

Imaging Infrarosso

L'istologia con i colori del IR

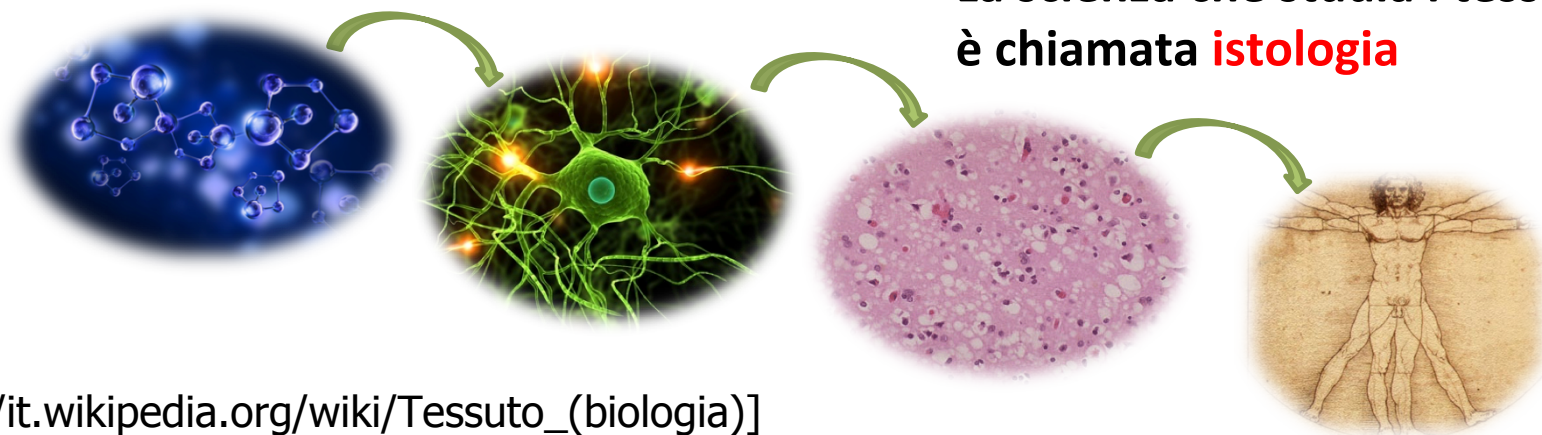
Lisa Vaccari

Il tessuto biologico

Un tessuto, in biologia, definisce un insieme di cellule, strutturalmente simili, associate per funzione: costituisce un livello superiore di organizzazione cellulare, deputato a svolgere un ruolo determinante all'interno di un organismo, e presente solo negli animali e nelle piante.

Negli animali a organizzazione superiore, spesso più tessuti diversi si associano tra di loro a formare strutture ulteriormente organizzate, gli organi; un tessuto può essere un solido, ma ugualmente un liquido: il sangue e la linfa, circolante nel sistema linfatico degli animali, sono anch'essi, dal punto di vista anatomico, tessuti.

La scienza che studia i tessuti
è chiamata **istologia**



[[https://it.wikipedia.org/wiki/Tessuto_\(biologia\)](https://it.wikipedia.org/wiki/Tessuto_(biologia))]

Perché studiare i tessuti?

L'istologia è un passaggio fondamentale non solo delle scienze mediche ma anche della scienza forense. L'analisi di un tessuto può avere:

Scopi diagnostici

Es: quale la causa del decesso di un paziente? E' la lesione in esame di natura benigna o maligna?

Scopi «terapeutici»

Lo studio degli effetti di una malattia a livello tissutale può fornire determinati informazioni per identificare migliori strategie di cura

*Con istologia in senso classico si intende lo **studio microscopico** (attraverso microscopia ottica ma anche microscopia elettronica) di tessuti animali (o vegetali) a seguito di staining (COLORAZIONE) e sectioning (RIDUZIONE IN FETTE SOTTILI).*

Lo staining istologico

Lo staining istologico prevede una serie di passaggi prima di arrivare all'analisi del campione che sono:

Fissazione: Si intendono i processi che consentono di preservare il tessuto dalla degradazione nonché di mantenerne la sua originale architettura

Processamento: Si intende il genere il passaggio di disidratazione, che serve a solidificare il tessuto per migliorarne il taglio

Inclusione: Si intendono i processi di inclusione del tessuto disidratato in resine (quali la paraffina o resine più dure) al fine di un migliore taglio

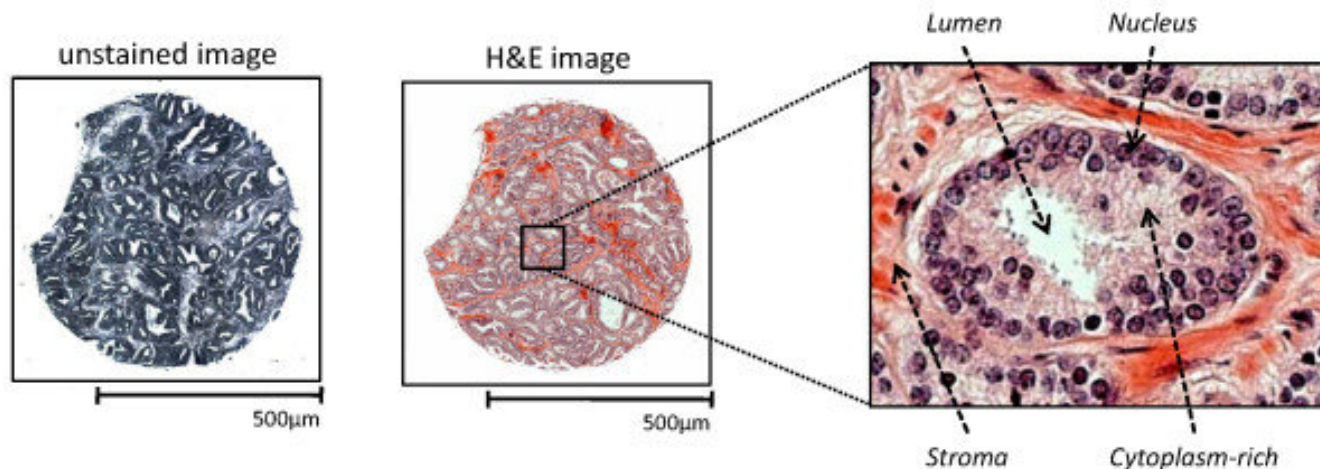
Sezionamento: Si intende il taglio del tessuto in sezioni sottili, in genere pochi micron, adatte ad essere analizzate al microscopio: lo strumento impiegato si chiama microtomo

Colorazione (staining vero e proprio): La colorazione è un processo che ha lo scopo di aumentare il contrasto di un tessuto per la sua migliore visualizzazione

Effetto dello staining

H&E staining: Colorazione con ematossilina eosina

L'**ematossilina** colora in blu violetto i componenti cellulari carichi negativamente, come acidi nucleici, proteine di membrana e membrane cellulari, elastina. Questi componenti si trovano prevalentemente a livello del **nucleo**, che assume pertanto il colore blu. L'**eosina** colora invece in rosso rosato i componenti carichi positivamente, come molte proteine cellulari, le proteine mitocondriali, le fibre collagene. Questi componenti determinano una colorazione rosata di **tutte le rimanenti zone cellulari, il citoplasma e le sostanze extracellulari.**



Ghiandola prostatica

[Ref: J.T. Kwak et al, *Multimodal microscopy for automated histologic analysis of prostate cancer*, IEEE Transactions on Medical Imaging]

Lo staining non è diagnostico del tipo cellulare (cellula malata o sana) ma ha il solo scopo di migliorare la visione del tessuto e della sua architettura.

E l'anatomopatologo, che in base alla sua esperienza, esamina l'architettura del tessuto e fa la diagnosi ♦ Human based diagnosis

E' possibile migliorare l'oggettività della tecnica istologica complimentandola con altri metodi di indagine?



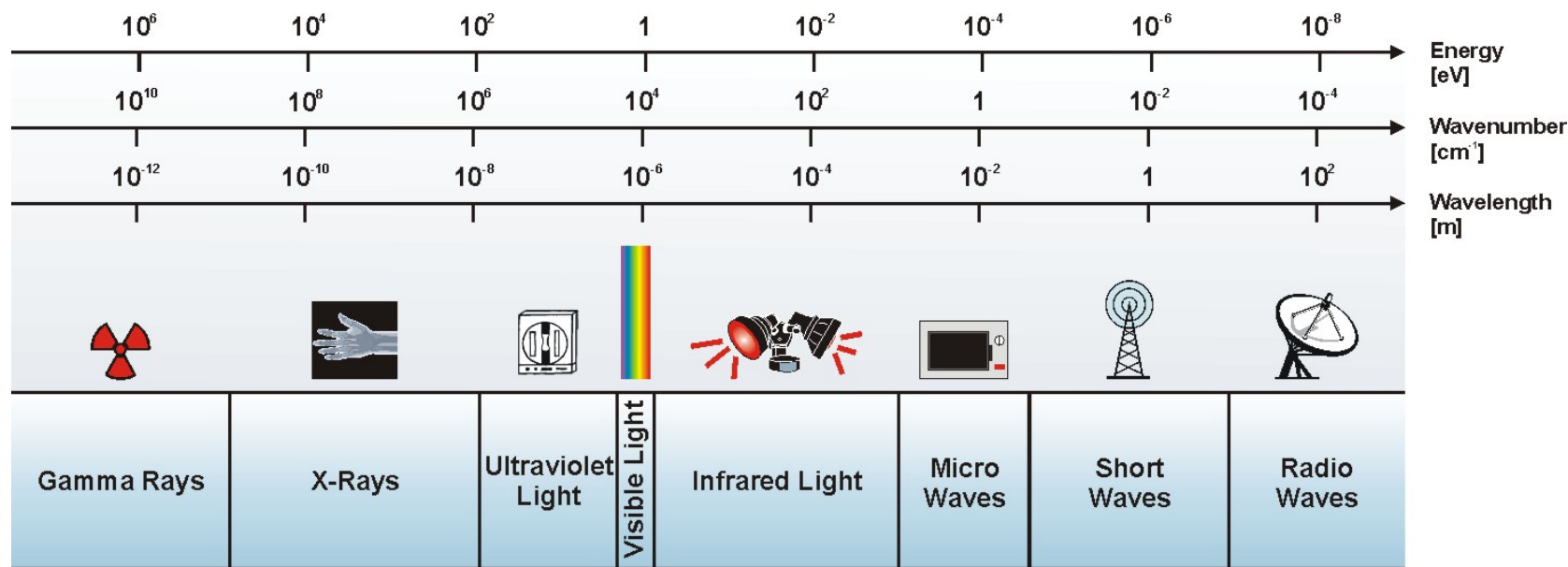
Questa l'idea di base del nostro esperimento, focalizzato sullo studio dei tessuti polmonari da pazienti COVID-19



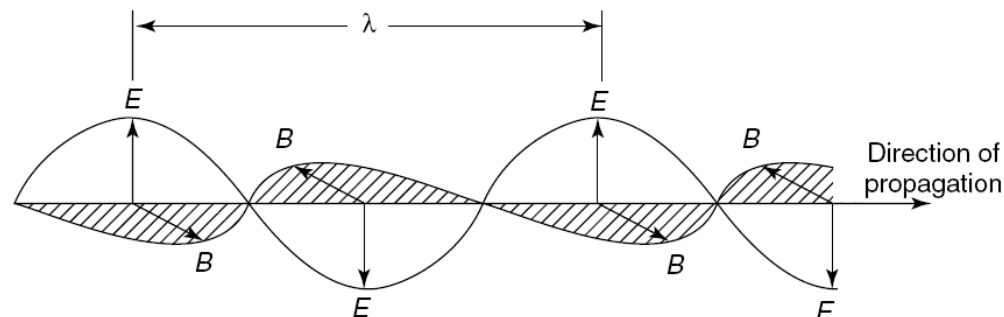
Il topic rappresenta un argomento su cui in generale fornire i concetti fondamentali per la comprensione dell'imaging con tecniche diverse dalla microscopia ottica, quali:

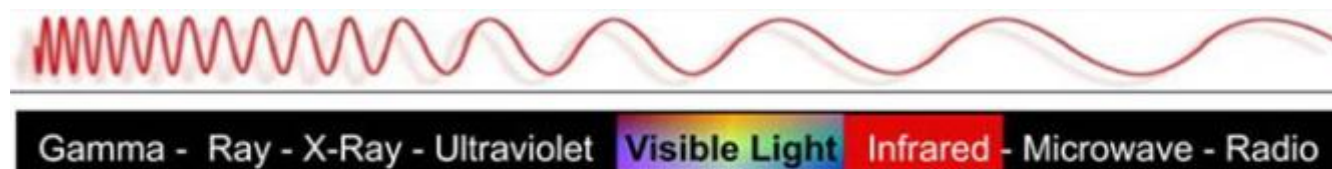
- La tomografia a raggi X
- La microscopia a forza atomica
- La microscopia infrarossa

Lo spettro Elettromagnetico e la radiazione IR

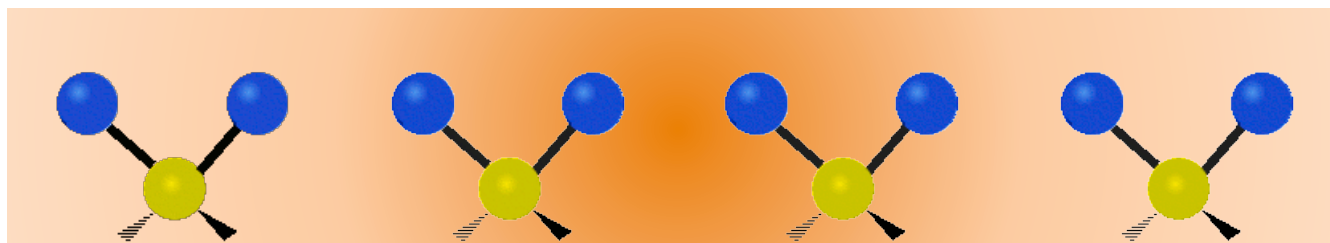


- velocità della luce, $c = 299.792.258 \text{ m/s}$
- Costante di Planck, $h = 6.62606957 \times 10^{-34} \text{ m}^2 \text{ kg} / \text{s}$
- Lunghezza d'onda, λ ([mm])
- Frequenza, ν ([Hz], $\nu = c/\lambda$)
- Energia E ([eV], $E = h\nu$)
- Numero d'onda, (cm^{-1}) , $\text{cm}^{-1} = 1/\lambda$

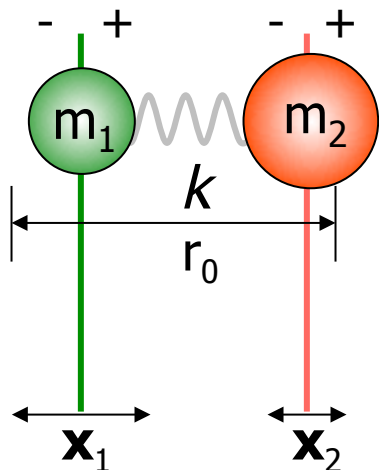




	NIR	MIR	FIR
λ (μm)	0.74	3	30
ν (THz)	400	100	10
$\tilde{\nu}$ (cm^{-1})	~ 13000	~ 3333	~ 333
E (eV)	1.65	0.413	0.041



Il modello "Ball and spring" per la molecola biatomica



1 e 2 rappresentano due atomi, m_1 ed m_2 le loro masse

La molla il legame che li unisce

Legge di Hooke:

$$F \text{ (Forza di richiamo)} = -k \cdot x$$

K = Costante di forza (tanto più grande quanto più rigida è la molla)

X = Spostamento dalla posizione di equilibrio

Le due masse si avvicinano e si allontanano con un **moto periodico** (vibrazione di stiramento, stretching), determinando un periodico allungamento/accorciamento del legame.

La **frequenza di questa vibrazione** è **direttamente proporzionale alla costante di forza della molla** (legame, k) ed **inversamente proporzionale alla "massa ridotta"** del sistema, μ

$$x(t) = A \sin(2\pi \nu t)$$

$$\nu = 1/2\pi \sqrt{K/\mu}$$

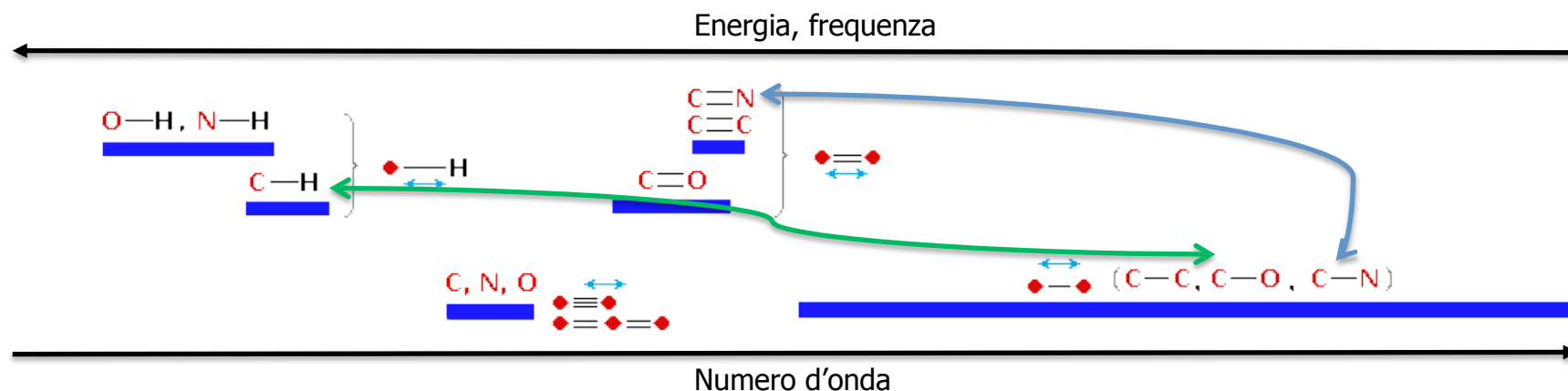
$$\mu = m_1 m_2 / (m_1 + m_2)$$

A che frequenza vibrano le molecole?

$$\nu = 1/2\pi \sqrt{K/\mu}$$

Si evince che:

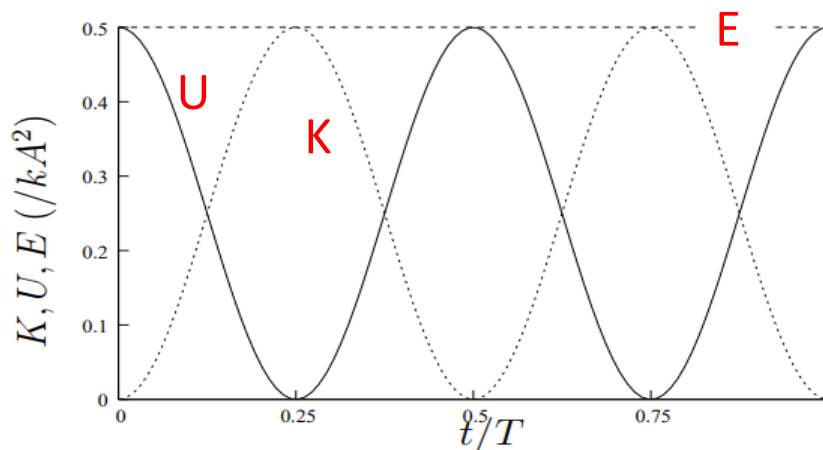
MAGGIORE È LA COSTANTE DI FORZA/LEGAME $K \rightarrow$ MAGGIORE È LA FREQUENZA DELLA VIBRAZIONE $\rightarrow$ MAGGIORE L'ENERGIA AD ESSA ASSOCIATA ($E=h\nu$)



MAGGIORE È LA MASSA RIDOTTA $\rightarrow$ MINORE È LA FREQUENZA DELLA VIBRAZIONE $\rightarrow$ MINORE L'ENERGIA AD ESSA ASSOCIATA ($E=h\nu$)

La meccanica classica

$$E = K + U = \frac{1}{2} k A^2$$

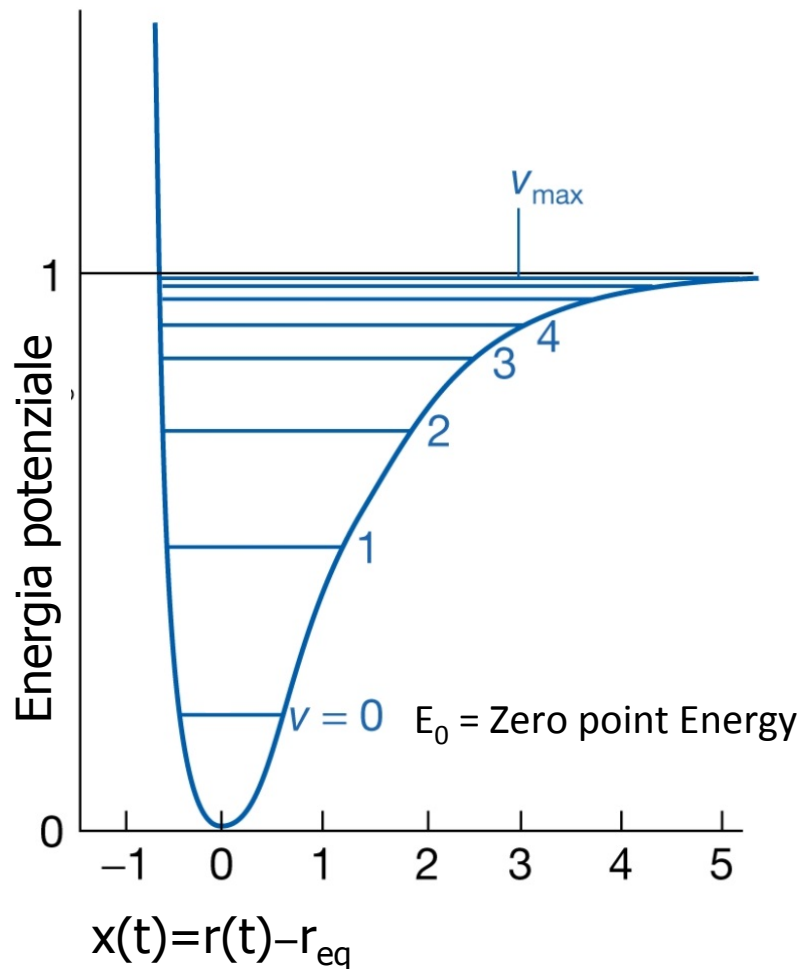


Il modello “ball-and-spring” della meccanica classica non prevede alcun limite ai valori di energia che una molecola può assumere. Secondo tale modello la molecola può anche avere energia cinetica nulla, ovvero non vibrare.

Tuttavia

le molecole sono sempre in vibrazione, anche alla T dello zero assoluto (energia del punto zero)

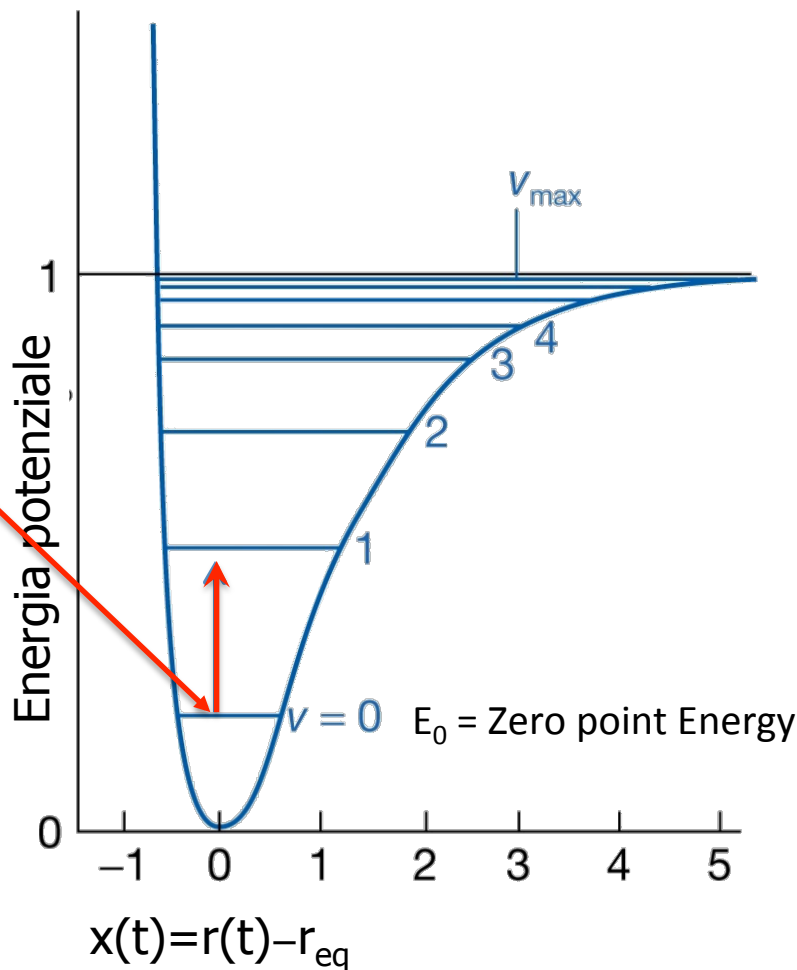
La meccanica quantistica



La meccanica quantistica ci dice che:

- 1- La vibrazione molecolare NON SI ARRESTA al punto di equilibrio, neppure allo zero assoluto.
L'energia di punto zero della vibrazione di frequenza ν è pari ad $(\frac{1}{2} h\nu)$
- 2- Esistono solo alcuni altri valori di energia vibrazionale che una molecola può assumere, separati da $(\frac{1}{2} h\nu)$

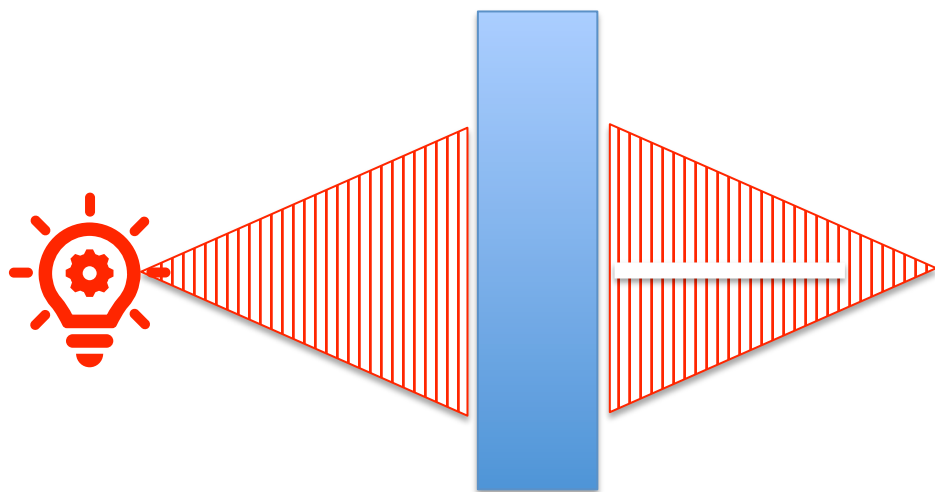
$$E_{vib} = h\nu(n + 1/2)$$



Se un sistema in vibrazione viene investito da una radiazione avente la **frequenza ν numericamente uguale a quella del moto vibrazionale**, tale radiazione verrà assorbita e il sistema acquisterà energia vibrazionale: continuerà a vibrare alla stessa frequenza, con maggiore ampiezza (e quindi più velocemente).

La spettroscopia infrarossa

Cosa misura lo strumento?



- Lo strumento opera irradiando un campione con radiazioni IR a diverse frequenze (energie)
 - Il campione assorbirà parte della radiazione alla specifica frequenza associata alla vibrazione molecolare
-
- Identificando la specifica frequenza assorbita possiamo determinare quale sia la molecola costituiva del campione
 - **La spettroscopia infrarossa è qualitativa**
 - Misurando l'attenuazione della radiazione possiamo conoscerne la concentrazione della molecola costitutiva del campione
 - **La spettroscopia infrarossa è quantitativa**

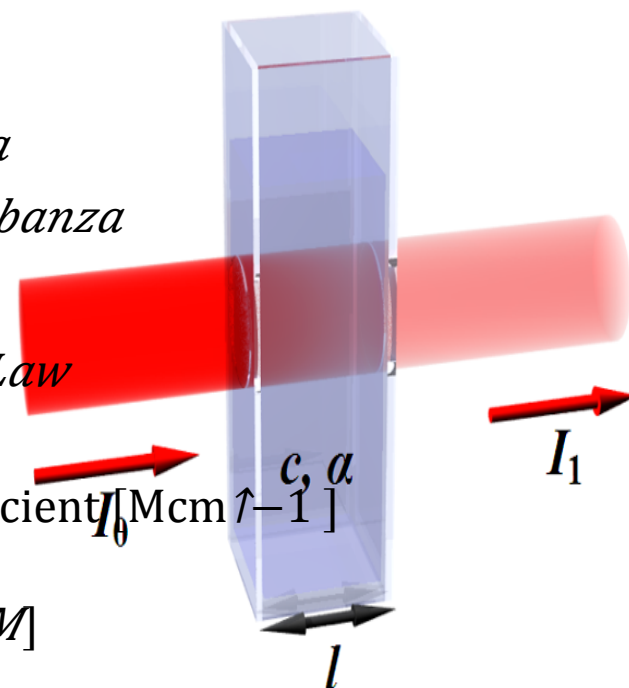
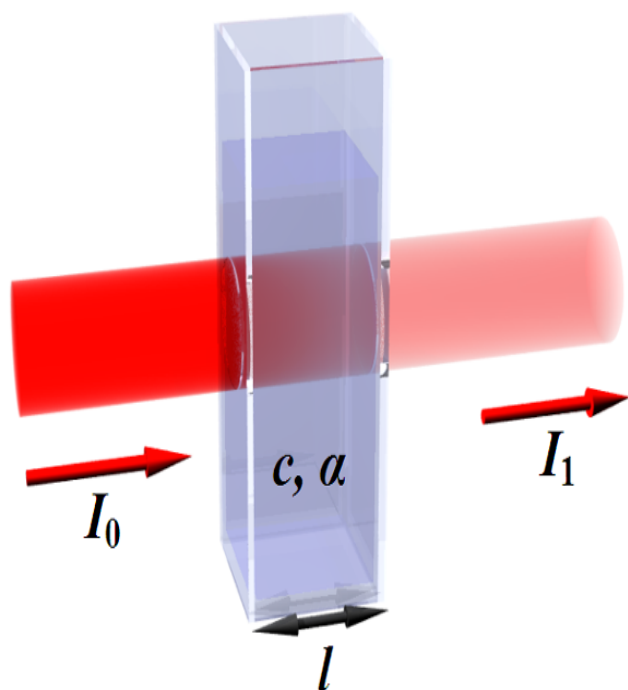
L'intensità del assorbimento è proporzionale allo spessore dello strato assorbente e la costante di proporzionalità è caratteristica della banda (Lambert-Beer).

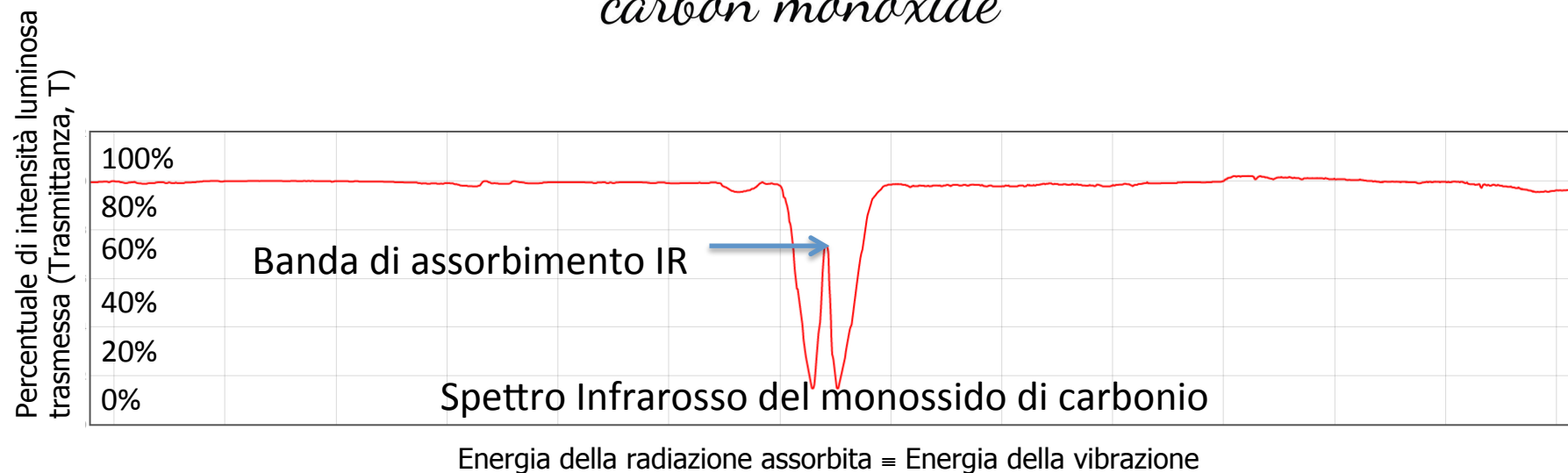
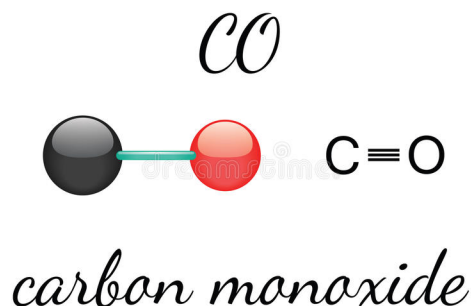
$$T = I/I_0 \rightarrow \text{Trasmittanza}$$

$$A = \log_{10} I_0/I \rightarrow \text{Assorbanza}$$

$$A = \alpha c l \rightarrow \text{Beer-Lambert Law}$$

α Molar Absorption coefficient [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]
 l Optical path [cm]
 c Molar concentration [M]





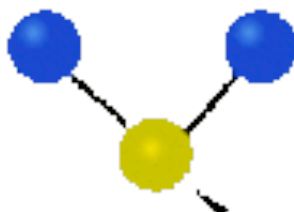
La **posizione** della **banda di assorbimento** dipende dal **tipo di molecola** (dagli atomi costituenti attraverso le masse e dalla costante di forza attraverso la forza del legame covalente). La **percentuale di assorbimento** dipende dalla **concentrazione della molecola**: maggiore la concentrazione di monossido, più intensa sarà la banda.

La maggior parte delle molecole ha più di 2 atomi!

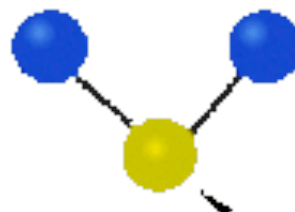
Per le **molecole triatomiche**, ed in generali per i gruppi di 3 atomi legati da legame covalente, esistono non solo vibrazioni di stiramento (stretching), ma anche di piegamento/deformazione (bending)

Stretching modes (ν)

Symmetric
Stretching

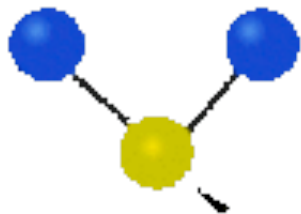


Antisymmetric
Stretching

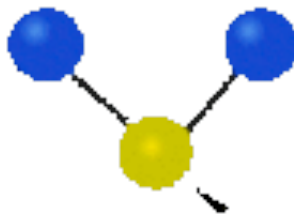


Bending modes

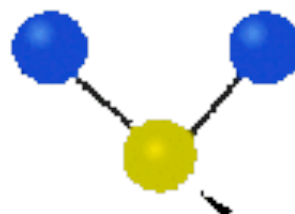
Scissoring (δ)



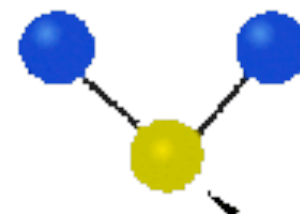
Rocking (r or ρ)



Wagging (ω)



Twisting (τ)

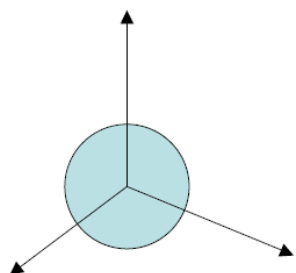


In quanti modi può vibrare una molecola costituita da N atomi?

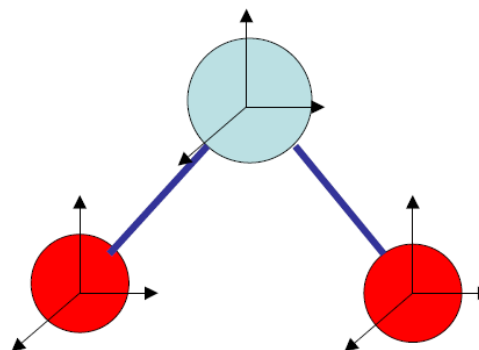
Gradi di libertà di una molecola

Ogni atomo, riferendosi ad una terna (x, y, z) di assi cartesiani, possiede 3 coordinate spaziali (gradi di libertà), cioè può muoversi nelle tre direzioni dello spazio x, y, z.

La molecola ne possiede quindi $3n$ gradi di libertà totali (n = numero di atomi). Questo valore comprende tutti i possibili movimenti della molecola:



3



$3n$

In quanti modi può vibrare una molecola costituita da N atomi?

Gradi di libertà vibrazionali di una molecola

Se ai **gradi di libertà totali** togliamo i gradi di libertà **traslazionali** e **rotazionali** restano i gradi di libertà **vibrazionali**.

Gradi di libertà traslazionali: la molecola si comporta come un corpo rigido il cui baricentro si sposta lungo i tre assi $\diamond$ la molecola presenta 3 gradi di libertà traslazionali (sono necessarie 3 coordinate per descrivere la traslazione).

Gradi di libertà rotazionali: la molecola ruota intorno ai tre assi; per le molecole lineari i gradi di libertà sono **2** (perché la molecola bidimensionale), per le altre sono **3**.

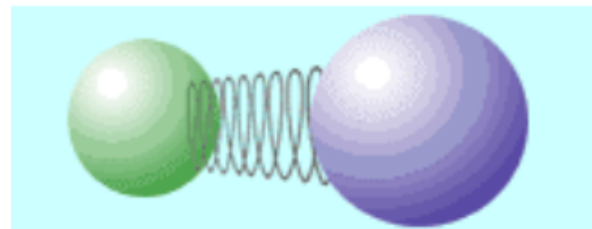
Gradi di libertà vibrazionali = $2N-6$ (5 per le molecole lineari)

Quante vibrazioni ci possiamo aspettare per una molecola costituita da N atomi?

Molecola Biatomica

$$3 \times 2 - 5 = 1$$

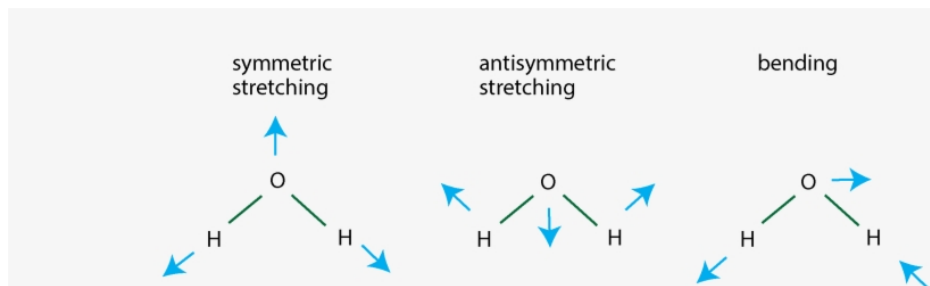
1 solo modo di vibrazione: Stretching



Molecola triatomica non lineare

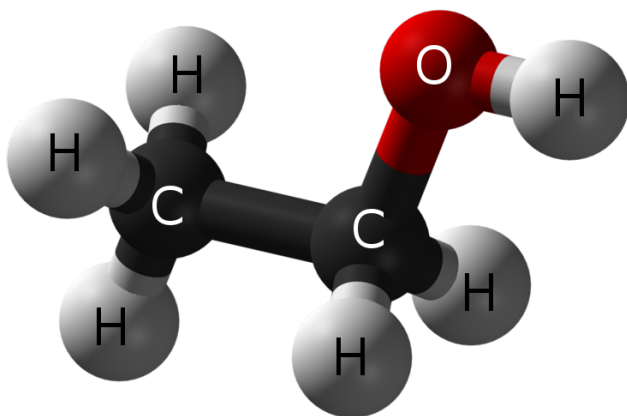
$$3 \times 3 - 6 = 3$$

3 modi di vibrazione: Stretching simmetrico, stretching asimmetrico, Scissoring



E' quindi corretto dire che per una molecola costituita da N atomi ci aspettiamo di osservare (3N-6) bande [o (3N-5) per una molecola lineare]?

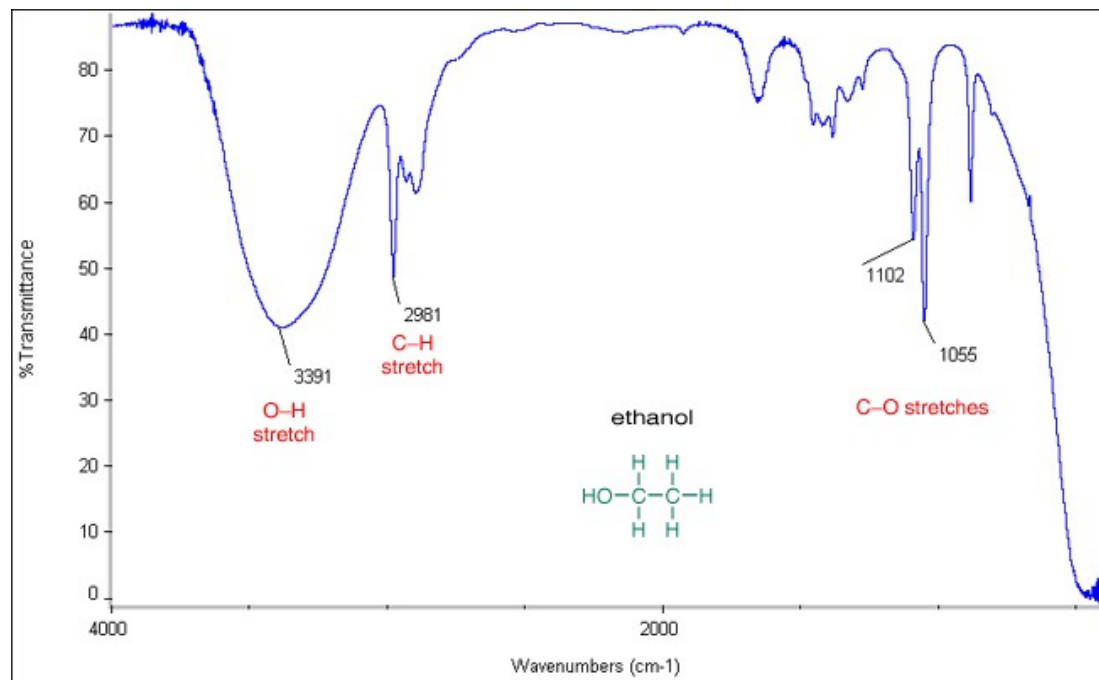
Quante bande IR ci aspettiamo di osservare?



CH₃-CH₂-OH

N=9

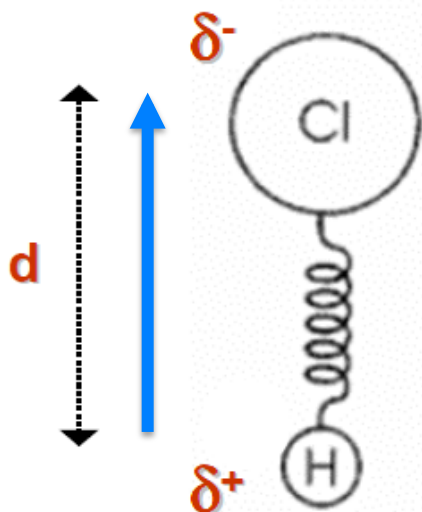
3N-6=21



Le bande IR che vediamo sono meno di 21!

Le bande vibrazionali che vediamo in uno spettro infrarosso (**BANDE ATTIVE**) possono non coincidere con i modi vibrazionali di una molecola.

$$\mu = |\partial| \times d$$



Le bande IR attive (= ovvero per le quali vi è un trasferimento di energia fra la radiazione incidente e la molecola) sono quelle associate ai modi di vibrazioni per i quali la vibrazione provoca la variazione del **momento di dipolo** della molecola.

Il momento di dipolo è una misura della distribuzione asimmetrica della carica di una molecola

$$\mu \text{ [C}\bullet\text{m]}$$

Quante bande IR osserviamo?

Le molecole biatomiche omonucleari, quali N₂, O₂, H₂, hanno un momento di dipolo nullo [non possiedono un momento di dipolo permanente] ed esso non può variare per effetto della vibrazione di stretching.

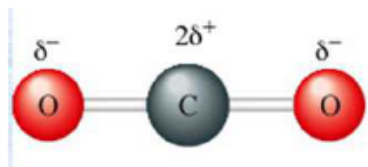
◇ ***Il modo di stretching di una molecola biatomica omonucleare non è IR attivo***

Le molecole biatomiche eteronucleari, come CO, HCl, hanno un momento di dipolo sempre diverso da zero (un atomo è sempre più elettronegativo dell'altro).

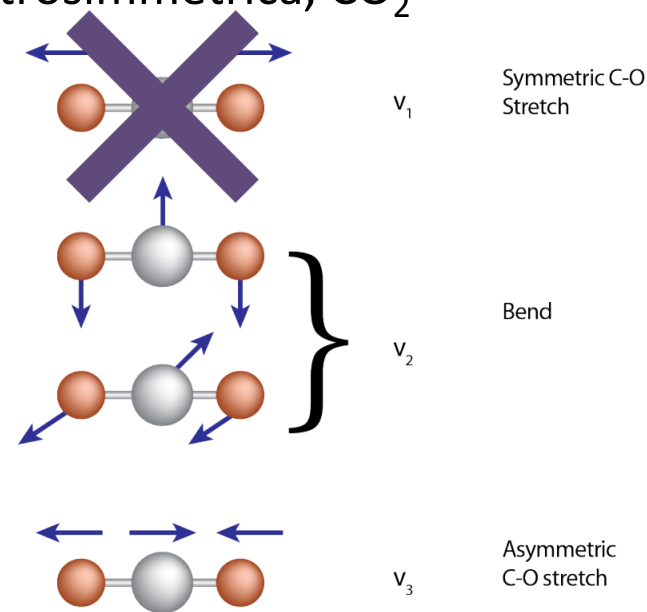
→ ***Il modo di stretching di una molecola biatomica eteronucleare è IR attivo***

Consideriamo una molecola triatomica lineare centrosimmetrica, CO₂

Il suo momento di dipolo permanente è nullo

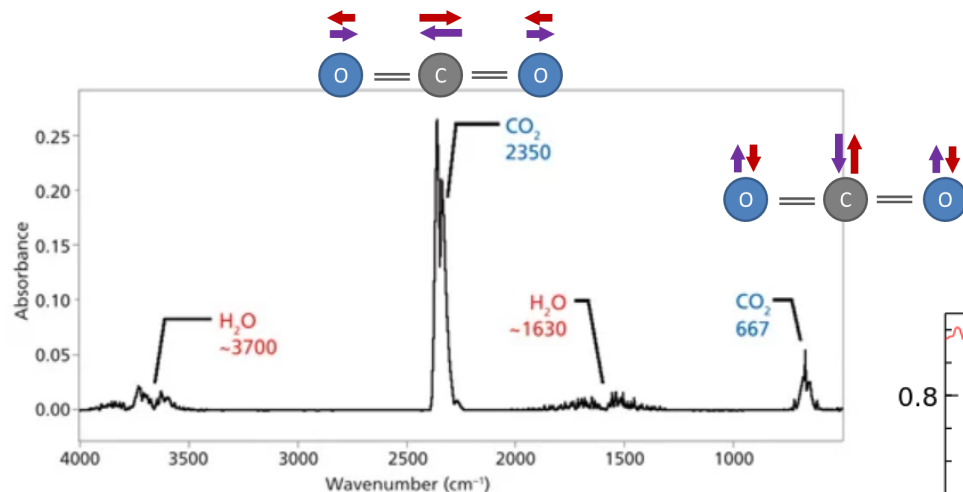


Ma la molecola può variare il suo momento di dipolo a seguito di alcune vibrazioni

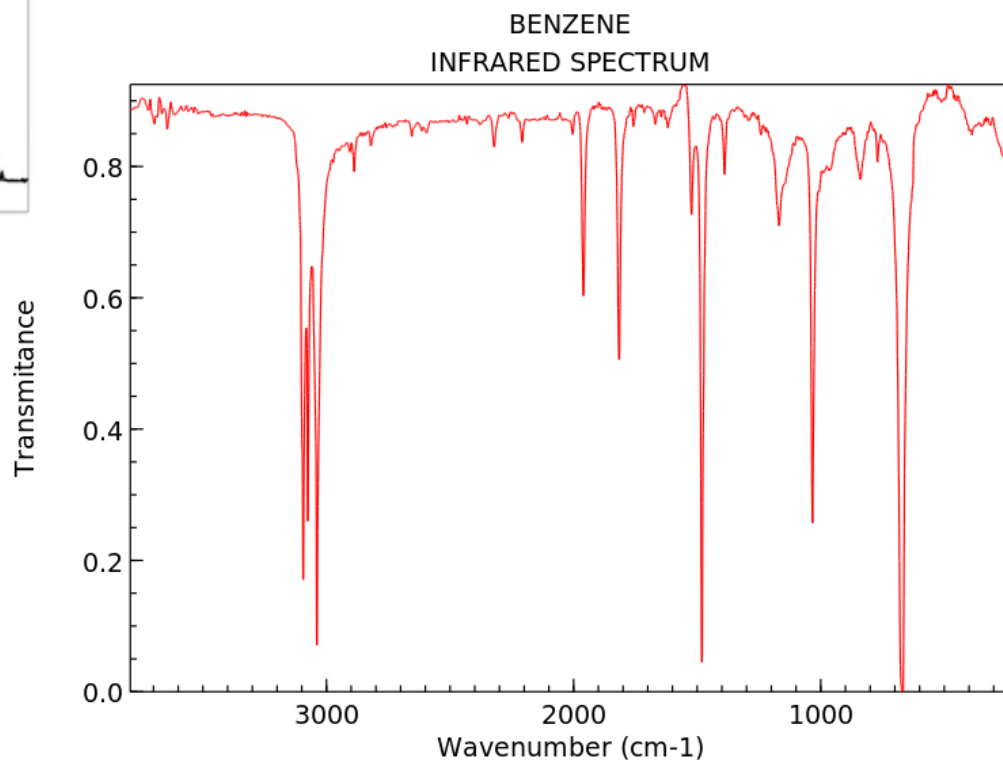


La complessità spettrale aumenta all'aumentare del numero di atomi di una molecola

Spettro infrarosso di del **diossido di carbonio**



OGNI MOLECOLA HA UN SPETTRO UNICO, CHE CI AIUTA A RICONOSCERE I GRUPPI FUNZIONALI DI CUI E' COSTITUITA.



NIST Chemistry WebBook (<https://webbook.nist.gov/chemistry>)

Cosa vediamo e possiamo capire dei sistemi biologici complessi?

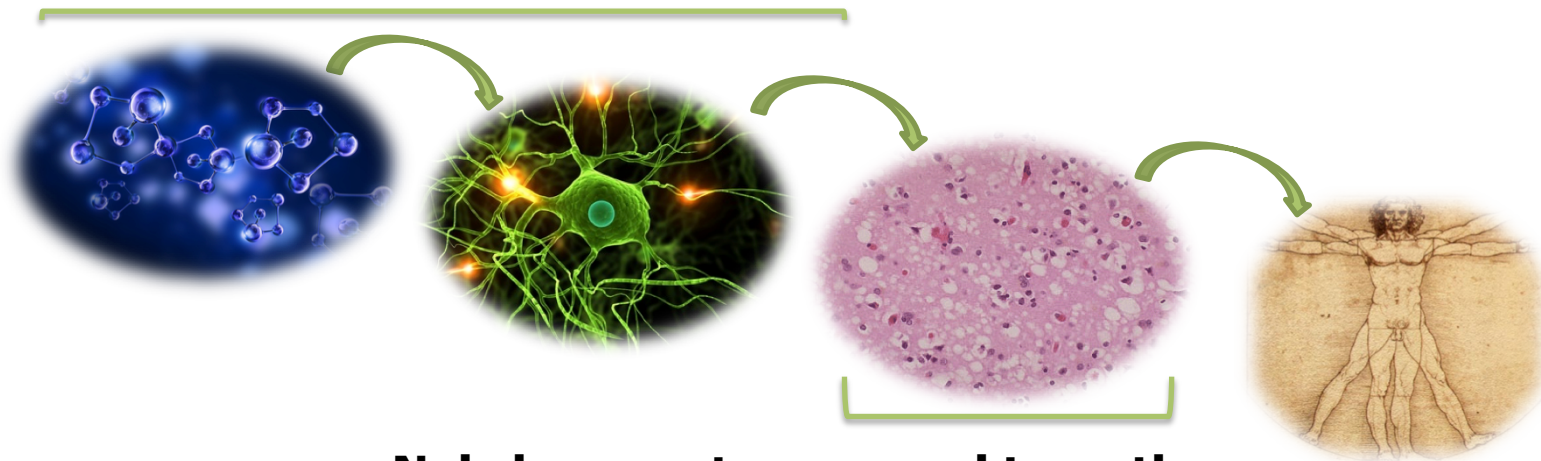
La Biospettroscopia è la spettroscopia delle **molecole della vita**

Queste molecole sono, per lo più, bio-macromolecole: polimeri di origine naturale costituiti da lunghe catene

Ci sono quattro grandi classi di bio-macromolecole che costituiscono la materia vivente

Proteine, Lipidi, acidi Nucleici e carboidrati

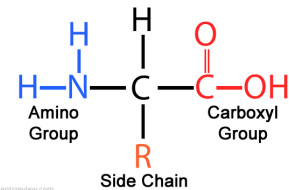
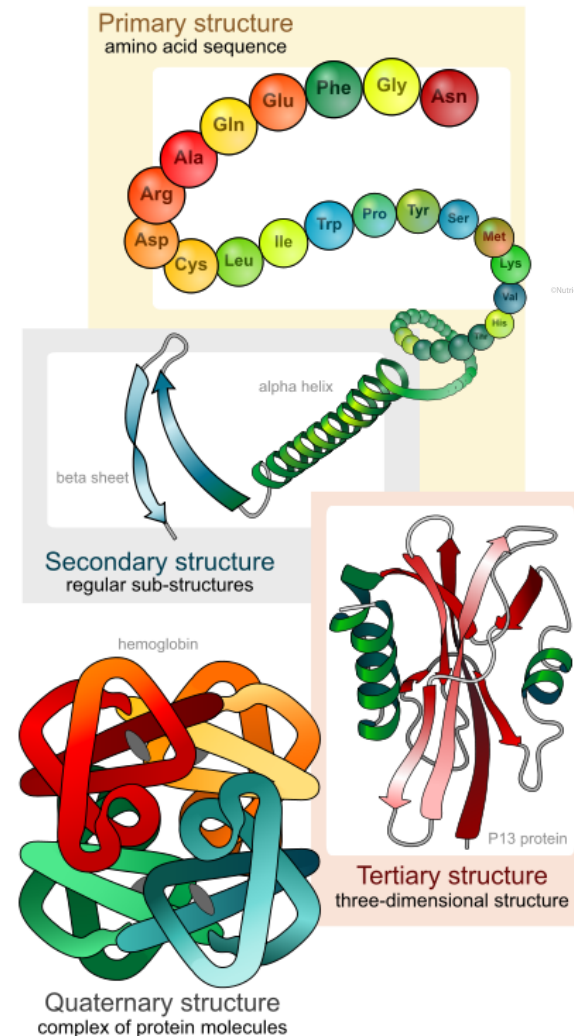
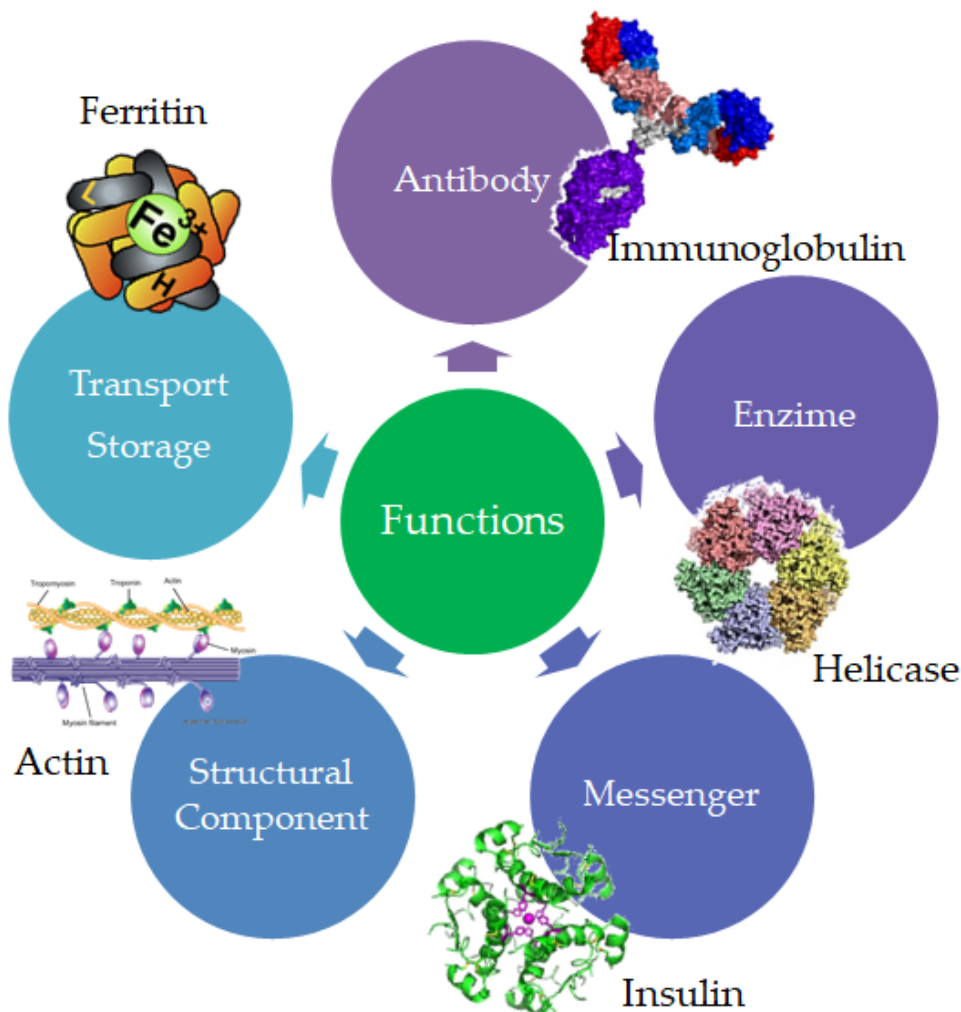
Campioni studiati con la spettroscopia infrarossa



Noi ci concentreremo sui tessuti

Proteine: Funzione e struttura

Proteins perform a vast array of functions within organisms, exhibiting activity strictly related to their structure (Structure-Activity relationship)



Lo spettro infrarosso delle proteine

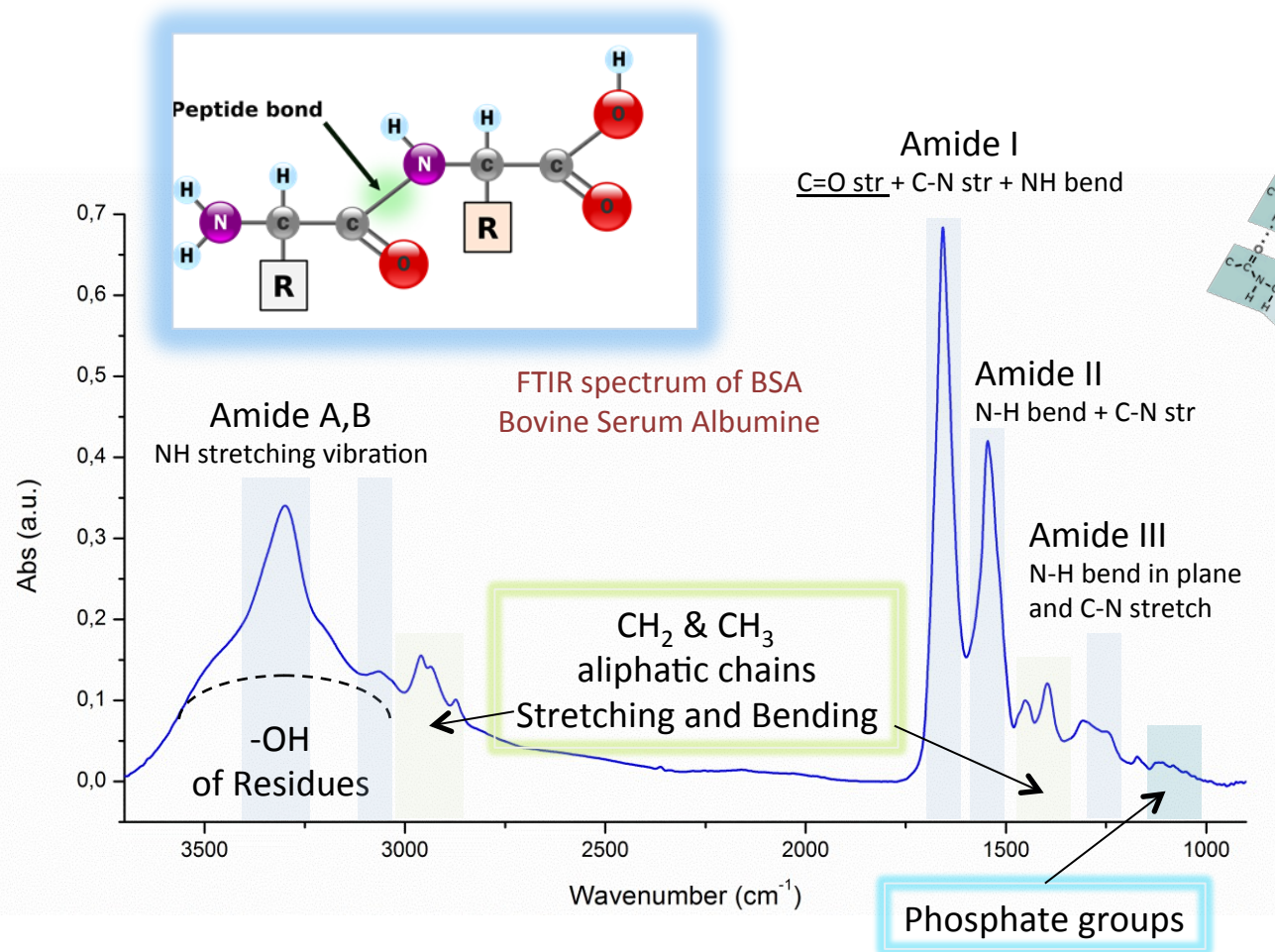
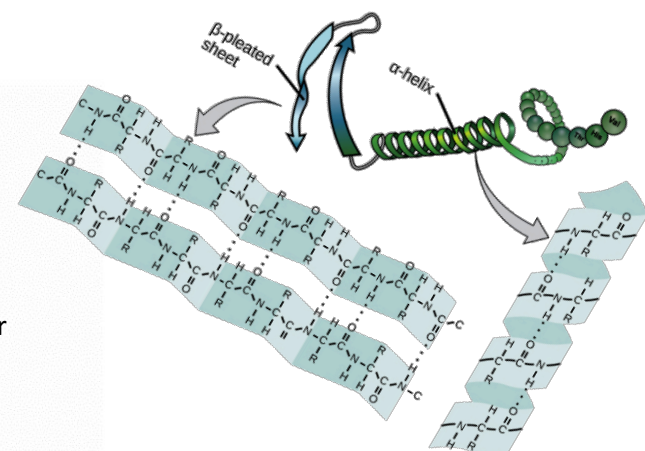
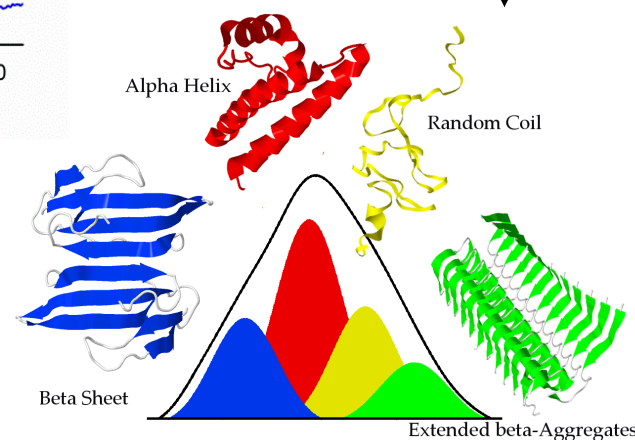


Image credit: OpenStax Biology.

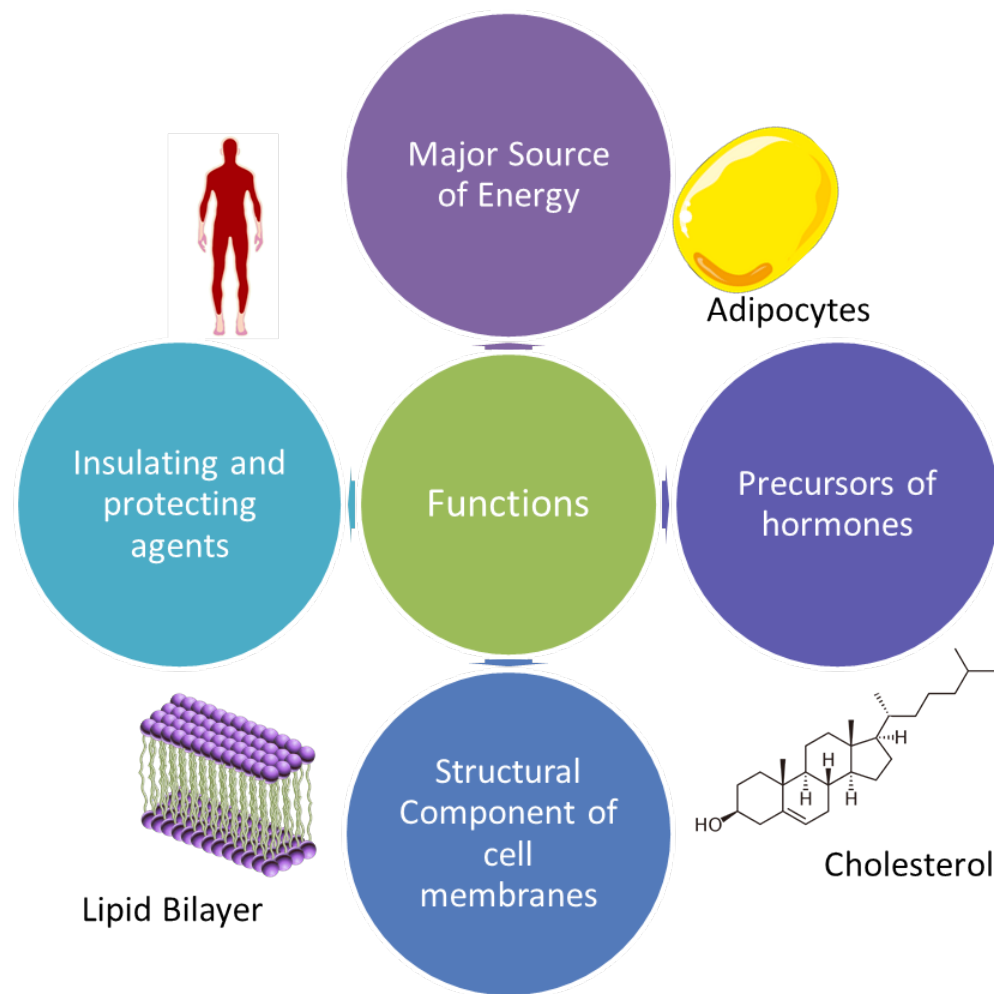


Different H-bonding networks for different peak positions



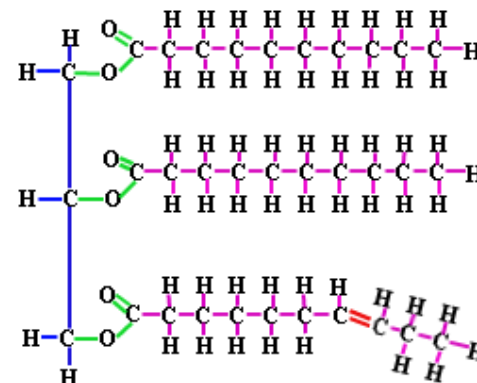
Amide I band is particularly sensitive to protein secondary structure, and conventionally employed for protein conformational studies

Lipidi: Funzione e struttura

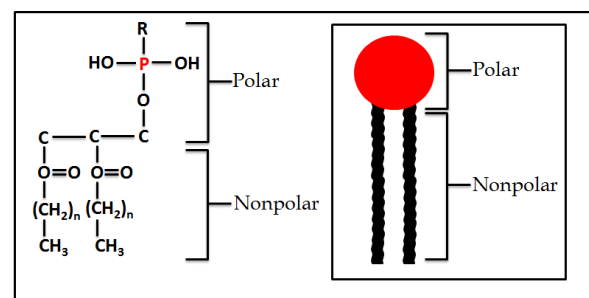


Glycerol

Fatty acids



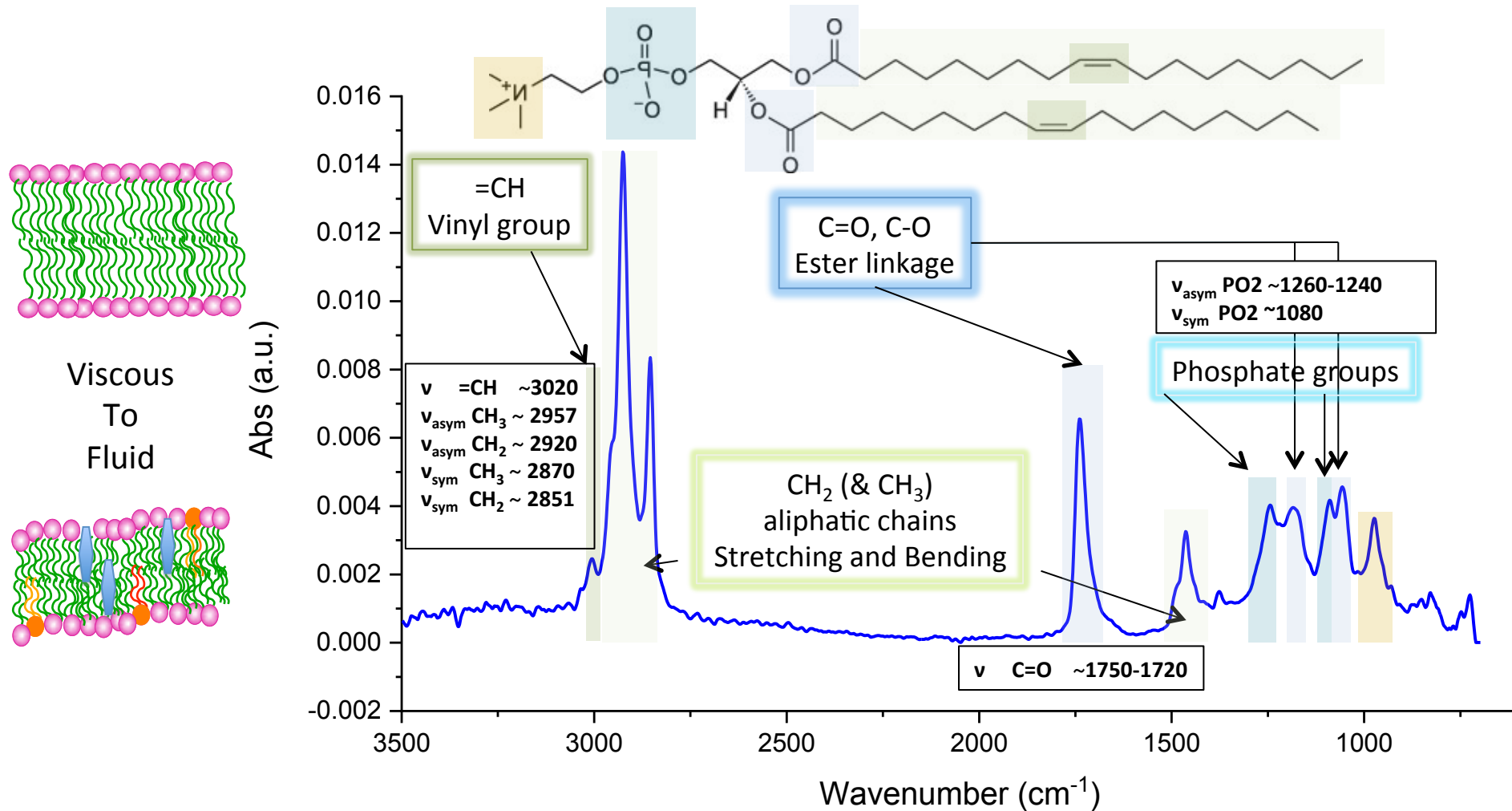
Triglyceride



Phospholipids

Lo spettro infrarosso dei lipidi

DOPC - Dipalmitoilfosfatidilcolina



CH_2/CH_3 ratio: methyl-branched fatty acids increase membrane fluidity

$=\text{C}-\text{H}$: Unsaturated fatty acids increase membrane fluidity

Shifts and broadening of the methyl and methylene bands are indicative of increased lipid disorder/fluidity

DNA stores information

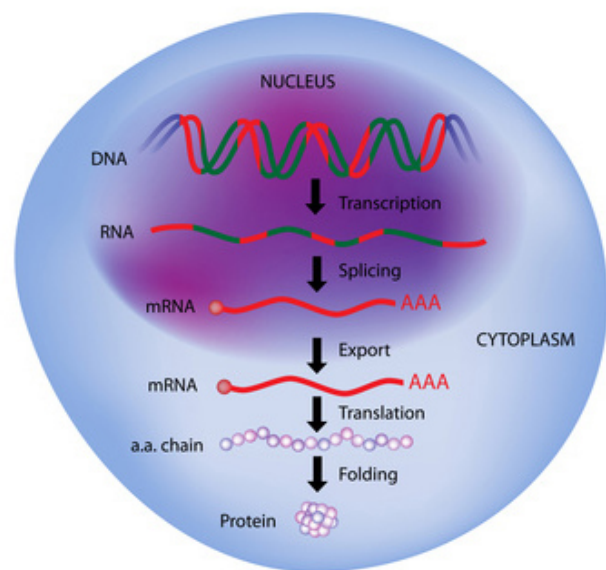


Image credit
<https://www.wonderwhizkids.com/gene-expression>

RNA transfer information

Components of Nucleic Acids

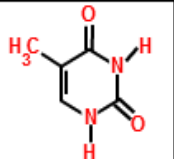
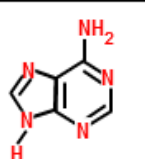
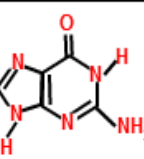
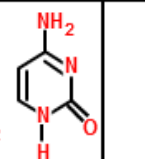
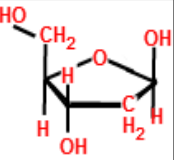
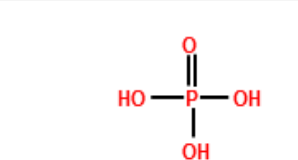
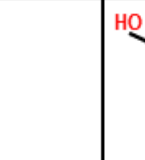
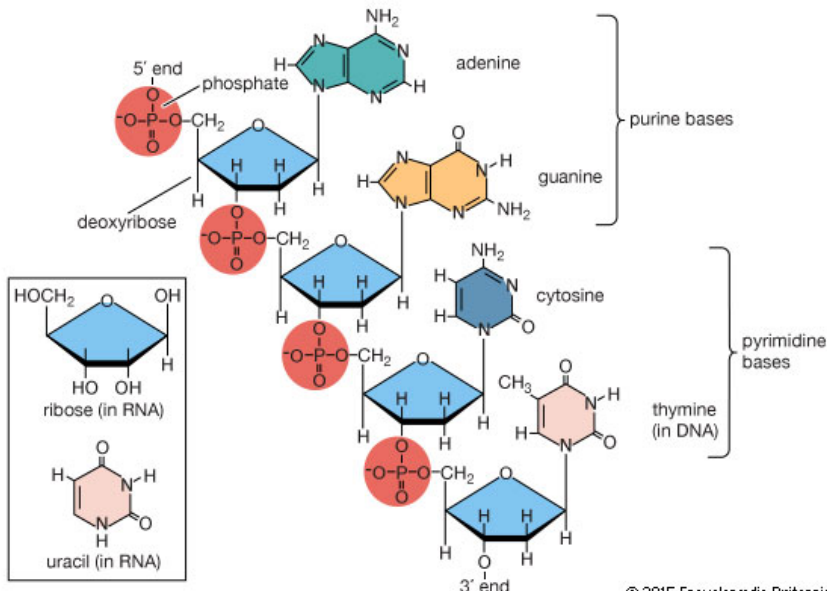
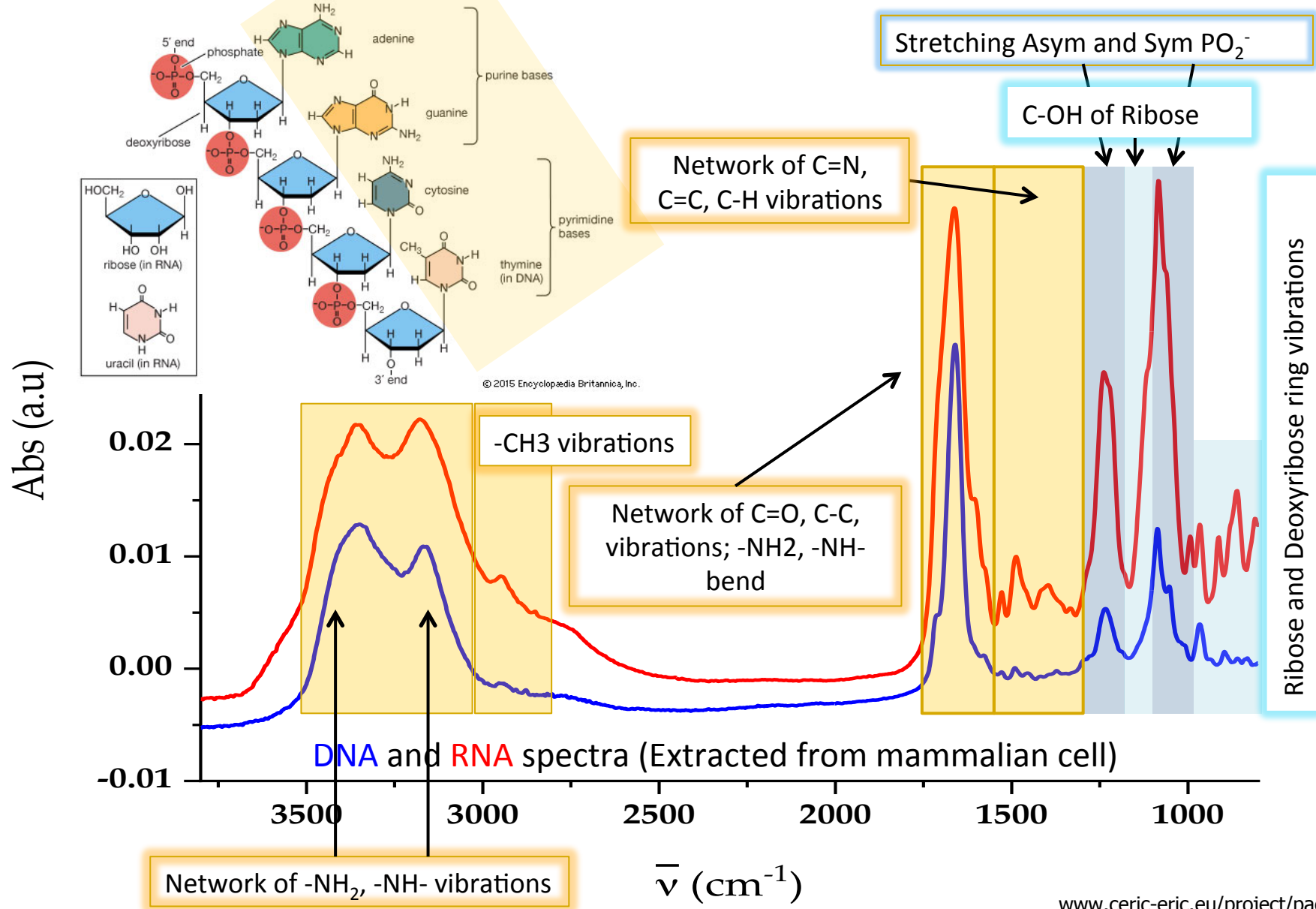
	DNA only	DNA & RNA		RNA only
Nitrogen bases	 Thymine	 Adenine	 Guanine	 Cytosine
sugar & phosphate	 2-Deoxyribose	 Phosphate		 Ribose

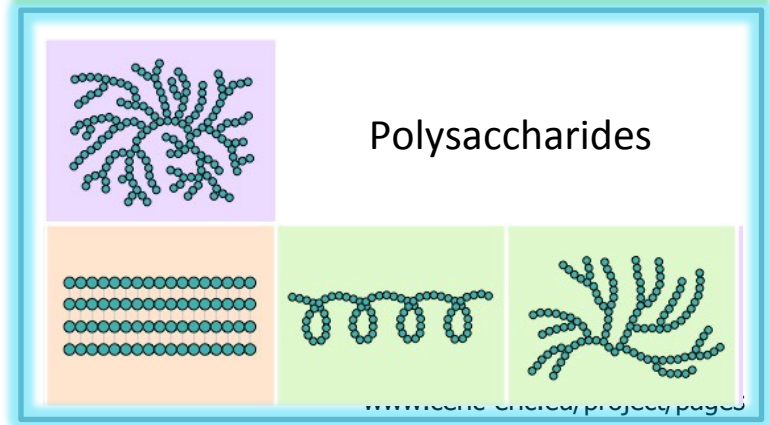
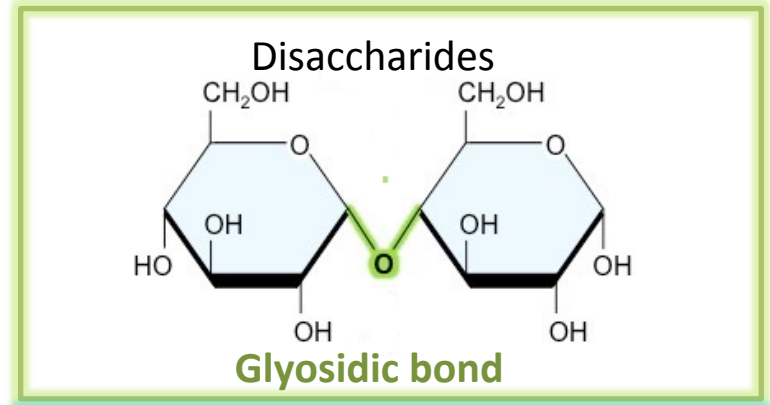
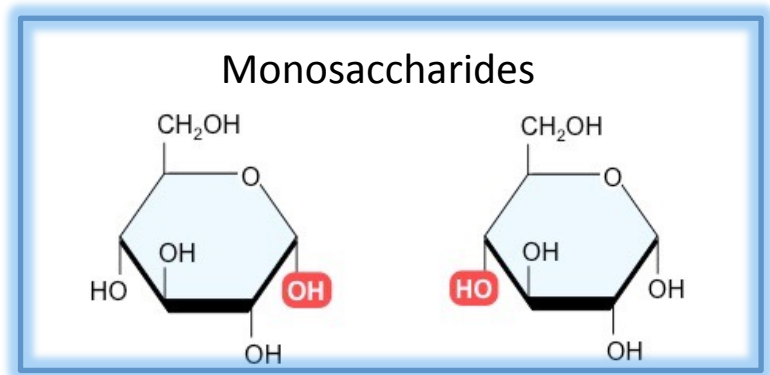
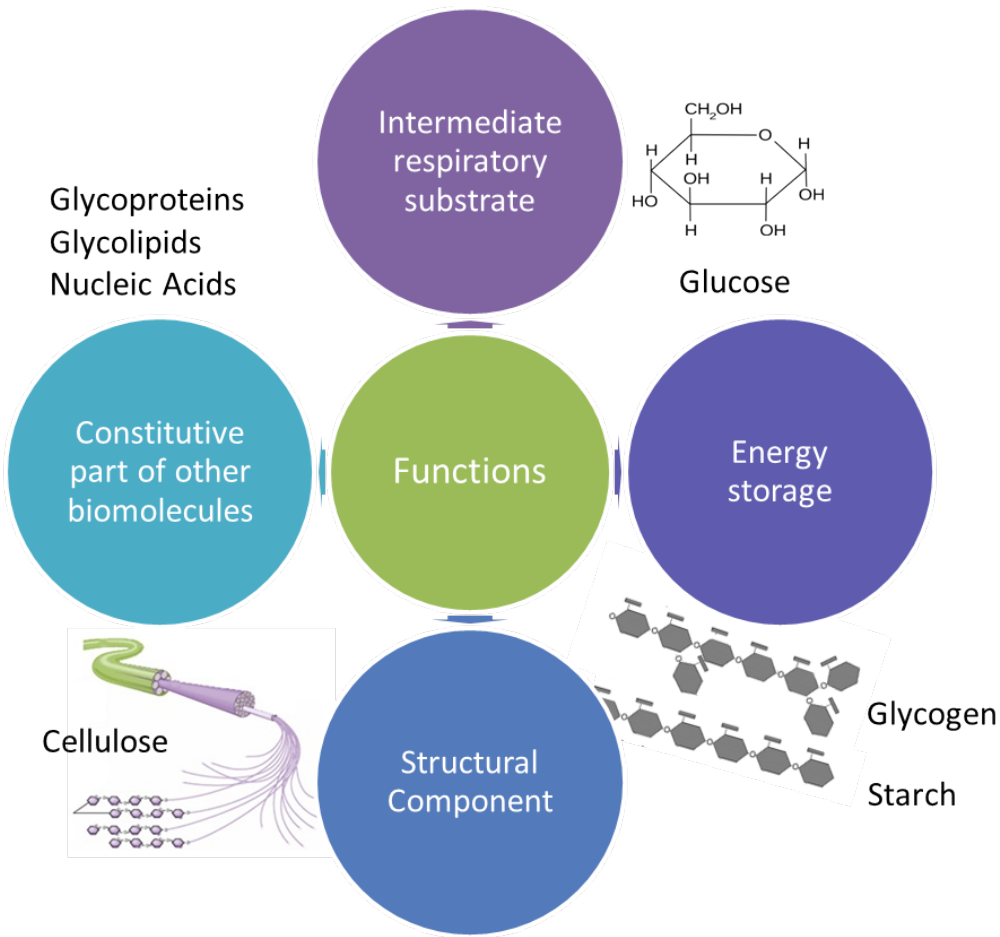
Image credit
<https://biology.tutorvista.com/biomolecules/nucleic-acids.html>



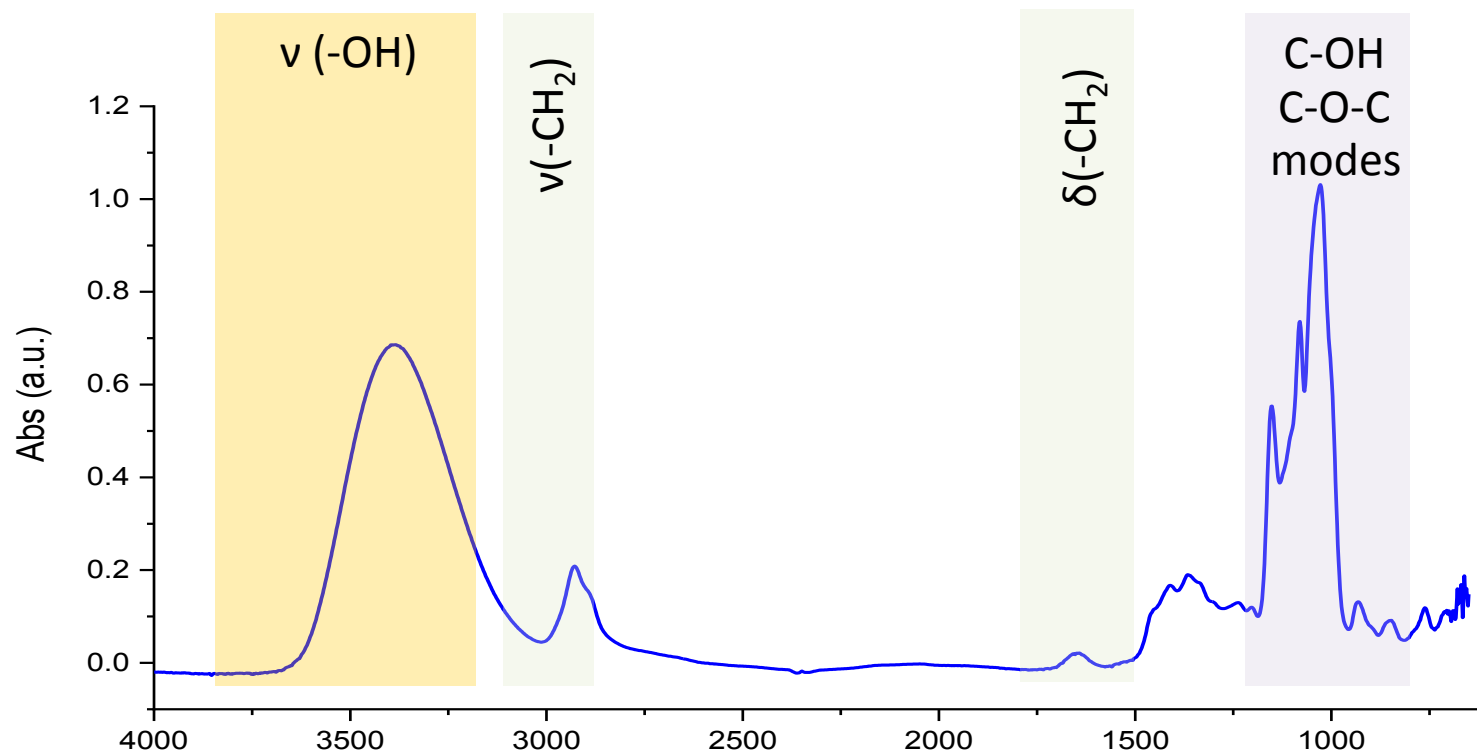
Lo spettro infrarosso degli acidi nucleici



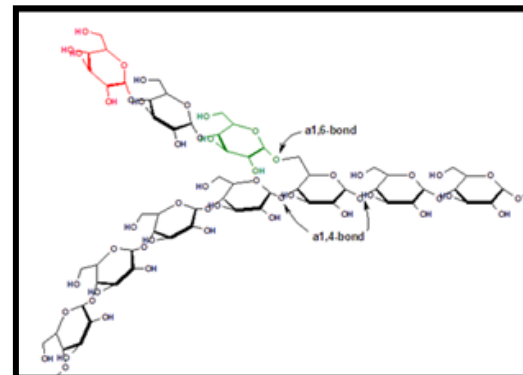
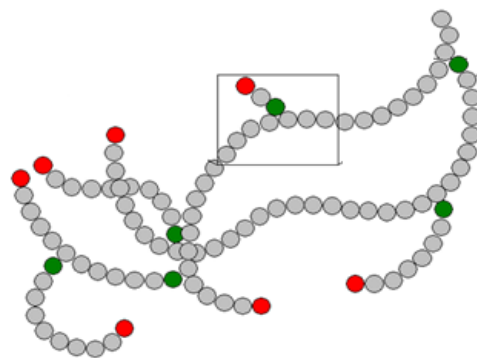
Carboidrati: Struttura e Funzione



Lo spettro infrarosso dei carboidrati



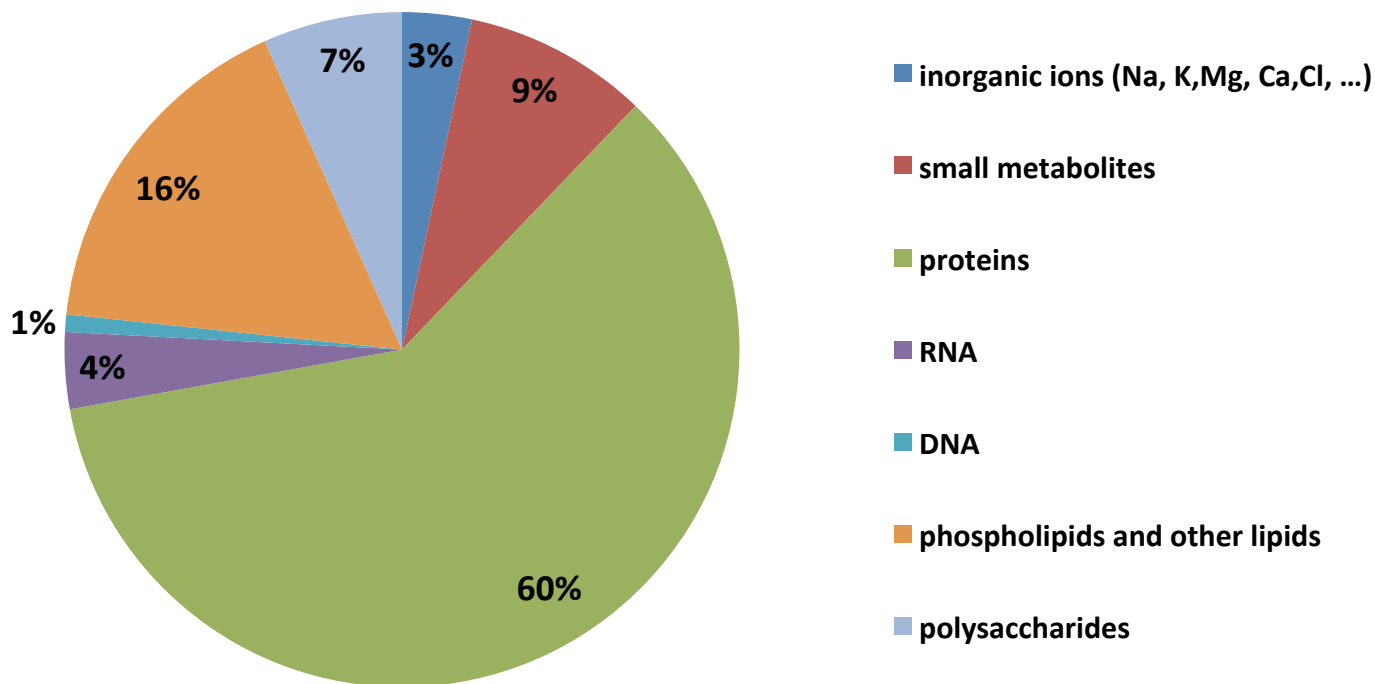
GLYCOGEN



Le cellule animali: Composizione media

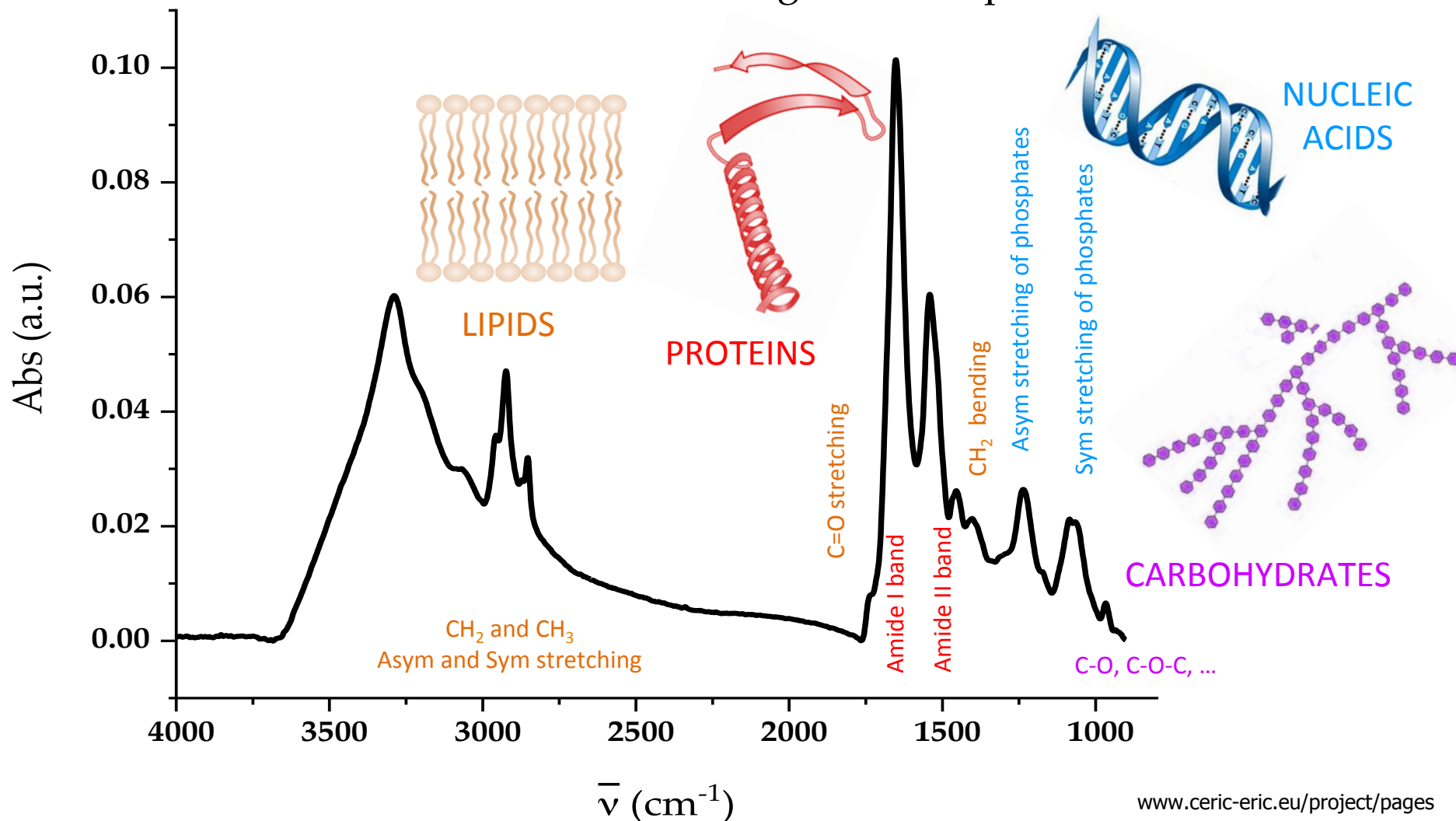
At a first glance, the FTIR spectrum of a mammalian cell can be viewed as the over imposition of the diverse spectral contribution of each individual components

**Typical mammalian dried cell chemical composition
(component percent of total cell weight)**



Le cellule animali: lo spettro infrarosso e le informazioni contenuto in esso

Band intensity, position, width and shape (band components) are sensitive to subtle biochemical changes of bio-specimens.



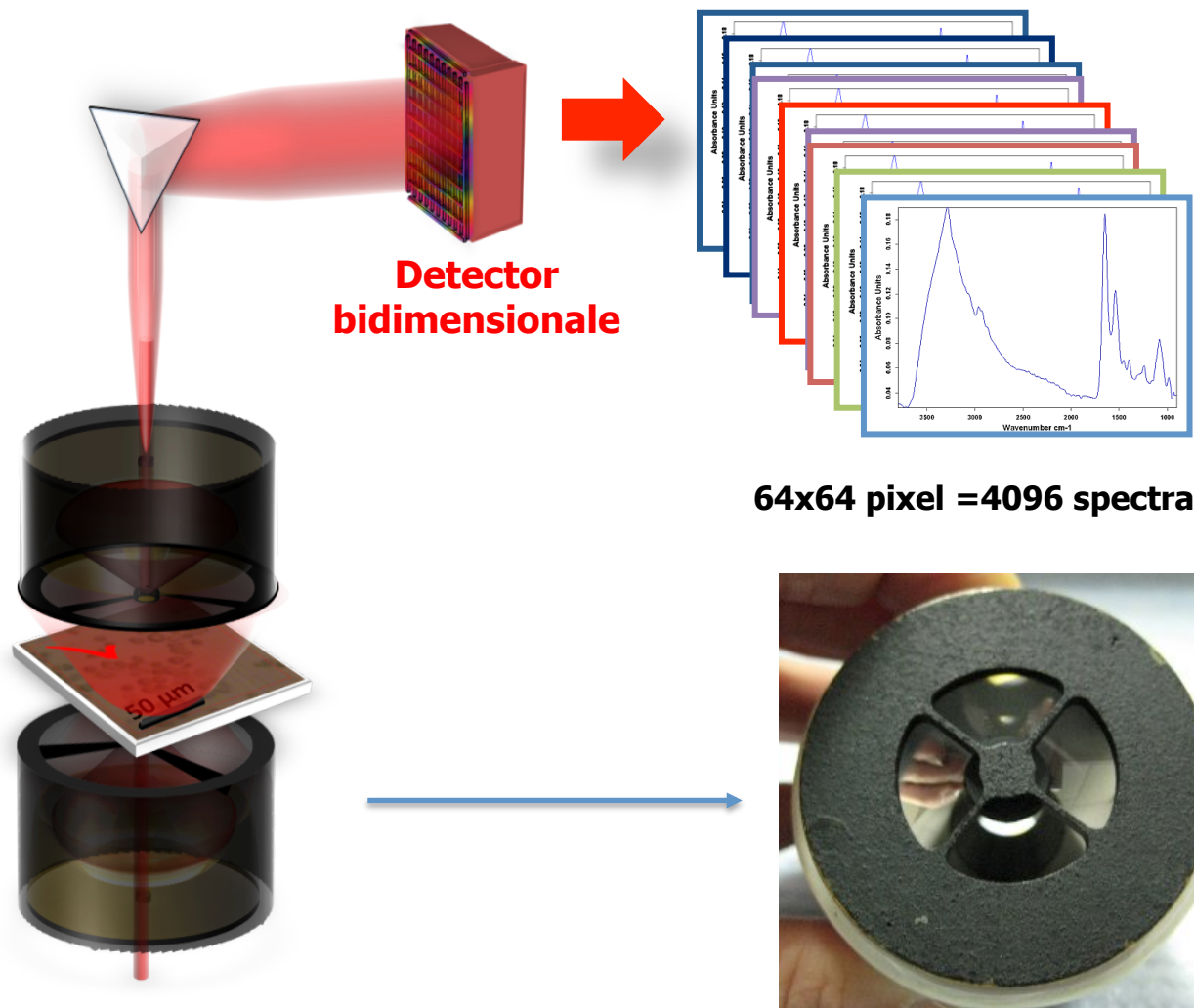


I campioni di tessuto vengono misurati al microscopio Vis-IR.

**I campioni misurati sono sezioni sottili non trattate con staining
Le immagini infrarosse sono LABEL-FREE**

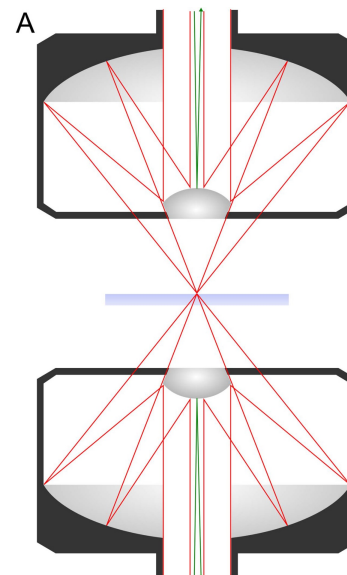
SISSI-Bio@Elettra - Photo courtesy of CERIC-ERIC
Photographer: Roberto Barnabà

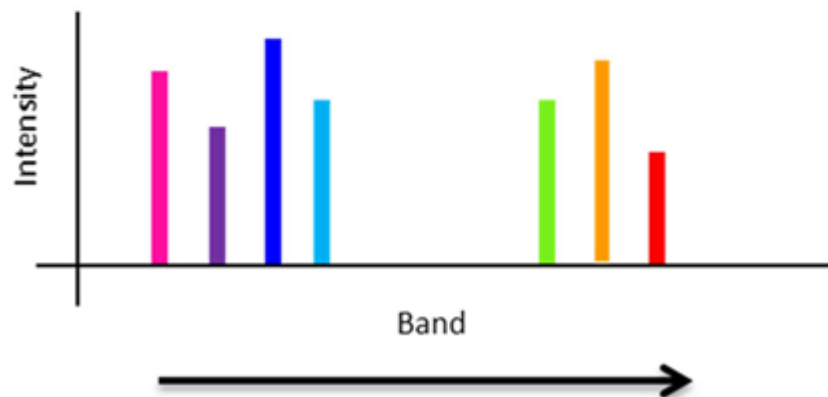
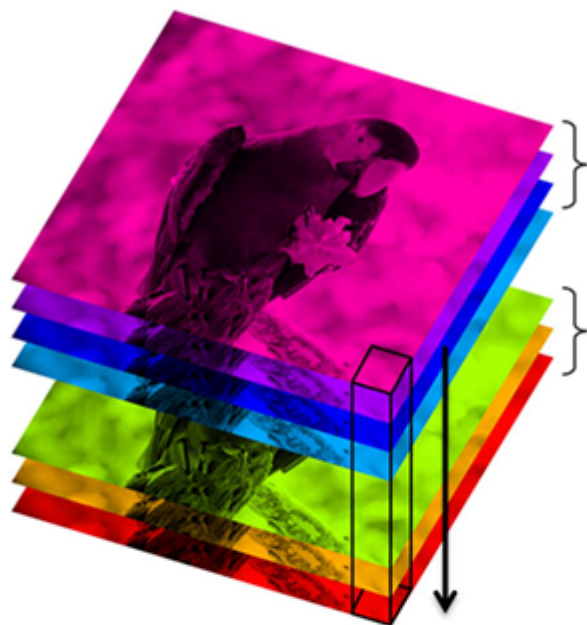
COME MISURARE UN CAMPIONE



Ad ogni pixel del detector è associato uno spettro. Quindi, per ogni pixel abbiamo 4 variabili (x, y, I, ν)

Come rappresentiamo le immagini infrarosse?





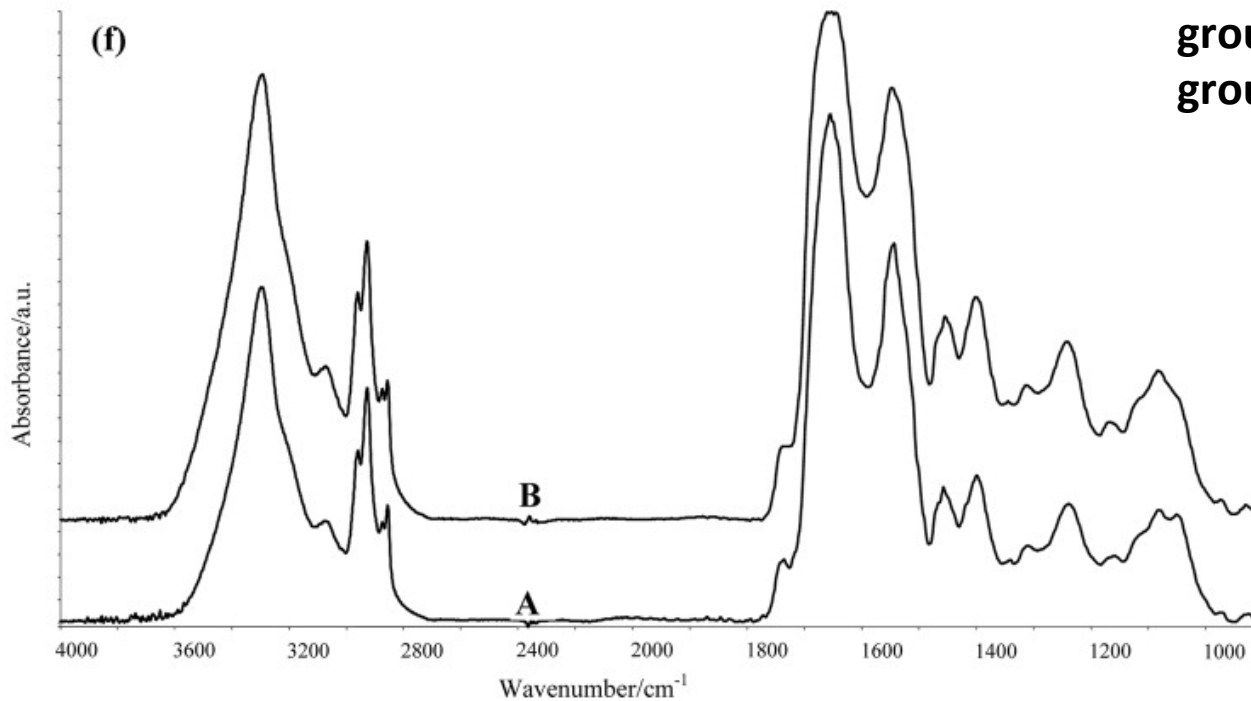
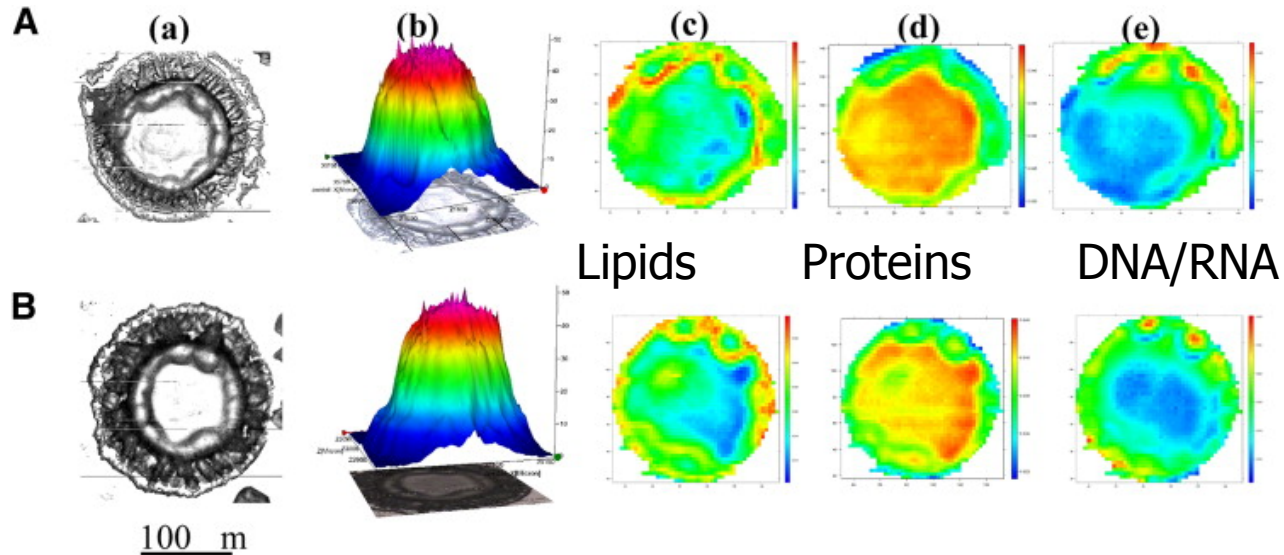
Per ogni banda dello spettro, possiamo costruire un'immagine per cui ogni pixel assuma una colorazione proporzionale all'intensità della banda considerata.

Le immagini all'infrarosso rappresentano quindi una distribuzione della bio-macromolecola associata alla banda considerata.

Si tratta di IMMAGINI CHIMICHE

La banda porta con sé informazioni sulla tipologia di molecola investigata e dal confronto con le immagini di altri campioni possiamo raggiungere lo scopo diagnostico desiderato. Per esempio, dal confronto fra tessuti malati e sani, definire in maniera oggettiva il grado della lesione, anche per i casi più incerti.

Immagini infrarosse di ovociti



group A, 30 ± 2 years old;
group B, 39 ± 2 years old;

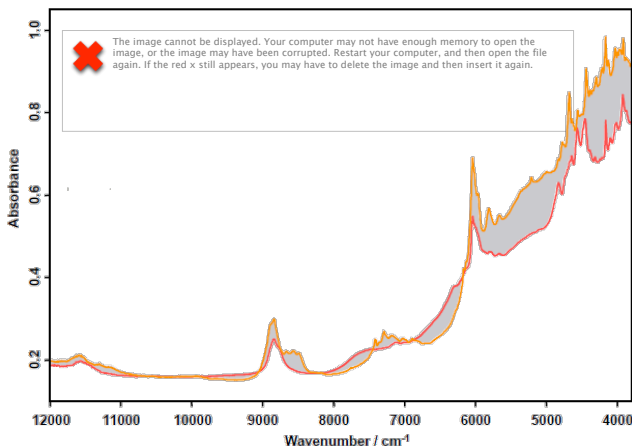
Esistono tuttavia metodi più raffinati per ottenere immagini infrarosse, e più adatti ad un confronto di molte immagini, basati su concetti di analisi statistica multivariata (non dissimili dagli algoritmi di riconoscimento per immagini ad oggi usati ampiamente per la ricerca per immagini fra diversi siti web!)

L'esempio della HCA – Hierarchical cluster Analysis

HCA

1. Spectral distance calculation

Distance between spectra a and b can be calculated with many algorithms. Euclidean spectral distance between a and b spectra is calculated over the all sampled k points (or within specific intervals).



2. Spectral distance matrix

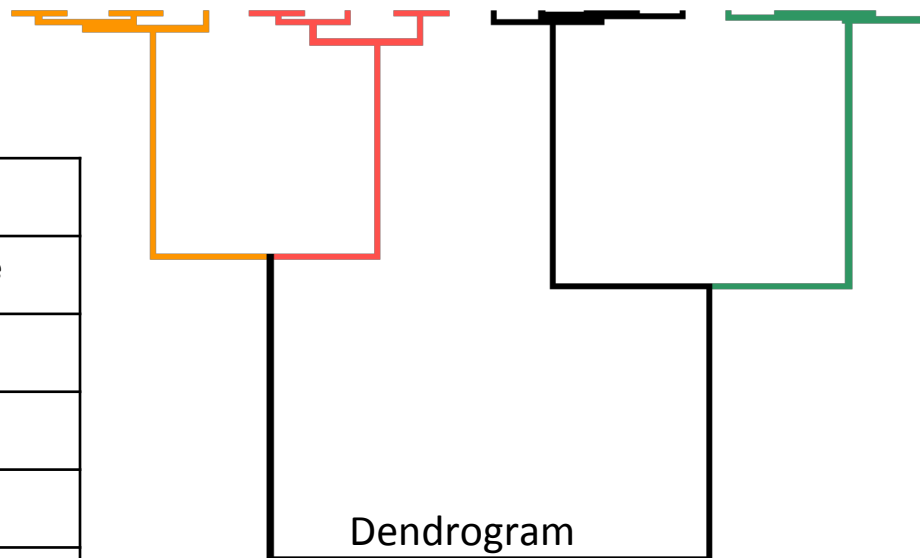
	a	b	c	d	e
a	0				
b	44	0			
c	11	54	0		
d	100	68	97	0	
e	120	92	115	21	0

There are many methods available to calculate spectral distances between a newly-created cluster and all the other spectra or clusters.

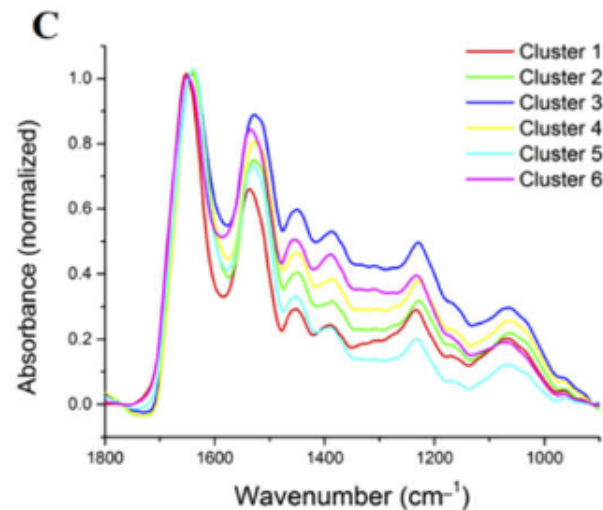
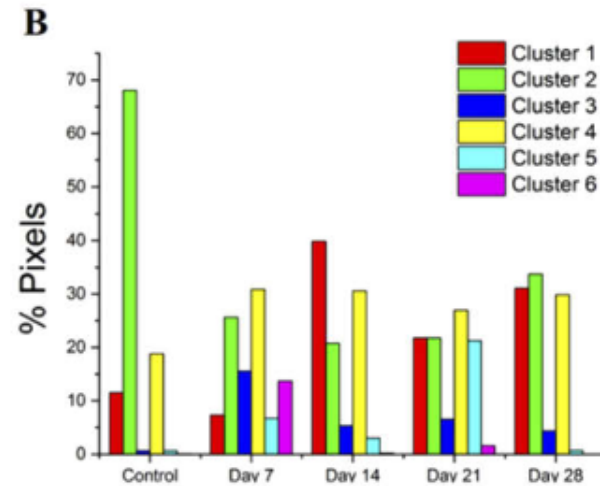
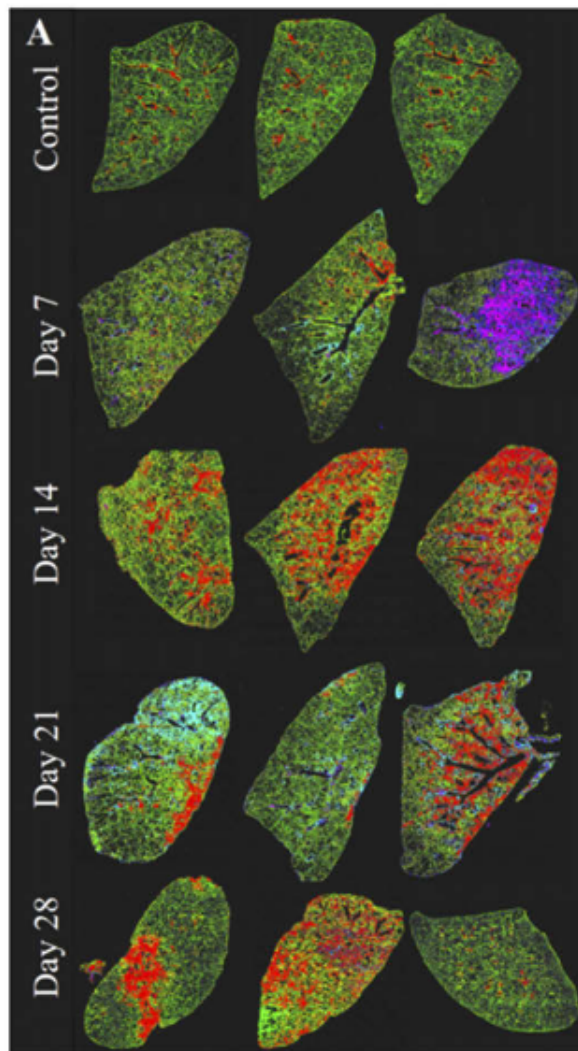


N	Clusters
1	a-b-c-d-e
2	ac-b-d-e
3	ac-b-de
4	abc-de
5	abcde

3. Spectra clustering



L'analisi statistica multivariata per la valutazione degli stati fibrotici



Con i ragazzi raccoglieremo **IMMAGINI INFRAROSSE DI CAMPIONI POLMONARI FISSATI IN FORMALINA E INGLOBATI IN PARAFFINA**. I campioni considerati saranno di paziente non affetto da covid e paziente affetto da covid-19, se disponibili. In alternativa, su campioni tissutali animali in-house.

◇ In questa fase commenteremo sulla microscopia, e sul concetto di risoluzione spaziale raggiungibile

Ci soffermeremo quindi sulla visualizzazione e riconoscimento delle bande più importanti dello spettro, rinnovando i concetti della presentazione. Ci focalizzeremo sui contributi spettrali associati alla fibrosi e all'infiammazione.

Generemo immagini sulle bande diagnostiche più importanti e quindi faremo una HCA, concentrandosi sul concetto di contrasto delle immagini, che è specifico di ogni tecnica.

Thank you

lisa.vaccari@elettra.eu