

Università degli Studi di Napoli “Federico II”

Scuola Politecnica e delle Scienze di Base
Area Didattica di Scienze Matematiche Fisiche e
Naturali

Dipartimento di Fisica “Ettore Pancini”



Laurea triennale in Fisica

**Caratterizzazione di cellule di
epatocarcinoma (HepG2) mediante
micro-spettroscopia infrarossa a
trasformata di Fourier (FT-IR)**

Relatori:

Prof. Lorenzo Manti
Prof.ssa Maria Lepore

Candidato:

Davide Vivolo
Matricola N85001370

A.A. 2022/2023

Indice

Introduzione	2
1. Principi di base della microspettroscopia infrarossa	3
1.1 Principi fisici della spettroscopia infrarossa	3
1.2 Caratteristiche degli spettri infrarossi	6
1.3 Microspettroscopia e spettroscopia FT-IR e loro utilizzo nella caratterizzazione cellulare	8
2. Materiali e Metodi	13
2.1 Linea cellulare	13
2.1.1 Rilevanza in ambito biomedico	13
2.2 Preparazione dei campioni	15
2.3 Microspettrometro FT-IR	16
2.3.1 Descrizione dell'apparato "Spectrum One"	20
2.3.2 Procedura sperimentale	20
2.4 Metodi di analisi dati	22
3. Risultati e discussioni	23
3.1 Analisi degli spettri relativi ai campioni t_{24}	24
3.2 Analisi degli spettri relativi ai campioni t_{48}	26
3.3 Analisi raziometrica	28
Conclusioni	31
Bibliografia	32

Introduzione

Negli ultimi anni la spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR) ha avuto un grande successo, soprattutto grazie allo sviluppo di metodi chemometrici resi possibili dalle innovazioni in campo strumentale e software. La spettroscopia FT-IR garantisce un'analisi "label free" qualitativa e quantitativa del campione in esame in maniera rapida.

Uno dei campi di applicazione più rilevanti della tecnica in questione è quello dello studio di materiale biologico per la sua caratterizzazione biochimica e strutturale e, per tale motivo, ha avuto svariate applicazioni in ambito biotecnologico e biomedico. Inoltre, la ricerca in questo settore ha permesso di ottenere ulteriori informazioni su processi biochimici fondamentali, quali, ad esempio, gli studi sull'efficacia e sulla risposta dei farmaci, sulle alterazioni delle funzioni cellulari alla base di varie patologie e sulla classificazione di quest'ultime.

Nel presente studio viene utilizzata la spettroscopia FT-IR in una modalità di acquisizione detta "transflection mode" per la caratterizzazione di una linea cellulare di epatocarcinoma cellulare (HepG2) confrontando gli spettri ottenuti con le caratteristiche spettrali presentate in altri lavori.

L'epatocarcinoma cellulare (HCC) rappresenta il tumore primario del sistema epatico più comune a livello mondiale. La sua scarsa differenziazione lo rende uno dei tumori più aggressivi dopo il tumore al pancreas e, inoltre, non esiste un metodo di stadiazione comunemente accettato in ambito medico.

Il presente elaborato consiste di tre capitoli. Nel primo vengono richiamati brevemente i concetti fondamentali dell'interazione radiazione-materia alla base della spettroscopia, per poi soffermarsi sulle caratteristiche generali dello spettro infrarosso con particolare attenzione alle regioni di rilevanza biologica. Vengono, inoltre, presentate alcune applicazioni della tecnica FT-IR propedeutiche ad una migliore comprensione dei risultati ottenuti successivamente. Nel secondo capitolo, oltre ad illustrare nel dettaglio la linea cellulare analizzata insieme alla sua preparazione, vengono descritte le caratteristiche tecniche di un tipico spettroscopio infrarosso a trasformata di Fourier, le procedure sperimentali e i metodi adottati per l'analisi dei dati. L'analisi degli spettri FT-IR ottenuti sui campioni è stata affrontata nel capitolo tre con la descrizione dei principali risultati ottenuti.

Capitolo 1 - Principi di base della microspettroscopia infrarossa

1.1 Principi fisici della spettroscopia infrarossa

La spettroscopia è basata sull'interazione tra la radiazione elettromagnetica (REM) e la materia nei suoi vari stati. Il dualismo onda-particella della REM indica che esiste una relazione fondamentale tra l'energia del fotone E , la frequenza e la lunghezza d'onda dell'onda elettromagnetica:

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$$

A livello molecolare, il prerequisito fondamentale affinché questa interazione avvenga è che l'energia del fotone $h\nu$ corrisponda alla differenza di energia tra i livelli energetici della molecola. A seconda del tipo di livello energetico della molecola (elettronico, vibrazionale e rotazionale), vengono coinvolte nell'interazione varie regioni di lunghezza d'onda nello spettro elettromagnetico. Nel caso della spettroscopia infrarossa (IR), la regione dello spettro elettromagnetico coinvolta è quella associata a numeri d'onda ($\bar{\nu} = 1/\lambda$) tra 4000 e 400 cm^{-1} (ovvero in frequenza tra $1,2 \cdot 10^{14}$ e $1,2 \cdot 10^{12}$ Hz). In questo intervallo di frequenze, nelle molecole si verificano transizioni di livelli energetici discreti vibrazionali. Si dice, quindi, che la spettroscopia IR appartiene alla spettroscopia vibrazionale [1]. Idealmente, l'assorbimento ad una lunghezza d'onda fissa si tradurrebbe esattamente in una linea stretta di diminuzione di potere irradiante; tuttavia, si verificano effetti fisici quali dinamiche di rilassamento, effetto Doppler ed effetti legati a fattori strumentali, che portano all'allargamento della banda [1].

Il moto degli atomi che compongono la molecola può essere approssimato a quello di un oscillatore armonico classico di piccola ampiezza che è in grado di descrivere i gradi di libertà vibrazionali molecolari [1]. Sebbene quella dell'oscillatore armonico sia un'approssimazione semplicistica della natura molecolare, essa riesce a descrivere adeguatamente le frequenze e le transizioni fondamentali, ovvero del tipo $\nu_{0 \rightarrow 1}$, che sono quelle di maggior rilievo nell'ambito della spettroscopia IR [1]. In realtà, però, possono avvenire anche transizioni tra livelli energetici non adiacenti (ad esempio $\nu_{0 \rightarrow 2}$) che nella spettroscopia IR prendono il nome di bande di overtone e si posizionano a numeri d'onda superiori a 4000 cm^{-1} . Inoltre, ad alte

temperature possono essere osservate transizioni di livelli energetici eccitati anche a numeri d'onda inferiori rispetto a quelle fondamentali [1].

Il modello dell'oscillatore armonico classico, quindi, funziona bene quando vi sono transizioni energetiche adiacenti e a basse temperature alle quali, seguendo la statistica di Boltzmann, le molecole tendono a popolare maggiormente lo stato fondamentale [1].

Ogni molecola può avere un momento di dipolo elettrico, permanente o indotto, μ : l'altezza di un picco osservato nello spettro IR dipende proprio dalla variazione di questa grandezza rispetto alle coordinate normali vibrazionali, q . L'assorbimento della REM da parte di una molecola con stati vibrazionali è possibile soltanto se il vettore elettrico della radiazione oscilla con la medesima frequenza della molecola. Infatti, vale che l'intensità della REM infrarossa,

$$I_{IR} \propto \left(\frac{d\mu}{dq} \right)^2 \quad (\text{eq.1}) [1].$$

La probabilità di transizione, quindi, è legata alla variazione di μ e le transizioni tra livelli non adiacenti sono poco probabili rispetto alle transizioni fondamentali [1].

Come si può notare, la spettroscopia IR risulta essere particolarmente sensibile alle vibrazioni dei gruppi funzionali polari, ovvero per le molecole con momento di dipolo non nullo. Una piccola variazione del momento si traduce in una forte banda risultante nello spettro (vedi eq.1). Quando si necessita di un grado di approssimazione migliore, la scelta più adatta è quella di considerare il modello dell'oscillatore anarmonico il quale risulta indispensabile per predire transizioni overtone e accoppiamenti tra modi vibrazionali [1].

I modi normali vibrazionali delle molecole sono di facile trattazione quando si considera il caso semplice di molecola diatomica. Tuttavia, il livello di complessità aumenta notevolmente quando il numero di atomi N (per $N \geq 3$) cresce, in quanto i modi normali saranno $3N-5$ e $3N-6$, rispettivamente per molecole poliatomiche lineari e non lineari. A queste condizioni, ogni modo normale può essere descritto da un oscillatore anarmonico e ogni singola oscillazione a priori non può essere più considerata indipendente dalle altre. Si presenta così un accoppiamento tra i modi normali di simile simmetria e spazialmente vicini nel framework della molecola [1].

L'accoppiamento conduce ad un aumento della complessità dello spettro IR e uno degli effetti è la combinazione di bande dovute a multiple eccitazioni da parte di un singolo fotone [1]. La forza di tale accoppiamento aumenta all'assottigliarsi della differenza di energia di transizione ΔE tra due modi normali, tendendo ad un comportamento degenerativo [1]. Inoltre, a differenza delle molecole diatomiche che hanno solo un grado di libertà vibrazionale, per molecole a molti atomi si osservano modi vibrazionali di deformazione, ad esempio bending modes, e stretching

modes. Per gli stessi gruppi chimici, le bande dovute a stretching modes sono osservate a più alti valori di numeri d'onda rispetto ai modi di deformazione [1].

Nella maggior parte dei casi, i moti atomici sono molto complessi, principalmente se si considerano eventuali spostamenti che aumentano le distanze interatomiche. Tenendo conto di ciò, è comprensibile che diventi particolarmente complicato stabilire un sistema di coordinate normali trasferibili per ogni molecola. Tuttavia, poiché vi sono delle similitudini in termini di vibrazioni tra molecole composte da gruppi funzionali simili, una migliore rappresentazione della stessa consiste nel considerare dei nuovi parametri come coordinate, quali lunghezza di legame, angoli diedri e di valenza [1].

I principali modi vibrazionali, descritti in Figura 1, sono i seguenti:

- vibrazioni di “stretching” dovute ad uno stiramento ritmico lungo l’asse di legame con conseguente aumento e diminuzione delle distanze interatomiche;
- vibrazioni di deformazioni planari o non planari (“bending”) dovute ad una variazione degli angoli di legame mentre le distanze dei legami rimangono pressappoco costanti.

Queste vibrazioni possono avvenire sul piano e sono dette “scissoring” e “rocking” oppure fuori dal piano e sono definite “wagging” e “twisting”.

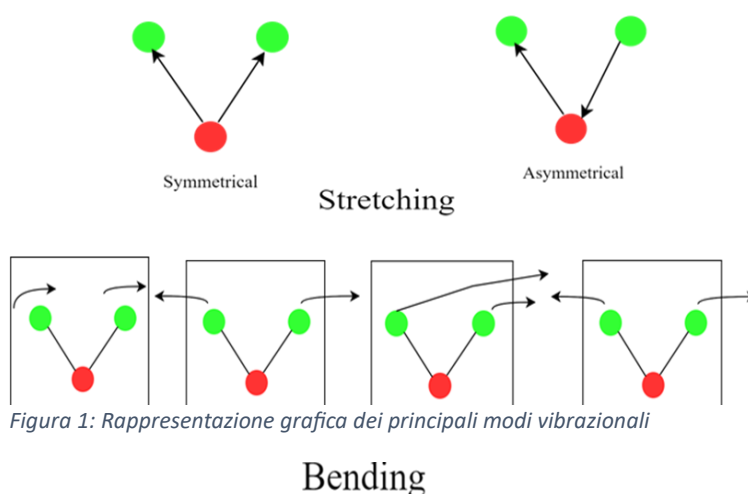


Figura 1: Rappresentazione grafica dei principali modi vibrazionali

1.2 Caratteristiche degli spettri infrarossi

La legge di Lambert-Beer descrive l'andamento dell'assorbanza A al variare della lunghezza d'onda:

$$A(\lambda) = \log_{10} \left(\frac{\varphi^i}{\varphi^t} \right) = \varepsilon(\lambda)cl$$

Dove:

- $\frac{\varphi^i}{\varphi^t}$ è il rapporto tra potere radiante incidente e trasmesso;
- ε è il coefficiente di assorbimento dipendente dalla lunghezza d'onda della radiazione ed è legato allo specifico materiale del campione;
- l è il cammino ottico libero che rappresenta lo spessore effettivo del campione;
- c è la sua concentrazione.

Uno spettro IR viene tipicamente rappresentato come un grafico con il numero d'onda (cm^{-1}) sull'asse orizzontale e l'assorbanza sull'asse verticale. Quest'ultima è una grandezza adimensionale [1].

I parametri che caratterizzano una banda di assorbimento IR sono: la sua posizione, la sua intensità e la sua forma. Uno dei principali vantaggi della spettroscopia infrarossa (IR) è la sua specificità chimica che è strettamente correlata al fatto che i gruppi funzionali generano bande caratteristiche in termini di intensità e numero d'onda. Le bande vibrazionali legate a un particolare gruppo funzionale tendono a comparire in regioni di numero d'onda simili e i valori tipici sono stati verificati attraverso l'analisi di un ampio numero di spettri IR misurati per varie molecole [1]. I principali contributi presenti negli spettri IR relativi a campioni d'interesse biologico sono riportati nella Tabella 1 insieme alle relative assegnazioni [1].

Per l'applicazione in ambito biologico (Figura 2), le regioni spettrali infrarosse d'interesse sono quelle che vanno indicativamente da 3500 a $600\ cm^{-1}$ che comprendono carboidrati (600 - $1450\ cm^{-1}$), l'ammide I e l'ammide II (1500 - $1700\ cm^{-1}$), mentre regioni di numero d'onda superiore (2550 - $3500\ cm^{-1}$) sono associate allo stretching vibrazionale dei legami S-H, C-H, N-H e O-H [1][2].

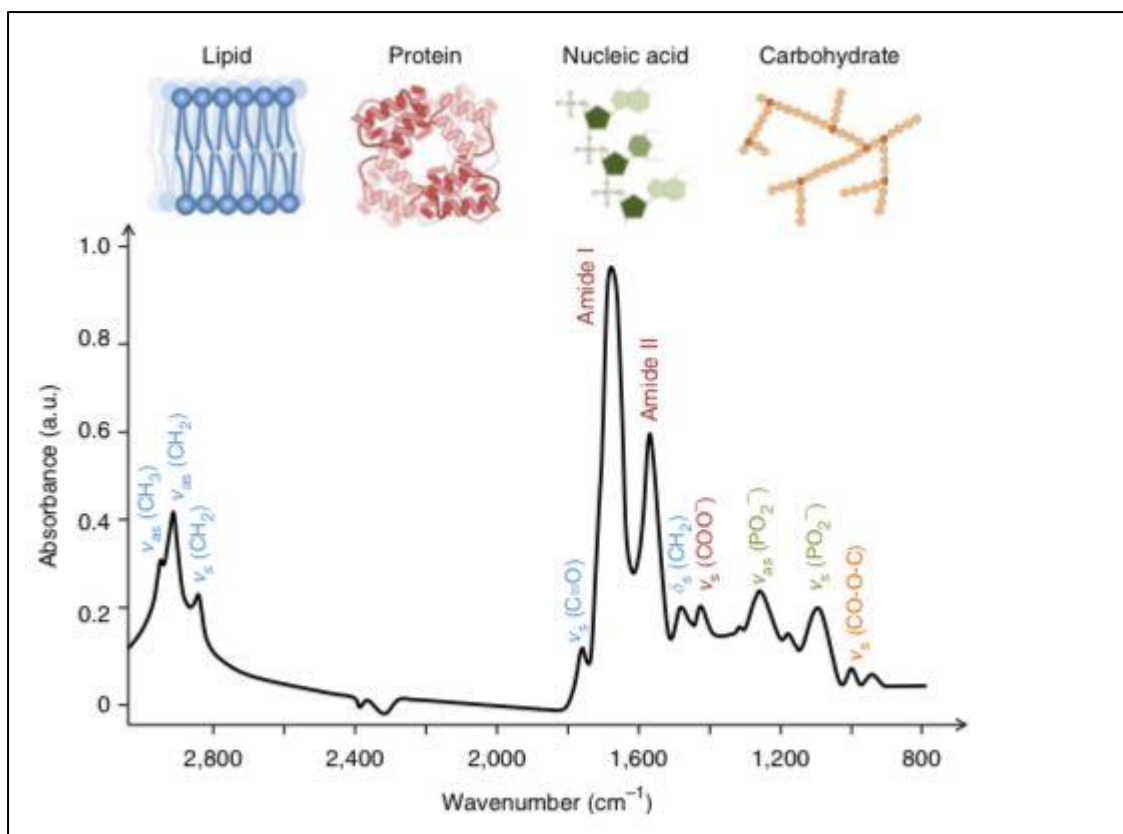


Figura 2: Rappresenta uno spettro infrarosso. In prossimità del grafico, i picchi indicano i gruppi funzionali caratteristici dei componenti biologici cellulari, indicati in alto.

La Tabella 1, riportata da Baker et al [2], evidenzia le tipiche posizioni spettrali associate a campioni di tipo cellulare.

Tabella 1: In tabella è rappresentata l'assegnazione dei picchi associati ai numeri d'onda dei gruppi funzionali dei più importanti componenti biologici cellulari.

Wavenumber (cm ⁻¹)	Assignment
~3300	amide A, stretch N-H of proteins
~3100	amid B, stretch. N-H with 1st. overtone of the amide I band resonant (Fermi), proteins
~3010	stretch. C-H, lipids, cholesterol, esters
~2922/2852	stretch. C-H (>CH ₂ , methyl) antisymmetric/symmetric, lipids, proteins, carbohydrates, esters
~2956/2874	stretch. C-H (CH ₃ , methyl) antisymmetric/symmetric, lipids, proteins, carbohydrates, nucleic acids
~1745-1735	stretch. C=O, esters phospholipids and lignin
~1695-1620	amide I-band, proteins
~1620-1590	asym. stretch. COO ⁻ , pectin; stretch. C=C, lignin
~1550	amide II-band, proteins
~1515	stretch. C=C, lignin
~1450	asym. def CH ₃ and asym. def CH ₂ , proteins, lipids and lignin
~1420	sym. stretch. COO ⁻ , pectin
~1400	stretch. C=O of COO ⁻ group, fatty acids and amino acids
~1370	sym. def. CH ₃ and sym. def. CH ₂ , proteins, lipids and lignin
~1360-1260	amide III-band absorptions (predominantly C-N stretching) with significant contributions from stretch. CH ₂ of carbohydrate residues
~1350-1260	stretch. PO ₄ ²⁻
~1350-1220	amide III-band, proteins
~1270	stretch. C-C and stretch. C-O lignin
~1250-1220	stretch. P=O symmetric of the > PO ₄ ²⁻ groups, phospholipids, nucleic acids
~1225	stretch. PO ₄ ²⁻ asymmetric of nucleic acids, phospholipids and lignin
~1185-1120	C-O ring vibrations of nucleic acid "sugars"
~1084 (1100-1040)	stretch. P=O symmetric of the > PO ₄ ²⁻ groups nucleic acids, phospholipids
~1000	stretch. C-O, carbohydrates

1.3 Microspettroscopia e spettroscopia FT-IR e loro utilizzo nella caratterizzazione cellulare.

Negli ultimi anni le misure di spettroscopia IR vengono effettuate utilizzando spettrometri a trasformata di Fourier (FT-IR) che consentono di svolgere in tempi rapidi un tipo di analisi non distruttiva con la quale ottenere, attraverso gli spettri, una caratterizzazione biochimica sia qualitativa che quantitativa di campioni d'interesse biomedico e biotecnologico [1, 2].

Sfruttando le caratteristiche proprie della spettroscopia FT-IR, essa è stata utilizzata estensivamente in molti studi biomolecolari e biomedici. Alcuni di questi sono elencati di seguito:

- **Identificazione biomolecolare:** l'alta specificità chimica raggiungibile con tale tecnica ha permesso l'individuazione di biomolecole quali lipidi, carboidrati, acidi nucleici e molti altri composti nei tessuti biologici [1,2,3];
- **Diagnosi di patologie:** la spettroscopia FT-IR è in grado di rilevare i cambiamenti strutturali delle molecole in concomitanza di fattori dannosi per la salute della cellula [1];
- **Monitoraggio dell'azione farmacologica:** attraverso gli spettri è possibile monitorare l'interazione molecolare tra farmaci e biomolecole fornendo informazioni dettagliate sul meccanismo di funzionamento di determinati composti farmacologici [1,2,3,4];
- **Rapida acquisizione dati:** la velocità di acquisizione dati permette l'analisi di numerosi campioni in poco tempo [1,2,4];
- **Analisi di biofluidi:** può essere impiegata per lo studio di biofluidi come sangue, urine e saliva [1,2].

In seguito, sono descritti in maggior dettaglio tre studi che evidenziano e sfruttano i vantaggi descritti precedentemente.

Lipiec et al, tramite l'utilizzo di uno spettrometro FT-IR, hanno analizzato gli spettri di singole cellule di adenocarcinoma prostatico umano PC-3, irraggiate con un numero definito di protoni a 2 MeV generati da un microfascio di protoni, insieme a cellule di controllo. Come illustrato dal grafico riportato dagli autori (Figura 3), si verifica uno spostamento dipendente dalla dose da 1234 a 1237 cm^{-1} dello stretching mode asimmetrico del gruppo $O - P - O$ dovuto ad un disordine locale del DNA concomitante a un cambio d'intensità della banda 1083 cm^{-1} di stretching mode simmetrico del gruppo $O - P - O$ [5].

In tale studio si sono analizzate ulteriori caratteristiche di tali spettri quali l'analisi della regione

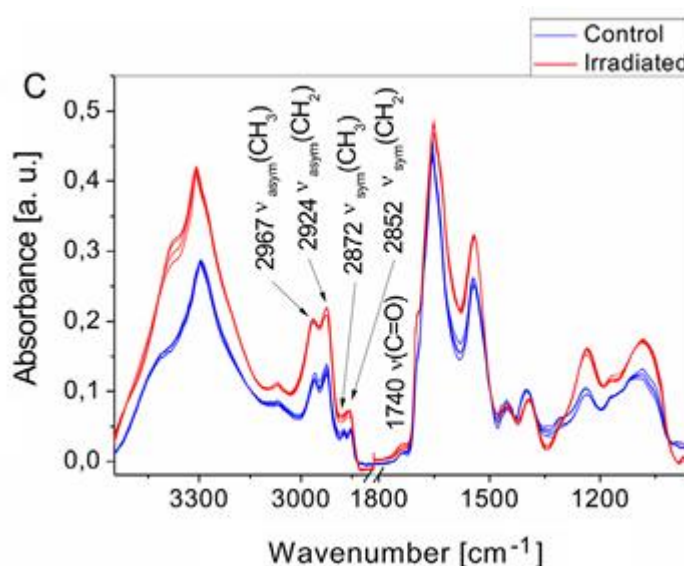


Figura 3: Rappresentazione grafica degli spettri per lo studio della struttura lipidica. In figura sono indicati i picchi associati ai modi vibrazionali dei gruppi funzionali.

spettroale compresa tra 3000 e 2800 cm^{-1} , associata agli stretching modes dei gruppi funzionali CH_2 e CH_3 (associati ai lipidi) (Figura 3), che ha rivelato un'alta assorbanza di questi due gruppi funzionali [5]. I risultati hanno evidenziato un'ossidazione dei gruppi terminali CH_3 , mentre i gruppi funzionali CH_2 non hanno subito lo stesso processo [5]. Di conseguenza, sono stati osservati solo spostamenti nelle bande CH_3 [5]. L'accumulo di lipidi è una caratteristica associata all'aumento del metabolismo lipidico durante l'apoptosi e alle inclusioni di gocce lipidiche, che sono coinvolte nella formazione dei corpi apoptotici [5]. Di fatti, uno studio più dettagliato degli spettri di derivata seconda sui modi di stiramento del gruppo funzionale CH_3 (Figura 4), ha rivelato uno spostamento dei picchi associati ai modi simmetrici e asimmetrici e tale ha come interpretazione quella del cambiamento della struttura lipidica dopo l'esposizione al raggio di protoni [5]. Inoltre, è stato calcolato il rapporto tra le aree integrate delle bande di stiramento simmetrico CH_2/CH_3 ed è stata osservata una diminuzione dell'intensità di CH_3 , concomitante con l'aumento di CH_2 , fenomeno indicativo della presenza di un processo ossidativo dei lipidi [5].

L'individuazione di biomarcatori al fine di evidenziare funzioni cellulari è di rilevante importanza quando si vogliono studiare gli effetti farmacologici sulle cellule [3].

Gautam et al hanno studiato gli effetti del farmaco Acetaminophen (APAP), somministrato ad un campione di topi, sull'epatotossicità analizzando campioni del fegato e del siero attraverso

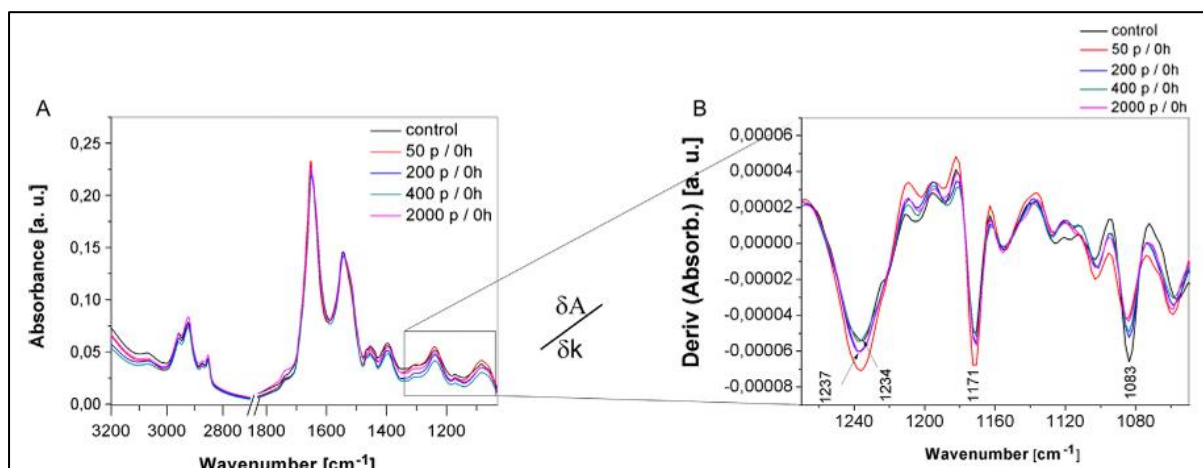


Figura 4: Sono illustrati in figura gli spettri medi insieme alle relative seconde derivate nell'intervallo spettrale degli acidi nucleici (1250-950 cm^{-1}) delle cellule di controllo e delle cellule irradiate (per quattro diversi quantitativi di protoni).

un microspettroscopio a trasformata di Fourier. I ricercatori sono riusciti a effettuare la classificazione dei picchi a partire dallo spettro di assorbimento dei campioni (Figura 5) e ad estrarre dati spettrali relativi alla popolazione di controllo e vari tempi dalla somministrazione del farmaco (Figura 6) [3]. Intanto, si porta all'attenzione del lettore la consistenza tra dati relativi ai picchi dei modi di stiramento simmetrici e asimmetrici di CH_2 e CH_3 evidenti in figura 5 e quelli riportati nello studio conseguito da Lipiec et al (Figura 4), al fine di rimarcare la riproducibilità degli esperimenti e la veridicità dei dati ottenuti tramite la tecnica spettroscopica FT-IR. Le cellule del siero trattate con l'APAP, hanno riscontrato una diminuzione delle intensità del glicogeno (associate a 1030 e 1080 cm^{-1}) rispetto ai dati presi dal campione di controllo [3]. Questi cambiamenti, insieme a quelli degli esteri di colesterolo, hanno suggerito la presenza di pattern di variazioni molecolari sui siti di catabolismo dell'APAP [3].

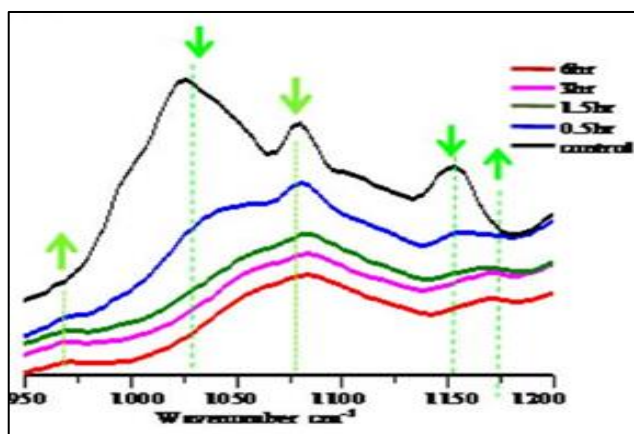


Figura 5: Spettri nella regione compresa fra 950 e 1200 cm^{-1} , raccolti dal campione di controllo (sano) e quello a cui è stato

La microspettroscopia FT-IR ha riscontrato ulteriori successi nell'ambito dell'analisi molecolare cellulare. Ricciardi et al, infatti, hanno portato avanti degli studi sulla linea cellulare di neuroblastoma SH-SY5Y esposta a raggi X, mettendo alla prova l'efficacia della μ -FT-IR nel monitorare i cambiamenti biochimici dovuti all'esposizione della radiazione con l'obiettivo di determinare la miglior dose per debellare la malattia e al contempo salvaguardare la salute

del paziente. Dopo aver individuato le posizioni dei numeri d'onda associate ai gruppi funzionali delle cellule di controllo riportati in Tabella 2, Ricciardi et al hanno rimarcato come lo spettro cellulare si possa dividere in due parti (Figura 7): una zona denominata ad alto numero d'onda (HWR) che va da 3600 a 2600 cm^{-1} e che comprende i contributi di proteine, lipidi e carboidrati e un'altra chiamata regione fingerprint che contiene principalmente informazioni riguardante acidi nucleici alcuni modi di deformazione di gruppi funzionali contenuti nelle proteine [6]. I ricercatori hanno raccolto i dati spettrali delle cellule di controllo (non esposte ai raggi X) e delle cellule dopo l'esposizione a t_0 (subito dopo l'irraggiamento) e a t_{24h} , utilizzando diverse dosi (2, 4, 6, 8, 10 Gy).

Tabella 2: Classificazione dei gruppi funzionali contenuti nei campioni cellulari associati alla posizione dei picchi.

Wavenumber (cm^{-1})	Spectral assignments
966	C-O stretch deoxyribose and C-N ⁺ -C stretch (mainly from DNA)
996	C-O stretch ribose (mainly from RNA)
1030	C-O stretch (mainly from glycogen)
1080	PO_2^- symmetric stretch in glycogen and nucleic acids
1152	CO-O-C asymmetric stretch (mainly from glycogen)
1171	CO-O-C asymmetric stretch from ester bonds in cholesteryl esters
1238	PO_2^- asymmetric stretch (mainly nucleic acids)
1397	COO^- symmetric stretch in fatty acids and amino acids
1451	CH_2 bending (mainly from lipids)
1542	N-H bending and C-N stretch in proteins (Amide II)
1648	C=O stretch in proteins (Amide I)
1741	C=O stretch in triglycerides and cholesterol esters
2856	CH_2 symmetric stretch (mainly from lipids)
2875	CH_2 symmetric stretch (mainly from lipids)
2926	CH_2 asymmetric stretch (mainly from lipids)
2956	CH_3 asymmetric stretch (mainly from lipids)
3012	=C-H stretch (mainly from unsaturated lipids)

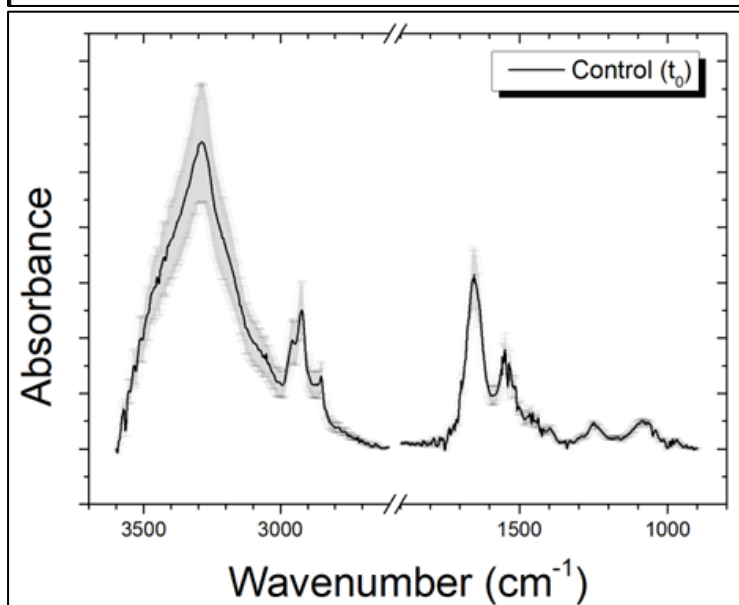


Figura 7: Rappresentazione dello spettro infrarosso delle cellule di neuroblastoma non esposte alla radiazione.

Nel presente lavoro, riportiamo i risultati ottenuti da Ricciardi et al riguardo gli spostamenti rivelati dalla spettroscopia dovuti alla dose della radiazione a t_0 riassunti dalla Tabella 3 [6].

Tabella 3: La tabella riporta i picchi in cm^{-1} delle cellule di controllo e quelle irradiate a diversi Gray. La seconda colonna è riferita al tipo di componente biologico rivelato all'assegnato numero d'ona (p, proteine; l, lipidi; c, carboidrati) ed i valori segnati tra parentesi rappresentano lo spostamento del picco.

		t_0 cells				
0 Gy		2 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Peak (cm^{-1})		Peak (cm^{-1})	Peak (cm^{-1})	Peak (cm^{-1})	Peak (cm^{-1})	Peak (cm^{-1})
2955	p, l	2956 (+1)	2957 (+2)	2957 (+2)	2958 (+3)	2959 (+4)
2922	l	2922	2922	2922	2922	2923 (+1)
2870	p, l	2877 (+7)	2874 (+4)	2885 (+15)	2888 (+18)	2888 (+18)
2851	l	2851	2851	2851	2852 (+1)	2852 (+1)
1652	p	1651 (-1)	1651 (-1)	1649 (-3)	1648 (-4)	1649 (-3)
1553	p	1550 (-3)	1551 (-2)	1550 (-3)	1547 (-6)	1544 (-9)
1527	p	1523 (-4)	1525 (-2)	1528 (+1)	1522 (-5)	1515 (-12)
1455	p, l	1455	1455	1452 (-3)	1451 (-4)	1452 (-3)
1396	p	1398 (+2)	1397 (+1)	1399 (+3)	1402 (+6)	1407 (+11)
1246	DNA, c	1248 (+2)	1247 (+1)	1243 (-3)	1240 (-6)	1241 (-5)
1082	DNA	1081 (-1)	1082	1084 (+2)	1083 (+1)	1088 (+6)

Nella regione HWR, si osserva uno spostamento oltre la risoluzione spettrale dei picchi a 2870 cm^{-1} , associati a lipidi e proteine di membrana, ad ogni dose tranne che nel campione da 4 Gy [6]. Le variazioni in questi picchi, comunemente legate ai lipidi, indicano modifiche nella fluidità di membrana [6]. Nella regione d'impronta, si notano spostamenti per diversi picchi, soprattutto a dosi più elevate, come ad esempio a 1553 e 1527 cm^{-1} , correlati alla banda delle proteine Amide II per le dosi di 8 e 10 Gy [6]. Nella banda corrispondente allo stiramento simmetrico COO^- della proteina (1396 cm^{-1}), si osserva uno spostamento significativo alle dosi di 8 e 10 Gy [6]. Le due bande associate allo stiramento del DNA PO_2^- (1246 e 1082 cm^{-1}) mostrano, rispettivamente, spostamenti a 8 e 10 Gy, e a 10 Gy [6]. Questi cambiamenti indicano variazioni nelle caratteristiche lipidiche, proteiche e del DNA delle cellule del neuroblastoma [6]. In particolare, lo spostamento della modalità di stiramento del PO_2^- potrebbe riflettere cambiamenti nella conformazione del DNA [6]. Inoltre, gli spostamenti della modalità Amide II potrebbero essere correlati a cambiamenti nei contributi degli enzimi coinvolti nella riparazione del DNA [6]. La validità dell'utilizzo della spettroscopia FT-IR è avvalorata da innumerevoli pubblicazioni, oltre a quelle presentate a titolo di esempio in questo paragrafo.

Capitolo 2- Materiali e Metodi

2.1 Linea cellulare

Il mantenimento della linea cellulare utilizzata in questo lavoro e la preparazione del campione sono stati effettuati presso il laboratorio di Biofisica delle radiazioni del Dipartimento di Fisica, Università di Napoli Federico II. Il sistema cellulare utilizzato in questo lavoro è stato quello delle cellule di epatocarcinoma HepG2, derivata nel 1975 da tessuto epatico di un paziente affetto da un carcinoma epatico ben differenziato. Questa linea cellulare è spesso usata come surrogato di epatocarcinomi primari. Le cellule HepG2 sono state acquistate dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia), coltivate in vitro in Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM), arricchito con il 10% di siero (Fetal Bovine Serum, FBS) ed antibiotici. Le colture sono quindi state mantenute in condizioni fisiologiche utilizzando incubatori appositi, in un'atmosfera umidificata al 5% di CO₂ a 37°C.

2.1.1 Rilevanza in ambito biomedico

L'epatocarcinoma, noto anche come carcinoma epatocellulare (HCC), è una forma di cancro che colpisce le cellule epatiche. Esso costituisce il tipo di tumore primario del fegato più comune, caratterizzato da un'alta mortalità e una limitata sopravvivenza a cinque anni [7,8]. Le cause che portano alla formazione di questo carcinoma sono svariate e correlate, e spesso hanno caratteristiche fortemente endemiche in relazione anche alle condizioni di igiene della zona geografica di appartenenza [7]. Come evidenziano gli studi portati avanti da vari ricercatori e riassunti da Tümen et al [7], lo sviluppo di HCC è fortemente influenzato dal virus dell'epatite B (HBV) e quello dell'epatite C (HCV) che, in concomitanza con la comparsa di cirrosi epatica, hanno un forte impatto sulla salute dei pazienti causando una diminuzione della loro sopravvivenza [7]. Un altro fattore discriminante viene individuato dalla malattia del fegato grasso alcolica e non (N/AFLD) che, in aggiunta, a fattori genetici e fattori esterni come l'avvelenamento da tossine e dallo stile di vita come consumo di alcol e il fumo, rendono questa patologia di origine abbastanza differenziata [7,8].

Nel 2020, quello al fegato è stato il sesto cancro più comune con un'incidenza annuale di 905.677 casi [7]. Nonostante i progressi nelle tecniche diagnostiche e terapeutiche, la mortalità legata al cancro al fegato rimane elevata, posizionandosi al secondo posto come

tumore più letale, subito dopo il cancro al pancreas, causando annualmente 830.180 decessi. Il tasso relativo di sopravvivenza a cinque anni si attesta solo al 18% dei casi [7]. Tra i tumori primari al fegato, il carcinoma epatocellulare (HCC) emerge come l'entità tumorale più rilevante, rappresentando circa il 75% - 90% di tutti i casi [7]. Dopo l'HCC, il colangiocarcinoma intraepatico è la seconda entità più comune, contribuendo a circa il 10% - 15% [7]. In aggiunta, sono presenti tipologie rare di cancro primario al fegato, come il carcinoma fibrolamellare, l'angiosarcoma e l'epatoblastoma.

Indipendentemente dall'origine, la cirrosi epatica si configura come il principale fattore di rischio per lo sviluppo del carcinoma epatocellulare [7]. Approssimativamente, un terzo di tutti i pazienti con cirrosi epatica svilupperà l'HCC nel corso della loro vita [7,8].

L'individuazione, la classificazione (comprendente la stadiazione della patologia) e successivamente la cura da somministrare al paziente sono influenzate da numerosi fattori e sono tuttora oggetto di ricerca, nell'ottica di rendere più efficienti gli strumenti a disposizione per migliorare le aspettative di vita del paziente [8]. Una migliore comprensione del funzionamento e dell'espansione dell'epatocarcinoma cellulare ha tra gli obiettivi quello di giungere allo sviluppo e alla messa a punto di tecniche atte alla debellazione di possibili formazioni tumorali. I tipi di trattamenti sono selezionati in base allo stadio di evoluzione del carcinoma presente nel paziente [7]. La letteratura indica varie tipologie di trattamenti con diverse opzioni farmacologiche e radiobiologiche.

L'approccio farmacologico consiste nella chemioterapia e nell'immunoterapia.

La chemioterapia coinvolge trattamenti farmacologici mirati a contrastare la proliferazione delle cellule tumorali, con tollerabilità variabile tra i pazienti [7].

La seconda strada percorribile consiste nell'approccio immunoterapeutico che include:

- Inibizione dei checkpoint: nei tumori, alcune cellule producono proteine che limitano l'azione delle cellule T attraverso checkpoint immunitari. Gli inibitori, come PD-1/PD-L1 o CTLA-4, potenziano la risposta immunitaria, permettendo alle cellule T di contrastare efficacemente le cellule tumorali [7];
- Terapie basate su cellule T: strategie innovative, come la terapia CAR-T (chimeric antigen receptor T-cell), prevedono la manipolazione delle cellule T del paziente per identificare in modo specifico le cellule tumorali e eliminarle [7];
- Vaccini contro il cancro: Alcuni vaccini sono formulati con l'obiettivo di attivare il sistema immunitario per identificare e contrastare specifici antigeni espressi sulle cellule tumorali. [7];
- L'Adoptive Cell Transfer (ACT): essa è una forma di terapia in cui le cellule

effettive, come ad esempio i linfociti, vengono sensibilizzate, coltivate in vitro, e successivamente reinserite nel paziente [7,8]. Le cellule T geneticamente modificate, che riconoscono e prendono di mira in modo specifico le cellule tumorali, sono i linfociti [7];

- Modulazione dell'ambiente tumorale: Alcuni farmaci mirano a modificare l'ambiente attorno alle cellule tumorali per renderlo più favorevole all'azione delle cellule del sistema immunitario [7,8];
- Enhancement della terapia locoregionale: rappresenta una nuova strategia terapeutica in cui il tessuto canceroso viene presentato come cellule infette o stressate, il che potrebbe in generale potenziare l'attività del sistema immunitario citotossico [7]. Due meccanismi cruciali possono rendere un tumore più suscettibile all'azione del sistema immunitario: la morte cellulare immunogenica e i segnali molecolari correlati ai patogeni [7];

Il secondo approccio è quello della radioterapia. Zhang et al, infatti, hanno condotto degli studi per apprendere informazioni sugli effetti dei raggi X sull'HCC nell'ottica di poter utilizzare tale radiazione in favore della tecnica di auto trasfusione intraoperatoria (IBS) che prevede il reinserimento in circolo, durante gli interventi chirurgici, del sangue del paziente, dopo averlo trattato con la radiazione [9].

Allo scopo di migliorare i risultati delle terapie oncologiche, spesso si praticano terapie che combinano elementi farmacologici e radiobiologici come, ad esempio, la chemioembolizzazione transarteriosa (TACE) [7]. Questa tecnica è considerata una terapia locoregionale applicata mediante accesso percutaneo e cannulazione profonda del sistema arterioso epatico, unico in fatto apporto sanguigno duale dovuto alla vena porta e arteria epatica [7]. L'obiettivo principale della TACE è consentire l'applicazione di un agente chemioterapico e l'embolizzazione (che può essere praticata attraverso RFA) aggiuntiva del vaso alimentatore [7]. I clinici distinguono regolarmente due tecniche di embolizzazione: la TACE convenzionale (cTACE), che utilizza il lipiodol come agente veicolante, e la DEB-TACE, che utilizza microsfele a rilascio di farmaco (DEB).

2.2 Preparazione del campione

Le cellule sono state seminate su vetrini MirrIR di area 25x25 mm² della Kevley Technologies, Chesterland, OH, USA, specifiche per la spettroscopia FT-IR. I vetrini sono stati seminati con una densità di circa 10⁴ cellule/cm², per un totale di circa di 5x10⁶ cellule/vetrino. Tale densità cellulare garantisce sia uno spazio intercellulare libero per la misurazione del segnale di fondo sia la presenza di aggregati cellulari sufficientemente sviluppati indispensabili per ottenere un

segnale sufficientemente intenso [6].

I campioni sono stati fissati utilizzando una soluzione di paraformaldeide al 3,7% in soluzione tampone fosfato salino (PBS) per 20 minuti a temperatura ambiente. Successivamente, sono stati lavati con acqua distillata per eliminare il residuo di PBS. I campioni sono stati poi essiccati a temperatura ambiente e conservati in un essiccatore fino all'analisi, al fine di minimizzare l'umidità dei campioni in quanto le molecole d'acqua sono caratterizzate da un forte segnale infrarosso.

Ricciardi et al, insieme a molti altri autori, concordano sul fatto che le cellule fissate, piuttosto che quelle in vivo, siano più adatte per essere indagate mediante la spettroscopia FT-IR [6]. Questo approccio è molto più idoneo, poiché la procedura di fissazione preserva le proprietà biochimiche delle cellule durante le misurazioni [6].

2.3 Microspettrometro FT-IR

I tradizionali spettrometri IR operano principalmente in una configurazione a doppio raggio: un dispositivo noto come chopper distribuisce la radiazione continua emessa dalla sorgente in due fasci di intensità equivalente [10]. Uno di questi fasci attraversa il campione, mentre l'altro svolge il ruolo di riferimento, percorrendo solitamente l'aria. Dopo il reset ottico, i due fasci vengono riuniti. Un elemento cruciale del sistema è il monocromatore, che può assumere la forma di un prisma o di un reticolo. Il suo compito è quello di decomporre la radiazione risultante nelle varie componenti spettrali [10]. Queste componenti vengono successivamente analizzati da un rivelatore in base alle diverse lunghezze d'onda. Durante la scansione, la radiazione monocromatica viene catturata istante per istante, e i segnali risultanti vengono amplificati e trasformati in uno spettro, che viene, infine, registrato [1,10].

L'architettura di uno spettrometro FT-IR presenta, oltre alla sorgente di radiazione e al rivelatore, il componente chiave che lo distingue che è l'interferometro e, tipicamente, la sua geometria si ispira a quella dell'interferometro di Michelson, riportato in Figura 8 [1,10].

Questo componente ha il compito di separare e ricombinare raggi luminosi in modo da ottenere, nella ricombinazione di questi, dei pattern di interferenza dipendenti dalla lunghezza d'onda, fornendo così un'interferogramma. L'interferometro di Michelson è costituito da due specchi, di cui uno fisso e l'altro mobile, e un beam splitter [1,10]. Il raggio di luce infrarossa passa per

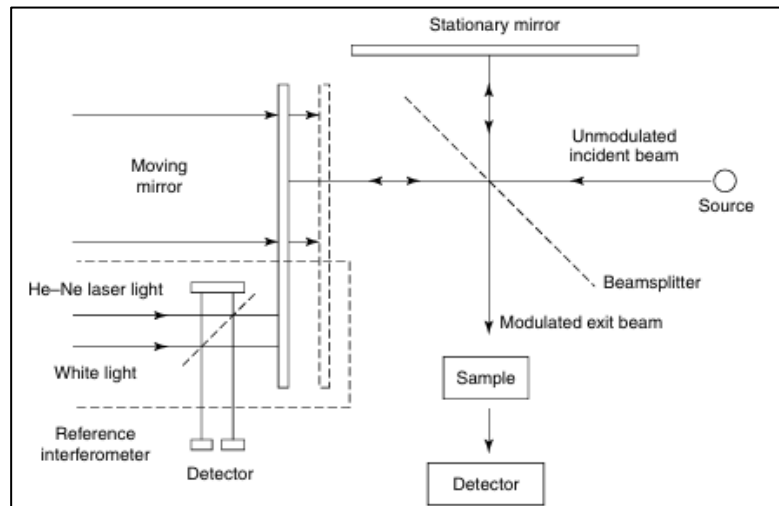


Figura 8: Rappresentazione della geometria di uno interferometro in combinazione con un detector riportata da Stuart et al [10].

il beam splitter posto in modo tale che l'angolo di incidenza sia 45° . Il raggio incidente viene diviso in due di ugual intensità: uno è riflesso verso lo specchio fisso e l'altro verso quello mobile. Gli specchi sono posti in modo che l'angolo di incidenza stavolta sia di 90° [1,10].

A questo punto, mentre uno dei raggi viene riflesso nuovamente verso il beam splitter con lo stesso cammino ottico, l'altro incide su uno specchio mobile generando così una differenza di cammino ottico tra il raggio incidente e quello uscente [10]. Per entrambi, una volta ritornati al beam splitter, parte della radiazione ritorna verso la sorgente e parte viaggia verso il detector attraversando il campione che è posizionato tra due bracci dell'interferometro [10]. Il rivelatore colleziona, quindi, l'intensità di un raggio che è somma algebrica di due onde [10]. Poiché in generale il cammino ottico del raggio che viaggia verso lo specchio fisso è diverso da quello che viaggia verso lo specchio mobile, l'interazione fra le due radiazioni nella ricombinazione sul beam splitter genera un fenomeno di interferenza [1,10]. La relazione che lega lo spostamento dello specchio mobile, Δ , e la differenza del cammino ottico, OPD, è la seguente [10]:

$$OPD = \pm 2\Delta \cdot n_i \quad (\text{eq.1})$$

dove, n_i è l'indice di rifrazione del gas in cui è immerso l'interferometro (che per il caso dell'aria corrisponde all'unità), il fattore due è legato al cammino del raggio che in totale percorre. Il segno dell'OPD dipende dalla posizione dello specchio rispetto alla posizione

iniziale. Supponiamo di avere una sorgente infrarossa monocromatica con frequenza $\bar{\nu}$ e intensità $I_0(\bar{\nu})$ che giunga ad un interferometro con geometria uguale a quella descritta precedentemente. Allora i due raggi faranno interferenza sul beam splitter e tale interferenza sarà costruttiva se lo spostamento dello specchio sarà $\Delta = n\lambda$, e distruttiva se sarà $\Delta = \left(n + \frac{1}{2}\right)\lambda$, dove λ è la lunghezza d'onda della radiazione monocromatica [10]. È chiaro che, se lo specchio si muove continuamente in certo range, sarà possibile registrare un segnale periodico d'intensità che può essere individuato come l'interferenza della radiazione in funzione del displacement dello specchio che a sua volta è legato alla differenza del cammino ottico (eq.1) [10]. L'interferogramma collezionato contiene tutte le informazioni spettrali della radiazione di partenza e rappresenta la trasformata di Fourier che, per una singola radiazione è descritta dalla relazione [10]:

$$I(\delta) = I_0(\bar{\nu})e^{i\delta\bar{\nu}}$$

ma poiché il nostro obiettivo è quello di collezionare informazioni spettrali su un range di frequenze infrarosse, l'interferogramma totale sarà [10]:

$$I(\delta) = \int_{-\infty}^{+\infty} I_0(\nu)e^{i\delta\nu} d\nu$$

Inoltre, il raggio, una volta aver investito il campione, sarà attenuato alle frequenze che corrispondono agli stati vibrazionali molecolari. Di conseguenza, le intensità registrate dal rivelatore saranno descritte da [10]:

$$I_{em}(\delta) = \int_{-\infty}^{+\infty} I_{em}(\nu)e^{i\delta\nu} d\nu$$

da cui, applicando l'antitrasformata si ottiene lo spettro della radiazione in frequenze:

$$I_{em}(\nu) = \int_{-\infty}^{+\infty} I_{em}(\delta)e^{-i\delta\nu} d\delta$$

Le intensità registrate sono in funzione del tempo in quanto:

$$\delta = 2\nu_s t_s$$

dove ν_s è la velocità di scanning e t_s rappresenta il tempo di scansione.

La velocità di scanning è un parametro fondamentale per lo spettrometro poiché da esso dipende la sua sensibilità. Maggiore è la quantità di scansioni ottenute a parità di tempo, maggiore sarà la sensibilità assoluta [10].

La strumentazione, tuttavia, ha delle limitazioni: se da un lato è necessario mantenere il più breve possibile il percorso dello specchio mobile (nel tentativo di non limitare troppo la velocità di scansione), dall'altro è altrettanto vero che risoluzioni più elevate possono essere ottenute soltanto per percorsi lunghi dello specchio [10].

Per poter passare da una risoluzione media di $1 - 2 \text{ cm}^{-1}$ a una risoluzione elevata pari o inferiore a $0,5 \text{ cm}^{-1}$, è necessario che il tempo di acquisizione aumenti notevolmente poiché lo specchio deve spostarsi su una distanza maggiore a frequenza costante [1,10].

A differenza degli spettrometri a scansione, quelli a trasformata di Fourier presentano, inoltre, notevoli vantaggi:

- Risparmio significativo di tempo: grazie alla registrazione simultanea della radiazione di tutte le lunghezze d'onda, il tempo di misurazione si abbrevia notevolmente, passando da 10 minuti degli strumenti tradizionali a pochi secondi [4,10];
- Miglior rapporto segnale-rumore (SNR): contrariamente alla tecnica di scansione, che registra una sola lunghezza d'onda alla volta (con perdita di intensità per le altre), la potenza totale della sorgente di radiazione rimane costantemente disponibile. In letteratura questo vantaggio viene indicato come vantaggio di Fellgett [1,4,10];
- Elevata precisione dei numeri d'onda: è possibile sovrapporre al segnale una radiazione laser monocromatica interna di riferimento, caratterizzata da una frequenza nota con estrema precisione [1,10];
- Gli spettri possono essere ottenuti a qualsiasi temperatura. Inoltre, la sorgente di radiazione infrarossa è abbastanza lontana dal campione, evitando così il surriscaldamento di quest'ultimo [10];
- La capacità di acquisire spettri da un'ampia gamma di campioni rende questa tecnica applicabile a praticamente ogni tipo di campione, indipendentemente dal suo stato fisico (solido, liquido, gas, soluzione, sospensione, ecc.). Ciò è reso possibile grazie all'utilizzo di specifiche tecniche e accessori adatti [1,10].

2.3.1 Descrizione dell'apparato "Spectrum One"

Lo strumento utilizzato per l'acquisizione degli spettri di assorbimento IR delle cellule è lo spettrometro Spectrum One FT-IR (PerkinElmer, Shelton, Connecticut) (Figura 9) equipaggiato con un microscopio a infrarossi del sistema Perkin Elmer Multiscope disponibile presso il Dipartimento di Medicina Sperimentale della Università "Luigi Vanvitelli" di Caserta. Lo strumento è costituito da un microscopio ottico con un ingrandimento, 10X ottico o 15X infrarosso, collineare con il fascio IR, per selezionare l'area per la quale acquisire lo spettro tramite un sistema di acquisizione di immagini ottiche con una videocamera digitale. Gli spettri possono essere acquisiti in "reflection" e "transflection mode". La fonte di radiazione stabile utilizzata per gli esperimenti è una lampada di Nernst (una ceramica di ossido di zirconio con aggiunte di ossido di ittrio riscaldato fino a 1500 – 2000 °C). Lo spettrometro usa un detector FPA (focal-array-plane) al Mercurio cadmio tellururo (MCT) con una risoluzione di 4 cm⁻¹.



Figura 9: Foto dello spettroscopio FT-IR Spectrum One

2.3.2 Procedura sperimentale

Le misurazioni sono state effettuate a temperatura ambiente su cellule coltivate sui vetrini MirrIR da 25x25 mm², in "transflection mode". Gli spettri sono stati acquisiti da un'area del campione di circa di 100x100 µm². Diverse regioni sono state esplorate su ogni vetrino e sono stati ottenuti vari spettri per ciascuna posizione. Gli spettri sono stati ottenuti da campioni cellulari fissati a 24 ore e a 48 ore dalla semina delle cellule sui vetrini. (Figura 10). Il segnale di fondo è stato acquisito in una regione del vetrino priva di cellule ed è stato raccolto nella regione spettrale compresa tra 4000 e 650 cm⁻¹, utilizzando

32 scansioni con una risoluzione spettrale di 4 cm^{-1} e un tempo di acquisizione di 5 s per ciascuno spettro, il tutto a temperatura ambiente.

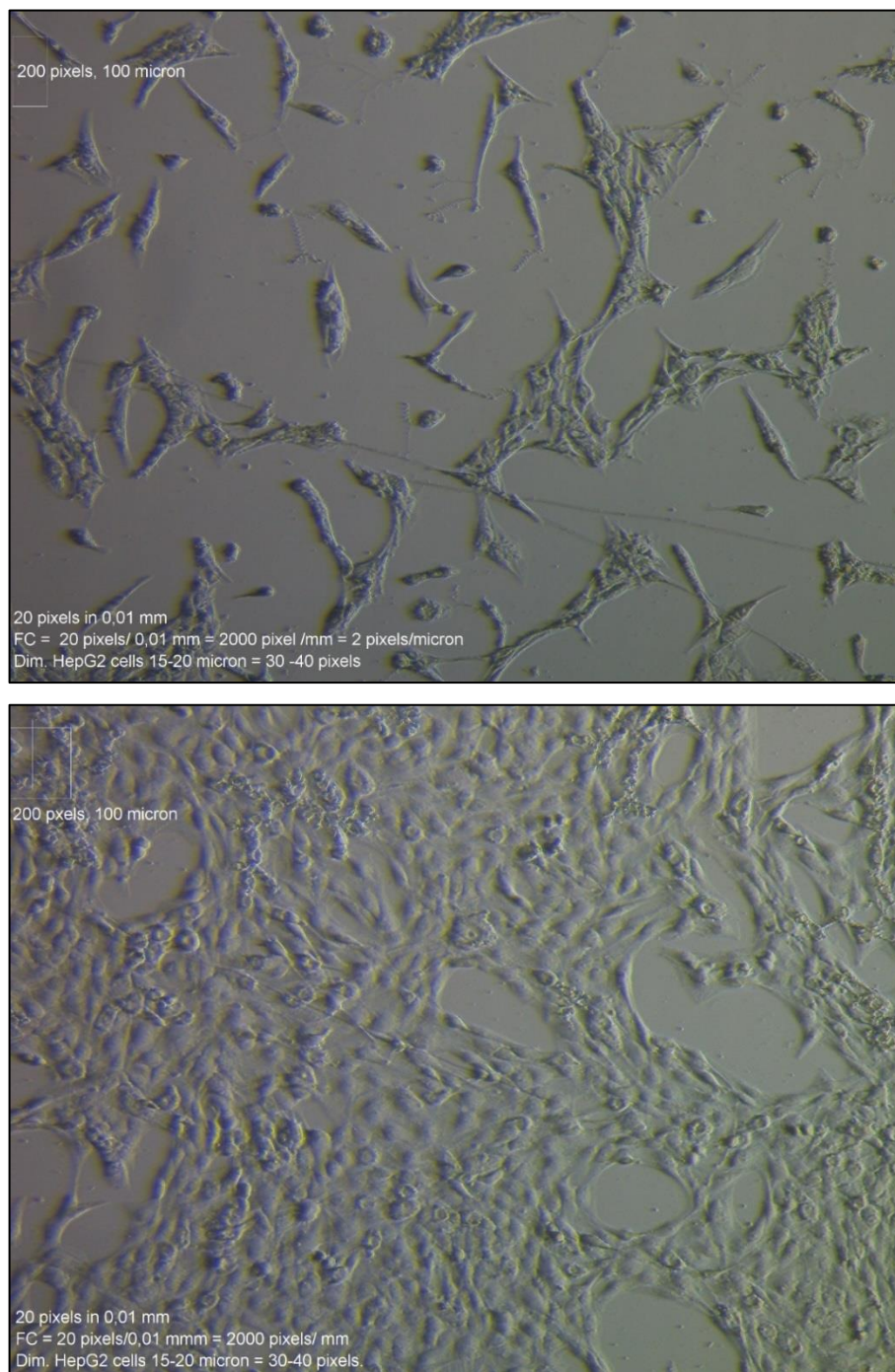


Figura 10: Foto scattata al microscopio per i campioni fissati a 24 e a 48 ore dalla semina sui vetrini

2.4 Metodi di analisi dati

Prima di procedere con l'analisi, i dati ottenuti sono stati elaborati con il software Origin (Versione 10, OriginLab Corporation, Northampton, MA USA). La correzione della baseline è una metodica che riduce notevolmente gli effetti dei segnali di fondo non legati al campione, ad esempio effetti di scattering o dipendenti dalla strumentazione [1,4]. Successivamente, sono stati ricavati due spettri ottenuti dalla media degli spettri della coltura cellulare ai tempi $t=24$ h e $t=48$ h. Dopo aver ottenuto gli spettri medi, tramite la funzione "Quickpeaks" disponibile in Origin, sono stati identificati i picchi per entrambi gli spettri e si è proceduto ad assegnare i vari picchi ai gruppi funzionali utilizzando quanto riportato in letteratura.

Per fornire un esempio delle potenzialità offerte dalla spettroscopia FT-IR, sono stati valutati i valori dei rapporti delle intensità di picchi opportunamente scelti per avere informazioni su alcune componenti biochimiche delle cellule esaminate, seguendo quanto riportato in ref. [6].

Capitolo 3- Risultati e discussioni

Gli spettri ottenuti sui campioni di HepG2 dai campioni t_{24} e t_{48} usando la geometria di acquisizione in transfection mode sono riportati in Figura 11. Gli spettri sono stati acquisiti nella regione spettrale $4000-650\text{ cm}^{-1}$ in differenti regioni spaziale dei campioni.

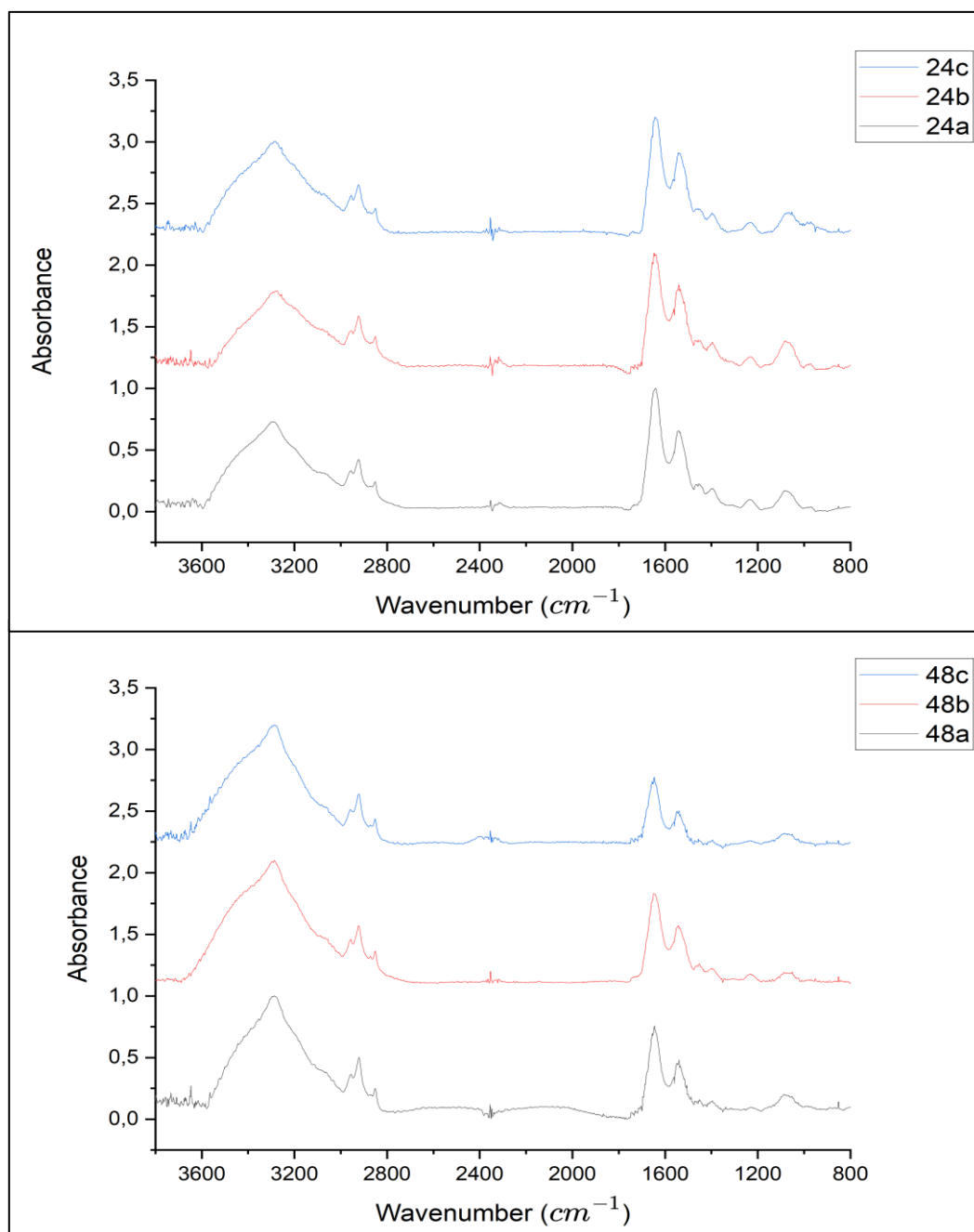


Figure 11: Rappresentazione dei dati spettrali della linea cellulare HepG2 raccolti a t_{24} e t_{48} in tre diverse posizioni del vetrino.

3.1 Analisi degli spettri relativi ai campioni t_{24}

In Figura 13 è riportato lo spettro medio per i campioni di tipo t_{24} . In tale figura non è presente la regione di numeri d'onda che va da 2800 a 1800 cm^{-1} poiché in tale regione non sono presenti contributi d'interesse per i campioni esaminati. Come si può vedere dalla Figura 12, lo spettro ottenuto risulta simile a quello presentato nel capitolo 2. Le due regioni di maggiore interesse sono quelle che vanno da 3600 a 2800 cm^{-1} e da 1800-650 cm^{-1} .

La prima regione è nota come regione degli alti numeri d'onda e comprende i contributi dovuti ai modi vibrazionali di stretching del gruppo funzionale $-N-H$ (presente nella catena peptidica dell'ammide A), modi di stretching del gruppo $O-H$ e intorno a 3100 cm^{-1} . Inoltre, è presente una zona legata agli stiramenti del gruppo Ammide B [1,6]. La regione compresa tra circa 3079 e 2850 cm^{-1} è assegnata allo stretching asimmetrico e simmetrico di proteine e lipidi, tra cui anche quelli di membrana ($-CH_3$ e $-CH_2$) [1,6,11].

Nella regione di fingerprint (1800-650 cm^{-1}), diversi picchi sono da evidenziare come significativi. Sono presenti i picchi a 1642 cm^{-1} e 1541 cm^{-1} associati principalmente all'ammide I ($C=O$ e $C-N$) e all'ammide II ($N-H$ e $C-N$). Queste due bande sono le più intense della zona. Intorno a 1468 cm^{-1} , si possono notare i contributi dovuti ai modi di bending asimmetrici di gruppi funzionali metile e metilene ($-CH_3$ e $-CH_2$) [1,6,11,12].

Successivamente si possono osservare contributi dello stretching simmetrico del gruppo carbossilato (COO^-) con posizione del picco a 1396 cm^{-1} e intorno a 1246 cm^{-1} e 1083 cm^{-1} abbiamo i contributi dovuti ai modi vibrazionali di stretching asimmetrico e simmetrico del gruppo PO_2^- insieme allo stretching dei gruppi fosfato ($C-O-P$) che insieme costituiscono la struttura dei legami fosfodiester degli acidi nucleici [1,6,11].

In Tabella 3 sono riportati i diversi picchi presenti in Figura 12 con le relative assegnazioni.

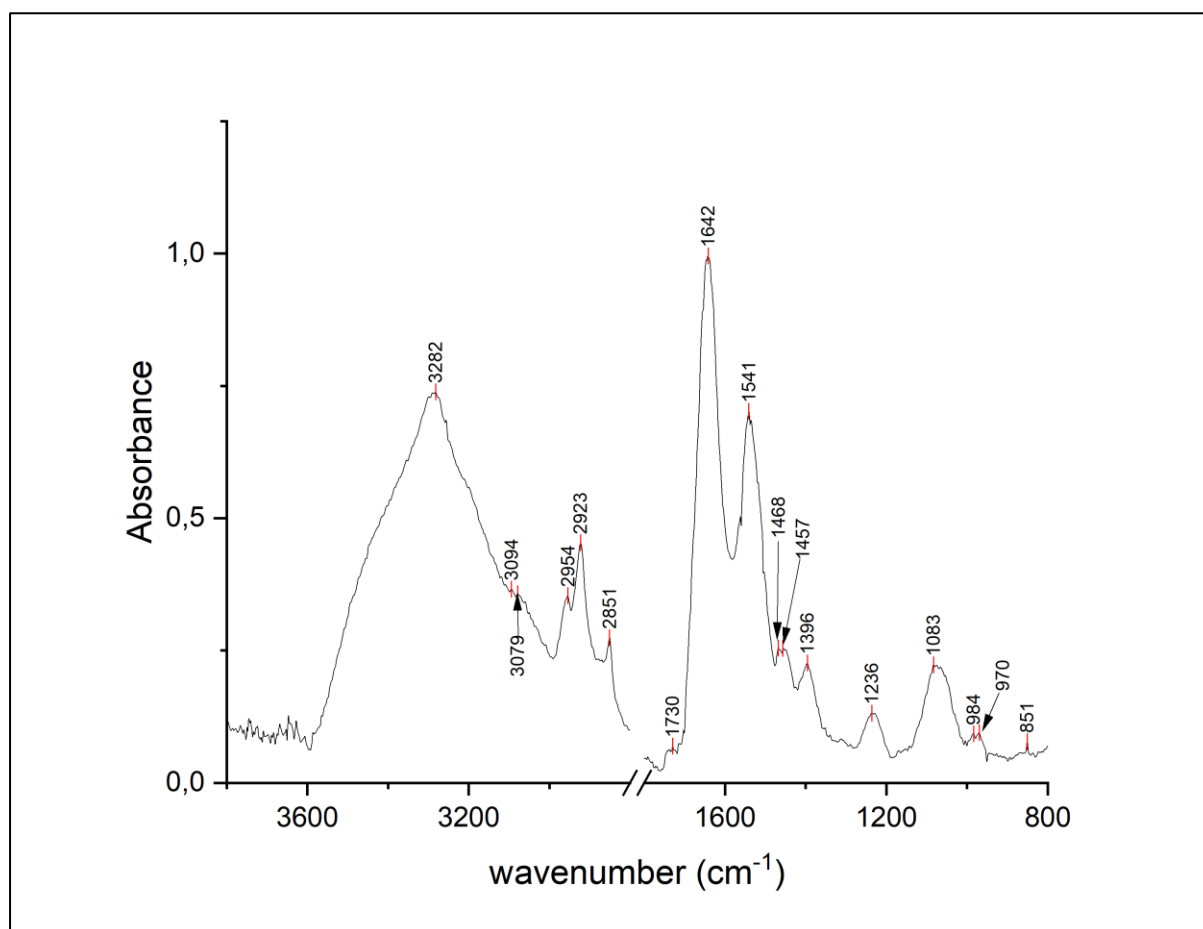


Figura 12: Rappresentazione dei dati spettrali medi delle cellule di HepG2 a 24 ore dal fissaggio. Nel grafico sono indicati i picchi più importanti.

Tabella 3: Picchi osservati dagli spettri FT-IR delle cellule a t_{24} in accordo con la letteratura [1] [6] [11] [12].
Le abbreviazioni riguardano i seguenti moti: ν = stretching, as = asimmetrico, s = simmetrico, δ = bending, sc =scissoring.

Picco	Assegnazione per t_{24}			
cm^{-1}	DNA/ RNA	Proteine	Lipidi	Carboidrati
3282		Ammide A ($-N - H \nu$)		$O - H \nu$
3094		Ammide B ($-N - H \nu$)		
3079				
2954		CH_3 $as. \nu$	CH_3 $as. \nu$	
2923			CH_2 $as. \nu$	
2870		CH_3 $s. \nu$	CH_3 $s. \nu$	
2851			CH_2 $s. \nu$	
1730			$C=O \nu$	
1642		Ammide I		
1541		Ammide II		

1468		CH_3 as. δ , CH_3 sc.	CH_3 as. δ , CH_3 sc.	
1457				
1396		COO^- s.v		
1236	PO_2^- as.v	$C - O - P$ v		
1083	PO_2^- s.v, $C - O - C$ v	$C - O - P$ v		
984	$C-O-P-O-C$ v			
970	$C-O-P-O-C$ v			

3.2 Analisi degli spettri relativi ai campioni t_{48}

Lo spettro medio del campione di cellule HepG2 dopo 48 dal fissaggio è riportato in Figura 13 e, invece, in Tabella 4 sono presenti le assegnazioni dei picchi. Per quanto riguarda la regione degli alti numeri d'onda, le posizioni dei picchi associati ai lipidi, carboidrati e proteine restano approssimativamente invariate tenendo conto del limite della risoluzione dello spettrometro FT-IR utilizzato (4 cm^{-1}). Tuttavia, la possibile proliferazione delle cellule, e di conseguenza un maggiore assorbimento della radiazione da parte del campione, ha reso più evidenti alcune bande posizionate a un numero d'onda maggiore della banda dell'ammide A. Nello specifico si fa riferimento ai picchi a $3595, 3584, 3564\text{ cm}^{-1}$, associati ad una bassa concentrazione degli alcoli e degli acidi carbossilici, e 3355 cm^{-1} dovuti ad un'alta concentrazione di alcoli in concomitanza con lo stretching vibrazionale delle ammine primarie ($N - H$) [1,6,11].

Per quanto riguarda la zona di "fingerprint" si possono evidenziare alcuni nuovi deboli contributi. Si presenta un ulteriore picco di bassa intensità intorno a 1740 cm^{-1} che potrebbe essere un contributo dovuto agli esteri fosfolipidi ($C=O$) [1,6,11]. Una cosa importante da notare è la diminuzione dell'intensità dei picchi dell'ammide I e II relativamente al picco di maggior intensità nella regione degli alti numeri d'onda. Sono presenti i picchi dovuti al contributo dei modi vibrazionali del DNA/RNA, in particolare i picchi a 1088 cm^{-1} , 1051 cm^{-1} , 1026 cm^{-1} dovuti allo stretching simmetrico e asimmetrico del gruppo PO_2^- e allo stretching dei gruppi estere e dei legami $C=N$ contenuti nelle ammine alifatiche [1].

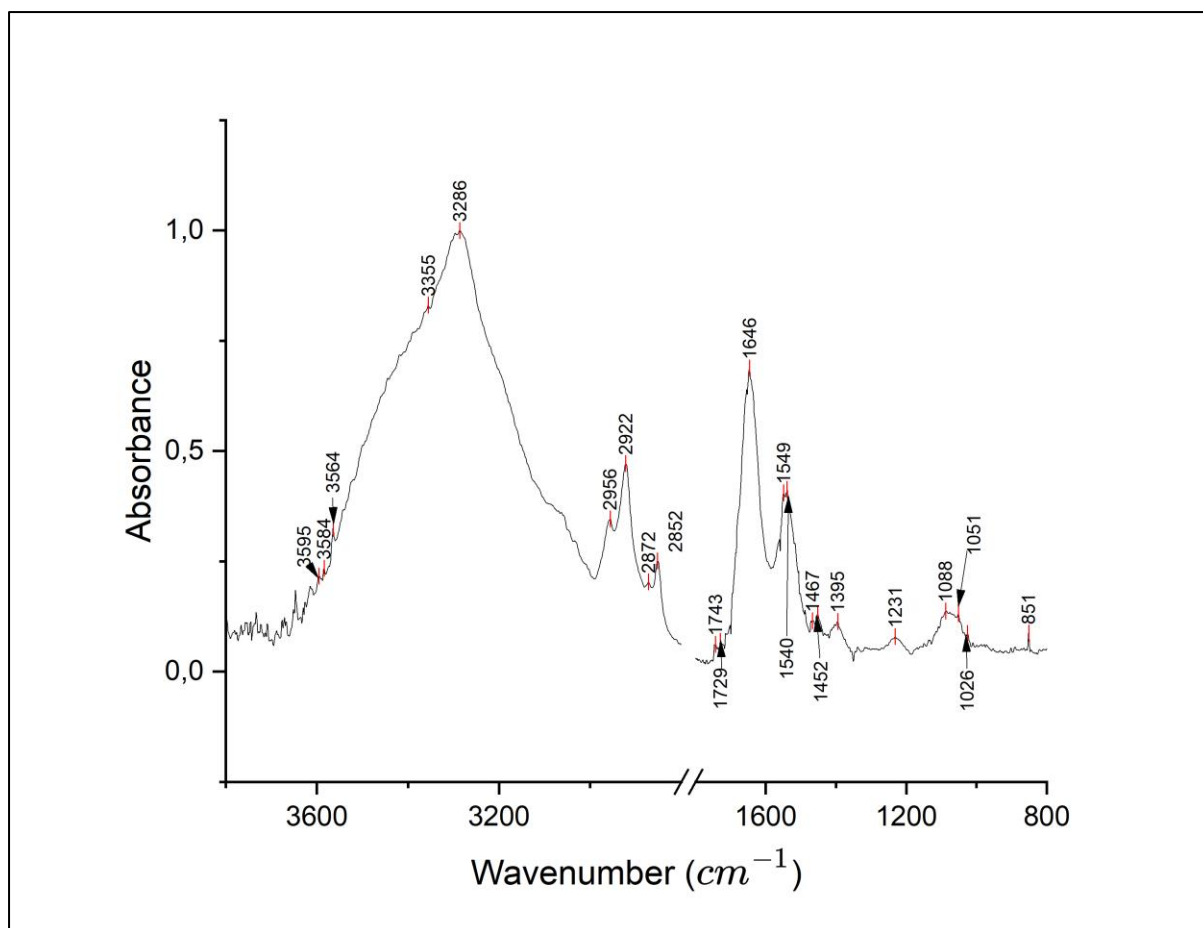


Figure 13: Rappresentazione dei dati spettrali medi delle cellule di HepG2 a 48 ore dal fissaggio. Nel grafico sono indicati i picchi più importanti.

Tabella 4: Picchi osservati dagli spettri FT-IR delle cellule a t_{48} in accordo con la letteratura [1] [6] [11] [12].
Le abbreviazioni riguardano i seguenti moti: ν = stretching, as = asimmetrico, s = simmetrico, δ = bending, sc =scissoring.

Picco	Assegnazione per t_{48}			
cm^{-1}	DNA/ RNA	Proteine	Lipidi	Carboidrati
3595				$O-H \nu$
3584	Piccola presenza di acidi carbossilici	Piccola presenza di acidi carbossilici	Piccola presenza di acidi carbossilici	
3564				
3355		$-N-H \nu$		$O-H as. \nu$
3286		Ammide A ($-N-H \nu$)		$O-H \nu$
2956		$CH_3 as. \nu$	$CH_3 as. \nu$	
2922			$CH_2 as. \nu$	
2872		$CH_3 s. \nu$	$CH_3 s. \nu$	
2852			$CH_2 s. \nu$	
1743			$C=O \nu$	

1729			C=O ν	
1646		Ammide I (C=O ν , C – N ν)		
1549		Ammide II		
1540				
1467		CH ₃ as. δ , CH ₂ sc.	CH ₃ as. δ , CH ₂ sc.	
1452		CH ₃ as. δ , CH ₂ sc.	CH ₃ as. δ , CH ₂ sc.	
1395		COO ⁻ s. ν		
1231	PO ₂ ⁻ as. ν	C – O – P ν		
1088	PO ₂ ⁻ s. ν , C – O – C ν	C – O – P ν		
1051	PO ₂ ⁻ s. ν , C – O – C ν	C – O – P ν		
1026	C=N ν	C=N ν		
851				

3.3 Analisi raziometrica

Dallo studio dell'assorbanza delle bande è possibile rilevare ulteriori informazioni sulle caratteristiche biochimiche del campione investigato. In particolare, la valutazione dei rapporti tra le intensità di picchi opportunamente scelti può fornire utili dettagli sui cambiamenti che possono essere indotti nel campione dalla sua interazione con agenti esterni o dalle mutate condizioni del campione stesso.

I rapporti indicati nella Tabella 5 permettono di avere informazioni circa i cambiamenti relativi alle diverse componenti cellulari, quali lipidi, proteine e DNA. In particolare, il primo rapporto può fornire informazioni circa il riarrangiamento della struttura secondaria delle proteine e il cambiamento dei contributi enzimatici coinvolti nella riparazione del DNA. Il secondo può fornire una valutazione relativa alla variazione delle concentrazioni relative di proteine e lipidi. Il rapporto tra le intensità dei picchi relativi allo stretching asimmetrico di CH₂ e CH₃ può fornire dettagli può contribuire a distinguere cellule sane da cellule cancerose come riportato in letteratura [12].

Il rapporto tra i picchi dell'ammide I e i modi di stretching di CH₃, insieme a quello tra quest'ultimo e i contributi del gruppo COO⁻, caratterizzano il contenuto di lipidi e proteine e la loro variazione indica un cambiamento nella fluidità della membrana cellulare e del contenuto proteico di quest'ultima.

La variazione dell'altezza della banda dell'ammide II in concomitanza di quella legata allo

stretching simmetrico e asimmetrico del gruppo fosfato fornisce informazioni circa il contenuto di DNA presente nella cellula, mentre il rapporto tra la banda di stretching simmetrico e quella di stretching asimmetrico del gruppo PO_2^- è il valore significativo indice di eventuali modifiche nella struttura del DNA[6,11,12].

Ulteriori informazioni sulle modifiche della struttura delle basi azotate del DNA possono essere ottenute dallo studio delle bande dello stretching simmetrico e asimmetrico del gruppo fosfato e, quindi, anche dello stretching di $C - O - P$ in rapporto all'altezza della banda di stretching asimmetrico del gruppo metile (Tabella 5). La letteratura indica questo valore come uno strumento per determinare la fosforilazione delle proteine [6,12].

A titolo di esempio i valori dei rapporti riportati in Tabella 5 sono stati valutati partendo dagli spettri relativi ai campioni t_{24} e t_{48} . I valori sono riportati come valori medi $\pm$ SD. È stato effettuato un t-test disaccoppiato con un livello di significatività pari a 0.05%, che ha mostrato che non vi è differenza significativa ($p \leq 0.05$) tra le medie dei rapporti dei picchi raccolti per le cellule fissate a t_{24} e a t_{48} , fatta eccezione per il rapporto (2). Questa discrepanza può essere attribuita a causa accidentali.

Tabella 5: Rapporti dei picchi spettrali a t_{24} e t_{48} considerati per le analisi delle funzioni biologiche del campione. Le indicazioni hanno come riferimento [6] [11] [12]. Le abbreviazioni riguardano i seguenti modi: v= stretching, as= asimmetrico, s= simmetrico.

N°	Rapporto		Origine Biomolecolare	Indicazione	R.M. $\pm$ SD	R. M. $\pm$ SD
	t_{24}	t_{48}			t_{24}	t_{48}
	A_x/A_y	A_x/A_y				
(1)	A_{1642}/A_{1541}	A_{1646}/A_{1549}	Ammide I/ Ammide II	Riarrangiamento proteico	$1,42 \pm 0,10$	$1,72 \pm 0,16$
(2)	A_{1541}/A_{2954}	A_{1549}/A_{2956}	Ammide II / CH_3 as. v	Contenuto proteine/lipidi	$1,99 \pm 0,03$	$1,16 \pm 0,17$
(3)	A_{1642}/A_{1236}	A_{1646}/A_{1231}	Ammide I/ PO_2^- as. v	Contenuto Proteine/DNA	$7,86 \pm 2,09$	$8,78 \pm 0,72$
(4)	A_{1642}/A_{1083}	A_{1646}/A_{1088}	Ammide I/ PO_2^- s. v	Contenuto Proteine/DNA	$4,66 \pm 1,20$	$5,70 \pm 0,82$
(5)	A_{2923}/A_{2954}	A_{2922}/A_{2956}	CH_2 as. v / CH_3 as. v	Saturazione lipidica	$1,28 \pm 0,05$	$1,36 \pm 0,05$
(6)	A_{1396}/A_{2954}	A_{1395}/A_{2956}	COO^- s. v / CH_3 as. v	Contenuto proteine/lipidi	$0,64 \pm 0,10$	$0,32 \pm 0,10$
(7)	A_{1236}/A_{2954}	A_{1231}/A_{2956}	PO_2^- as. v, C- O-P v / CH_3 as. v	Fosforilazione proteica	$0,37 \pm 0,07$	$0,23 \pm 0,03$

(8)	A_{1083}/A_{2954}	A_{1088}/A_{2956}	PO_2^- s. v, C-O-C v, C-O-P v / CH_3 as. v	Fosforilazione proteica	$0,63 \pm 0,14$	$0,35 \pm 0,07$
(9)	A_{1236}/A_{1083}	A_{1231}/A_{1088}	PO_2^- as. v / PO_2^- s. v	Modificazione del DNA	$0,59 \pm 0,07$	$0,65 \pm 0,04$

Conclusioni

La spettroscopia FT-IR in modalità “transflection”, applicata a cellule di epatocarcinoma HepG2, ha permesso di investigarne le caratteristiche biologiche e strutturali. Gli spettri ottenuti hanno chiaramente evidenziato i contributi funzionali delle diverse componenti cellulari, come lipidi, proteine, DNA e carboidrati. Inoltre, dall'analisi raziometrica del campione emerge che il trattamento per la preparazione del campione a tempi diversi non ha alterato lo stato biochimico e strutturale delle cellule esaminate.

I risultati descritti in questo lavoro di tesi confermano ulteriormente la validità della spettroscopia FT-IR come strumento “label-free” per l'analisi e lo studio di campioni di interesse biotecnologico e biomedico. Nel contesto clinico, l'applicazione della spettroscopia FT-IR, unitamente ad altre sofisticate tecniche di analisi attualmente disponibili, potrebbe dimostrarsi estremamente utile nel riconoscimento precoce di diverse patologie, agevolando così l'identificazione del percorso di guarigione ottimale da adottare per il paziente.

Bibliografia

- [1] Beć, Krzysztof B., Justyna Grabska, and Christian W. Huck. "Biomolecular and bioanalytical applications of infrared spectroscopy—A review." *Analytica chimica acta* 1133 (2020): 150-177.

- [2] Baker, Matthew J., et al. "Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials." *Nature protocols* 9.8 (2014): 1771-1791.

- [3] Gautam, Rekha, et al. "Identification of early biomarkers during acetaminophen-induced hepatotoxicity by Fourier transform infrared microspectroscopy." (2012): e45521.

- [4] Faelelbom, Khairi Mustafa, et al. "Recent applications of quantitative analytical FT-IR spectroscopy in pharmaceutical, biomedical, and clinical fields: A brief review." *Reviews in Analytical Chemistry* 41.1 (2022): 21-33.

- [5] Lipiec, Ewelina, et al. "Synchrotron FT-IR shows evidence of DNA damage and lipid accumulation in prostate adenocarcinoma PC-3 cells following proton irradiation." *Journal of molecular structure* 1073 (2014): 134-141.

- [6] Ricciardi, Valerio, et al. "An FT-IR microspectroscopy ratiometric approach for monitoring X-ray irradiation effects on SH-SY5Y human neuroblastoma cells." *Applied Sciences* 10.8(2020): 2974.

- [7] Tümen, Deniz, et al. "Pathogenesis and current treatment strategies of hepatocellular carcinoma." *Biomedicines* 10.12 (2022): 3202.

- [8] Subramaniam, Somasundaram, Robin K. Kelley, and Alan P. Venook. "A review of hepatocellular carcinoma (HCC) staging systems." *Chinese clinical oncology* 2.4 (2013).

- [9]. Zhang, Feng-Jiang, et al. "Effect of X-ray irradiation on hepatocarcinoma cells and erythrocytes in salvaged blood." *Scientific reports* 7.1 (2017): 7995.

- [10] Stuart, Barbara H. *Infrared spectroscopy: fundamentals and applications*. John Wiley & Sons, 2004.

[11] Portaccio, Marianna, Bahar Faramarzi, and Maria Lepore. "Probing biochemical differences in lipid components of human cells by means of ATR-FT-IR spectroscopy." *Biophysica* 3.3 (2023): 524-538.

[12] Liu, Renming, et al. "Studies on best dose of X-ray for Hep-2 cells by using FT-IR, UV–vis absorption spectroscopy and flow cytometry." *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 73.4 (2009): 601-607.