

ENTE PER LE NUOVE TECNOLOGIE,  
L'ENERGIA E L'AMBIENTE

Dipartimento Innovazione



IT9700748

# **RADIAZIONI IONIZZANTI E PEROSSIDAZIONE LIPIDICA NELL'ORGANISMO UMANO**

GIANFRANCO GIUBILEO  
Centro Ricerche Frascati, Roma

RT/INN/97/16

29 - 02 -

R



ENTE PER LE NUOVE TECNOLOGIE,  
L'ENERGIA E L'AMBIENTE

Dipartimento Innovazione

# RADIAZIONI IONIZZANTI E PEROSSIDAZIONE LIPIDICA NELL'ORGANISMO UMANO

GIANFRANCO GIUBILEO  
Centro Ricerche Frascati, Roma

RT/INN/97/16

Questo rapporto è stato preparato da: *Servizio Edizioni Scientifiche* - ENEA, Centro Ricerche Frascati, C.P. 65 - 00044 Frascati, Roma, Italia

I contenuti tecnico-scientifici dei rapporti tecnici dell'ENEA rispecchiano l'opinione degli autori e non necessariamente quella dell'Ente.

## IONIZING RADIATION AND LIPID PEROXIDATION IN HUMAN BODY

### SUMMARY

*Lipids are organic compounds constituting the living cells. Lipid molecules can be disassembled through peroxidative pathways and hydrocarbons can be breded as end-product of lipid peroxidation in vivo. Lipid peroxidation can be started by an indirect effect of ionizing radiation. So a radioinduced cellular damage in human body can be detected by monitoring the production of specific hydrocarbons.*

(PEROSSIDAZIONE LIPIDICA, DANNO RADIOINDOTTO, ETANO, PENTANO, RADICALI LIBERI)

### RIASSUNTO

I costituenti molecolari fondamentali delle membrane biologiche sono i lipidi, sostanze organiche molto diffuse negli organismi viventi. La degradazione dei lipidi tramite perossidazione porta alla produzione di particolari idrocarburi. Le radiazioni ionizzanti possono per effetto indiretto dare inizio al processo di perossidazione lipidica. In linea di principio un danno radioindotto nell'organismo umano può quindi essere rivelato tramite la determinazione di opportuni idrocarburi.

## INDICE

1 - INTRODUZIONE.....	p. 7
2 - I RADICALI LIBERI E L'EFFETTO INDIRETTO DELLE RADIAZIONI.....	p. 8
3 - I LIPIDI E LE MEMBRANE CELLULARI .....	p. 12
4 - LA PEROSSIDAZIONE LIPIDICA E LA PRODUZIONE DI IDROCARBURI .....	p. 18
5 - CONCLUSIONI.....	p. 22
BIBLIOGRAFIA .....	p. 23

**NEXT PAGE(S)  
left BLANK**

# RADIAZIONI IONIZZANTI E PEROSSIDAZIONE LIPIDICA NELL'ORGANISMO UMANO

## 1 - INTRODUZIONE

I lipidi rappresentano una classe eterogenea di composti organici insolubili in acqua presenti nelle cellule viventi. In questo lavoro l'interesse è rivolto ai lipidi polari che costituiscono la struttura portante delle membrane cellulari.

I lipidi di membrana possono essere degradati in composti più semplici con vari meccanismi chimici. Tra questi riveste una certa importanza la degradazione ossidativa (perossidazione lipidica) che si verifica in seguito alla interazione tra molecole lipidiche e radicali liberi energetici. Uno degli "end points" della perossidazione lipidica è rappresentato dalla liberazione di taluni idrocarburi leggeri volatili.

Tali idrocarburi, una volta liberi di diffondere nell'organismo umano, inevitabilmente entrano nel circolo sanguigno, attraverso il quale arrivano fino ai polmoni e vengono quindi espulsi con il fiato.

La loro presenza nel fiato è rivelabile in una prima approssimazione mediante gascromatografia e, a livelli di selettività più elevati, mediante tecniche spettroscopiche sofisticate basate sull'uso di laser accordabili.

La perossidazione lipidica può essere iniziata dai radicali liberi che si formano nella radiolisi dell'acqua.

Quest'ultima possibilità non è trascurabile in quanto l'acqua è il costituente maggiore degli organismi viventi e l'azione delle radiazioni ionizzanti sul corpo umano per effetto indiretto si esplica massicciamente attraverso la radiolisi dell'acqua contenuta nell'ambiente intracellulare ed extracellulare.

Ciò significa che l'entità di un danno radioindotto alle membrane cellulari potrebbe essere stimabile dalla quantità di specifici idrocarburi emessi con il fiato o quanto meno presenti nel sangue circolante.

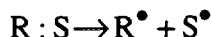
Nelle pagine che seguono vengono passati in rassegna gli eventi coinvolti nella produzione radiondotta di idrocarburi nell'uomo, in previsione dell'inserimento del fenomeno in un programma sperimentale idoneo allo sviluppo di applicazioni pratiche.

L'attività per la quale il presente rapporto è stato scritto è compresa nell'ambito di una applicazione degli acceleratori di particelle allo studio di effetti immediati delle radiazioni ionizzanti sull'organismo umano. Lo scopo di tale ricerca è di indagare sulla possibilità di mettere a punto un metodo di ricostruzione rapida della dose assorbita.

Lo studio teorico-sperimentale in oggetto rientra nell'accordo di programma ENEA-MURST.

## 2 - I RADICALI LIBERI E L'EFFETTO INDIRETTO DELLE RADIAZIONI

I radicali liberi sono atomi o molecole aventi un elettrone esterno spaiato rispetto allo spin e sono generalmente, ma non necessariamente, neutri. Essi si formano quando in una molecola eccitata si dissocia un legame covalente in modo tale che ciascuno degli elettroni leganti rimane con uno solo dei frammenti (scissione omolitica). Tale processo viene simbolicamente indicato come



dove  $R^{\bullet}$  e  $S^{\bullet}$  sono i due radicali che si formano,  $R:S$  è la molecola di partenza e il punto rappresenta un elettrone spaiato. Reazioni di questo tipo sono dette reazioni di dissociazione unimolecolare. La fotodissociazione, la radiolisi, la dissociazione termica di molecole sono tutti esempi di dissociazione unimolecolare nelle quali ciò che cambia è il meccanismo di eccitazione con cui la quantità di energia sufficiente a causare la dissociazione viene trasferita alla molecola che si dissocia.

In alternativa alla dissociazione unimolecolare, i radicali possono essere prodotti attraverso reazioni bimolecolari di ossidoriduzione. Quando la produzione di radicali avviene attraverso processi redox, è sempre coinvolto il trasferimento di un elettrone singolo, oppure di un atomo o di un gruppo di atomi con un elettrone non appaiato, da una molecola all'altra. Sono piuttosto comuni reazioni del tipo seguente (l'asterisco indica che la molecola di trova in uno stato eccitato):

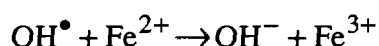


con le quali avviene la sottrazione di un atomo di idrogeno ad una molecola del substrato.

I radicali liberi sono molto reattivi a causa della tendenza che ha l'elettrone non appaiato ad appaiarsi con un elettrone simile di un altro radicale (processo di ricombinazione radicalica) o di un composto non saturato (reazioni di addizione). Le reazioni di ricombinazione sono

energeticamente favorite perché hanno una bassa energia di attivazione e sono esotermiche. Ma l'energia liberata nella ricombinazione dei radicali può essere sufficiente, se non è persa o delocalizzata, a causare l'immediata ridissociazione della molecola nello stesso o in un altro punto. La ricombinazione radicalica e le reazioni di addizione non costituiscono le uniche alternative di deradicalizzazione.

In molti casi l'elettrone spaiato viene eliminato con una reazione di trasferimento elettronico, come nell'esempio seguente:



Può anche avvenire che il radicale reagisca con altre molecole per formare un secondo radicale meno reattivo del primo. Frequentemente in presenza di molecole organiche i radicali reattivi sottraggono ad esse atomi di idrogeno con una reazione che produce nuovi radicali liberi più stabili. La sottrazione di idrogeno è una forma abituale di reazione tra radicali e composti organici negli organismi biologici. Come vedremo in seguito, questo fenomeno gioca un ruolo importante nella perossidazione dei lipidi.

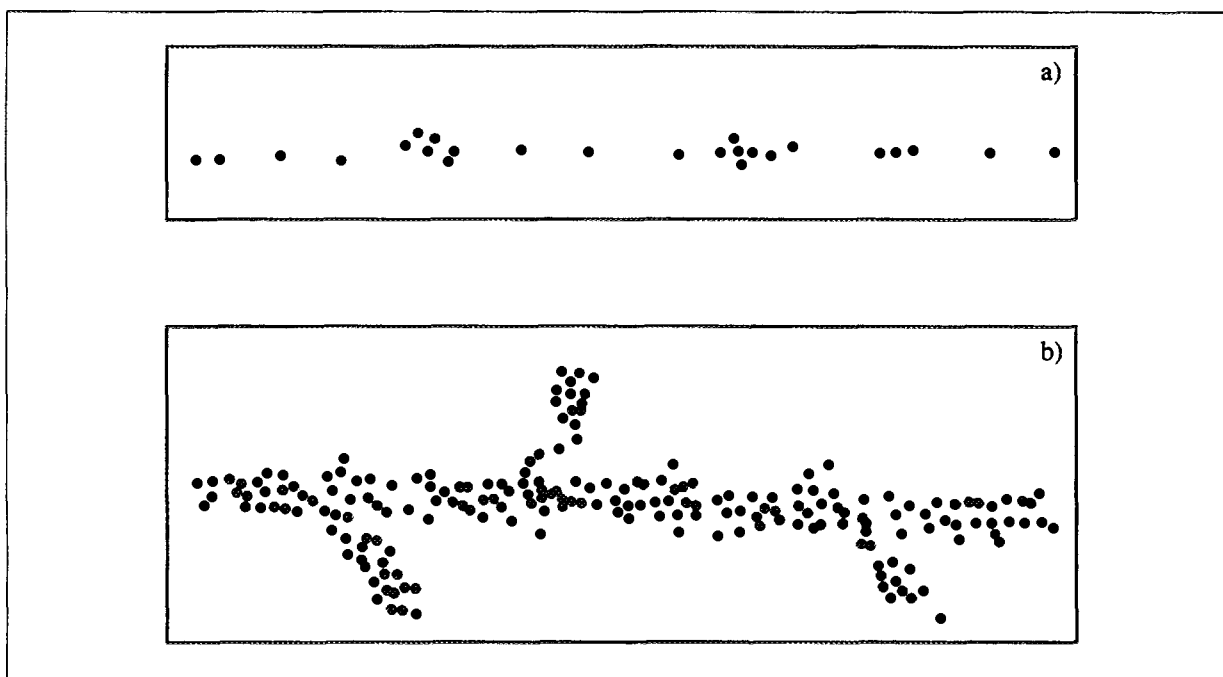
La reattività dei radicali dipende in gran parte dalla loro struttura, ma non è trascurabile l'influenza di fattori legati all'ambiente circostante, ovvero pH, temperatura, effetti di polarità dovuti alle differenze nelle densità elettroniche di reagenti e solventi, nonché effetti induttivi da parte di ioni.

Una misura della reattività dei radicali comunemente accettata è basata sull'energia di dissociazione del legame che un dato radicale forma con l'idrogeno. Quanto maggiore è l'energia di dissociazione  $D(\text{R-H})$  del legame tra il radicale R e l'idrogeno, tanto più reattivo risulta il radicale R [1].

La formazione di radicali liberi è un fenomeno comune nella materia esposta all'azione di radiazioni ionizzanti.

Quando una particella ionizzante dotata di una certa energia attraversa un mezzo materiale si verifica una deposizione di energia sotto la forma di ionizzazioni e di eccitazioni delle molecole del mezzo attraversato. Gli eventi primari di ionizzazione e di eccitazione molecolare, riuniti in piccoli gruppi detti spur, sono distribuiti lungo la traccia della particella con una densità che dipende principalmente dal LET della radiazione. Con radiazione a basso LET, come i raggi  $\gamma$  e fasci di elettroni di alta energia, gli spur sono piuttosto distanziati l'uno dall'altro. Con radiazioni a LET elevato, come i fasci di particelle pesanti cariche, i gruppi di eventi primari sono molto ravvicinati e si sovrappongono a formare una colonna di molecole eccitate e ionizzate (vedi fig. 1). Nel corso della successiva dissociazione delle molecole eccitate e delle reazioni ioniche che avvengono all'interno o in prossimità della traccia della particella, numerosi radicali liberi vengono prodotti attraverso i processi indicati all'inizio di questo capitolo.





*Fig. 1 - Distribuzione degli eventi primari lungo la traccia di una particella direttamente ionizzante in acqua. a) particella a basso LET; b) particella ad alto LET.*

I radicali di origine radiochimica sono quasi sempre “caldi” rispetto all’ambiente circostante in quanto le energie di eccitazione delle molecole che li producono sono generalmente maggiori delle energie di dissociazione dei legami intramolecolari che vengono rotti. Data la loro mobilità i radicali che non reagiscono chimicamente nella regione di elevata concentrazione radicalica generata dalla traccia diffondono facilmente nel bulk del mezzo materiale attraversato e reagiscono con il substrato, propagando così a distanza della traccia l’azione delle radiazioni. Le modificazioni chimiche che avvengono nella materia irradiata sono il risultato globale di tutte le reazioni chimiche date da ioni, molecole eccitate e radicali liberi generati dalle interazioni primarie.

In un organismo vivente irradiato troveremo quindi macromolecole che hanno interagito direttamente con la radiazione primaria e altre che hanno interagito con le specie reattive secondarie generate successivamente agli eventi primari. Le molecole che hanno subito un’interazione risultano generalmente danneggiate nella loro integrità strutturale con la conseguente inibizione della funzione biologica che espletano. Se l’assorbimento della radiazione si verifica direttamente nella macromolecola biologica danneggiata, allora si parla di effetto diretto; se invece il danno si verifica in una molecola diversa da quella che ha subito l’interazione primaria, allora si parla di effetto indiretto (vedi fig. 2).

In un organismo vivente il contributo dell’effetto indiretto ha un peso rilevante [2]. Gli eventi primari di interazione sono distribuiti a caso lungo la traccia, cosicché in un sistema complesso qual’è un organismo biologico superiore, composto da una grande varietà di molecole, le molecole più probabilmente coinvolte sono quelle presenti in maggior numero. Essendo il

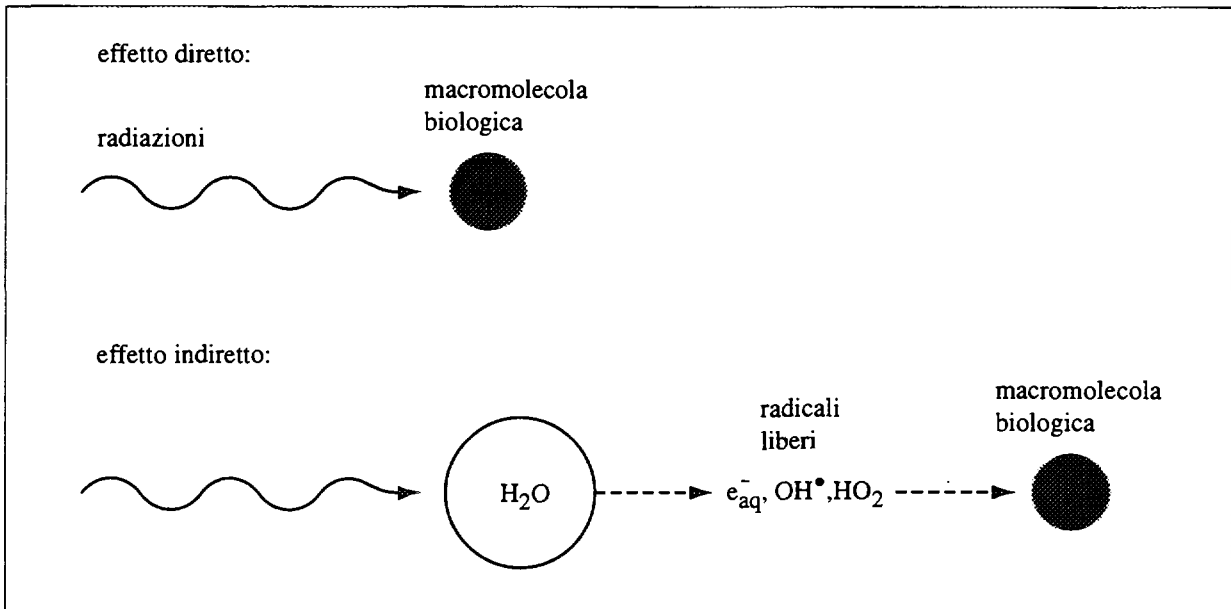


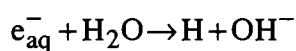
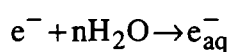
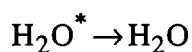
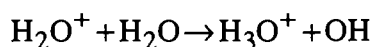
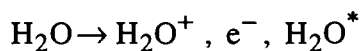
Fig. 2 - Rappresentazione schematica dell'effetto diretto e dell'effetto indiretto delle radiazioni ionizzanti.

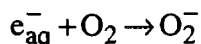
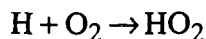
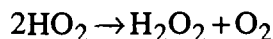
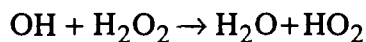
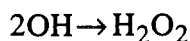
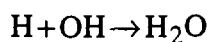
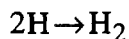
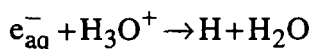
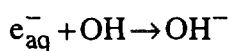
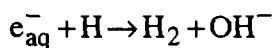
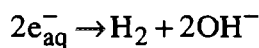
tessuto biologico costituito per il 70-90% di acqua, ne deriva che la maggior parte dell'energia depositata è catturata dalle molecole di acqua, e che la maggior parte dei radicali liberi messi in moto sono quelli provenienti dalla radiolisi dell'acqua.

In definitiva, una parte sostanziale dell'azione delle radiazioni in un organismo vivente viene mediata da piccoli radicali acquosi liberi di muoversi che, prodotti all'interno o nelle immediate vicinanze della traccia, diffondono nel tessuto e interagiscono col substrato.

Nell'ambito dello studio dei danni biologici causati dalle radiazioni, la radiolisi dell'acqua merita quindi un'attenta considerazione.

Elenchiamo di seguito le reazioni più importanti che hanno luogo con la radiolisi dell'acqua senza entrare nel merito dei meccanismi di reazione.





Le reazioni elencate sono quasi tutte molto rapide, avvenendo in tempi inferiori al microsecondo.

Le specie  $e_{\text{acq}}^-$ ,  $\text{H}$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{HO}_2$ ,  $\text{O}_2^-$  che si formano nella radiolisi dell'acqua sono generalmente indicate come "prodotti radicalici", mentre le specie  $\text{H}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  sono indicate come "prodotti molecolari". Una ulteriore distinzione può essere operata tra specie "riducenti" ( $e_{\text{acq}}^-$ ,  $\text{H}$ ) e specie "ossidanti" ( $\text{OH}$ ,  $\text{HO}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). I prodotti radicalici ossidanti sono quelli che poi vanno a reagire con i gruppi funzionali dei composti organici, promuovendo la formazione di radicali organici e la degradazione ossidativa delle biomolecole.

Dell'azione ossidativa dei radicali sulle biomolecole, nella fattispecie gli acidi grassi, parleremo dopo aver riportato con il capitolo successivo una panoramica sulla composizione lipidica delle membrane cellulari.

### 3 - I LIPIDI E LE MEMBRANE CELLULARI

I lipidi sono una classe di composti organici caratterizzati dall'essere insolubili in acqua, ma solubili nei comuni solventi organici (etere, alcool, acetone, cloroformio). Essi vengono suddivisi in fosfolipidi, cerebrosidi, steroidi, grassi neutri e cere [3].

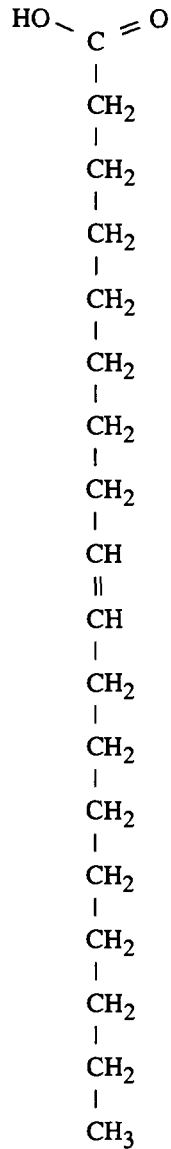


Fig. 3 - Un esempio di acido grasso: la molecola dell'acido oleico.

Nell'organismo umano i lipidi svolgono funzioni generali di componenti strutturali delle membrane cellulari, di depositi intracellulari di combustibile metabolico e di forma di trasporto del combustibile metabolico. Vi sono inoltre altre sostanze, presenti nell'organismo in quantità molto minori ma con intensa attività biologica, anche classificate tra i lipidi. Queste comprendono alcune vitamine e loro precursori, nonché un certo numero di ormoni.

Nel presente lavoro vengono presi in considerazione i lipidi costituenti le membrane cellulari. Tutte le cellule viventi sono delimitate da una membrana citoplasmatica. Anche molte strutture intracellulari (come nuclei, mitocondri, lisosomi) sono delimitate da membrane allo scopo di

contenere e localizzare in una determinata sede cellulare i componenti indispensabili allo svolgimento di specifiche funzioni. Tutte le membrane cellulari hanno una costituzione simile.

La struttura portante di una membrana cellulare consta di un doppio strato di fosfolipidi tenuti assieme da legami non covalenti nel quale si trovano immerse svariate proteine. Lo spessore del doppio strato è di circa 8 nm.

I fosfolipidi si trovano quasi esclusivamente nelle membrane cellulari. Essi contengono una molecola di glicerolo alla quale si trovano legati due residui di acidi grassi (indicati genericamente con  $R_1$  e  $R_2$ ) e un gruppo fosforico a sua volta legato a un gruppo alcolico. I gruppi alcolici più comuni sono la colina, l'etanolamina, la serina, l'inositolo e il glicerolo stesso. Le molecole di acidi grassi sono lunghe catene idrocarburiche con un gruppo carbossilico terminale; un esempio ne è l'acido oleico riportato nella figura 3. La struttura generale di un fosfolipide o fosfogliceride è riportata nella figura 4.

I gruppi alcolici sono fortemente polari, mentre gli acidi grassi non lo sono. Pertanto possiamo schematizzare un qualunque fosfogliceride con una testa polare rappresentata dal gruppo glicerolo-fosfato-alcol e con due code non polari rappresentate dai residui  $R_1$  e  $R_2$  di acidi grassi. Nella figura 5 è esemplificata tale schematizzazione applicata a una molecola di fosfatidilcolina.

A causa della presenza nella stessa molecola di una parte polare (idrofila) e di una parte non polare (idrofobica), in un ambiente acquoso quale è il tessuto vivente i fosfolipidi formano spontaneamente due strati paralleli tenuti assieme da legami idrofobici (forze di Van der Waals) con le porzioni apolari rivolte verso l'interno e le porzioni polari verso l'esterno in contatto con l'ambiente acquoso intra ed extracellulare (vedi figura 6). Il doppio strato è una delle configurazioni di energia minima dei fosfolipidi in acqua e non richiede somministrazione di lavoro per essere mantenuto. A questa caratteristica è dovuta la stabilità delle membrane cellulari.

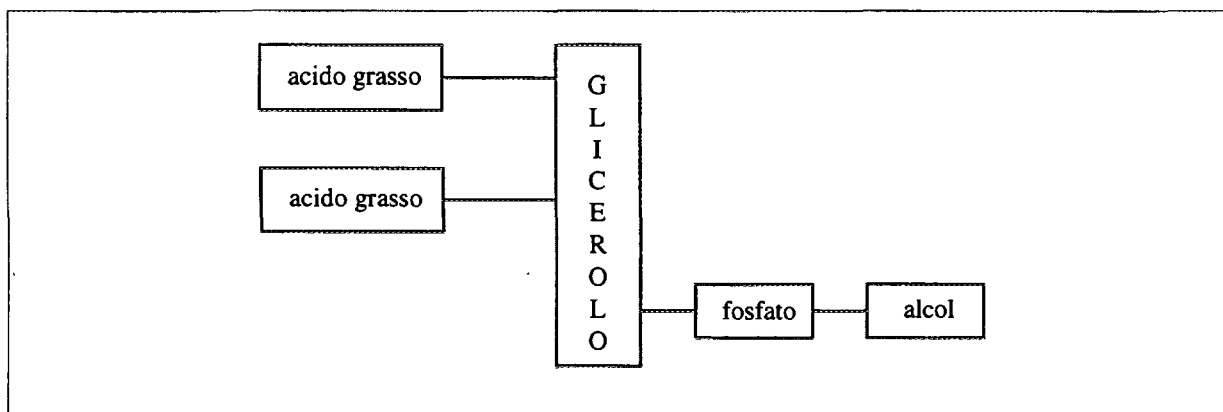


Fig. 4 - Struttura generale dei fosfogliceridi.

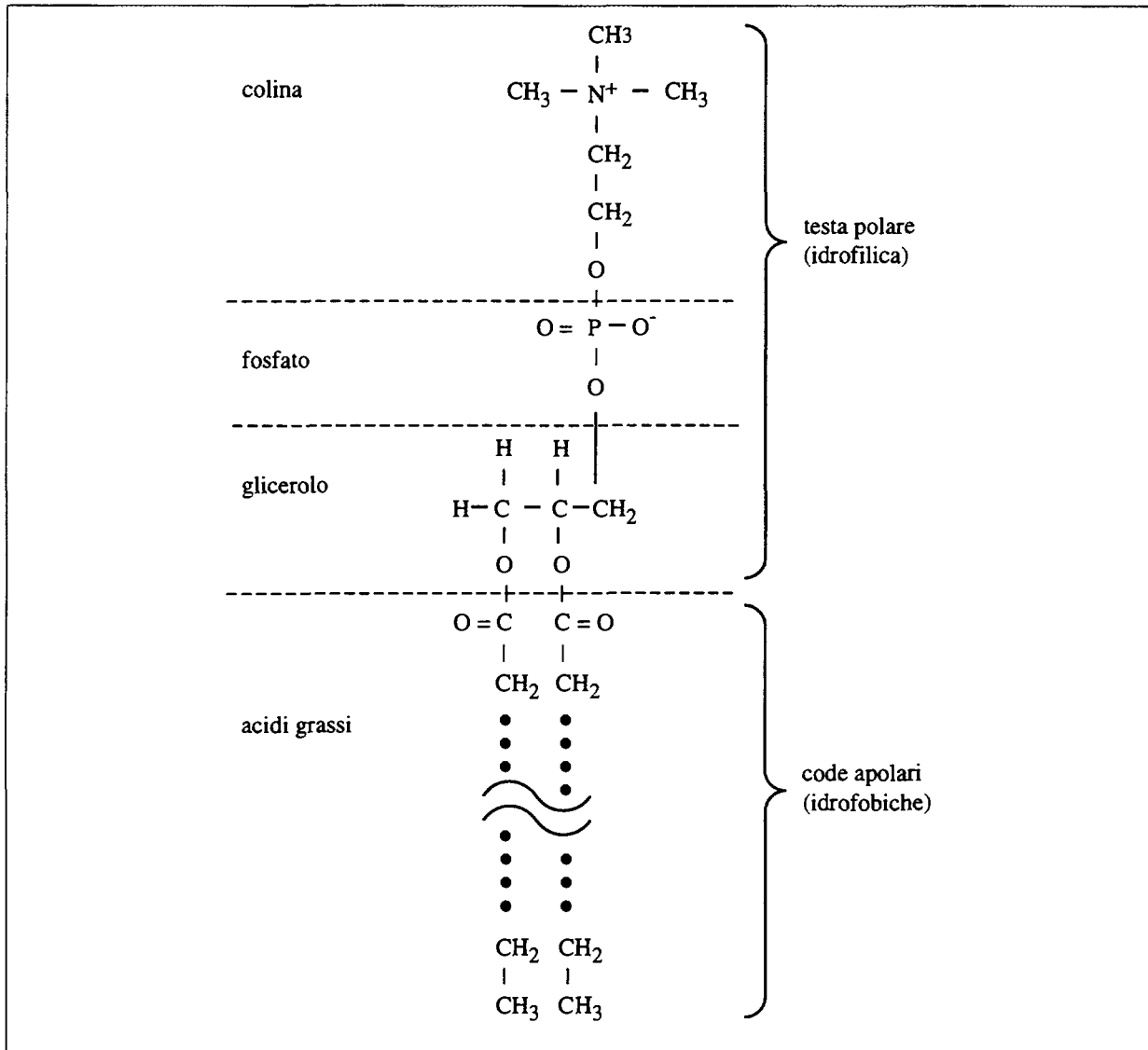


Fig. 5 - Un esempio di molecola fosfolipidica (la fosfatidicolina).

I fosfogliceridi non sono l'unico tipo di lipidi presente nelle membrane, ma sono i più numerosi e sono i più polari. I lipidi di membrana appartengono a due classi distinte: quelli polari che formano il doppio strato (e che rappresentano il 70% del totale) e quelli che reagiscono più intimamente con le proteine inserite nel doppio strato formando complessi lipo-proteici.

Il rapporto tra i diversi tipi di lipidi polari in ciascuna membrana è caratteristico per il tipo di membrana, per il tipo di cellula e per la specie di appartenenza. A titolo di esempio, nella figura 7 è riportata la composizione lipidica di una membrana eritrocitaria umana.

L'aspetto della struttura delle membrane che presenta interesse per gli scopi del lavoro in oggetto è che nella composizione delle code idrofobiche dei fosfogliceridi entrano maggiormente a far parte taluni acidi grassi sui quali l'attacco dei radicali liberi dà inizio alla successione di eventi che si conclude con la liberazione di idrocarburi leggeri.

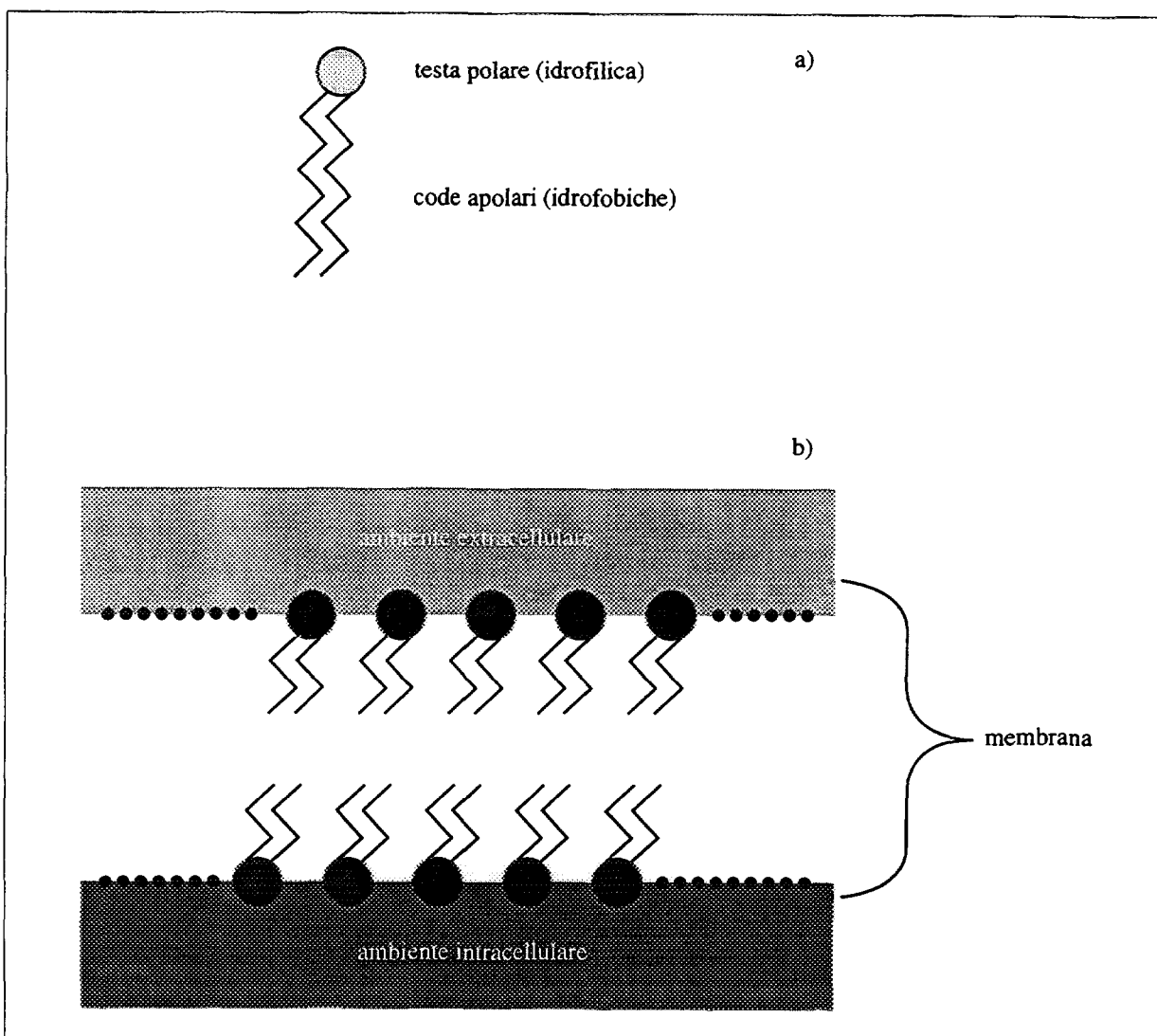


Fig. 6 - a) rappresentazione schematica di un fosfolipide; b) modello di membrana a doppio strato fosfolipidico.

Colesterolo	25	Sfingomieline	20	Fosfatidilinositolo	1
Fosfatidilcolina	22	Fosfatidilserina	10	Acido fosfatidico	2
Fosfatidicolamina	20				

Fig. 7 - Composizione percentuale dei lipidi della membrana eritrocitaria umana.

Nella lunga catena idrocarburica di un acido grasso gli atomi di carbonio sono legati nella maggioranza dei casi ad altri due atomi di carbonio e a due atomi di idrogeno con legami covalenti semplici ( $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ).

Occasionalmente però si osservano legami doppi tra due atomi di carbonio contigui ( $-\text{CH}=\text{CH}-$ ).

Le catene con uno o più legami doppi sono dette **insature**, mentre quelle che hanno solo gruppi  $\text{CH}_2$  sono dette **sature**, cioè saturate con atomi di idrogeno. I vari acidi grassi differiscono tra loro principalmente per la lunghezza della catena e per il numero e le posizioni dei legami insaturi. Dai vari tipi di cellule e tessuti sono stati isolati più di 70 acidi grassi diversi. Nella figura 8 sono elencate le strutture dei più importanti acidi grassi saturi e insaturi che si trovano in natura nelle cellule viventi. Quasi tutti hanno un numero pari di atomi di carbonio e catene lunghe da 14 a 22 atomi di carbonio.

In linea di principio le code idrocarburiche dei fosfogliceridi possono essere formate da qualunque tipo di acido grasso, ma ciò che si riscontra in natura è che gli acidi grassi insaturi predominano sul tipo saturo e che negli organismi superiori (in particolare quello umano) gli acidi grassi insaturi più abbondanti sono gli acidi oleico, linoleico, linolenico e arachidonico. Le relative strutture sono riportate in figura 9.

Queste ultime tre specie molecolari sono da ricordare in quanto dalla degradazione ossidativa di questi acidi grassi provengono gli idrocarburi leggeri suscettibili di essere rivelati come prodotto ultimo del danno radiobiologico.

a) Acidi grassi saturi			b) Acidi grassi insaturi		
Numero di atomi di carbonio	Nome comune	Numero di legami doppi	Numero di atomi di carbonio	Nome comune	Numero di legami doppi
2	acetico	0	24	crotonico	1
4	butirrico	0	22	erucico	1
6	caproico	0	18	oleico	1
8	caprilico	0	18	linoleico	2
10	caprico	0	18	linolenico	3
12	laurico	0	20	arachidonico	4
14	miristico	0	24	nervanico	1
16	palmitico	0			
18	stearico	0			
20	arachico	0			
24	lignocerico	0			

Fig. 8 - Acidi grassi più comuni



Nome comune	Struttura
acido oleico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
acido linoleico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
acido linolenico	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
acido arachidonico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$

Fig. 9 - Struttura degli acidi grassi insaturi più abbondanti.

In che cosa consista la degradazione ossidativa degli acidi grassi è argomento del prossimo capitolo.

#### 4 - LA PEROSSIDAZIONE LIPIDICA E LA PRODUZIONE DI IDROCARBURI

Con il termine “perossidazione lipidica” si intende la degradazione ossidativa degli acidi grassi insaturi indotta dai radicali liberi che inevitabilmente si formano nel corpo umano.

Il processo è catalizzato da ioni metallici e da enzimi ed il suo contributo alla distruzione delle cellule e delle membrane biologiche è ben noto. Un incremento nella formazione dei radicali liberi è coinvolto in numerose situazioni cliniche (fibrosi cistica, tumori, patologie epatiche e polmonari) e nell’invecchiamento; esso determina un incremento del numero delle perossidazioni che avvengono nell’organismo.

La perossidazione lipidica ha inizio dalla reazione tra un acido grasso e un radicale ossidante, ad esempio generato dalla radiolisi dell’acqua. In presenza di tali radicali liberi, determinati atomi di idrogeno vengono facilmente sottratti alle code idrocarburiche poli insature lasciando radicali lipidici che sono in grado a loro volta di sottrarre altri atomi di idrogeno agli acidi grassi poli insaturi adiacenti. Gli acidi grassi poli insaturi, quelli che si trovano principalmente nelle membrane cellulari e subcellulari, sono più facilmente soggetti alla perossidazione rispetto agli altri componenti lipidici a causa della minore forza con cui gli atomi di idrogeno risultano legati alla catena di atomi di carbonio quando si vengono a trovare tra due doppi legami.

Gli atomi di idrogeno che si trovano nella condizione suddetta vengono sottratti alla catena idrocarburica dando luogo al primo passo del processo di degradazione ossidativa. Il fenomeno di radicalizzazione si ripete molte volte in tempi dell’ordine del microsecondo con una reazione che coinvolge decine di molecole differenti, con formazione di radicali ossigenati e causando la frammentazione di molte macromolecole. Per di più tra i prodotti di reazione vi sono quelli in grado a loro volta di propagare ulteriormente il processo di perossidazione.

Il processo a catena iniziato dai radicali liberi può evolvere secondo vari percorsi differenti a seconda del tipo di molecole presenti e dell'ambiente di reazione.

Molti di tali percorsi (pathways ossidativi) sono stati caratterizzati in dettaglio. In particolare sono noti quelli che portano alla formazione di alcani. L'esempio di figura 10 riporta lo schema semplificato della formazione di pentano dalla degradazione perossidativa di acido arachidonico.

Idealmente la perossidazione lipidica (LP) potrebbe essere dedotta dal consumo di ossigeno e dalla scomparsa del substrato di reazione. Questo è però un metodo semplice di rivelare la LP efficace solo in vitro in situazioni in cui abbiamo il controllo di tutti i parametri. Certamente non è un metodo utilizzabile in vivo, data l'ovvia difficoltà a misurare la scomparsa del substrato. Tanto più che nel complesso organismo umano l'abbondanza relativa delle varie classi di acidi grassi può variare entro certi limiti anche con l'alimentazione. Viceversa nella pleora di prodotti del degrado ossidativo che si formano nel corso della LP è possibile individuare numerosi markers del fenomeno. Pertanto i test di perossidazione lipidica in vivo sono basati sulla determinazione di opportuni prodotti di reazione riscontrabili nel sangue e nelle urine.

Tra di questi troviamo aldeidi, idroperossidi, vari composti luminescenti e, infine, idrocarburi alifatici di basso peso molecolare.

La correlazione tra rilascio di idrocarburi e perossidazione lipidica fu predetta teoricamente nel 1961 e fu per la prima volta verificata sperimentalmente in vitro nel 1964.

Nel 1974 fu descritta per la prima volta la produzione di etano quale manifestazione della LP in vivo. Successivamente fu dimostrato sperimentalmente che esso deriva quasi esclusivamente dalla perossidazione di acidi grassi poli insaturi del tipo  $\omega 3$ , ovvero acido linolenico e derivati. Allo stesso modo è stato dimostrato che la perossidazione di acidi grassi poli insaturi  $\omega 6$  (cioè acido linoleico e acido arachidonico) si conclude principalmente con la formazione di pentano.

Altri idrocarburi come propano, butano, iso-butene, sono stati inclusi in diversi studi ma la loro rilevanza nella determinazione della LP rimane dubbia.

Come già sottolineato precedentemente in queste pagine, gli acidi linoleico, linolenico e arachidonico sono gli acidi grassi poli insaturi più abbondanti nel corpo umano, il che giustifica la presenza di etano e pentano negli episodi di LP.

A conferma di ciò, nella letteratura specializzata attualmente esiste un accordo generale nel considerare etano ( $C_2H_6$ ) e pentano ( $C_5H_{12}$ ) da soli oppure in combinazione come i migliori markers volatili della perossidazione lipidica tanto in vitro quanto in vivo [4-8].

Etano e pentano, sebbene rappresentino solo il prodotto finale di una parte del complesso delle degradazioni perossidative, rivestono un interesse particolare nella valutazione della LP in quanto la loro analisi fa ricorso a metodi non invasivi. Alla temperatura ambiente questi due composti sono gas o liquidi altamente volatili e, a causa della non polarità della loro molecola, sono in pratica insolubili in acqua. Ciò ne facilita la diffusione nel tessuto vivente e



La concentrazione dei suddetti gas nel fiato può essere determinata raccogliendo l'aria esalata in un contenitore per campioni gassosi.

L'analisi dei componenti gassosi del campione di fiato viene normalmente eseguita mediante gascromatografia ed eventuale spettrometria di massa.

Misure più accurate di un componente specifico possono essere eseguite mediante spettroscopia molecolare di assorbimento nell'infrarosso basata su laser a semiconduttore, oppure mediante laser a CO<sub>2</sub> utilizzando l'effetto optoacustico.

La conclusione che si può trarre da quanto precede è che in linea di principio per mezzo dell'analisi del respiro esalato in un contenitore ermetico è possibile ottenere informazioni sull'andamento della perossidazione lipidica in un individuo.

Quali concentrazioni ci si attende di dover misurare? Non essendo la produzione di idrocarburi l'unica conclusione dei processi di LP e non disponendo del valore numerico dei vari "branching ratio", non è facile fornire una stima teorica. Pertanto in questo lavoro introduttivo verrà riportato quanto si evince dalla letteratura vagliata da chi scrive. Nella maggioranza dei test eseguiti in vitro solo una frazione pari a 1%÷10% dei processi di perossidazione lipidica si conclude con l'emissione di idrocarburi. Sempre in vitro, l'evoluzione dell'etano, considerato uno dei markers più sensibili a disposizione, consente di rivelare la perossidazione dello 0.03% degli acidi grassi poli insaturi ω<sub>3</sub> presenti inizialmente.

In vivo la produzione di idrocarburi risulta ridotta a causa di vari fattori legati al metabolismo. Tuttavia le quantità prodotte sono ancora apprezzabili. Nei ratti la produzione sperimentalmente misurata in vivo ammonta a circa 0.2 millimoli di pentano per ogni mole di lipidi perossidati.

Per quanto concerne l'uomo il numero di pubblicazioni relative all'argomento è ancora limitato, ma è riportato che di norma in un individuo adulto sano la concentrazione di etano nell'espriato vale mediamente 0.3÷1.69 nmoli/l e quella del pentano vale 0.13÷4.94 nmoli/l. Tali valori sono indicative dell'ordine di grandezza delle concentrazioni minime che l'apparato di misura deve poter bene apprezzare al fine di rivelare un eventuale aumento del tasso di produzione di alcani quale manifestazione di un danno radioindotto nell'uomo.

L'interazione del tessuto vivente con le radiazioni ionizzanti è una fonte di produzione massiccia di radicali liberi, per cui è ragionevole supporre che anche in conseguenza di una esposizione del corpo umano all'azione di radiazioni si verifichi un aumento della perossidazione lipidica; aumento che sarà tanto più elevato quanto più elevata è la quantità di energia depositata nei tessuti irradiati.

La correlazione tra danno radioindotto alle membrane e perossidazione lipidica è stata dimostrata in cellule viventi in coltura già dal 1964. Nonostante l'accertata capacità delle radiazioni ionizzanti di indurre LP, a conoscenza di chi scrive non sono stati pubblicati lavori che vadano oltre la sperimentazione in vitro [9,10].

## 5 - CONCLUSIONI

La deposizione di energia radiante nel corpo umano si può manifestare con la produzione di etano e pentano quale conseguenza del verificarsi delle seguenti circostanze:

- a) le radiazioni ionizzanti che attraversano la materia vivente producono radicali liberi, mediatori dell'effetto indiretto;
- b) i radicali liberi promuovono i processi di perossidazione dei lipidi delle membrane cellulari, costituiti prevalentemente da acidi grassi poli insaturi del tipo  $\omega 3$  e  $\omega 6$ ;
- c) i prodotti finali della perossidazione degli acidi grassi poli insaturi  $\omega 3$  e  $\omega 6$  sono rispettivamente etano e pentano.

Una frazione dei gas etano e pentano eventualmente prodotti può essere misurabile per un certo periodo di tempo nel sangue circolante e nell'aria espulsa dai polmoni. E' naturale chiedersi se la correlazione tra i gas emessi e l'energia depositata possa venire utilizzata per risalire alla dose.

Si propone pertanto di indagare sulla possibilità di ricostruire la dose assorbita in vivo tramite misure di etano e pentano radioindotti. La sperimentazione dovrà vertere sulla quantità di idrocarburi emessi per unità di dose e di massa e sui tempi e modi di emissione.

I problemi posti dalla misura di etano e pentano verranno discussi in un prossimo lavoro.

## RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la Dr.ssa Mirella Ricci Ghigo per la ricerca bibliografica su banche dati al calcolatore.

**BIBLIOGRAFIA**

- [1] R.J. Woods and A.K. Pikaev, "Applied Radiation Chemistry" J. Wiley (1994)
- [2] Coggle, "Biological Effects of Radiation", I.P.S. New York (1983)
- [3] A. Lehninger, 'Biochimica', Zanichelli (1976)
- [4] W.A. Pryor and S. Shipley Godber, Free Radic. Biol. Med. **10**, 177 (1991)
- [5] C.V. Smith, Free Radic. Biol. Med. **10**, 217 (1991)
- [6] K.N. Jeejeebhoy, Free Radic. Biol. Med. **10**, 191 (1991)
- [7] C.R. Wade and A.M. Van Rij, Anal. Biochem. **150**, 1-7 (1985)
- [8] C.M.F. Kneepkens, G. Lepage and C.C. Roy, Free Radic. Biol. Med. **17**, 127 (1994)
- [9] J.A. Raleigh and W. Kremers, Int. J. Radiat. Biol. **34**, 439 (1978)
- [10] C.R. Dobbs, K.S. Kumar, J.F. Weiss and G.N. Catravas, Int. J. Radiat. Biol. **39**, 445 (1981)

Edito dall' **ENEA**  
Unità Comunicazione e Informazione  
Lungotevere Grande Ammiraglio Thaon di Revel, 76 - 00196 Roma  
*Stampa: COM-Centro Stampa Tecnografico - C. R. Frascati*

Finito di stampare nel mese di luglio 1997