

* Tecniche radiochimiche

- Studio chimico-fisico degli elementi radioattivi, sia naturali che artificiali, e il loro uso nello studio dei fenomeni chimici;
- Per la quantificazione di proteine specifiche, vitamine e ormoni e per i dosaggi enzimatici;
- Per lo studio del trasporto di specie ioniche, di molecole biologicamente rilevanti e di metaboliti all'interno di cellule e organelli;
- Per applicazioni diagnostiche e terapeutiche (RADIOFARMACI).

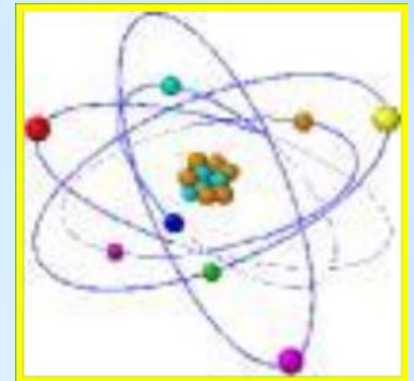
* **TECNICHE RADIOCHIMICHE**
parte della medicina nucleare che si
occupa dello studio e dell'impiego delle
sostanze radioattive

L'ATOMO



- Un atomo e' costituito da un nucleo carico positivamente, circondato da una nuvola di elettroni carichi negativamente;
- I nuclei atomici sono costituiti da due particelle: protoni e neutroni;
- I protoni sono particelle cariche positivamente con una massa circa 1850 volte superiore a quella di un elettrone orbitalico;
- I neutroni sono particelle elettricamente neutre con una massa approssimativamente uguale a quella di un protone.

L'ATOMO

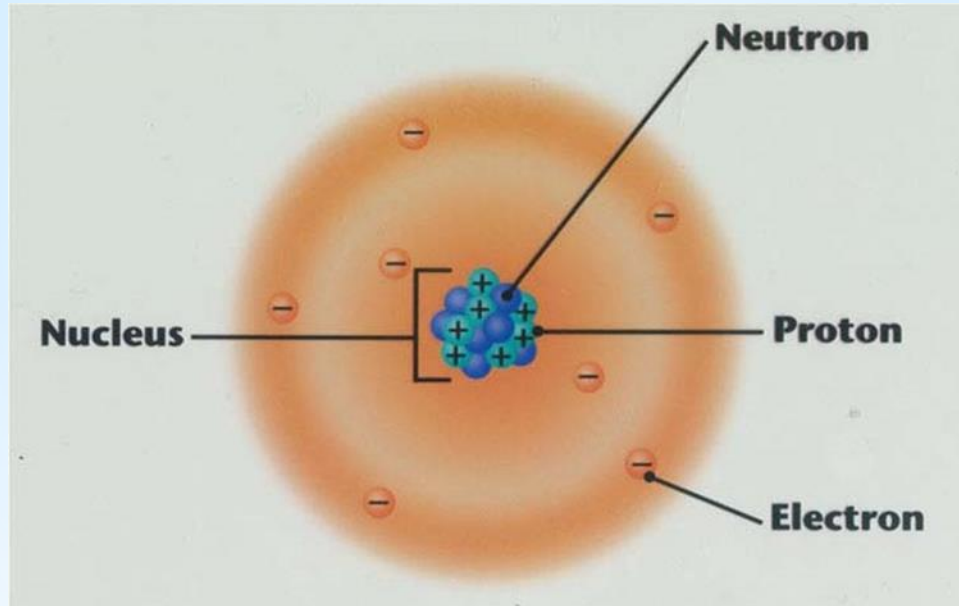


- Il numero di elettroni deve essere uguale al numero di protoni, perché l'atomo nel suo complesso è elettricamente neutro. Tale numero è detto numero atomico (Z);
- La somma dei protoni e dei neutroni di un nucleo è detta numero di massa (A)

$$A = Z + N$$

dove :

N = numero di neutroni



- ❖ Gli isotopi sono prodotti da combinazioni differenti di protoni e neutroni. Se da queste combinazioni si generano nuclei stabili, l'isotopo sarà definito STABILE;
- ❖ Quando invece il meccanismo repulsivo delle forze nucleari induce instabilità nell'atomo si producono ISOTOPI RADIOATTIVI;

La radioattività è determinata da uno squilibrio del numero di neutroni e protoni, normalmente uguali tra di loro, per cui si manifesta un'emissione spontanea di radiazioni che induce la formazione di un diverso nucleo e quindi di un nuovo atomo

- ❖ Il nucleo si può trasformare nella direzione di una maggiore stabilizzazione, con l'emissione di massa e/o energia.

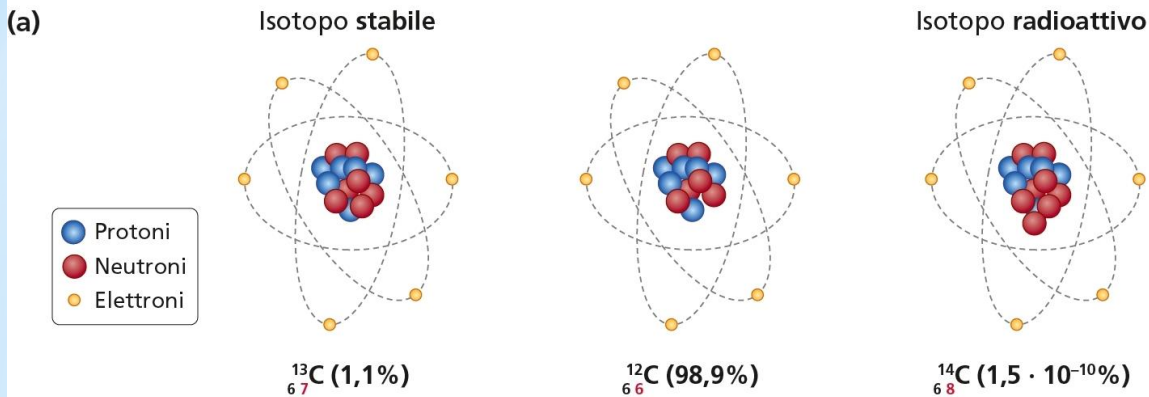
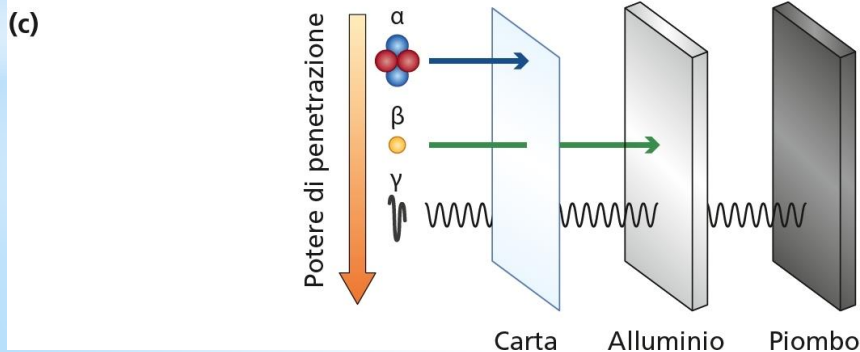
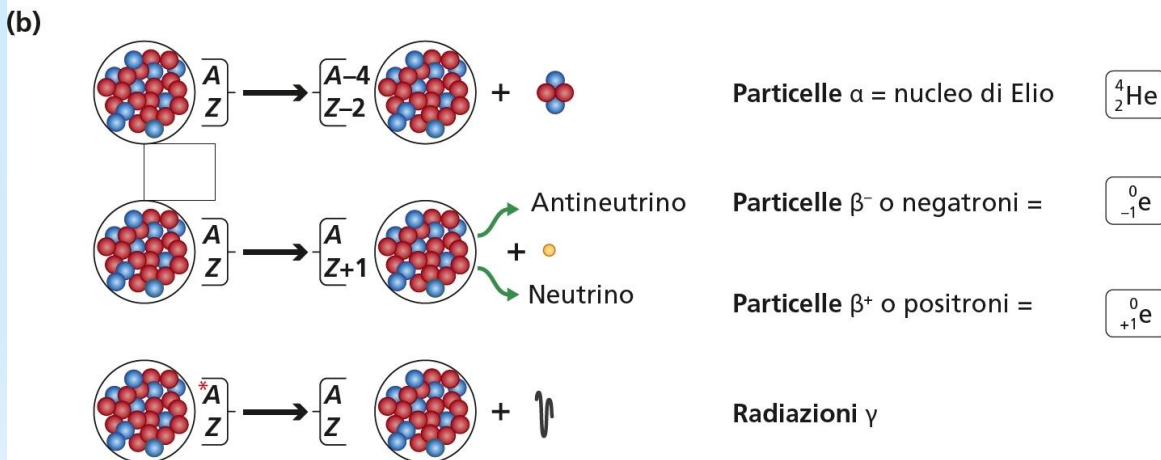


Figura 9.1
 Isotopi, emissione e potere di penetrazione. (a) Costituzione schematica dell'atomo di carbonio e dei relativi isotopi, stabile e radioattivo. (b) Tipologia di emissioni. (c) Capacità di penetrazione delle differenti tipologie di radiazioni emesse.



* Quando un nucleo più pesante, in seguito a **DECADIMENTO RADIOATTIVO**, si trasforma in uno più leggero si ha l'emissione di Radiazioni che possono essere di tipo:

- Particelle alfa (α)
- Particelle beta (β)
- Raggi gamma (γ)

Tabella 9.1 Tipi di radioattività e proprietà associate.

Radiazione emessa	Ambito di energia (Mev)	Distanza di penetrazione		
		Aria (m)	Tessuto (mm)	Piombo (mm)
Raggi alfa (α)	4-8 *	0,025-0,080	0,05	0
Raggi beta (β)	0,01-3	0,150-16	0,06-4	0,05-03
Raggi gamma (γ)	0,03-3	1,3-13	500	30
Raggi X diagnostici terapeutici	> 0,09	120	150	0,3
	> 0,25	240	300	1,5

Ellettronvolt (eV): *energia associata alle emissioni di radiazioni, 1 eV = energia che una carica elettrica unitaria (es. un elettrone) acquista quando viene accelerato da una differenza di potenziale di un Volt; 1 eV = $1,6 \times 10^{-13}$ J o $3,8 \times 10^{-14}$ cal.*

- ❖ CENNI STORICI: La radioattività fu scoperta dal fisico francese Antoine-Henri Becquerel (1852-1908) nel 1896, quando osservò che l'uranio era in grado di impressionare una lastra fotografica anche se la lastra era coperta. Perciò la radioattività è in grado di penetrare e attraversare vari materiali. I vari tipi di radioattività furono inizialmente chiamati a seconda del loro potere di penetrazione, partendo dai raggi α , che sono i meno penetranti seguiti dai raggi β e γ :
- ❖ **i raggi α** possono a malapena attraversare un foglio di carta e bastano pochi cm di aria per bloccarli (Pericolosi però se si respira un gas radioattivo o si ingerisce la sostanza radioattiva);
- ❖ **i raggi β - (e β +)** possono penetrare per qualche millimetro nell'alluminio;
- ❖ **i raggi γ** possono attraversare vari centimetri di piombo.

- **Particelle alfa (α):** caratteristiche di isotopi di elementi ad alto numero atomico Z, sono composte da due neutroni e due protoni (nucleo di He) e sono cariche positivamente (+2). Sono caratterizzate da un'alta massa con un A maggiore di 200 e a seguito di un percorso breve verso la materia che impattano portano alla distruzione delle molecole che la costituiscono. Pertanto, sono le più pericolose da un punto di vista biologico e poco utilizzate nei laboratori biomolecolari;
- **Particelle beta (β):** sono gli elettroni emessi da un nucleo e sono chiamati più precisamente «raggi β »; con una carica che può essere sia positiva [(decadimento per emissione di positroni (β^+)] sia negativa [(decadimento per emissione di negatroni (β^-)). Hanno masse ed energie inferiori a quelle delle radiazioni alfa ma con potere di penetrazione maggiore. I radioisotopi che li emettono sono molto instabili e ritrovano stabilità trasformando protoni in neutroni, aumentando il rapporto N/Z. Largo impiego nel laboratorio biomolecolare (es. trizio e carbonio per marcare composti organici).

In particolare, quando il nucleo è instabile per difetto di neutroni, un protone in eccesso emette una particella β^+ , (positrone,) e si trasforma in neutrone secondo la formula:



Le particelle β^- invece possono ionizzare il mezzo attraversato provocando l'allontanamento di elettroni dalla sfera di influenza nucleare per repulsione elettrostatica (trizio ^3H e ^{14}C) secondo la formula:



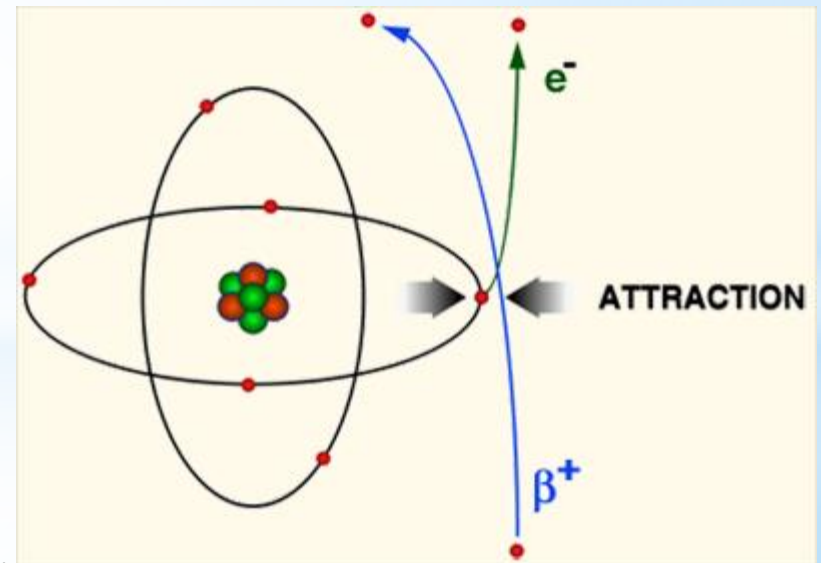
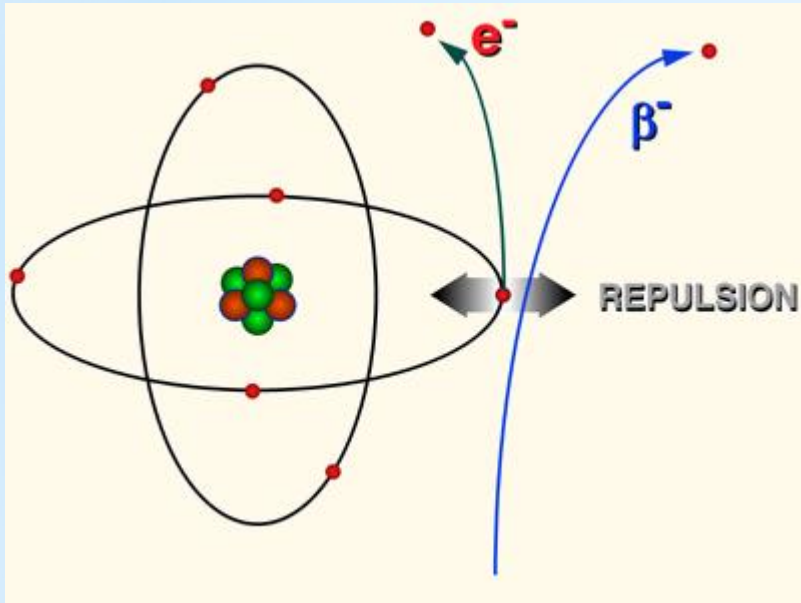
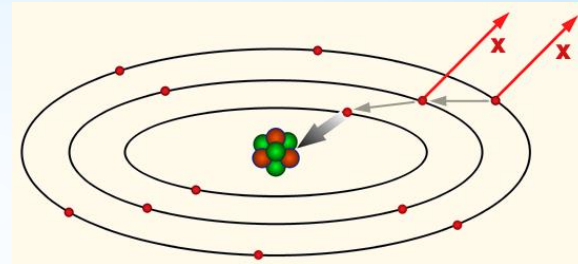
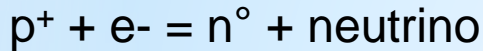


Tabella 9.2 Proprietà dei radioisotopi impiegati nell'indagine biomolecolare.

Elemento	Isotopo	Emissione	Emivita ($t_{1/2}$)	Applicazioni	E_{\max} (MeV)
Idrogeno	^3H	β^-	12,3 anni	Marcatura composti organici (ligandi, substrati); marcatura DNA; attività specifica alta	0,018
Carbonio	^{14}C	β^-	5760 anni	Marcatura composti organici (ligandi, substrati); attività specifica bassa	0,156
Fosforo	^{32}P	β^-	14,3 giorni	Marcatura proteine e nucleotidi; attività specifica alta	1,710
	^{33}P	β^-	25,6 giorni	Marcatura DNA e proteine; attività specifica alta	0,248
Zolfo	^{35}S	β^-	87,2 giorni	Marcatura proteine; attività specifica bassa	0,167
Iodio	^{125}I	γ , EC	59,9 giorni	Marcatura proteine; attività specifica alta	0,035
	^{131}I	β^- , γ	8,04 giorni	Marcatura proteine; attività specifica alta	0,600; 0,740
Sodio	^{22}Na	β^+ , EC	2,58 anni	Studi di trasporto; attività specifica alta	2,842
Cloro	^{36}Cl	β^- , β^+ , EC	300 000 anni	Studi di trasporto; attività specifica bassa	0,709; 1,142

Cattura elettronica

Quando il nucleo è instabile per difetto di neutroni un elettrone degli orbitali più interni può venire catturato dal nucleo dove un protone si trasformerà in neutrone secondo la formula:



La cattura elettronica è più probabile rispetto al decadimento β^+ per gli elementi con alto numero atomico.

La cattura elettronica provoca una transizione isobarica identica a quella causata dal decadimento β^+ : il numero Z si riduce di una unità e l'atomo si trasforma in un elemento chimico differente.

Il riarrangiamento degli elettroni orbitali, che si spostano verso l'orbitale più interno rimasto privo di un'elettrone e quindi verso orbite a minore contenuto di energia, provoca la liberazione dell'energia in eccesso sotto forma di **radiazioni X** "caratteristiche".

CONTEGGIO (EFFETTO) CERENKOV Quando un emettitore beta possiede un'energia di decadimento superiore a 0.5 MeV, esso provoca l'emissione da parte dell'acqua di una luce bianco-azzurrognola, detta luce di Cerenkov

➤ la radioattività può assumere la forma di un **fotone** anziché di una particella con una massa: **raggi γ** . I fotoni, con lunghezza e frequenza ben precisa, derivano da transizione di livelli discreti di energia. La loro emissione non comporta alcun cambiamento di A e Z. Basso potere ionizzante ma con potere di penetrazione superiore a quello delle radiazioni alfa e beta.

DECADIMENTO RADIOATTIVO

Processo spontaneo che avviene a velocità definita e caratteristica per ciascun radioisotopo

Legge del decadimento radioattivo

Il decadimento radioattivo avviene con la legge statistica:

$$dN / dt = -\lambda N$$

N = numero di atomi presenti al tempo t ;

λ = costante di decadimento: probabilità che ogni singolo nucleo ha di decadere nell'unità di tempo.

La legge del decadimento radioattivo:

$$N(t) = N_0 e^{-\lambda t}$$

N_0 = numero di nuclidi presenti all'istante $t=0$

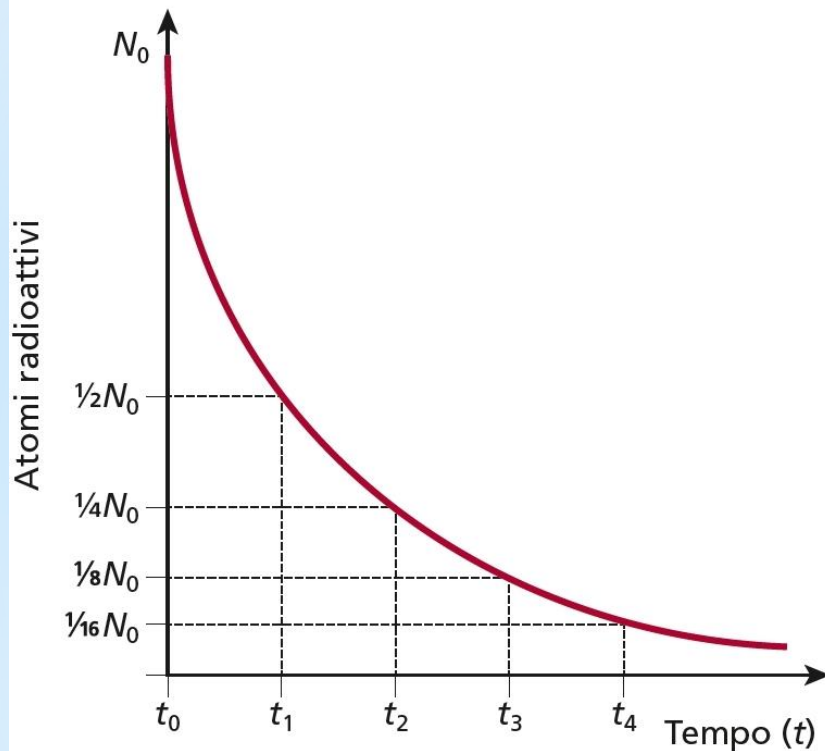


Figura 9.2

Rappresentazione grafica del decadimento nel tempo di un numero iniziale N_0 di atomi radioattivi. Per ogni numero di atomi radioattivi presenti ai rispettivi tempi, il relativo tempo di dimezzamento $t_{1/2}$ è sempre costante ($t_1 - t_0 = t_2 - t_1 = t_3 - t_2 = t_4 - t_3$) e per ogni intervallo di tempo pari a $t_{1/2}$ il numero di atomi radioattivi si dimezza. Rispetto al numero iniziale di atomi (N_0), il $t_{1/2}$ coincide con il punto t_1 .

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{\lambda}$$

$t_{1/2}$ = tempo di dimezzamento

λ = costante di decadimento

Tempo di dimezzamento $t_{1/2}$ (o emivita): tempo occorrente per ridurre alla metà il valore dei radionuclidi iniziali ovvero il tempo necessario affinché si disintegrino la metà degli atomi presenti all'inizio del decadimento da N_0 a $\frac{1}{2} N_0$.

UNITA' DI MISURA

L'attività di un isotopo è definita dal numero di disintegrazioni che avvengono, nell'unità di tempo, in una certa quantità di isotopo.

Becquerel (Bq): disintegrazione nucleare per secondo (1 d.p.s.) o 60 disintegrazioni per minuto (d.p.m.);

Curie (Ci): $3,7 \cdot 10^{10}$ d.p.s. ($3,7 \cdot 10^{10}$ Bq), corrisponde alle d.p.s. che avvengono in un grammo di radio ^{226}Ra (elemento con decadimento alfa e $t_{1/2}$ pari a 1620 anni). Si considerano i suoi sottomultipli mCi ($3,7 \cdot 10^7$ Bq) e μCi ($3,7 \cdot 10^4$ Bq).

ATTIVITA' SPECIFICA di un radioisotopo: misura della concentrazione della sua radioattività, normalmente espressa come attività (Bq, Ci, d.p.m.) per quantità unitaria (g, mol, L): per esempio Bq/g; Bq/mol; Ci/mol; Ci/g; Ci/L.

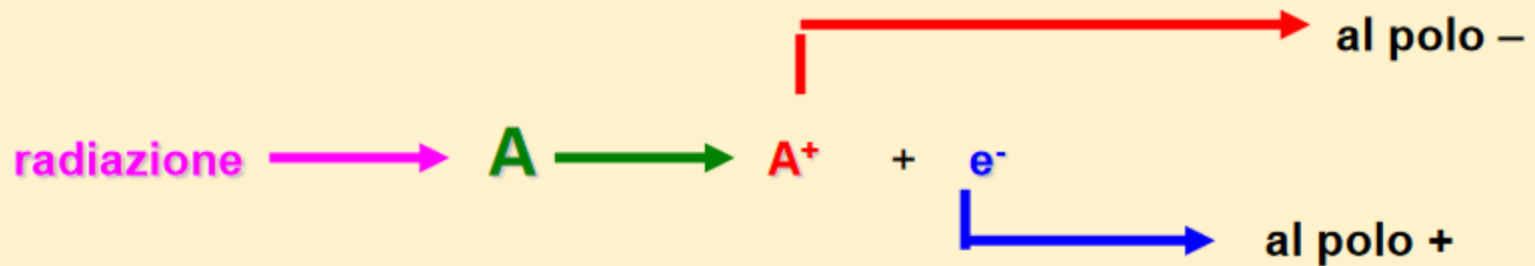
RILEVAZIONE E MISURA DELLA RADIOATTIVITA'

Tre sono i metodi comunemente utilizzati e si basano su:

- ❖ ionizzazione dei gas
- ❖ eccitazione di solidi o soluzioni
- ❖ capacita' di un composto radioattivo di impressionare un'emulsione fotografica (autoradiografia)

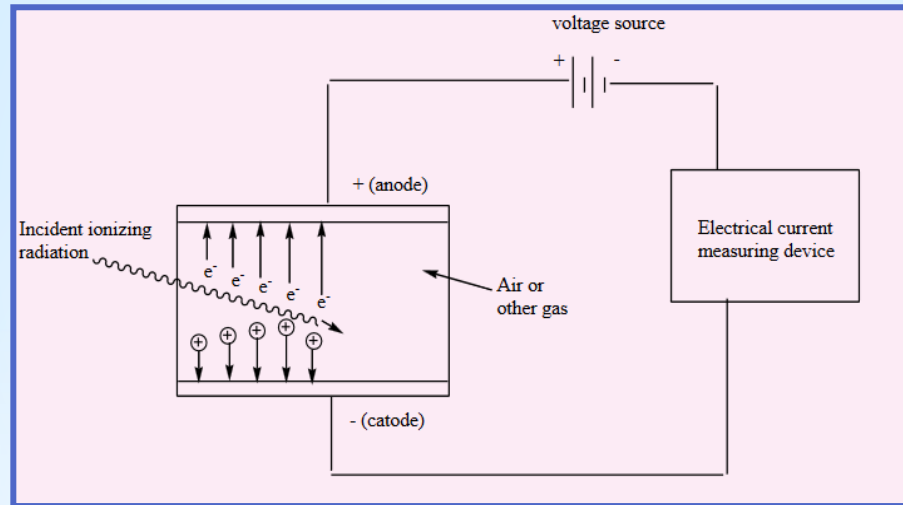
METODI BASATI SULLA IONIZZAZIONE

La radiazione produce coppie di ioni, nel volume sensibile del rivelatore. Le coppie ioniche, elettrone-ione, formate dalla radiazione, si separano sotto l'azione del campo e vengono raccolte rispettivamente all'anodo e al catodo. La rivelazione si basa sulla misura delle cariche raccolte agli elettrodi



Meccanismo relativo a rivelatori con campo elettrico applicato

METODI BASATI SULLA IONIZZAZIONE

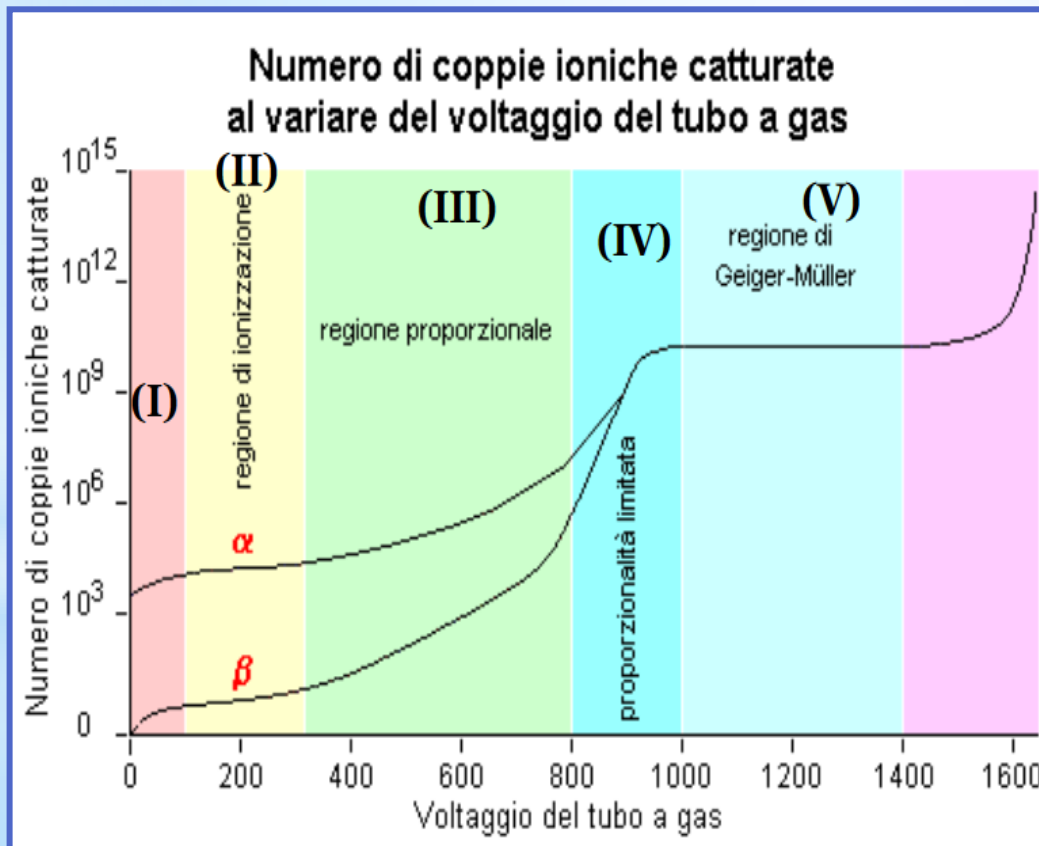


Strumenti il cui funzionamento si basa sulla ionizzazione prodotta dalle radiazioni stesse quando attraversano una fase gassosa (detta di riempimento) contenuta nel volume sensibile del rivelatore. L'alimentatore fornisce una differenza di potenziale tra i due elettrodi. La scarica degli ioni ai rispettivi elettrodi produce una corrente elettrica che può essere misurata con l'uso di un amplificatore e un amperometro.

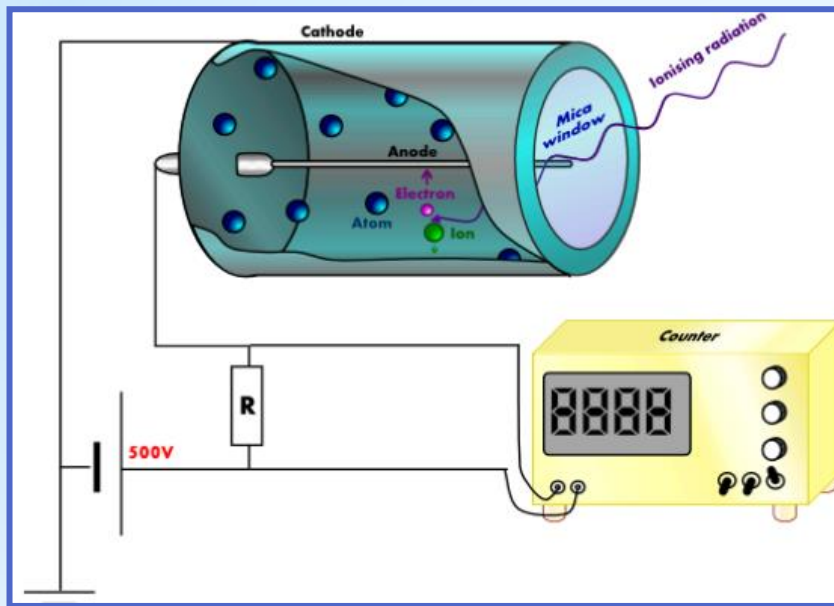
CLASSIFICAZIONE DEI RILEVATORI A GAS

Cambiando la tensione applicata si hanno 3 diversi modi di funzionamento che caratterizzano 3 tipi di Rivelatori a Gas:

- Camera a Ionizzazione (radioprotezione)
- Contatore Proporzionale (fisica sperimentale)
- Contatore Geiger (radioattività ambientale)



Con questo sistema si misurano il numero di eventi radioattivi e non la loro energia. I contatori Geiger possono rivelare radiazioni β ad alta energia ^{32}P o ^{14}C mentre non sono in grado di misurare il ^3H

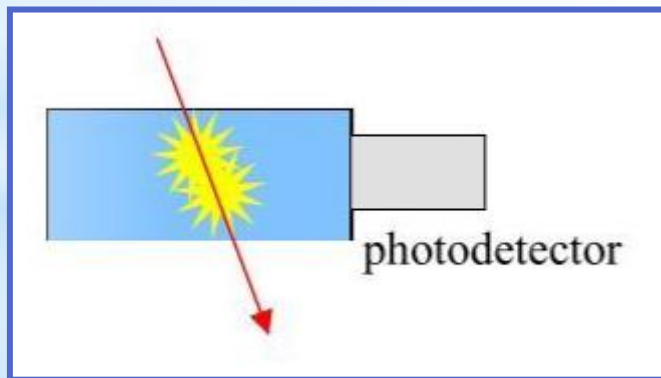


Il più semplice Rivelatore a Gas è costituito da un *condensatore cilindrico* riempito di gas (es. Argon)

METODI BASATI SULL'ECCITAZIONE

Gli isotopi radioattivi interagiscono con la materia, causando la ionizzazione o l'eccitazione. Quest'ultima comporta l'emissione di fotoni da parte degli scintillatori.

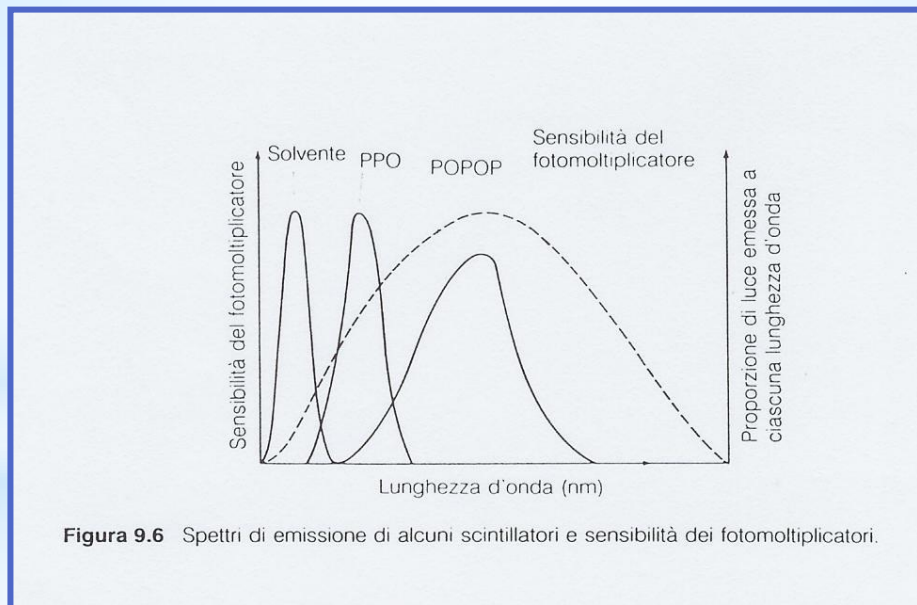
- Il fenomeno di scintillazione puo' essere rilevato e quantificato grazie al "conteggio a scintillazione". In pratica, una particella carica, attraversando uno scintillatore, perde energia eccitando gli atomi del materiale. Questi ultimi, diseccitandosi (ovvero passando allo stato fondamentale), emettono luce visibile (detta luce di scintillazione). L'emissione di luce avviene in un tempo brevissimo ($< 10^{-7}$ sec) ed in quantità proporzionale all'energia persa dalla particella. La luce viene poi convertita in segnale elettrico mediante l'impiego di un fotomoltiplicatore.



I contatori a scintillazione possono essere:

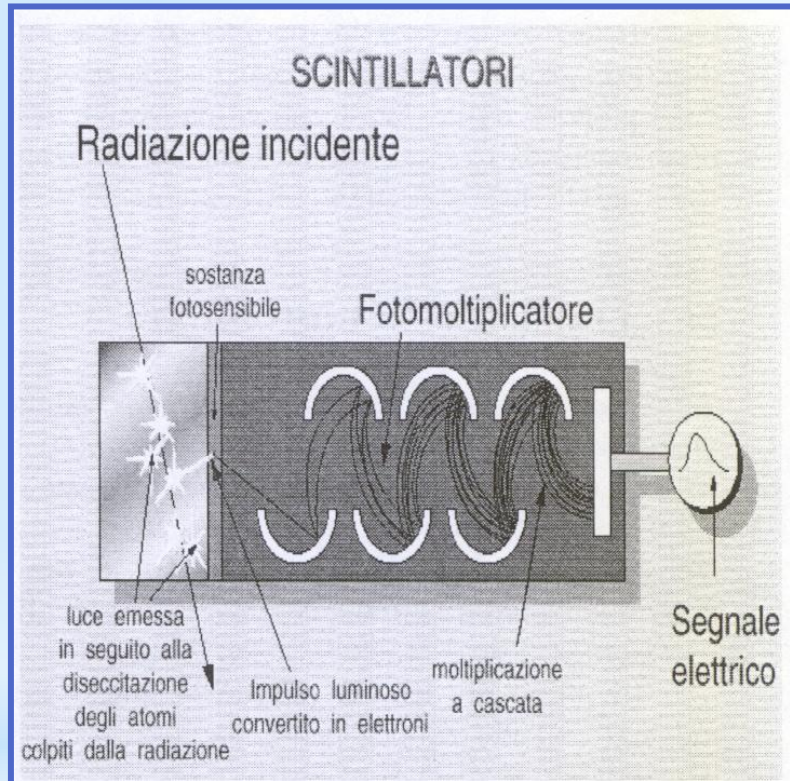
- contatori a scintillazione solida;
- contatori a scintillazione liquida.

La luce emessa ha una lunghezza d'onda molto corta e non viene rilevata con efficienza nella maggior parte dei fotomoltiplicatori. Utilizzando uno scintillatore primario ed uno secondario, la luce potrà essere rilevata.



PPO 2,5 difenilosazolo

POPOP 1,4 bis (2-(5-fenilosazolil)-benzene

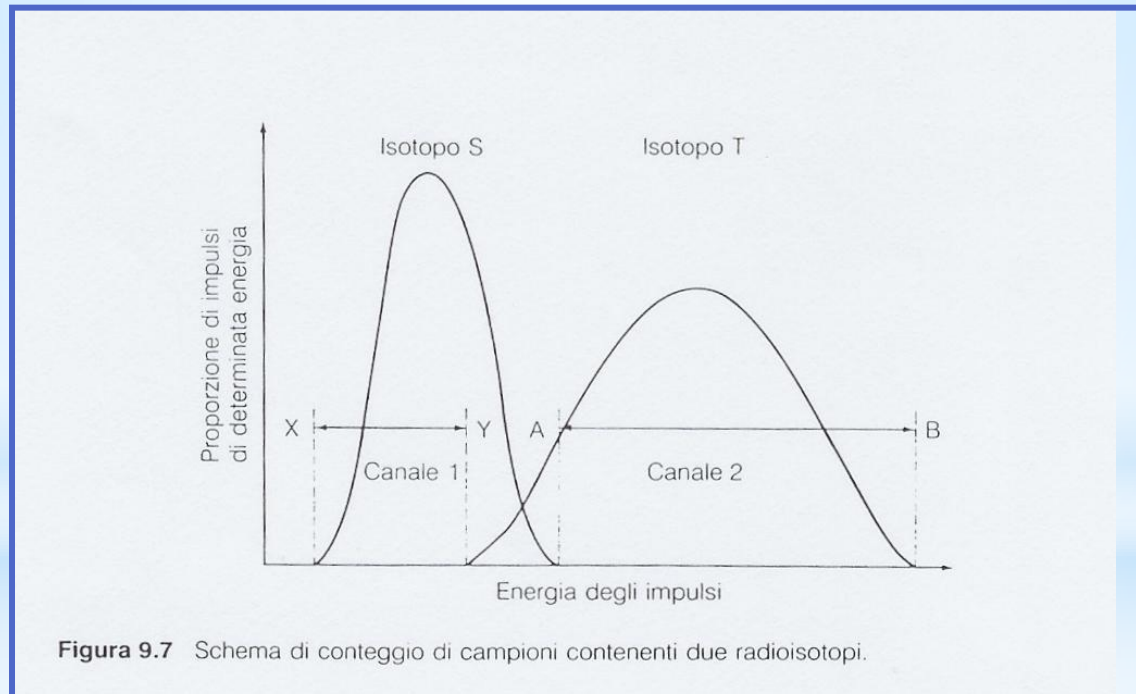


Scintillatori solidi: il campione radioattivo è posto vicino ad un cristallo di materiale fluorescente (ioduro di sodio, solfuro di zinco) il quale a sua volta è vicino ad un fotomoltiplicatore (adatto per emettitori gamma)

Scintillatori liquidi: Il campione radioattivo viene aggiunto ad una solvente che contiene uno o più scintillatori.

CONTEGGIO DI CAMPIONI CONTENENTI DUE RADIOISOTOPI

L'intensità dell'impulso elettrico prodotto dalla trasformazione dell'energia luminosa nel fotomoltiplicatore è direttamente proporzionale all'energia associata all'evento radioattivo. Poiché i diversi emettitori beta hanno diversi spettri di energia è possibile determinare separatamente due isotopi tarando l'analizzatore di ampiezza in modo da registrare l'energia compresa in determinati valori canali



Vantaggi dei contatori a scintillazione

- Elevata efficienza
- Possibilità di contare separatamente diversi isotopi
- Possibilità di misurare molti campioni automaticamente

Svantaggi

- Quenching
- Chemiluminescenza

Determinazione dell'efficienza di conteggio

- Standardizzazione interna Il campione viene contato (A in cpm) a questo campione viene aggiunto una sostanza radioattiva standard con valore di disintegrazioni per secondo (dps) noto (B) , Il campione viene poi ricontato (C in cpm) **Efficienza= [100x(C -A)/B]%**;
- Rapporto tra i canali Si prepara una curva di calibrazione basata sulle conte in due canali di standard che coprono regioni diverse dello spettro ma in parte sovrapponibili; I campioni vengono contati e valori corretti secondo la curva standard;
- Standardizzazione esterna Questo metodo utilizza come standard esterno un emettitore gamma, ogni campione di cui si deve effettuare il conteggio viene esposto a questa fonte radioattiva esterna, la radiazione penetra all'interno del campione eccita il liquido di scintillazione. Si costruisce una retta di taratura.

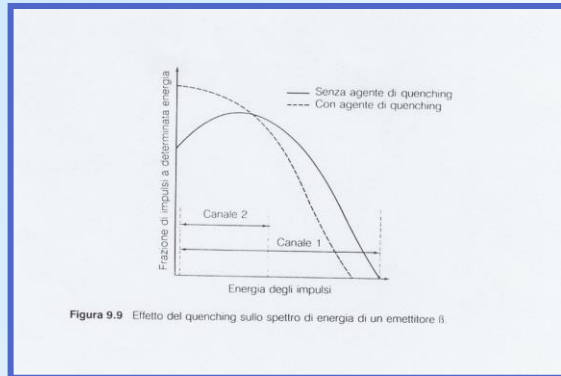


QUENCHING

Il quenching e' lo smorzamento che si manifesta quando si verifica un'interferenza nel processo di trasferimento dell'energia.

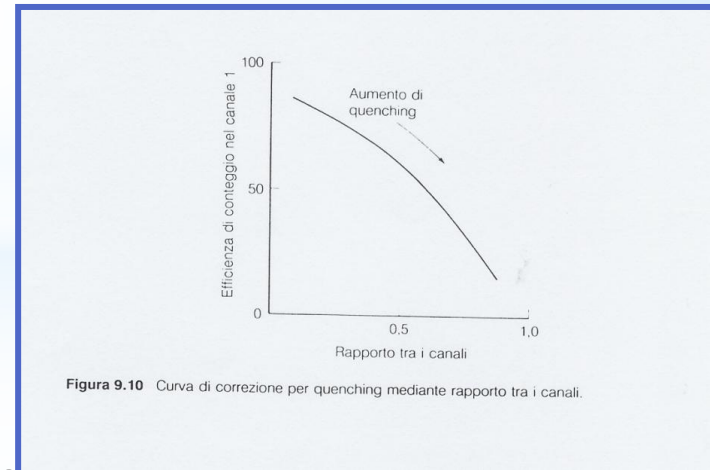
Il quenching puo' essere di tre tipi:

- *quenching ottico*
- *quenching da colore*
- *quenching chimico*



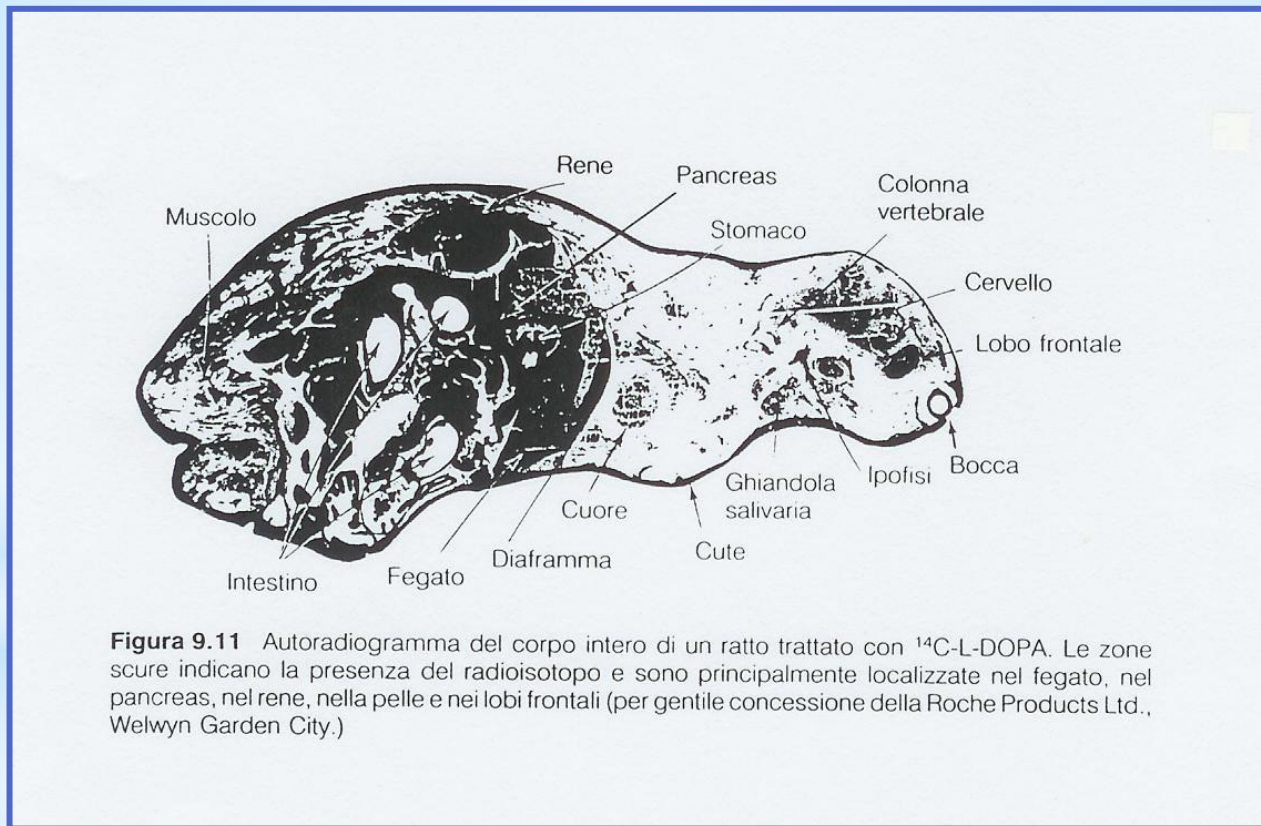
Effetto del quenching sullo spettro di energia di un emettitore beta

Curva di correzione per quenching mediante rapporto tra canali

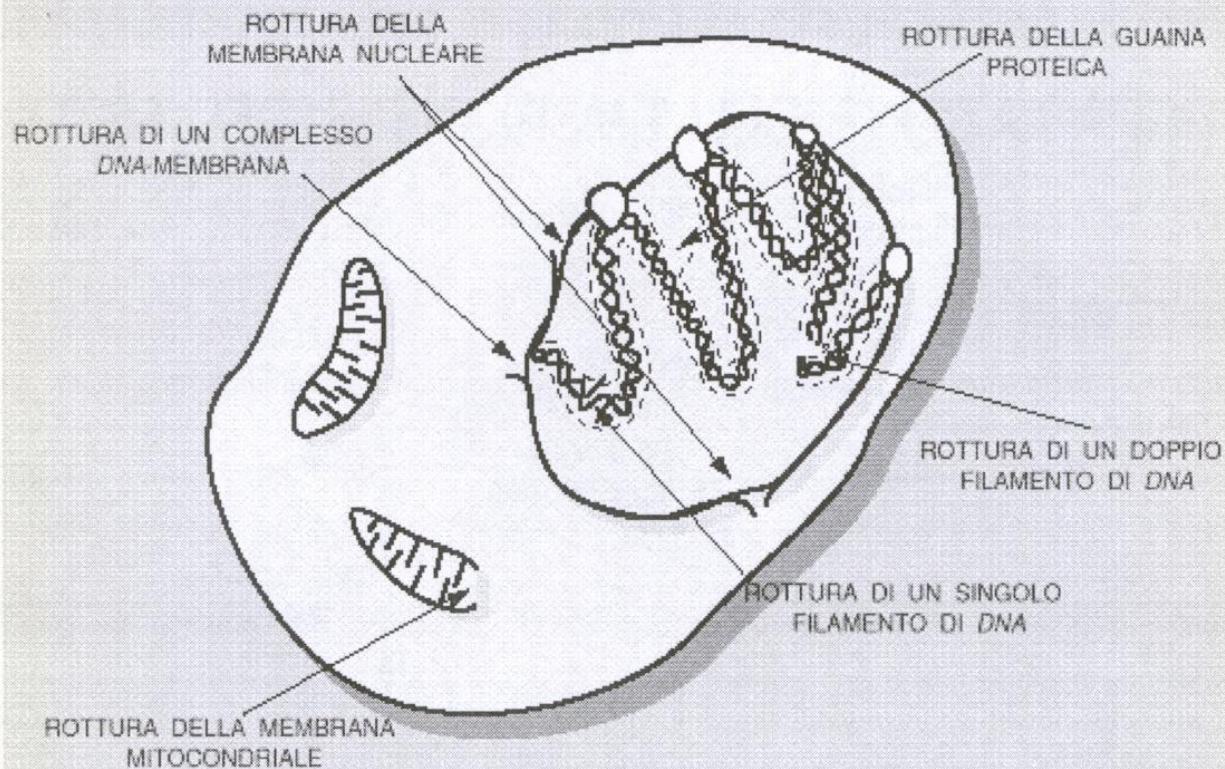


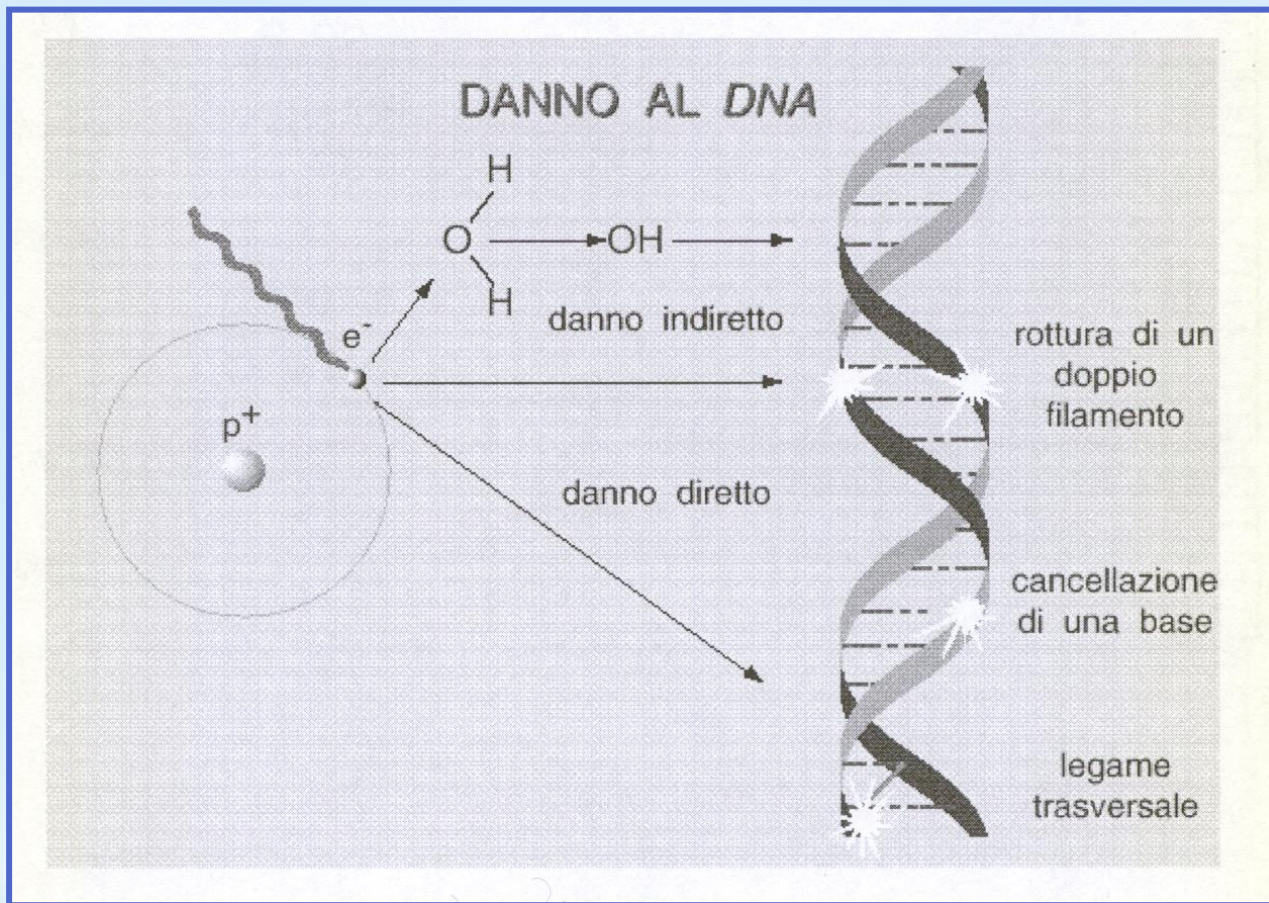
AUTORADIOGRAMMA

Le radiazioni ionizzanti agiscono su un'emulsione fotografica, producendo un'immagine latente in modo analogo alla luce visibile. Per ottenere un'autoradiografia, sono necessari una sorgente di radiazioni presente nell'oggetto ed un'emulsione sensibile alle stesse radiazioni.



TIPI FONDAMENTALI DI DANNI PRODOTTI ALLE STRUTTURE CELLULARI





Gli effetti diretti si verificano nel DNA sotto forma di interruzioni di una sola o di ambedue le eliche della molecola. Altri effetti comprendono un gran numero di modificazioni, di ricombinazioni, di induzioni di legami spuri, di alterazioni degli zuccheri delle basi. Le aberrazioni cromosomiche sono il risultato del danno al DNA.

il DNA è il principale bersaglio danneggiato in una cellula irradiata.