TORALDO DI FRANCIA G. 1955, *Resolving Power and Information*, «*Journal of the Optical Society of America*», 45(7), pp. 497–501.

<sup>12</sup> SHEPPARD C.J.R. 2017, *Resolution and super-resolution*, «*Microsc. Res. Tech.*», 80, pp. 590–598.

aggirare il limite fisico della diffrazione permettendo di ricostruire l'immagine del campione in modo più dettagliato. Questa è appunto la super risoluzione ottica. Le immagini possono essere pensate come un puzzle fatto di tante singole molecole fluorescenti che oggi si riescono a localizzare su scala nanometrica o sub-nanometrica.

Tra gli stratagemmi, le strategie di calcolo e le configurazioni ottiche originali spiccano quelli individuati dai tre laureati Nobel<sup>13</sup>, preludio per quegli sviluppi che in una decade hanno portato al microscopio ottico atomico, capace di precisione nell'ordine dell'Angstrom per la localizzazione di molecole fluorescenti<sup>14</sup>. I tre laureati Nobel condividono una stessa idea di base per 'aggirare' il limite di diffrazione, una sorta di 'uovo di Colombo': si tratta di trovare il modo di precludere l'emissione simultanea di due sorgenti puntiformi, spettralmente identiche, ovvero che emettono alla stessa lunghezza d'onda, quando queste sono 'troppo' vicine, ovvero quando si trovano a distanze più piccole della quantità  $d$ . Si tratta di un'intuizione applicabile a tutti quei meccanismi di contrasto per i quali siamo in grado di controllare due stati come assorbimento della luce e trasparenza, spin-su o spin-giù, polarizzazione in uno stato o nel suo stato opposto. Nel caso della fluorescenza, l'accensione o lo spegnimento del segnale emesso può essere realizzato in regioni estremamente confinate o su singole molecole fluorescenti. La generazione in modo confinato dell'emissione stimolata per nascondere l'emissione di fluorescenza

<sup>13</sup> DIASPRO A. 2014, *Circumventing the diffraction the limit*, Il Nuovo Saggiatore, 30 (5-6), pp. 45-51.

<sup>14</sup> SAHL S.J. et al. 2024, *Direct optical measurement of intramolecular distances with Angstrom precision*, «Science», 386, pp. 180-187.

intorno a una zona di diametro  $<d$ <sup>15</sup> è in sintonia con l'avvento delle proteine fluorescenti verdi fotoattivabili<sup>16</sup>, che permettono di localizzare 'lampadine accese' in modo sparso, ovvero a distanze  $>d$ , dunque di selezionare in regioni altrettanto confinate la fluorescenza utile per la formazione delle immagini<sup>17</sup>. Il 'trucco' sta nel far sparire, controllando la fluorescenza emessa, una parte del segnale, migliorando così il dettaglio riportato sull'immagine. Nel primo caso, per ogni interrogazione – punto per punto – del campione fluorescente, la fluorescenza emessa viene spazialmente selezionata in una regione nanometrica utilizzando un secondo fascio luminoso a forma di toroide. Nel secondo caso le molecole fluorescenti vengono accese e spente singolarmente. L'effetto dei due metodi sta nello scalamento di un fattore  $K_{sr}$  di  $d$ ,  $d_{sr} = d/K_{sr}$ , dove 'sr' sta per super risoluzione (Fig. 5).

Circa dieci anni fa, emerge un nuovo concetto di interrogazione dei campioni fluorescenti che parte dall'idea di minimizzare il numero di fotoni che concorrono a ottenere la super risoluzione e di svincolarsi dalle caratteristiche della lente del microscopio, sintetizzate dal limite di Abbe. Il metodo è noto come MINFLUX (minimal emission fluxes) e introduce un nuovo concetto per localizzare gli emettitori di fotoni nello spazio che, anziché essere basato sul valore massimo del segnale raccolto, utilizza

<sup>15</sup> HELL S.W., WICHMANN J. 1994, *Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy*, Opt. Lett. 19, pp. 780-782.

<sup>16</sup> PATTERSON G.H., LIPPINCOTT-SCHWARTZ J. 2002, *A Photoactivatable GFP for Selective Photolabeling of Proteins and Cells*, «Science», 297, pp. 1873-1877.

<sup>17</sup> BETZIG E. et al. 2006, *Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution*, «Science», 313, pp. 1642-1645.

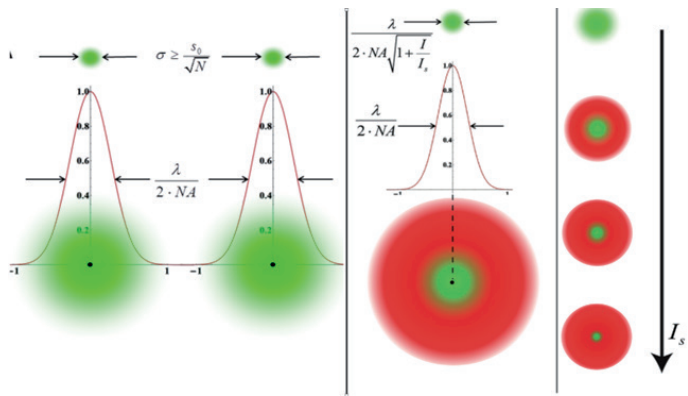


Fig. 5 – Per la microscopia a singola molecola (sinistra) e quella a selezione della regione di fluorescenza attraverso emissione stimolata (destra), il valore di  $K_{sr}$  è riportato come fattore di scala rispetto a  $d$ , noto come limite di Abbe. Qui,  $NA = n \sin a$  dove  $n$  è l'indice di rifrazione della materia tra la lente e il mezzo,  $a$  è il semiangolo di apertura della lente e la funzione  $\sin$  è limitata a 1. Ancora,  $s_0 = d = \lambda / (2n \sin a)$  è il limite di Abbe,  $N$  è il numero di fotoni raccolti,  $I$  è l'intensità del fascio di luce utilizzato per innescare l'emissione stimolata e  $I_s$  è quella intensità che permette di abbattere il segnale di fluorescenza di una quantità  $1/e$  in una regione confinata (Chacko et al. 2013).

il raggiungimento di un minimo. Sodando gli emettitori, le singole molecole fluorescenti, con intensità locale minima di eccitazione luminosa, MINFLUX minimizza la quantità di fotoni di fluorescenza necessari per un'elevata precisione di localizzazione<sup>18</sup>. MINFLUX ha raggiunto una precisione di circa 1 nanometro, risolvendo spazialmente solo molecole che si trovavano a 6 nanometri di distanza. Fin dalle prime dimostrazioni sperimentali vi era l'aspettativa che questa modalità di localizzazione potesse aprire nuovi orizzonti per l'osservazione della dinamica, distribuzione e struttura delle macromolecole nelle cellule viventi. La precisione di localizzazione,  $\sigma_{MF}$ , dipende dall'abilità metrica di confinamento del fascio di luce investigante,  $L$ , e dalla quantità di fotoni raccolti, uniti da una robusta analisi statistica del segnale raccolto; non dipende quindi dalle caratteristiche della

<sup>18</sup> BALZAROTTI F. et al. 2017, *Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes*, «Science», 355, pp. 606-612.

lente che determinano il limite di Abbe ma da  $L$  e dal rapporto con il numero di fotoni raccolti  $N$ ,  $L/\sqrt{N}$ . Poiché tecnologicamente  $L \ll d$ , che nei metodi a singola molecola scala anch'esso con il numero di fotoni raccolti  $N$ , si possono ottenere elevate precisioni di localizzazione con un basso numero di fotoni raccolto. Poiché  $L$  può raggiungere valori nanometrici si riesce a definire la posizione dell'emettitore alla scala dell'Angstrom<sup>19</sup>. La Fig. 6 riporta una rappresentazione grafica della differenza tra le diverse modalità a super risoluzione.

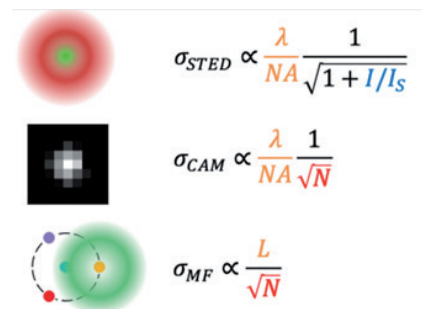


Fig. 6 - Dall'alto in basso i metodi a emissione stimolata (STED), singola molecola (CAM) e MINFLUX (MF) per i quali si nota come la precisione di localizzazione della MINFLUX sia svincolata dalle caratteristiche della lente e dipenda dalla possibilità di restringere la regione di interrogazione di tipo toroidale attraverso il diametro  $L$ .

La microscopia ottica in fluorescenza entra dunque a pieno titolo nella scala dell'Angstrom con la MINFLUX e relative varianti<sup>20</sup>. Possiamo dunque definire la microscopia ottica anche atomica, aggiungendo che tra le sue prerogative vi sono quelle di poter formare immagini a temperatura ambiente e pressione atmosferica mantenendo inalterate le procedure di marcatura in fluorescenza dei campioni (Fig. 7).

<sup>19</sup> REINHARDT S.C.M. et al. 2023, *Ångström-resolution fluorescence microscopy*, «Nature» 617, pp. 711-716; WEBER M. et al. 2023, *MINSTED nanoscopy enters the Ångström localization range*, «Nat Biotechnol» 41, pp. 569-576.

<sup>20</sup> SALERNO M. et al. 2024, *MINFLUX Nanoscopy: A "Brilliant" Technique Promising Major Breakthrough*, «Microsc. Res. Tech», <https://doi.org/10.1002/jemt.24765>.

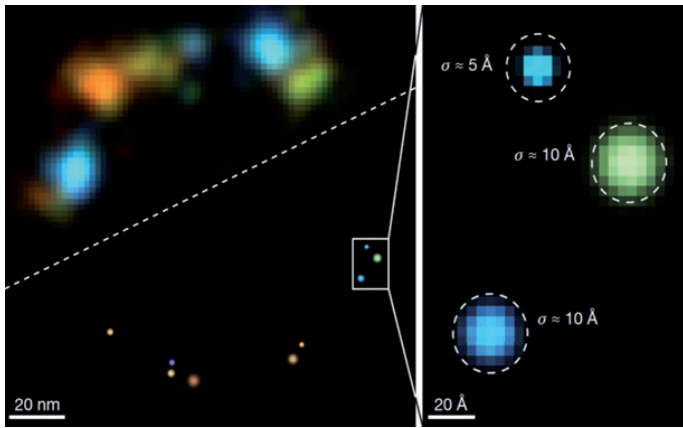


Fig. 7 - Accesso a informazioni di tipo molecolare con precisione di localizzazione alla scala dell'Angstrom, modificata da REINHARDT et al. 2023.

### 3. L'Intelligenza Artificiale ovvero il Microscopio Artificiale

Oggi siamo protagonisti e spettatori di una rivoluzione nella microscopia ottica amplificata dal crescente utilizzo di algoritmi di intelligenza artificiale che pervade non solo ogni attività nella società civile ma, soprattutto, ogni nuovo passaggio del percorso verso la scoperta in tutti i campi del sapere, dalla medicina all'astrofisica, dalla previsione dei disastri naturali ai segreti dell'antichità, dalla ricerca di nuovi pianeti abitabili alla comprensione dei meccanismi molecolari<sup>21</sup>.

I metodi a super risoluzione fino alla precisione dell'Angstrom sono piuttosto diffusi e molti quesiti biologici sono stati affrontati in modo originale grazie alla possibilità di andare oltre il limite classico del microscopio ottico. Le immagini prodotte dal microscopio si sono arricchite non solo di un dettaglio inimmaginabile anche per Robert Hooke, ma anche di informazioni spettroscopiche su scala molecolare<sup>22</sup>. L'insieme di dati di-

<sup>21</sup> CATTANEO M. 2024, *Rivoluzione AI*, «National Geographic», Italia.

<sup>22</sup> CASTELLO M. et al. 2019, *A robust and versatile platform for image scanning microscopy enabling super-resolution FLIM*, «Nature Methods», 16(2), pp. 175-178.

sponibile dalle numerose varianti del microscopio ottico costituisce il nucleo per lo sviluppo di un 'microscopio artificiale' che ha lo scopo di trasformare un'interrogazione senza etichetta (*label-free*) del campione in un'immagine basata sulla fluorescenza a contenuto molecolare. Il microscopio artificiale è guidato dall'intelligenza artificiale che ne diventa una componente essenziale insieme alla lente, alla luce e al sensore.

Attraverso un nucleo computazionale costituito, ad esempio, da tre moduli basati su una rete neurale convoluzionale (CNN) e un'analisi tICA (tensor Independent Component Analysis) sviluppabile per apprendimento automatico non supervisionato è possibile realizzare una strategia di apprendimento profondo supervisionato con l'ambizioso obiettivo di creare un ambiente virtuale robusto 'per vedere ciò che prima non potevamo percepire'. In particolare, la trasformazione di dati *label-free* a bassa risoluzione spaziale in immagini in fluorescenza ad alto contenuto molecolare costituisce una sfida affascinante e utile al tempo stesso (Fig. 8).

La Fig. 9 mostra una sequenza di immagini *label-free*, fluorescenza e combinate della distribuzione del DNA nel nucleo di una cellula.

### 4. Conclusione

Il microscopio atomico unito all'intelligenza artificiale apre un'importante finestra sulla possibilità di ottenere un nuovo modo di formare immagini. L'ambizioso obiettivo è quello di eliminare la necessità di eseguire biopsie offrendo in tempo reale informazioni a livello molecolare da immagini raccolte senza etichetta.

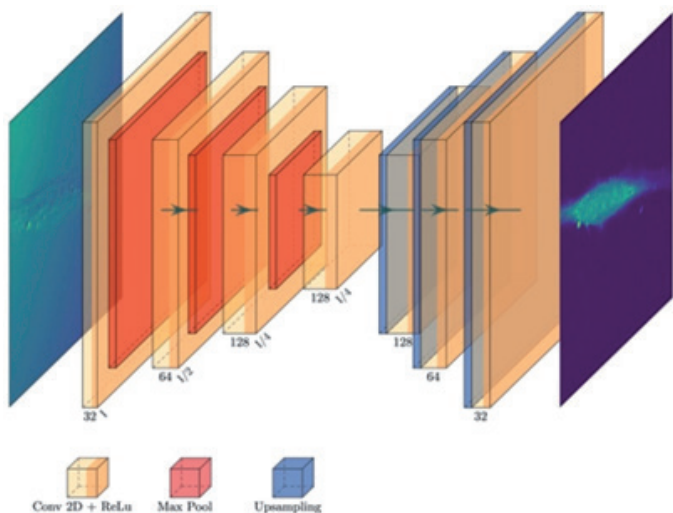


Fig. 8 - Architettura di rete neurale per apprendimento e trasformazione di immagini label-free in immagini in fluorescenza (DIASPRO et al. 2023).

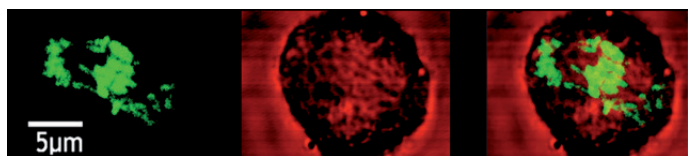


Fig. 9 - Correlazione tra la distribuzione del DNA nel nucleo attraverso immagini in fluorescenza (verde) e immagini basate sul contrasto label-free ricavabile da elementi della Matrice di Mueller, descrittore degli stati di polarizzazione (LE GRATIET et al. 2021, Review on Complete Mueller Matrix Optical Scanning Microscopy Imaging, «Appl. Sci » 11).

Immaginate un medico o uno scienziato che raccogliendo in modo relativamente semplice informazioni luminose *label free* da un paziente o da un sistema biologico si trovi trasformate le immagini in mappe ad alto contenuto molecolare come mostrato in Fig. 10.

Oggi, possiamo trarre vantaggio dal microscopio ottico che diventa atomico contando

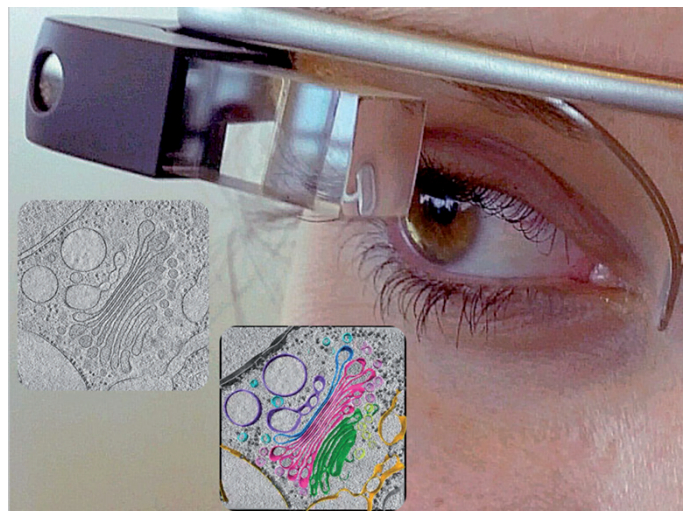


Fig. 10 - Rappresentazione creativa della modalità di accesso alle informazioni molecolari (a colori) raccogliendo dati in modalità label-free (livelli di grigio) combinati utilizzando l'intelligenza artificiale.

su un'intelligenza che in fondo resta naturale, inimitabile e insuperabile anche se la chiamiamo artificiale, «fatta con arte dall'uomo»<sup>23</sup>.

### Ringraziamenti

Lavoro in parte finanziato da PNRR SEELIFE "StrEngthEning the ItaLIan InFrastructure of Euro-bioimaging" (B53C22001810006, IR0000023). L'autore ringrazia i gruppi di ricerca, DiasproLab, al Dipartimento di Fisica dell'Università di Genova e all'unità di ricerca Nanoscopy dell'Istituto Italiano di Tecnologia, Great Campus di Erzell, Genova.

<sup>23</sup> ALIGHIERI D. 1304, *Il Convivio*, Cv II-I, 20-12.

\*Alberto Diaspro è professore ordinario di Fisica applicata nell'Università di Genova, Direttore di Linea di Ricerca all'IIT e socio corrispondente dell'Istituto Veneto di Scienze, Lettere ed Arti