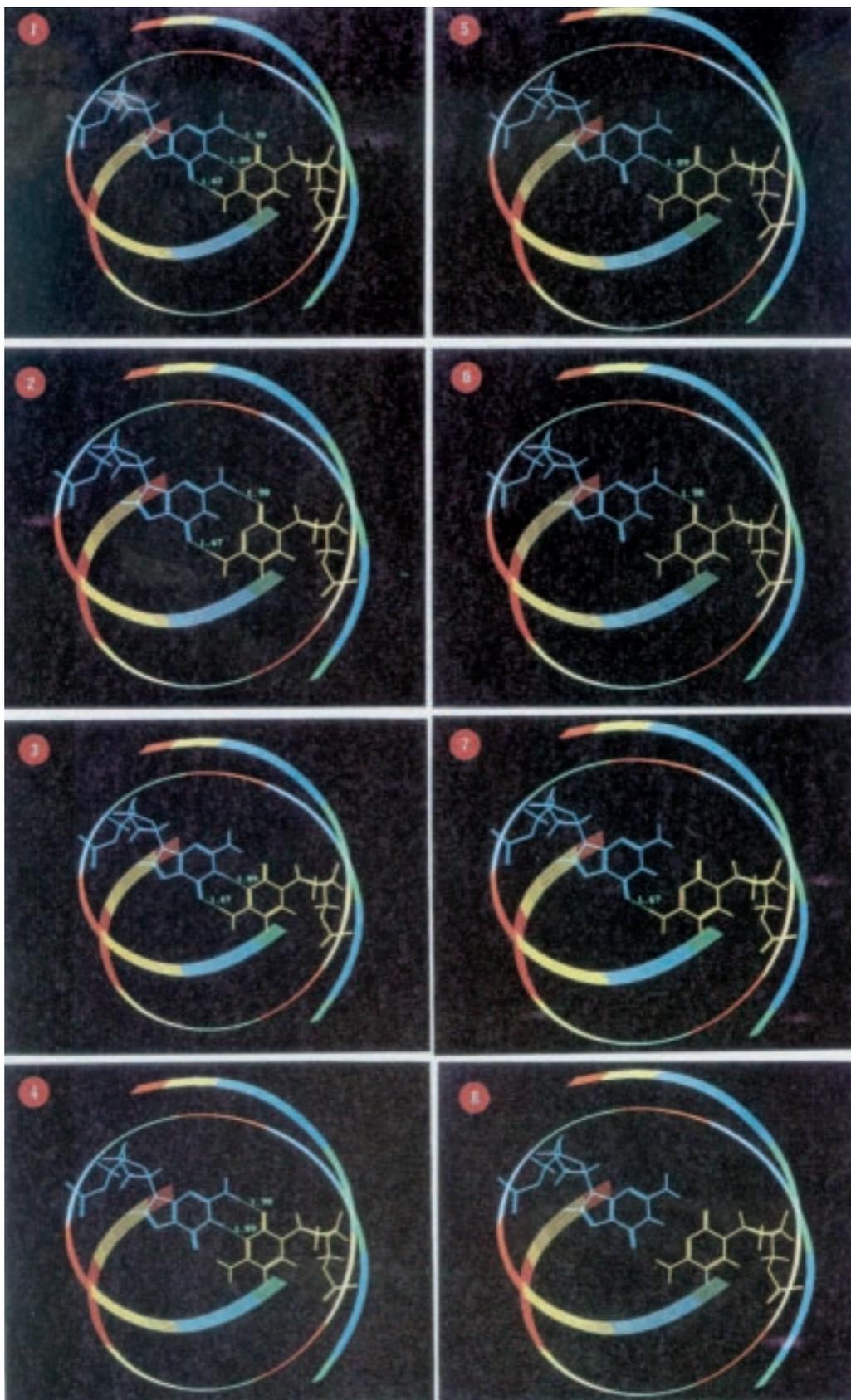


## **PARTE SETTIMA**

*Le modificazioni chimiche  
all'interno della  
materia irradiata*

**Tavola VII**

*Cinetica di dissociazione radioindotta delle basi G e C nella doppia elica di DNA. I tre ponti-H, che uniscono G e C nel DNA nativo (1), possono essere distrutti, uno per volta, a seconda dell'entità della radiazione: una radiazione più debole può far scomparire un ponte-H al centro (2) oppure da un lato (3) o dall'altro (4); una radiazione di media entità può far scomparire due ponti-H lasciandone uno solo al centro (5) oppure da un lato (6) o dall'altro (7); una radiazione più forte provoca invece la totale dissociazione delle due basi (8).*



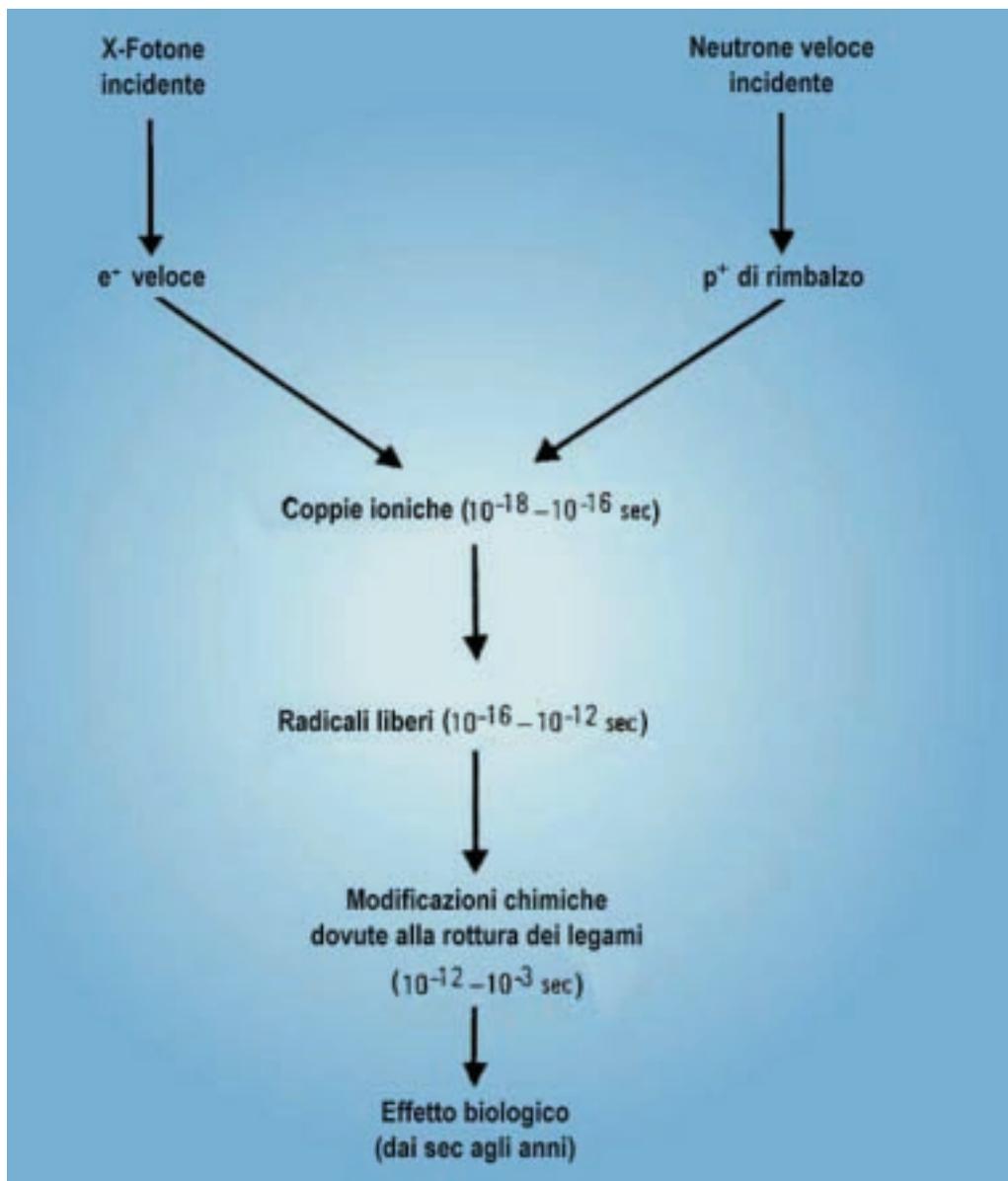
## Gli effetti diretti e indiretti delle radiazioni

I capitoli precedenti hanno descritto le fondamentali modificazioni fisiche che hanno luogo all'interno della materia irradiata.

Esse avvengono in tempi sorprendentemente brevi: tra  $10^{-24}$  e  $10^{-14}$  secondi.

Ora si vuole analizzare la tappa successiva, quella delle modificazioni radioindotte a livello chimico, poiché sono queste che causano effetti di natura biologica.

I tempi chimici sono meno brevi: mentre le *coppie ioniche* e i cosiddetti *radicali liberi* si formano rispettivamente in  $10^{-18}$ - $10^{-12}$  e  $10^{-16}$ - $10^{-12}$  secondi, i cambiamenti strut-



**Fig. 61**

*Durata degli eventi che si susseguono nella materia colpita da raggi X o neutroni veloci. Elettroni veloci e protoni di rimbalzo prodotti rispettivamente da raggi X e neutroni veloci incidenti generano coppie ioniche che vivono per  $10^{-18}$ - $10^{-16}$  s. I radicali liberi perdono la loro attività in  $10^{-16}$ - $10^{-12}$  s. I legami chimici si rompono in  $10^{-12}$ - $10^{-3}$  s. Gli effetti biologici possono manifestarsi nel corso di alcuni s o nell'arco di anni.*

turali dovuti alla formazione di *ponti-H* o *cross-link* richiedono  $10^{-12}$ - $10^{-3}$  secondi.

La Fig.61 mostra che i raggi X e i neutroni veloci inducono effetti biologici che si manifestano in tempi più lunghi, misurabili in secondi, minuti, ore o addirittura anni.

Al di là di questi tempi lunghi, l'analisi dei cambiamenti biologici radioindotti dovrà essere affrontata con considerazioni che tengano conto della natura della materia vivente che non è una massa di atomi disordinati, ma è un insieme ben ordinato di strutture molecolari e macromolecolari caratteristiche, disciolte o sospese in ambiente acquoso a sua volta complesso contenente peraltro sali minerali e grassi.

## a. Le radiazioni direttamente e indirettamente ionizzanti

La natura diversa delle varie classi di radiazioni determina il tipo di risposta da parte di un sistema biologico colpito.

Anche quando radiazioni diverse depositano in un bersaglio la stessa quantità di energia, inducendovi la formazione dello stesso numero di coppie ioniche, la risposta biologica rivela sempre delle differenze quantitative.

Per tale ragione è necessario ricorrere a dei valori medi di riferimento il che facilita il paragone degli effetti di questa o di quell'altra energia radiante.

Trattasi di effetti che si possono distinguere in *diretti* e *indiretti*. *Radiazioni direttamente ionizzanti* sono le particelle  $\alpha$  e quelle  $\beta^-$  (elettroni), i protoni e le schegge di fusione.

*Radiazioni indirettamente ionizzanti* sono i raggi X, quelli  $\gamma$  e i neutroni.

Le prime possono distruggere i legami chimici delle molecole colpite ovvero ionizzarle direttamente. Le seconde, da sole, non producono alcun cambiamento nella molecola bersaglio, salvo il trasferimento della propria energia cinetica che comporta, successivamente, una produzione di particelle cariche "secondarie" (elettroni) capaci di distruggere altri legami chimici nelle molecole circostanti.

## b. Le differenze nel percorso

Le radiazioni direttamente ionizzanti, oltre ad avere velocità diverse, hanno anche dei rapporti "carica/massa" differenti.

Ciò causa una distribuzione spaziale eterogenea delle ionizzazioni prodotte in un bersaglio in quanto la loro discriminazione lungo il percorso della particella incidente diminuisce con l'aumento della carica e della massa di questa.

Per esempio, il percorso di un elettrone veloce può produrre coppie ioniche che spazialmente sono ben discriminate.

I raggi X e  $\gamma$  possono essere descritti, invece, come radiazioni ionizzanti "sparse", a intervalli irregolari.

Le particelle  $\alpha$ , in virtù della loro grande massa e della loro minore velocità, hanno un percorso piuttosto breve: ciò produce ionizzazioni tanto ravvicinate al punto che queste tendono a sovrapporsi (come se fossero incolonnate). Le particelle  $\alpha$ , analogamente alle schegge di fissione, si comportano cioè come radiazioni "densamente" ionizzanti.

I neutroni, avendo massa e velocità che si mantengono su valori medi, producono ionizzazioni collocabili spazialmente a metà strada.

Pertanto i neutroni possono essere classificati come radiazioni ionizzanti "intermedie".

## La distribuzione delle radiazioni nella materia

L'effetto delle radiazioni, oltre che dall'energia depositata, dipende dunque dalla sua distribuzione in un determinato sistema molecolare.

### a. Il trasferimento lineare di energia

Per ben definire questo effetto, nel 1954, R. E. Zirkle introduce l'idea di *trasferimento lineare di energia* (*linear energy transfer* o *LET*).

Trattasi di una nozione che aiuta a descrivere *l'energia ceduta a una massa di materiale lungo il percorso di una particella ionizzante, esprimendola in KeV per micrometro* ( $\text{KeV}\mu\text{m}^{-1}$ ).

Siccome le particelle cariche possiedono un ampio spettro di energia cinetica, il loro *LET* (non potendo specificare il numero preciso di ionizzazioni prodotte) si limita a indicare una "quota media" di energia depositata da ogni singola radiazione.

Alcuni valori di *LET*, in acqua, per i vari tipi di radiazioni, sono riportati in Tab.VII. Essi aiutano a spiegare varie correlazioni.

In primo luogo, il valore del *LET* è come regola più grande per una radiazione corpuscolata e più piccolo per una radiazione non corpuscolata (le particelle  $\alpha$ , i neutroni e i protoni sono radiazioni ionizzanti ad alto *LET*, mentre i raggi X, quelli  $\gamma$  e gli elettroni veloci sono radiazioni ionizzanti a basso *LET*).

#### Tabella VII

Valori del trasferimento lineare di energia (*LET*) e dell'efficacia biologica relativa (*RBE*) rivelabili in acqua per vari tipi di radiazioni. I raggi X hanno i valori più bassi di *LET* ed *RBE*. I valori di *RBE* aumentano lentamente man mano che crescono quelli *LET* delle varie radiazioni. L'altissimo *LET* dei frammenti di fissione del plutonio-239 li fa diminuire.

Tipi di radiazioni	LET ( $\text{KeV}/\mu\text{m}$ )	RBE
Raggi X (4 MeV)	0,3	0,6
Raggi $\gamma$ da Co-60 (1,2-1,3 MeV)	0,3	0,8
Raggi X (250 KeV)	3,0	1,0
Particelle $\beta$ da H-3 (0,6 KeV)	5,5	1,3
Protoni (7 MeV)	10,0	1,5
Protoni di rimbalzo da neutroni di fissione	45,0	1,8
Particelle $\alpha$ da Po (5,3 MeV)	190,0	3,5
Frammenti di fissione da Pu-239	4000-9000,0	0,7

Tra le radiazioni corpuscolate, la differenza di *LET* è dovuta alla correlazione inversa tra questo valore e la carica e la massa della particella (ricordiamo che i fotoni sono privi di massa).

In secondo luogo, il valore del *LET* varia inversamente all'energia cinetica della particella stessa.

Per tale motivo, non appena la particella si avvicina alla fine del suo percorso, rallentando, la densità delle ionizzazioni prodotte aumenta.

Nel caso della particella  $\beta$  (in virtù della sua energia relativamente bassa e del suo percorso relativamente breve) si hanno dei valori di *LET* che sono 10-15 volte più grandi di quelli dei raggi X da 3 MeV o dei raggi  $\gamma$  da  $^{60}\text{Co}$ .

D'altra parte, il numero delle ionizzazioni diventa significativo se si considera il sistema biologico come mosaico di bersagli nel cui ambito, per produrre un dato effetto, deve essere incorporata una certa quantità di energia.

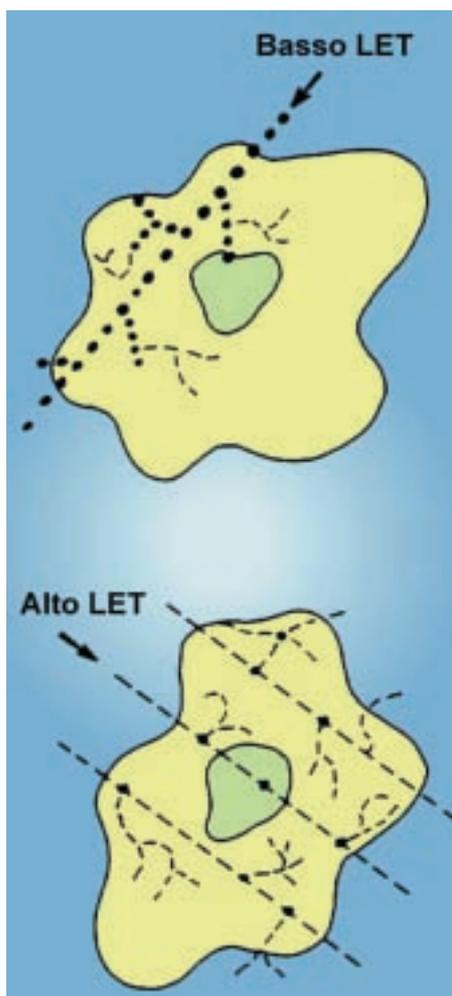
Bersagli del genere possono essere molecole particolari, cellule singole oppure tessuti interi.

Pertanto, uno stesso effetto può essere prodotto sia da ionizzazioni singole che da ionizzazioni multiple: se il bersaglio è grande e se una sola ionizzazione è richiesta per produrre un dato effetto, una radiazione a basso *LET* distribuisce ionizzazioni su un'area cellulare più ampia avendo così più probabilità di colpire punti critici diversi; per piccoli bersagli, che richiedano colpi multipli per produrre un effetto, sono invece più efficaci delle radiazioni ad alto *LET* (Fig.62).

**Fig. 62**

*Distribuzione delle ionizzazioni indotte in una cellula da radiazioni a basso o alto LET.*

Il numero di queste ionizzazioni può essere anche lo stesso nei due bersagli. Le ionizzazioni generate da raggi X e  $\gamma$  a basso *LET* vi si distribuiscono però in maniera diffusa (in alto), mentre quelle generate da neutroni ad alto *LET* vi si distribuiscono a grappoli (in basso).



## b. L'efficacia biologica relativa

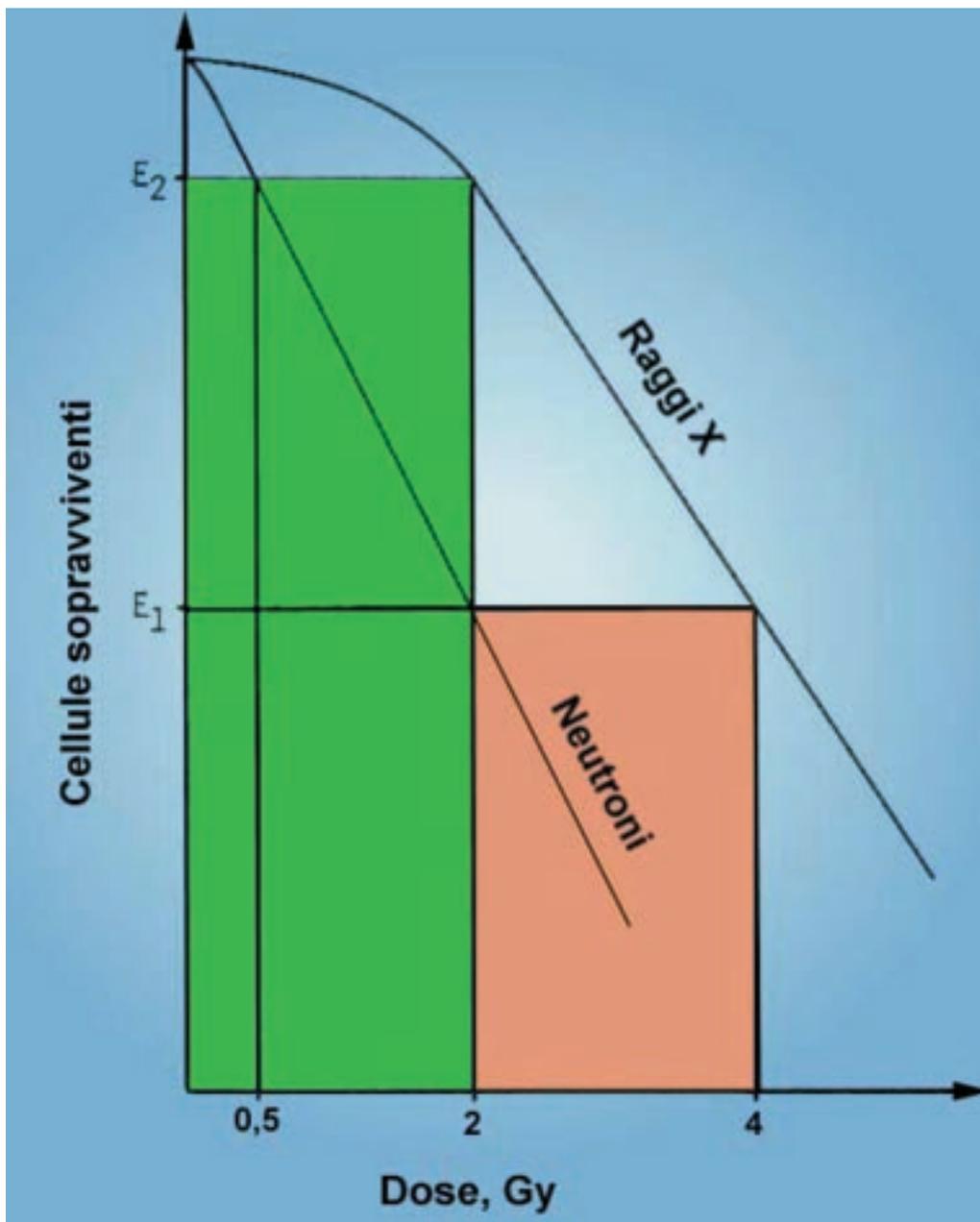
Le osservazioni sulle modificazioni biologiche indotte dalle radiazioni non entrano in questa Introduzione alla Biofisica alla Radiazioni.

Ciononostante, è opportuno illustrare il concetto di *efficacia biologica relativa* (*relative biological effectiveness* o *RBE*) per inserirlo meglio, come fatto per il *LET*, nel quadro generale delle modificazioni fisico-chimiche che hanno luogo all'interno della materia irradiata (anche perché le ionizzazioni e le eccitazioni radioindotte a livello biologico non sono altro che "addizioni" di quelle ai livelli fisico e chimico).

Così, in virtù della differenza dei valori di *LET* nella deposizione di energia da parte di differenti tipi di radiazione, non deve sorprendere il fatto che dosi uguali di radiazioni diverse producano effetti biologici differenti.

Per esempio, 600 cGy di raggi X da 250 KV sono richiesti per provocare il decesso del 50% di individui in una colonia di topi ( $LD_{50} = 600 \text{ cGy}$ ), mentre solo 300 cGy di neutroni veloci producono lo stesso effetto.

Vale a dire che i neutroni, in questo caso, possono essere ritenuti due volte più efficaci dei raggi X.



**Fig. 63**  
 Determinazione dei valori di Efficacia Biologica Relativa. Comparando delle curve di sopravvivenza di cellule colpite per esempio da raggi X o da neutroni, il valore di RBE è 2,0 a livello  $E_1$  (cioè  $4 \text{ Gy} : 2 \text{ Gy} = 2,0$ ) e 4,0 a livello  $E_2$  (cioè  $2 \text{ Gy} : 0,5 \text{ Gy} = 4,0$ ). In ordinata, le cellule sopravvivenenti sono espresse in valori percentuali.

Tale esempio fa capire perché, quando si compara l'RBE di due tipi di radiazione, si prendano come riferimento standard dei raggi X da 250 KV.

Con il senno del poi, si può ammettere che questa non sia stata la migliore delle scelte possibili poiché gli emettitori  $\gamma$ , come gli atomi di  $^{60}\text{Co}$ , hanno un LET più basso ed emettono una radiazione più "monoenergetica". Ma i raggi X erano molto di moda all'inizio delle ricerche radiobiologiche.

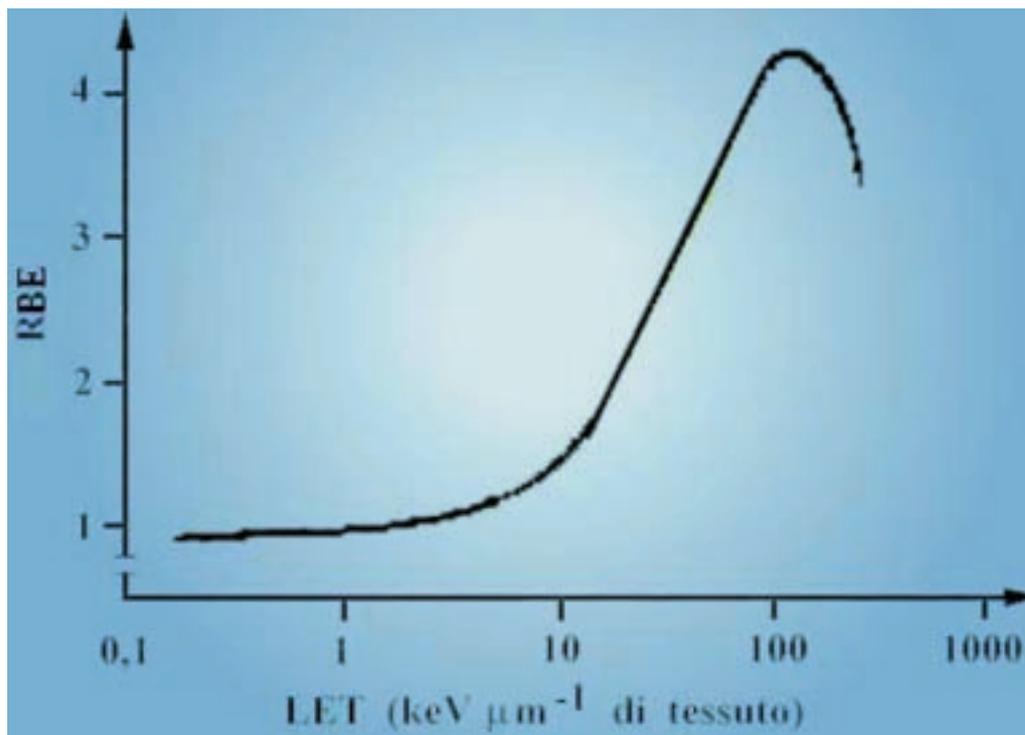
Qual è la definizione di RBE?

Trattasi di un rapporto tra le energie assorbite di due fasci di radiazioni necessarie per produrre il medesimo effetto biologico (Fig.63).

I valori di RBE possono essere espressi in due modi:

$$\text{RBE} = \frac{\text{Effic. biol. della radiazione sperimentale}}{\text{Efficacia biologica dei raggi X da 250 KV}}$$

**Fig. 64**  
 Dipendenza dell'Efficacia  
 Biologica Relativa dal  
 Trasferimento Lineare di Energia.  
 Col variare dei valori di *RBE*, i  
 valori di *LET* in un tessuto  
 possono variare da 0,1 a 1.000  
 $\text{KeV}\cdot\mu\text{m}^{-1}$ .



oppure

$$\text{RBE} = \frac{\text{cGy per avere effetti con raggi X da 250 KV}}{\text{cGy per avere effetti con la radiaz. sperim.}}$$

Questi valori inizialmente variano poco con l'incremento del *LET*. Poi, man mano che il *LET* cresce, aumentano anch'essi (Fig.64).

Tale aumento è attribuibile a una densità di ionizzazione relativamente più alta, dovuta a una deposizione ottimale di energia da parte delle radiazioni ad alto *LET*. Oltre i  $100 \text{ KeV}/\mu\text{m}$  di percorso - cioè con l'ulteriore aumento del *LET* - l'*RBE* diminuisce, poiché una gran parte di energia viene "dissipata".

Insomma, se il concetto di *LET* è stato coniato per comprendere nel contempo sia gli eventi di ionizzazione che quelli di eccitazione, il concetto di *RBE* è servito per capire che - pur tenendo conto del fatto che tutte le radiazioni ionizzanti interagiscono con la materia vivente in modo analogo - i diversi tipi di radiazioni differiscono quantitativamente nella loro efficacia e cioè nella loro capacità di recar danno a un sistema.

Per tale motivo i valori di *RBE* sono sempre espressi in relazione a un tipo standard di radiazione, mentre il fattore principale che li influenza è proprio il *LET* in quanto misura della distribuzione delle ionizzazioni e delle eccitazioni durante il percorso di una particella.

Se l'efficacia biologica di una data particella è in relazione alla distribuzione delle ionizzazioni e delle eccitazioni generate lungo il suo percorso, le particelle ad alto *LET* diventano più dannose di quelle a basso *LET*.

Questo spiega perché le particelle  $\alpha$ , i protoni e i neutroni hanno valori di *RBE* maggiori rispetto a quelli dei raggi X, dei raggi  $\gamma$  e degli elettroni.

## I cluster di ionizzazione e le coppie ioniche

Come discusso prima, le radiazioni ionizzanti trasferiscono la loro energia a molecole e macromolecole attraverso due processi: uno di *ionizzazione* e un altro di *eccitazione* (il primo è preponderante quando molecole e macromolecole si trovano ad alta concentrazione, il secondo è preponderante quando queste si trovano a bassa concentrazione).

Nel sistema irradiato, una singola ionizzazione deposita in media un'energia di 33 eV. Siccome solo 10-15 eV sono necessari per ionizzare una molecola (per estrarne un elettrone), l'energia eccedente viene prima distribuita su tutte le sue parti e poi rimossa come energia di "eccitazione". Anche questa energia eccedente può essere concentrata su di un dato legame provocandone la rottura.

### a. Il concetto di cluster

Di solito le ionizzazioni sono doppie o triple e pertanto si manifestano come *grappoli* ovvero *cluster*. Assumendo che in media occorrono tre ionizzazioni per singolo cluster, per ottenere delle apprezzabili ionizzazioni primarie, si deve partire da una base di 100 eV. Tale quantità di energia, anche se bassa, è sufficiente per produrre effetti che possono divenire letali. Infatti, se in una sfera di materia, con diametro di 30 Å, vengono depositati 100 eV per cluster, in questa la temperatura sale da 37 °C a 80 °C.

Ciò indica che l'indice significativo dell'alterazione di un determinato stato molecolare o macromolecolare è la distribuzione dell'energia e non la sua quantità assoluta.

Da questo punto di vista, diventa importante la distinzione tra lo stato di una molecola che riceve dell'energia direttamente attraverso processi di ionizzazione o eccitazione (*effetto diretto*) e quello di una molecola che riceve dell'energia proveniente indirettamente da un'altra molecola (*effetto indiretto*).

Il primo effetto risulta cruciale nei sistemi acquosi, poiché in essi le molecole, una volta ionizzate, possono poi trasferire l'energia acquisita ad altre molecole. Peraltro, quasi la metà di un danno può essere arrecata a molecole specifiche per effetti indiretti delle radiazioni, mentre l'altra metà del danno è il risultato di effetti diretti delle radiazioni.

### b. La formazione di ioni positivi e negativi

Quando le radiazioni depositano dell'energia nel materiale biologico, vi generano particelle cariche che successivamente ionizzano atomi, molecole e macromolecole.

L'espulsione di un elettrone da una molecola (A) comporta la comparsa di uno ione positivo (A<sup>+</sup>) oltre a quello negativo (e<sup>-</sup>):



Questi due ioni prodotti, A<sup>+</sup> ed e<sup>-</sup>, vengono definiti *coppia ionica*.

La formazione di tale coppia rappresenta la tappa iniziale per ambedue gli effetti diretti e indiretti delle radiazioni.

Le coppie ioniche vivono per pochissimo tempo, come anticipato prima; ma, qualora interagiscano con un ambiente adatto, possono dare origine ai cosiddetti *radicali liberi*.

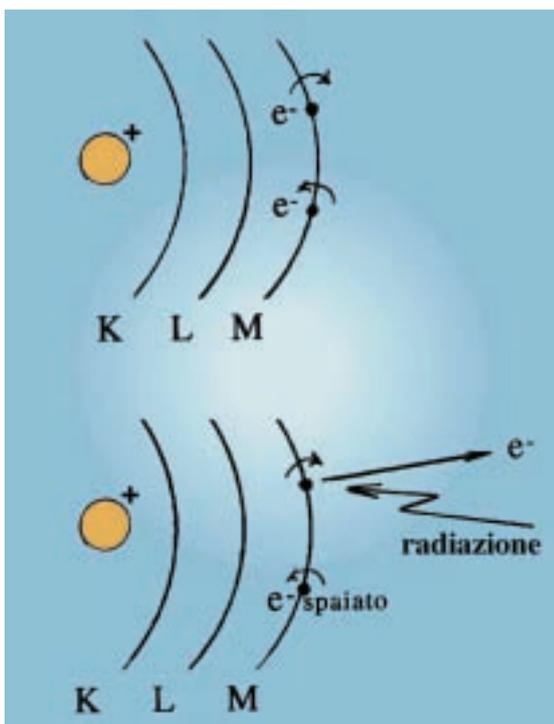
## I radicali liberi

Si definiscono *radicali liberi* quegli atomi che, pur risultando elettricamente neutri, presentano un elettrone spaiato nell'orbitale esterno (Fig.65).

Tali atomi risultano assai reattivi poiché hanno la proprietà di attrarre un altro elettrone, per appaiarlo con quello che hanno perduto, oppure di disfarsi dell'elettrone spaiato.

Di conseguenza i radicali liberi acquistano la duplice proprietà di agire come *ossidanti*, quando si comportano come accettori di elettroni, e *riducenti*, quando si comportano come donatori di elettroni.

La scoperta dei radicali liberi risale agli studi sulla *foto-decomposizione* della molecola di *cloro* nei suoi due atomi.



**Fig. 65**  
Formazione dell'elettrone spaiato. Gli schemi si riferiscono per semplicità al modello dell'atomo di N. Bohr. A livello M, più esterno, i valori di *spin* della coppia di elettroni sono opposti:  $+1/2$  e  $-1/2$  (in alto). Se la radiazione espelle uno dei due elettroni dal livello M, l'elettrone che vi rimane risulta "spaiato" rispetto allo *spin* (in basso).

### a. La scissione omolitica del legame covalente

La foto-decomposizione della molecola di cloro comporta una *scissione omolitica* del legame covalente:



ovvero



### b. La radiolisi dell'acqua

Figurano come radicali liberi anche quelle *molecole* che sono elettricamente neutre poiché hanno un elettrone spaiato in un guscio esterno di uno dei loro atomi. Queste molecole, assai reattive, sono quasi sempre intermedie tra coppie ioniche e prodotti chimici finali.

Il loro processo di formazione può essere compreso facilmente analizzando la *radiolisi dell'acqua*.

L'acqua costituisce il 70-90% dei sistemi biologici ed è l'ambiente principale dove ha luogo la maggior parte delle ionizzazioni primarie radioindotte.

Quando una radiazione colpisce una molecola d'acqua ( $H_2O$ ), dopo l'espulsione di un elettrone, questa si trasforma in *acqua positiva* ( $H_2O^+$ ):



Gli elettroni originati dalla reazione (2) interagiscono con la stessa acqua in due modi: formando *acqua negativa* ( $H_2O^-$ )



oppure formando *elettroni idrati* ( $e^-_{aq}$ ), cioè dipoli acquosi orientati con la loro parte positiva verso la carica elettronica negativa

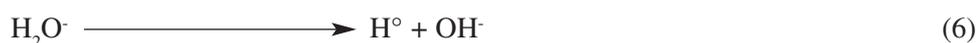


Le reazioni (2) e (3) sono relativamente più lente di quella (4). Ciò rende gli elettroni idrati piuttosto stabili a temperatura ambiente (con estinzione massima a  $720 \text{ nm}$ ).

Le due molecole di acqua ionizzata, una positivamente (2) e l'altra negativamente (3), sono invece molto instabili. Tale instabilità le fa ben presto dissociare in ioni idrogenionici ( $H^+$ ) e idrossilici ( $OH^-$ ) e in radicali liberi idrogenionici ( $H^\circ$ ) e idrossilici ( $OH^\circ$ ):



oppure



### c. L'instabilità dei radicali idrossilici e idrogenionici e la relativa stabilità dell'elettrone idrato

I radicali liberi  $H^\circ$  e  $OH^\circ$  sono assai reattivi.

Ciò li rende di esistenza breve:  $10^{-9}$ - $10^{-11}$  secondi.

La loro considerevole quota di energia può provocare la rottura di una serie di legami chimici (gli  $OH^\circ$ , come si vedrà più avanti, sono particolarmente responsabili per le rotture di singoli tratti di *DNA*).

In virtù della loro elevata reattività, essi possono interagire: prima di tutto, tra loro; poi, con composti organici diluiti in acqua; infine, con i gas sempre diffusi in acqua ("effetto ossigeno").

Nel primo caso,  $H^\circ$  e  $OH^\circ$  si possono *dimerizzare*. Tale dimerizzazione è possibile poiché dei radicali liberi possono condividere i loro elettroni spaiati in un unico legame chimico. Due radicali liberi idrogenionici possono infatti unirsi per formare una molecola di idrogeno



mentre due radicali liberi idrossilici si associano formando acqua ossigenata

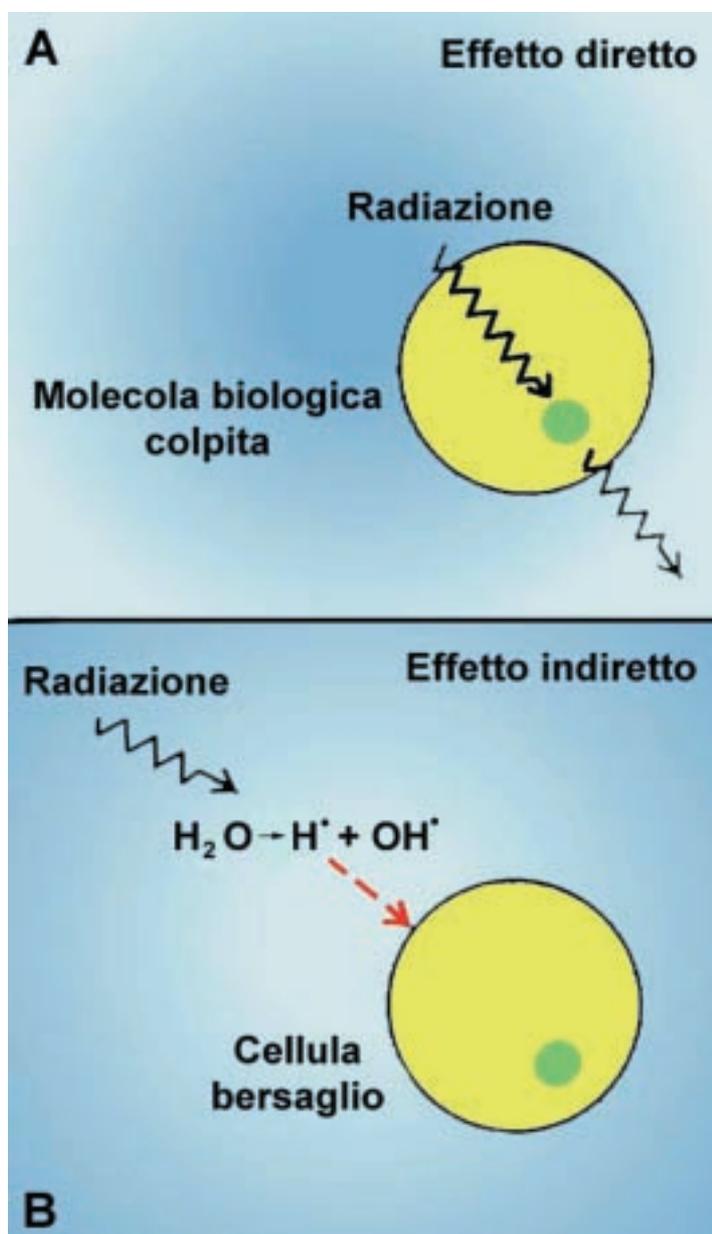


Un radicale  $\text{H}^\circ$  e uno  $\text{OH}^\circ$  danno vita a una molecola d'acqua normale:



Se l'effetto delle radiazioni ionizzanti finisce con le reazioni (7), (8) e (9), non ci sarebbe nulla di preoccupante per la vita poiché la produzione di idrogeno, acqua ossigenata e acqua normale non può provocare ulteriori ionizzazioni.

Quando però i radicali liberi  $\text{H}^\circ$  e  $\text{OH}^\circ$  agiscono sui *composti organici (RH)* diluiti in acqua, i loro effetti diventano gravi, in quanto si formano *radicali liberi organici (R<sup>o</sup>)*.



**Fig. 66**

Paragone tra gli effetti diretti e indiretti delle radiazioni ionizzanti. Diversamente dalle radiazioni che in una determinata struttura della cellula bersaglio provocano in maniera diretta delle ionizzazioni (A), i radicali liberi  $\text{H}^\circ$  e  $\text{OH}^\circ$  originati dalla radiolisi dell'acqua nella cellula bersaglio provocano indirettamente delle ionizzazioni a catena (B).

#### d. L'interazione coi composti organici

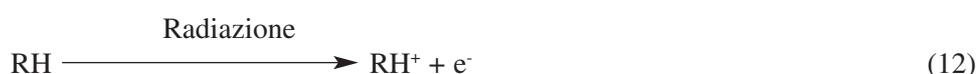
In questo caso si tratta di un'azione indiretta delle radiazioni, biologicamente assai dannosa:



oppure



Le radiazioni ionizzanti possono colpire anche direttamente il soluto ( $RH$ ) provocando ancora una volta la formazione di radicali liberi organici ( $R^\circ$ ):



e poi



Il risultato delle reazioni (12) e (13) non è la liberazione di una molecola di idrogeno ( $H_2$ ), come nella reazione (10), ma è la liberazione di un protone ( $H^+$ ).

#### e. L'effetto ossigeno

Con l'ossigeno interagiscono essenzialmente il radicale libero idrogenionico ( $H^\circ$ ) e l'elettrone idrato ( $e^-_{aq}$ ) formando radicali liberi perossidi di idrogeno instabili ( $HO_2^\circ$ ) e idroperossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ):



Il radicale libero  $HO_2^\circ$  è molto reattivo, con proprietà ossidanti. Un po' meno potente dell' $OH^\circ$  e dell' $H_2O_2$ , esso ha però un'esistenza più lunga e quindi è capace di diffondere dal luogo della sua formazione (circa  $20 \text{ \AA}$ ) fino a ulteriori interazioni.

D'altra parte, interagendo con gli stessi radicali liberi organici ( $R^\circ$ ), l' $O_2$  delle reazioni (14) e (17) può provocare, attraverso una reazione a catena, la formazione di radicali liberi perossidi di molecole organiche ( $RO_2^\circ$ ):





## f. La radioprotezione chimica

La formazione dei radicali liberi, essendo un processo chimico, può essere modificata da processi biologici.

Per esempio, gli enzimi che distruggono i *perossidi* quali la *catalasi* o la *perossidasi*, riducendo la quantità di  $\text{H}_2\text{O}_2$  intracellulare, riducono anche l'entità di un eventuale danno biologico che altrimenti si produrrebbe.

Così gli *aminotioili* (*cisteina*, *glutatione ecc.*) possono agire come agenti fissatori di radicali liberi.

Col loro *gruppo sulfidrilico* (*M-SH*) essi possono facilmente "riparare" un radicale libero organico ( $\text{R}^\circ$ ) attraverso il seguente meccanismo:



L'atomo di idrogeno del gruppo sulfidrilico del protettore si trasferisce al radicale libero organico che così si ripara (*RH*).

Il protettore può ridurre inoltre la reazione tra radicali liberi idrossilici e ossigeno:



Ciò comporta la formazione di radicali perossidi in seguito a una competizione con l'ossigeno stesso in quanto donatore di idrogeno.

I radicali liberi  $\text{OH}^\circ$ , massimi responsabili per l'azione indiretta delle radiazioni (Fig.66), possono essere rimossi dal dimetilsolfossido (*DMSO*).



## Effetto delle radiazioni sulle biomacromolecole

Non sono stati ancora identificati i bersagli critici grazie ai quali le radiazioni ionizzanti fanno perdere alle cellule le loro capacità riproduttive.

Si è però cominciato a far luce sulla radiosensibilità di quelle macromolecole come gli acidi nucleici che posseggono tali capacità e si è visto che la deposizione di energia da parte di radiazioni direttamente o indirettamente ionizzanti induce dei cambiamenti primari che, a loro volta, provocano a catena una serie di cambiamenti secondari.

Questi nuovi cambiamenti implicano essenzialmente: la *rottura di legami deboli* quali i *ponti-H*, la *formazione di legami covalenti (cross-link)* e infine la *degradazione delle macromolecole*.

Uno o più cambiamenti di tale tipo possono prima portare la cellula alla perdita delle sue capacità riproduttive e poi provocarne la morte.

### a. Le interazioni con le proteine ai vari livelli della loro struttura

Per quanto riguarda le proteine, sia la struttura a  *$\beta$ -foglietti ( $\beta$ -pleated sheet)* che quella ad  *$\alpha$ -elica* sono mantenute da *ponti-H*. Tali legami vengono distrutti facilmente dalle radiazioni, con conseguente alterazione delle proprietà funzionali della macromolecola.

Se questa macromolecola è un enzima, la rottura dei suoi ponti-H può provocare una inibizione o addirittura una perdita di proprietà catalitiche.

La stessa cosa si può dire se in una proteina si verifica una rottura di *ponti-S-S-*, legami più stabili di quelli idrogeno, perché covalenti, originati da due gruppi sulfidrilici.

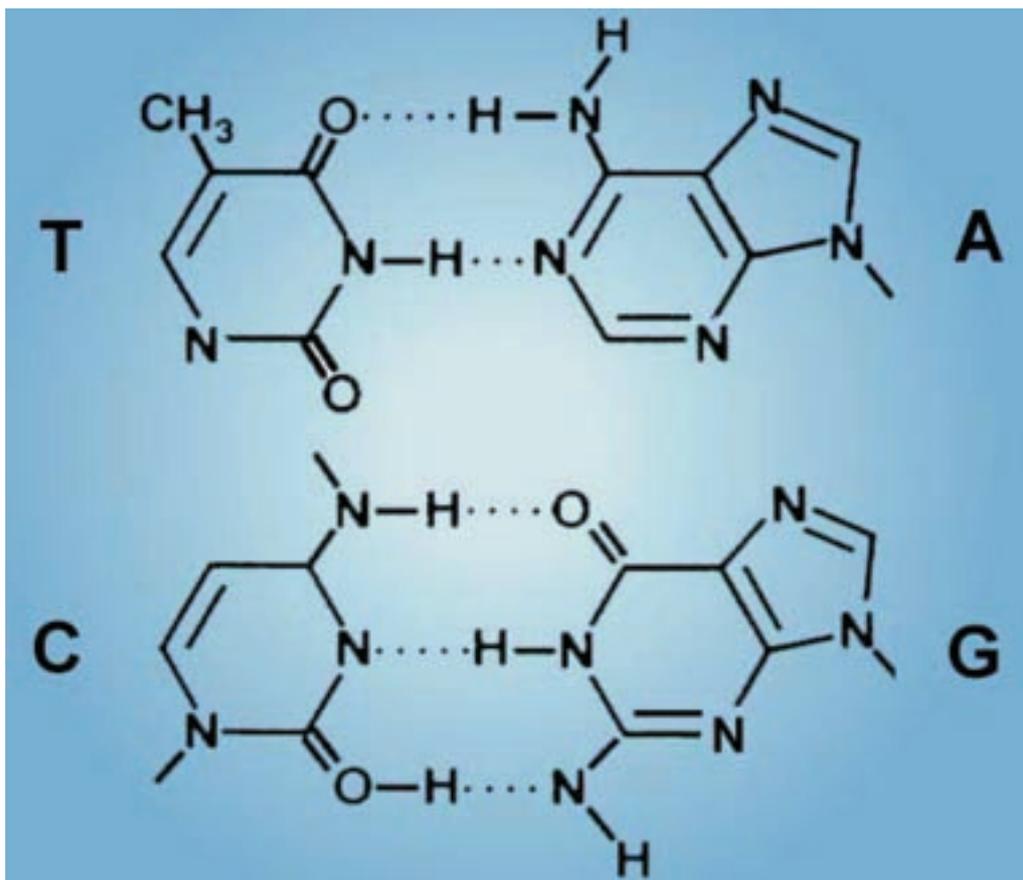
In tal caso, il primo risultato è uno svolgimento (*unfolding*) parziale di catene polipeptidiche altamente spiralizzate il che può comportare egualmente la perdita di proprietà funzionali da parte dell'intera macromolecola. Lo svolgimento causa anche una diminuita solubilità e un'augmentata aggregabilità, favorendo infine l'insolubilità delle proteine. Altre alterazioni radioindotte possono verificarsi nella viscosità, nell'indice di rifrazione o nella conduttività elettrica di queste proteine.

### b. Le interazioni con la doppia elica di DNA

Per quanto riguarda la *doppia elica* di DNA nativo, i *ponti-H* hanno un ruolo fondamentale nell'appaiamento delle basi al suo interno (Fig.67). Così come quelli delle proteine, anch'essi possono essere distrutti dalle radiazioni e non si sa se un danno irreversibile della doppia elica irradiata dipenda soltanto da una o da un gran numero di rotture di *ponti-H*.

Si capisce che l'insieme dei cambiamenti indotti dalle radiazioni (da una parte, nelle strutture secondaria e terziaria delle proteine e, dall'altra, all'interno della doppia elica del DNA) finisce con l'influenzare le stesse interazioni *DNA-proteine*. Vale a dire che la radiosensibilità dei *ponti-H* può avere da sola una forte risonanza, all'interno del-

**Fig. 67**  
 Legami idrogeno tra basi azotate all'interno della doppia elica di DNA. Tra T e A si stabiliscono due ponti-H; tra C e G se ne stabiliscono tre. Per la formazione di questi ponti (in media lunghi 2,8-2,9 Å), le due eliche devono essere disposte in *senso antiparallelo* l'una rispetto all'altra.



la cromatina, nei rapporti tra *DNA* e proteine istoniche e non istoniche. Conseguentemente, la radiosensibilità della cromatina finisce con l'influenzare i noti fenomeni della trascrizione e della traduzione da cui dipende il processo fondamentale della vita e cioè la sintesi delle macromolecole proteiche.

Oltre a questi tipi di modificazioni conformazionali, dovuti alla rottura radioindotta di ponti idrogeno e disolfurei (rottura che non compromette la struttura primaria delle catene peptidiche e polinucleotidiche), le radiazioni ionizzanti possono causare una degradazione di molecole e macromolecole arrecandovi delle vere e proprie interruzioni. Se nelle macromolecole degradate sono presenti delle sequenze identiche, cioè ripetute, tali interruzioni hanno luogo negli stessi punti. Questo fenomeno suggerisce che l'energia assorbita in un dato punto del polimero può essere trasmessa da uno all'altro dei suoi monomeri fino al raggiungimento di un legame più debole.

I radicali degli aminoacidi, considerati come catene laterali dei polipeptidi, sono altri bersagli assai radiosensibili. Ciò è dovuto al fatto che essi possono comportarsi come "trappole" di elettroni. Le modificazioni specifiche che si estrinsecano al loro interno in seguito alle irradiazioni dipendono dalla loro composizione chimica. Le conseguenze di queste modificazioni sono analoghe a quelle discusse nel caso della rottura dei *ponti-H*, poiché i gruppi funzionali presenti nei radicali aminoacidici ( $-COO^-$  o  $-N^+H_3$ ) e in genere la struttura globale di questi radicali (contenenti  $-CH_2$  e  $-CH_3$  o, in alcuni casi, anelli aromatici) sprigionano forze relativamente deboli (da quelle di *Van der Waals* a quelle *elettrostatiche*, con *interazioni idrofiliche*, e a quelle delle *coesioni per idrofobia*) che cooperano nella stabilizzazione delle strutture più complesse, *terziaria* e *quaternaria*.

Particolarmente interessanti sono le informazioni che riguardano i danni arrecati dalle radiazioni alla doppia elica di *DNA*.

Questi danni possono aver luogo in diverse maniere e in diversi suoi siti (Fig.68).

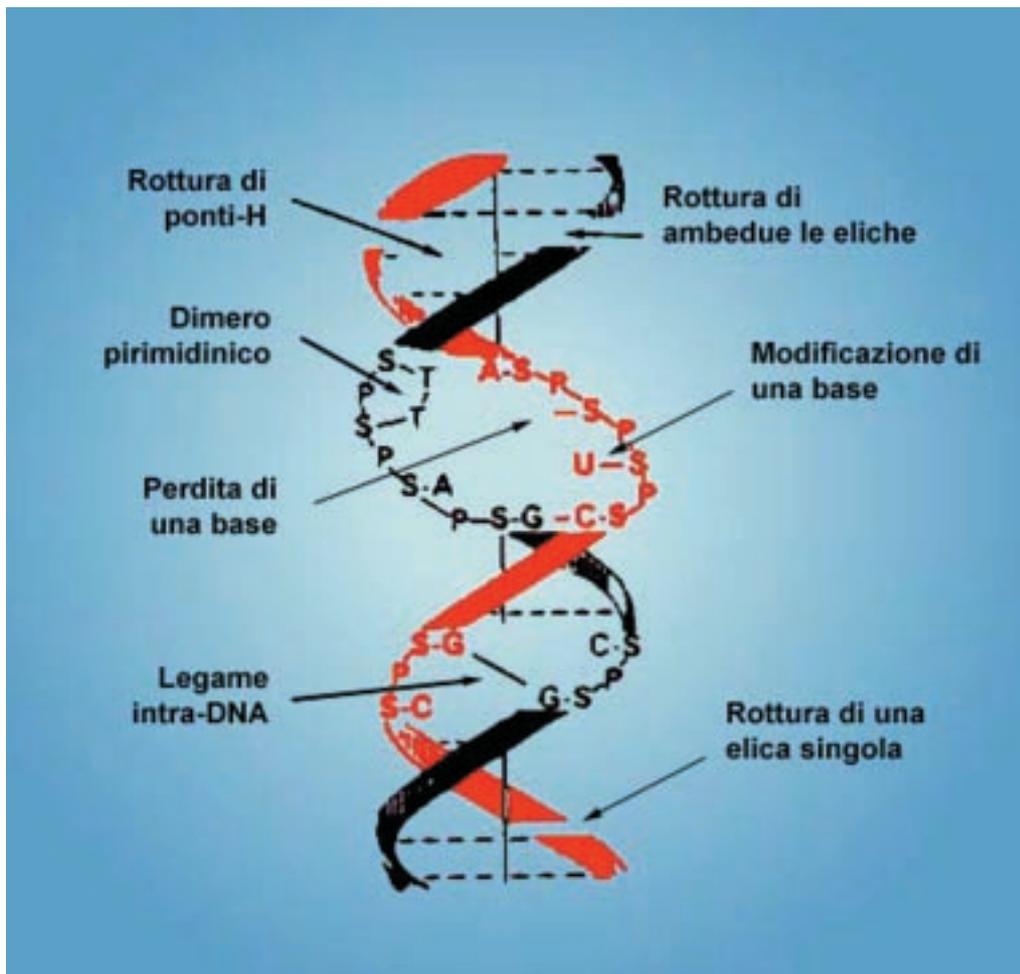
Prima di tutto, le radiazioni possono provocare la perdita di una base all'interno della doppia elica: vi si può constatare, per esempio, una *depurinazione* radioindotta.

Un altro effetto può essere la trasformazione radioindotta di una base: per esempio, per *deaminazione*.

Quando i danni sono delle rotture delle *catene*, lo sperimentatore le osserva su una o su tutte e due: si parla di rotture singole (*ss*) se si verificano su una sola catena; si parla invece di rotture doppie (*ds*) se hanno luogo su ambedue le catene. Si tratta sempre di una interruzione dei legami di estere tra il deossiriboso e il fosfato inorganico (la cui sequenza alternata, dall'una e dall'altra parte, forma i portanti "monotoni" della doppia elica). Di solito, le rotture *ss* vengono *riparate* (sempre che non ci sia la necessità di lasciare libere le estremità da esse prodotte).

Però, in ambiente di ossigeno, le estremità che si ritrovano in uno stato reattivo (detto "perossidabile") diventano incapaci di reagire le une con le altre.

Una rottura *ds* si ha invece se la radiazione causa due tagli, uno su una catena e un altro sull'altra (al massimo a distanza di cinque nucleotidi). Praticamente la doppia rottura si realizza quando i due tagli si ritrovano in giustapposizione o quando li produce una particella singola ma molto carica (con circa 500 eV) che opera in un *cluster di ionizzazione* ampio 20 Å (vedi Cap.36a).



**Fig. 68**

Tipi di danni arrecati dalle radiazioni nella doppia elica di DNA. La distruzione di ponti-H in uno o più punti comporta *microdenaturazioni*, con allontanamento locale delle due eliche. In seguito alla distruzione dei legami covalenti tra *pentoso* e *fosfato*, in uno o più punti, si possono verificare *rotture singole* (*ss breaks*) e *doppie* (*ds breaks*) delle eliche. Due pirimidine adiacenti lungo un'elica, per esempio due T, possono associarsi tramite *legami covalenti* formando un *dimero* (*ciclobutano*). Una o più basi azotate all'interno della doppia elica possono essere *distrutte* (*base loss*) o *mutate* (per esempio con formazione di U). Si possono formare dei legami covalenti all'interno dello stesso DNA (per esempio un *GG cross-link*) o anche tra DNA e *proteine cromosomiali* (*DNA-protein cross-link*).

### c. La formazione dei legami covalenti all'interno della stessa macromolecola

La formazione di un legame covalente (*cross-link*) è il risultato di un grave danno radioindotto.

Tale legame viene definito *intramolecolare* quando due parti di una stessa macromolecola si ritrovano congiunte e *intermolecolare* quando la macromolecola si ritrova combinata con un'altra.

Dei *cross-link* possono coinvolgere sia le proteine che gli acidi nucleici, sempre che la radiazione sia in grado di attivare chimicamente due punti di contatto vuoi nell'ambito della stessa macromolecola vuoi tra due macromolecole distinte.

Le conseguenze del *cross-link* radioindotto possono essere le più diverse. Per esempio, per le proteine enzimatiche, la sua comparsa comporta una inattivazione della macromolecola (con inibizione di attività biocatalitica), accompagnata da diminuzione di solubilità e aumento di precipitabilità.

### d. La formazione dei legami covalenti tra macromolecole diverse

La formazione di *cross-link* all'interno di una doppia elica di *DNA* o tra due doppie eliche di *DNA* oppure ancora tra *DNA* e proteine può essere attribuita alla formazione e al congiungimento di determinati loro siti reattivi.

Un *cross-link* nella doppia elica di *DNA* può stabilirsi tra due basi, come ben dimostrato quando *UV* o radiazioni ionizzanti formano un tetracarbonio (*ciclobutano*) unendo con legami covalenti gli atomi  $C_5$  e  $C_5$  e  $C_6$  e  $C_6$  di due timine adiacenti (vedi Tavole VIII e IX).

Il *DNA* legato con le proteine è più resistente alle radiazioni: infatti vi si riscontrano meno perdite o trasformazioni di basi e meno rotture di catene (forse uno dei possibili ruoli di particolari proteine nucleari è proprio quello di proteggere il *DNA* dai radicali liberi).

Per la stretta associazione tra *DNA* e *proteine cromosomiali (istoniche e non)* e tra *DNA* e *proteine di membrana*, si possono formare dei *cross-link* radioindotti intermolecolari all'interno di un determinato complesso.

Tali *cross-link* possono finire con l'alterare sia la *replicazione* del *DNA* che la stessa *regolazione genetica della trascrizione*.

Per quanto riguarda l'*RNA*, le sue modificazioni radioindotte sono poco conosciute. Si presume però che vi siano delle forti analogie coi fenomeni descritti per il *DNA*.

### e. L'alterazione delle funzione macromolecolari

Le radiazioni di una certa entità provocano dunque delle modificazioni che, alterando le normali funzioni macromolecolari, diventano cruciali, come accennato, non solo nella biocatalisi ma anche nella trasmissione del flusso di informazione genetica dal *DNA* all'*RNA* e dall'*RNA* alle proteine.

D'altra parte, si conosce poco circa l'effetto delle piccole dosi di radiazione sull'espletamento delle funzioni metaboliche, mentre alcune scuole hanno anche suggerito - ipotizzando una *ormesi* - che il fondo di radioattività naturale possa essere utile per mantenere attive tali funzioni (vedi Cap.25b).

Pertanto si invitano gli studenti a prestare attenzione a tutto quell'affascinante lavoro radiobiologico che ha suggerito come probabilmente in natura, in particolari condizioni fisico-chimiche, le stesse radiazioni abbiano potuto avere un ruolo importante nei processi di costruzione di molecole e macromolecole *prebiotiche*.

## La teoria dell'urto

Nelle pagine precedenti sono stati descritti i danni più comuni causati dalle radiazioni ionizzanti all'interno dei vari tipi di biopolimeri. Sommati gli uni agli altri, questi danni possono modificare l'organizzazione generale delle forme di vita attualmente conosciute, al punto da comprometterne la stessa esistenza.

### a. La radiosensibilità dei biocatalizzatori

L'attività catalitica degli *enzimi* - minuscole "macchine" biologiche - può essere influenzata negativamente dalle radiazioni. Gli enzimi, come è noto, sono costituiti da una o più subunità polipeptidiche (*parte proteica*). In alcuni casi, questa parte proteica è accoppiata a un'altra parte non proteica (*parte prostetica*). Le radiazioni inducono modificazioni in ambedue le parti. Una riduzione del peso totale dell'enzima irradiato può essere dovuta prevalentemente alla distruzione di alcuni suoi aminoacidi e quindi alla frammentazione della sua parte proteica. Possono aver luogo inoltre delle modificazioni radioindotte dell'enzima, limitate alla sola sfera delle strutture proteiche secondarie e terziarie. La stessa solubilità del biocatalizzatore può risultare alterata.

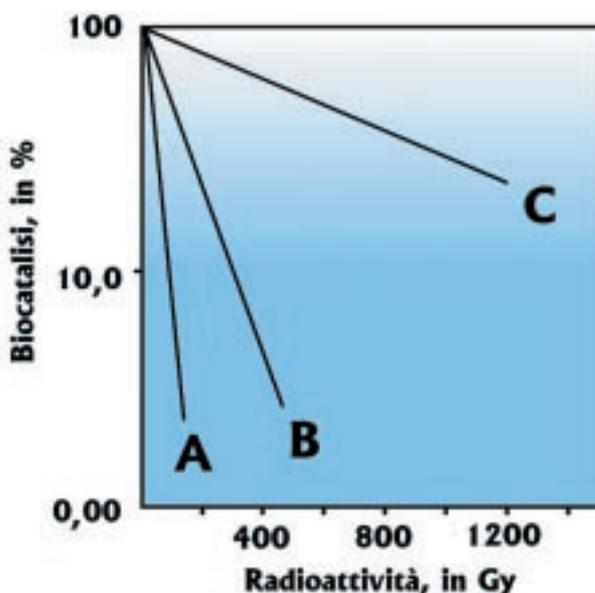
Tra i primi enzimi studiati dal punto di vista radiobiologico figura la *deossiribonucleasi (DNAsi)*. Nel 1957, su *Archives of Biochemistry and Biophysics*, lo scienziato giapponese S. Okada era già in grado di descriverne le *curve di inattivazione* in funzione della dose radioattiva: il saggio *in vitro* mostrava che la percentuale delle macromolecole *DNAsiche* inattivate incrementava man mano che aumentava la dose radioattiva, soprattutto quando il livello della loro concentrazione era più basso.

Questo fenomeno può essere spiegato oggi dal fatto che la diminuzione della concentrazione di enzima finirebbe col favorire la sua inattivazione radioindotta per il relativo aumento delle molecole di acqua: a bassa concentrazione enzimatica, l'inibizione della biocatalisi avverrebbe per *via indiretta* prevalentemente per la diffusione di radicali liberi dell'acqua; ad alta concentrazione enzimatica, l'inibizione della biocatalisi avverrebbe per *via diretta* prevalentemente per l'interazione tra radiazione e biocatalizzatore (Fig.69).

D'altra parte, anche se l'attività biocatalitica di alcuni enzimi studiati dallo scrivente (*ornitina- $\delta$ -transaminasi, DNA-polimerasi, DNA-metilasi, restrittasi dcm-inibite*) può essere influenzata già da 1 o 2 Gy, è generalmente accettato che di solito la sua inibizione può essere indotta da radiazioni dell'ordine di decine di Gy. Tale dose è di gran lunga più grande rispetto a quella, pari a 1,5 Gy, necessaria per eliminare i due terzi di una popolazione cellulare sia *in vivo* che *in vitro*.

Questa differenza potrebbe essere causata dalla maggiore radiosensibilità dei bersagli cellulari, rispetto a quella dei bersagli enzimatici. L'interesse teorico dell'ipotesi va confrontato col fatto che la presenza di determinate proteine nella miscela di reazione, per esempio quella della *sieroalbumina*, può radioproteggere la biocatalisi. Nella cellula intanto gli enzimi sono sempre circondati da un gran numero di proteine.

**Fig. 69**  
 Inibizione dell'attività enzimatica in funzione della dose radioattiva. L'ordinata indica in scala logaritmica l'attività enzimatica residua, dopo irradiazione. La radiosensibilità dell'enzima dipende dalle sue bassa, media o alta concentrazioni nella miscela di reazione: (A) 40-60 µg per ml; (B) 400-600 µg per ml; (C) 4000-6000 µg per ml.



## b. La radiosensibilità dei virus

Mentre nella maggioranza dei casi la radiosensibilità della biocatalisi ha a che fare con le sole strutture proteiche, quella dei virus, oltre che con le *proteine capsidiche*, ha a che fare coi loro *genomi* che possono essere a *DNA* o a *RNA*. La radiosensibilità dei virus, in quanto complessi *nucleoproteici* (cristallizzabili), è comunque maggiore rispetto a quella degli enzimi.

La variazione della percentuale di particelle virali radiore-sistenti, in funzione della dose radioattiva, viene definita come

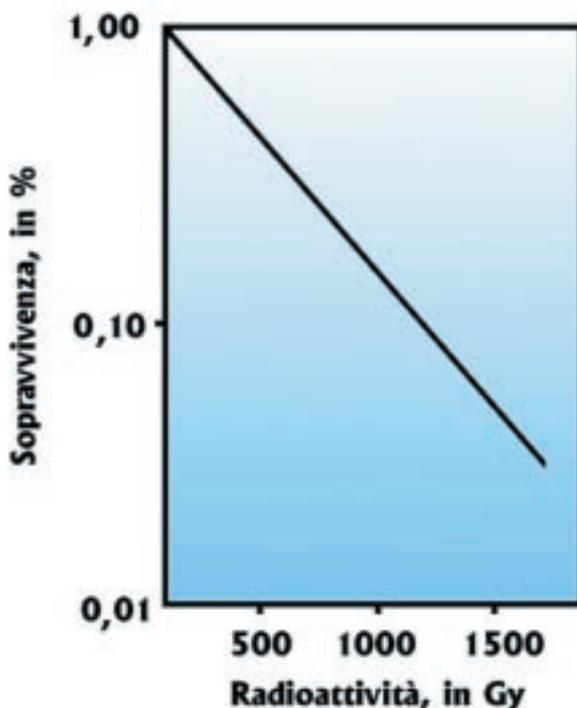
*curva di sopravvivenza* (Fig.70). In un diagramma semilogaritmico, questa funzione è esponenziale. La sua linearità indica che all'aumento graduale della dose radioattiva corrisponde una diminuzione graduale della percentuale di sopravvivenza delle particelle virali. Trattasi di una relazione monoesponenziale simile a quella descritta in Fig.69 per l'inattivazione radioindotta dell'attività enzimatica.

Nei due decenni trascorsi tra le guerre mondiali, alcuni studi di *genetica formale* suggerivano che i danni arrecati dalle radiazioni alle molecole, alle macromolecole e alle biostrutture in genere dovessero dipendere dalla particolare radiosensibilità di alcuni loro *bersagli* specifici. In un lavoro degli inglesi D. E. Lea e R. B. Haines, intitolato *The bactericidal action of ultraviolet light*, comparso nel 1940, si accennava già a quella che

poi sarebbe divenuta la ben nota *teoria dell'urto* (o *del bersaglio*). Mentre lo stesso D. E. Lea riproponeva questa teoria nel 1946 in un libro dal titolo *Actions of radiations on living cells*, a breve scadenza, nel 1947, le sue argomentazioni venivano portate avanti dal genetista russo N. W. Timofeeff-Resovsky.

La teoria dell'urto correla i processi fisici relativi all'assorbimento della radiazione (eccitazione e ionizzazione) con quelli biologici relativi all'andamento esponenziale della curva di sopravvivenza. Tale andamento implica che delle biostrutture (per esempio, delle semplici macromolecole o delle intere particelle virali) vengano coinvolte a caso dall'eccitazione e dalla ionizzazione. All'interno di queste biostrutture de-

**Fig. 70**  
 Sopravvivenza delle particelle virali in funzione della dose radioattiva. L'ordinata indica in scala logaritmica la frazione di virus residui, dopo irradiazione.



vono esistere dei *bersagli critici* il cui danno induce la loro totale distruzione. Le biostrutture sopravvivono se nessun colpo arriva nei bersagli critici. L'esponenzialità della curva di sopravvivenza suggerisce intanto che, in teoria, basti un solo colpo, in un singolo bersaglio critico, per distruggere un'intera biostruttura.

La curva di sopravvivenza esponenziale si può esprimere con un'equazione:

$$N = N_0 \cdot e^{-D/D_0} \quad (1)$$

dove  $N$  è il numero di particelle virali rimaste illese dopo una dose radioattiva  $D$ ,  $N_0$  è il numero di particelle virali presenti nella popolazione di partenza,  $e$  rappresenta la base dei logaritmi naturali e  $D_0$  rappresenta una costante che indica la pendenza della retta (Fig.70).

Nel caso che si ponga  $D_0 = D$ , siccome  $e^{-1}$  equivale a 0,37, l'equazione (1) diventa:

$$N = N_0 \cdot 0,37. \quad (2)$$

L'equazione (2) dimostra che  $D_0$  non è altro che una determinata dose di radioattività corrispondente a quella necessaria per ridurre il numero di particelle virali al 37%, rispetto al valore iniziale di  $N$ . Anche se la legge della distribuzione binomiale prevede che  $D_0$  debba corrispondere a una dose sufficiente per ottenere in media un urto per particella virale, la casualità delle onde di eccitazione e ionizzazione fa sì che alcune particelle virali ricevano più urti, mentre altre non ne ricevano alcuno. Ne consegue che, in termini di media statistica, *il valore di  $D_0$  diventa pari a quella dose radioattiva che è necessaria per distruggere circa il 63% delle particelle virali, mentre il 37% di queste particelle riesce a sopravvivere.* Il valore di  $D_0$  può variare lievemente a seconda della specie virale irradiata. Per i virus essa si aggira intorno ai 500 Gy.

### c. La radiosensibilità dei batteri

La teoria dell'urto può essere applicata non solo per spiegare la radiosensibilità del sistema nucleoproteico virale, ma anche per considerare la radiosensibilità dei batteri che sono veri e propri sistemi cellulari, anche se ancora privi di nucleo (*cellule procariotiche*). Il valore di  $D_0$  per i batteri è molto più basso di quello stabilito per i virus: esso oscilla tra 10 e 250 Gy. Così, i batteri sono molto più radiosensibili dei virus.

Per quanto riguarda la forma delle curve di sopravvivenza, per i batteri, si possono descrivere tre tipi di andamenti.

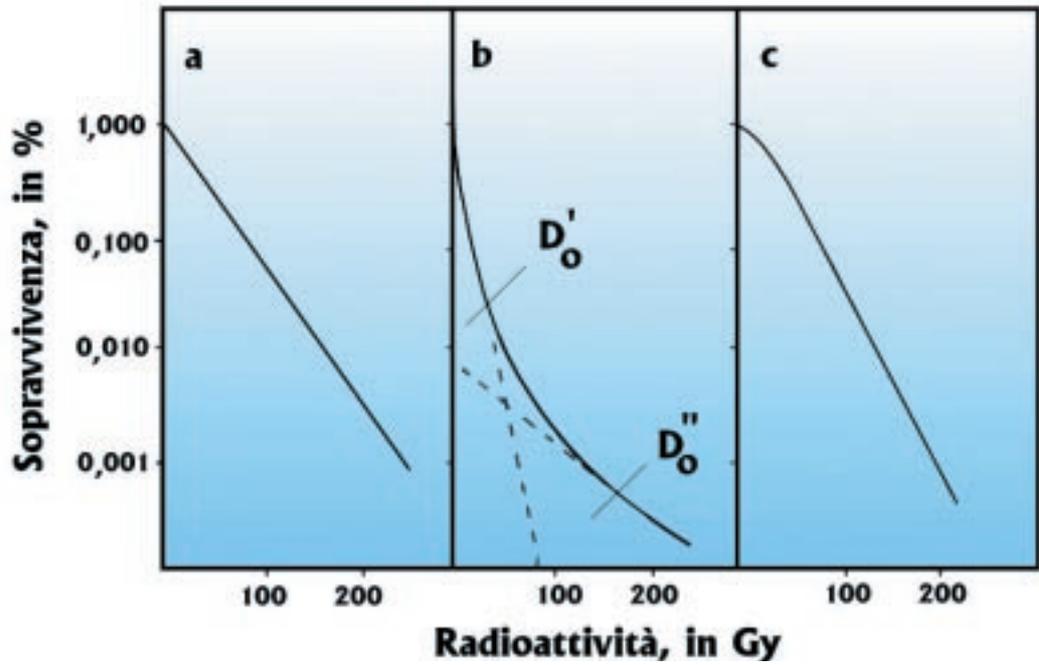
In un primo caso, l'andamento della curva di sopravvivenza è monoesponenziale, come per l'inattivazione dei virus (Fig. 71a). Trattasi prevalentemente di specie batteriche che occupano i livelli più bassi della scala evolutiva.

In un secondo caso, l'andamento della curva di sopravvivenza è bifasico (Fig.71b). Tale tipo di andamento potrebbe avere almeno due spiegazioni. Si potrebbe trattare del mescolamento di due ceppi: uno, più radiosensibile (con maggiore pendenza e minore  $D_0$ ); l'altro, più radioresistente (con minore pendenza e maggiore  $D_0$ ). Si potrebbe trattare anche del mescolamento di batteri appartenenti allo stesso ceppo, ma caratterizzati da diversi stati differenziativi: la maggiore radiosensibilità dovrebbe essere riferita a batteri in fase divisionale, mentre la maggiore radioresistenza dovrebbe essere riferita a quelli in fase intercinetica.

In un terzo caso, l'andamento della curva di sopravvivenza è ancora una volta bifasico: si forma una *spalla* alle basse dosi radioattive; il carattere *esponenziale* viene mantenuto soltanto alle alte dosi (Fig.71c). Con tale andamento della curva di soprav-

vivenza, il valore del  $D_0$  può essere stimato solo per il tratto esponenziale. La curva a spalla diverrà caratterizzante per le cellule eucariotiche (Fig. 72). Forse, per i batteri, essa riguarda specie che occupano i livelli più alti della scala evolutiva.

**Fig. 71**  
*Sopravvivenza dei batteri in funzione della dose radioattiva.*  
 L'ordinata indica in scala logaritmica la frazione di cellule batteriche residue, dopo irradiazione. (a) Curva di sopravvivenza esponenziale dovuta a urti singoli. (b) Curva di sopravvivenza bifasica. (c) Curva di sopravvivenza a spalla dovuta a eventi multipli.



## La radiosensibilità durante il ciclo cellulare

Una curva di sopravvivenza per delle cellule di mammifero viene descritta nel 1956 sul *Journal of Experimental Medicine* da T. T. Puck e P. I. Markus.

Alle basse dosi di radiazione, la *spalla* è soltanto abbozzata nelle curve di sopravvivenza delle popolazioni batteriche più evolute (Fig.71c). Essa diventa però caratterizzante per tutte le curve di sopravvivenza delle cellule eucariotiche: dopo la spalla, la curva diventa esponenziale man mano che aumenta la dose radioattiva (Fig.72). Il valore di  $D_0$  che, come spiegato prima, indica la dose necessaria per ridurre a 0,37 la percentuale delle cellule sopravvissute, ci parla della sola pendenza di questa parte.

### a. La radiosensibilità delle cellule eucariotiche

Si vedano ora le caratteristiche principali di una tipica curva di sopravvivenza di cellule eucariotiche irradiate. Il numero  $N$ , che in Fig.72 è uguale a 3, si evince dall'estrapolazione del suo tratto rettilineo. In genere, a bassi valori di  $LET$  (vedi Cap.35a), i valori di  $N$  variano da 1 a 5, mentre quelli di  $D_0$  variano da 1 a 3 Gy. I valori di  $N$  e  $D_0$ , da soli, bastano per definire la forma di una curva di sopravvivenza. Per tali motivi, essi si possono usare per paragonare cellule diverse, per esempio quelle normali e quelle cancerose. Oltre che da  $N$  e  $D_0$ , la curva di sopravvivenza delle cellule eucariotiche è caratterizzata da un terzo parametro,  $D_q$ , definibile come *quasi-dose soglia*. Questo parametro corrisponde a una dose il cui sviluppo esponenziale supera del 100% la sopravvivenza. Trattasi di un valore che è utile nell'analisi del cosiddetto *ricupero* del danno radioattivo, poiché misura quantitativamente la spalla. Per delle cellule irradiate da raggi X, il  $D_q$  oscilla tra 0,5 e 2,5 Gy.

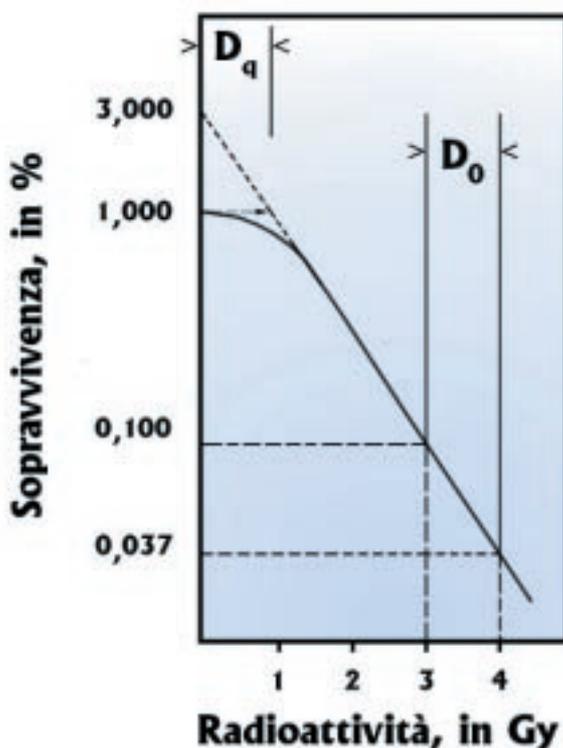
La determinazione dei punti sperimentali delle curve di sopravvivenza delle cellule eucariotiche di solito risulta difficile per una serie di motivi, per esempio per gli errori statistici che si accumulano quando si lavora con basse dosi di radiazione. Per tali motivi, nell'analisi di queste curve, l'applicazione della teoria dell'urto risulta circostanziata. Per i virus i calcoli erano esemplificati poiché, per la loro curva di sopravvivenza, si poteva applicare la teoria del bersaglio a urto singolo (vedi Fig.70). Per le cellule eucariotiche, si possono prevedere invece almeno tre forme di curva corrispondenti a tipi diversi di calcolo.

Il primo tipo di calcolo si basa sul cosiddetto *modello semplice a bersaglio multiplo*. La sua motivazione è nel fatto che, per uccidere una cellula, almeno due o più bersagli devono ricevere un urto singolo per ciascuno. Tale modello può essere descritto dall'equazione:

$$f = 1 - (1 - e^{D/D_0})^N \quad (1)$$

dove  $f$  rappresenta la frazione di cellule illese dopo una dose  $D$ ,  $D_0$  rappresenta la dose che garantisce la sopravvivenza del 37% delle cellule,  $N$  equivale al numero dei bersagli colpiti da un urto singolo. Questa equazione prevede un inizio di curva a pendenza zero il che comporta che a basse dosi di radioattività l'uccisione della cellula non do-

**Fig. 72**  
*Sopravvivenza delle cellule eucariotiche in funzione della dose radioattiva.* L'ordinata indica in scala logaritmica la frazione di cellule residue, dopo irradiazione. In questo grafico, il numero  $N$  previsto dalle equazioni (1) e (2) del Cap.39b è uguale a 3.  $D_q$  rappresenta la *quasi-dose soglia* il cui valore è di circa 1 Gy.  $D_0$  indica la dose che lascia in vita il 37% delle cellule irradiate (in questo caso il suo valore equivale a 1 Gy).



vrebbe aver luogo (Fig.73a). L'interesse di questa curva potrebbe essere solo teorico. Le curve di sopravvivenza fino a oggi osservate negli esperimenti mostrano sempre una certa pendenza iniziale, anche se limitata (Fig. 73b).

Il secondo tipo di calcolo si basa su un *modello a urto singolo e bersaglio multiplo*. Trattasi di un'equazione che soddisfa la maggioranza delle curve di sopravvivenza osservate in laboratorio:

$$f = e^{D/D_1} [1 - (e^{D/D_2})]^N \quad (2)$$

Questa equazione suggerisce che, a basse dosi, la curva di sopravvivenza inizia ad angolo, rispetto all'asse delle ascisse, per poi continuare in linea retta esponenziale (Fig. 73b). In altre parole, anche delle basse dosi riescono a distruggere una cellula.

Nell'equazione (2), la *pendenza non zero* può essere spiegata da un *modello semplice a bersaglio multiplo*, contenente una *componente a urto singolo*. Tale componente ha a che fare spesso con radiazioni ad alto LET. Infatti, la radiazione o colpisce rapidamente tutti i bersagli cellulari o comporta urti ripetuti su un bersaglio singolo. Ambedue le alternative possono provocare la distruzione della cellula.

Il terzo tipo di calcolo si basa su un *modello di grafico a curvatura continua*. Trattasi di un'equazione *quadratica lineare*:

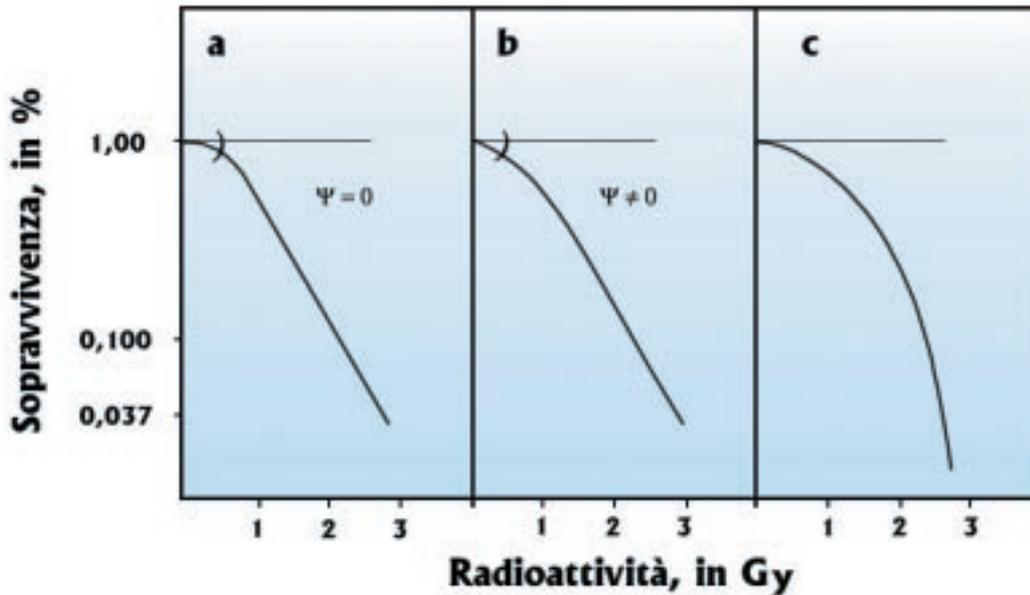
$$f = e^{(\alpha D + \beta D^2)} \quad (3)$$

dove  $\alpha$  e  $\beta$  indicano che la radiazione comporta un urto singolo, con eventi a due urti. La curva di sopravvivenza, in tal caso, inizia ancora una volta con pendenza non zero, continuando sempre in forma curvilinea. Come la curva di Fig.73a, anche quella di Fig.73c è raramente osservabile in laboratorio.

## b. La radiosensibilità delle varie fasi del ciclo cellulare

Per comprendere meglio i motivi della mutevole radiosensibilità delle cellule sincronizzate, mentre attraversano le varie fasi del loro ciclo mitotico, è opportuno ricordare che il bersaglio più probabile per provocarne sempre la morte è rappresentato dal DNA.

Per quanto concerne le particelle virali, è stato dimostrato ampiamente che le lesioni radioindotte della doppia elica hanno conseguenze letali. Nel caso dei virus, possono verificarsi letali anche la lesione di singole eliche oppure la distruzione di singole basi azotate. Per quanto riguarda i batteri, le prove che parlano a favore dell'ipotesi DNA - quale principale bersaglio delle radiazioni - sono tante. Da più parti sono comparsi suggerimenti secondo cui le membrane potrebbero avere un ruolo determinante nella morte radioindotta dei batteri. Per le cellule eucariotiche (animali e vegetali), che

**Fig. 73**

Variatione della curva di sopravvivenza delle cellule di mammifero in funzione della dose radioattiva. L'ordinata indica in scala logaritmica la frazione di cellule residue, dopo irradiazione. (a) Curva con spalla a pendenza zero, seguita da una retta esponenziale (modello a bersaglio multiplo secondo il quale le bassissime dosi radioattive non sarebbero sufficienti per distruggere le cellule). (b) Curva con spalla a pendenza non zero, seguita da una retta esponenziale (modello a bersaglio multiplo con componente a urto singolo). (c) Curva con spalla a pendenza non zero che presenta però una curvatura continua (tale andamento rispetta il modello dell'equazione quadratica lineare).

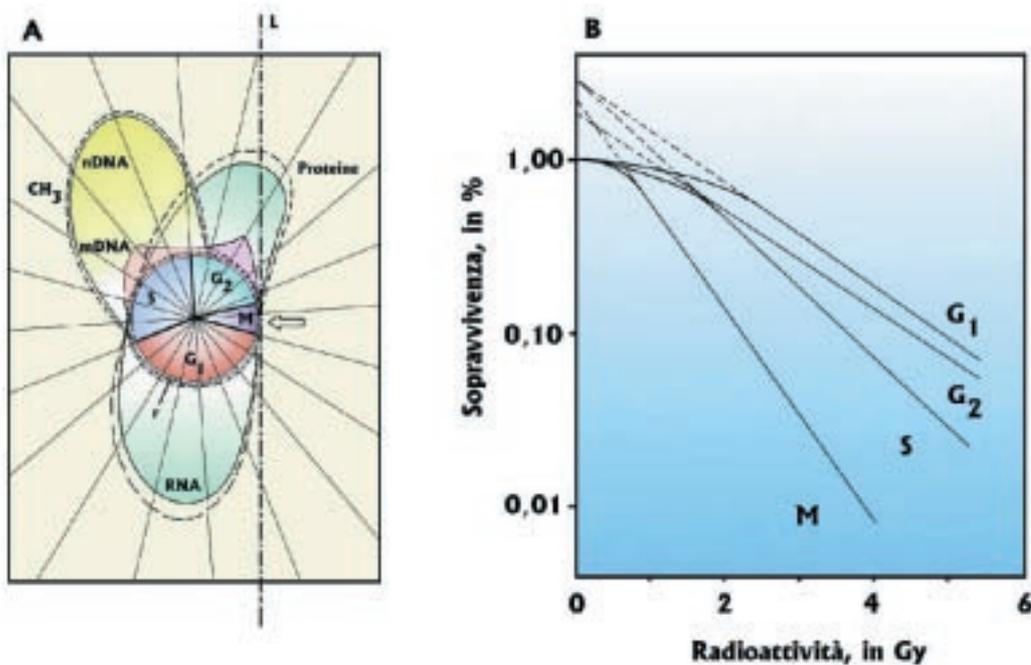
sono molto più grandi di quelle batteriche, il numero dei bersagli particolarmente radiosensibili potrebbe aumentare. Pure in questo caso, la maggior parte delle esperienze suggerisce che proprio i danni del genoma sono i principali responsabili di letalità. Come menzionato altrove, da alcuni calcoli risulta che statisticamente, su 1000 danni, un  $D_0$  pari a 1-2 Gy può causare all'incirca 950 lesioni di elica singola e 50 lesioni di elica doppia.

Nel laboratorio dello scrivente è stato chiarito che, nonostante la continua efficienza del sistema di DNA riparo durante l'intera vita della cellula, si verifica una spiccata diversificazione nella radiosensibilità delle varie fasi del ciclo mitotico. Per le cellule *HeLa* sincronizzate, i valori di  $D_0$  variano così nelle varie fasi: 0,80 Gy, in  $M$ ; 1,20 Gy, in  $S$ ; 1,60 Gy, in  $G_2$ ; 1,70 Gy, in  $G_1$  (Fig.71B). Quindi, la morte cellulare radioindotta dipende dal punto dove si trova la cellula irradiata nel mentre percorre il suo ciclo vitale: le cellule in mitosi sono le più radiosensibili; seguono quelle che stanno duplicando il DNA genomico; sono relativamente radioresistenti quelle in  $G_2$ ; sono particolarmente radioresistenti quelle in  $G_1$ . La notevole radiosensibilità delle cellule in fase di divisione mitotica,  $M$ , può spiegare in maniera soddisfacente perché i tessuti ricchi di cellule in rapida proliferazione (*midollo osseo*) siano molto più sensibili alla radioattività rispetto a quelli che sono ricchi di cellule a lenta proliferazione.

La regolazione delle biosintesi macromolecolari nelle stesse cellule *HeLa* sincronizzate mostra che, mentre la replica del DNA genomico ha luogo nella fase  $S$ , la replica del DNA mitocondriale si verifica in parte in  $S$  e in parte in  $G_2$ . Diversamente, in  $G_1$  e  $G_2$ , i valori massimi del tasso traduzionale sono in sovrapposizione con quelli del tasso trascrizionale del *pre-mRNA* con *poli-A* attaccato. La fase mitotica è caratterizzata invece da un relativo smorzamento delle biosintesi macromolecolari (Fig.74A). La differenza di radiosensibilità delle varie fasi del ciclo mitotico, se giudicata nel quadro di questa "temporizzazione" dell'espressione genica, ovviamente non può escludere che ai fini della letalità cellulare, oltre al bersaglio principale qual è il DNA, possano concorrere anche altre cause, vuoi a carico di una o di tutte le varie classi di RNA, vuoi a carico di una o di tutte le varie classi di proteine.

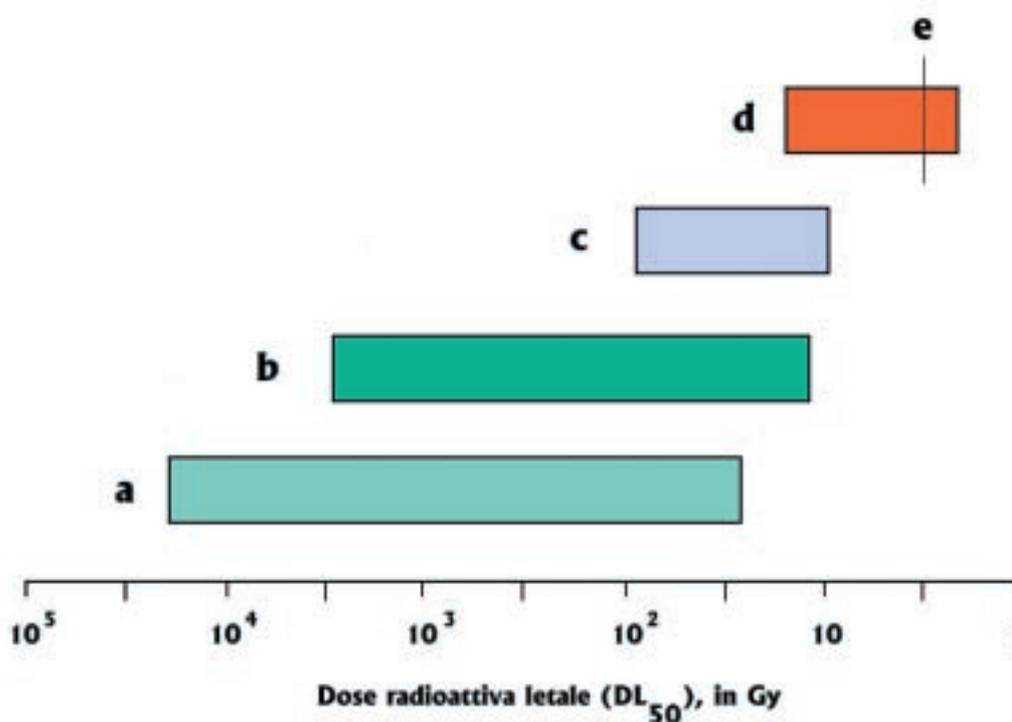
Il quadro che si presenta davanti agli occhi è insomma quello di una "evoluzione" della radiosensibilità che si manifesta sia nella forma delle curve di sopravvivenza e sia nell'entità delle dosi radioattive capaci di provocare effetti letali. I diagrammi semilogaritmici, nel caso degli enzimi, dei virus e dei batteri che occupano un livello più bas-

**Fig. 74**  
 Variazione del valore  $D_0$  nelle curve di sopravvivenza di cellule eucariotiche temporizzate e irradiate nelle diverse fasi del ciclo vitale. (A) Rappresentazione "orbitale" dell'espressione genica elaborata sperimentalmente dallo scrivente nel 1976: il ciclo è mostrato in senso orario dalla sequenza delle fasi  $G_1$ ,  $S$ ,  $G_2$  e  $M$ ; il tempo, in ore, è segnato dai raggi sulla coordinata circolare funzionante da "ascissa"; l'ordinata è rappresentata da ognuno di questi raggi la cui scala indica il tasso di sintesi, modificazione strutturale o riparazione delle tre classi di macromolecole coinvolte (DNA, RNA e proteine); la freccia indica il punto del relativo smorzamento, in  $M$ , dell'espressione genica; la linea  $L$  indica l'asimmetria delle orbite costruite sperimentalmente intorno all'ascissa circolare. La sintesi duplicativa (—) e la metilazione post-sintetica (- - -) del DNA nucleare ( $nDNA$ ) presentano un "apogeo" in  $S$ . La sintesi duplicativa del DNA mitocondriale ( $mDNA$ ) mostra apogei in  $S$  e  $G_2$  (—). La riparazione,  $r$ , dell' $nDNA$  è garantita sempre durante la vita della cellula. La trascrizione dell' $RNA$  messaggero (—) e la sua traduzione in proteine (- - -) hanno apogei in  $G_1$  e  $G_2$ . (B) Dopo irradiazione, il valore di  $D_0$  è di circa 0,80 Gy in  $M$ , 1,20 Gy in  $S$ , 1,60 Gy in  $G_2$  e 1,70 Gy in  $G_1$ .



so nella scala evolutiva, si manifestano come linee rette. Nel caso dei batteri più evoluti e poi in quello delle cellule eucariotiche, questi diagrammi si manifestano come curve bifasiche, con una spalla e un tratto lineare esponenziale. Nel caso dei mammiferi, la spalla può essere in teoria anche a pendenza zero, mentre sono frequenti andamenti a curva continua. Questa diversità formale delle curve di sopravvivenza è correlabile nell'evoluzione a una radiosensibilità crescente: un  $D_0$  pari a circa 500 Gy, per i virus; un  $D_0$  oscillante tra 10 e 250 Gy, per i batteri; un  $D_0$  pari a circa 1-2 Gy, per le cellule di mammifero. Tutto ciò è in armonia con dati noti da tempo (Fig.75): una relativa radiostabilità genetica dei batteri e delle piante contro una relativa radiosensibilità degli

**Fig. 75**  
 "Evoluzione" biologica della radiosensibilità. (a) Cellule batteriche; (b) regno vegetale; (c) animali di sangue freddo; (d) animali di sangue caldo; (e) genere umano.



animali a sangue freddo e caldo e soprattutto dell'Uomo. Un crescendo così palese della radiosensibilità, man mano che si passa da sistemi viventi più semplici a quelli più complessi, suggerisce che questi ultimi aderiscono adeguatamente al *background naturale di radioattività* (vedi Cap.26). In circa tre miliardi e mezzo di anni, la loro omeostasi si sarebbe consolidata *ad hoc* sulla Terra, mentre le pur minime oscillazioni di radioattività, rispetto alla norma, avrebbero influenzato significativamente l'adattamento a una determinata nicchia ecologica. Un discorso questo che, dalle esigenze di nuovi studi sull'effetto biologico delle basse dosi di radioattività, fa risalire a quello che concerne la salvaguardia della *culla* stessa nella quale la vita, col suo *codice*, si è originata ed evoluta.

