

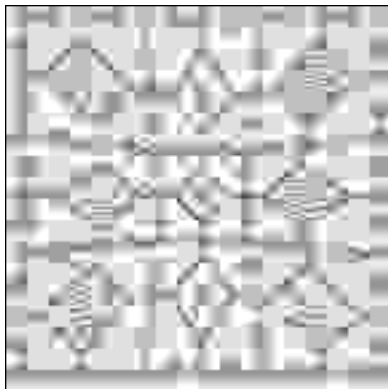
Sped. in A. P. 45% - art.2 comma 20/b legge 662/96 - n°10 - Gennaio 1985 - Direttore responsabile: Sergio Rassu - Editore: Medical Systems S.p.A. Genova - Contiene I.P. - Stampa: Tipolitografia Nuova ATA Genova

www.medicalsystems.it
http://medicalsystems.editoria.com

ISSN 0394 3291

Caleidoscopio

Italiano

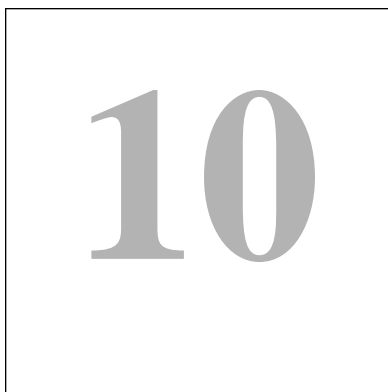


Norman P. Kubasik

Il Dosaggio Radioimmunologico (2)

PARTE PRIMA

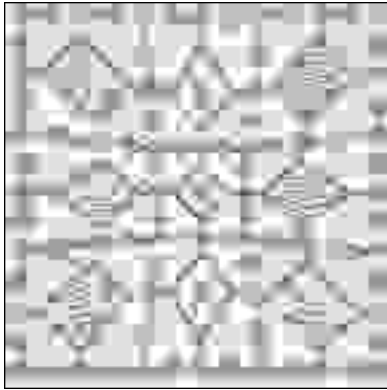
Direttore Responsabile
Sergio Rassu



Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401
Stampato a Genova 1985

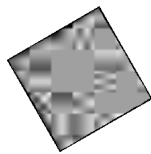
Caleidoscopio

Italiano



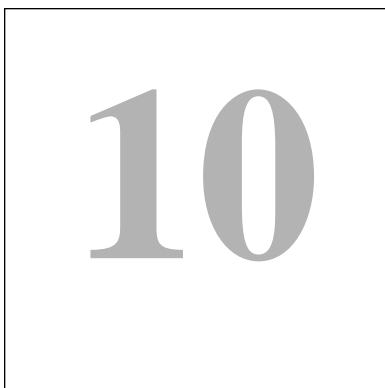
Norman P. Kubasik

The genesee Hospital Rochester (USA)



Il Dosaggio Radioimmunologico (2)

PARTE PRIMA



Direttore Responsabile
Sergio Rassu



Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401
Stampato a Genova 1985

ISTRUZIONI PER GLI AUTORI



INFORMAZIONI GENERALI. *Caleidoscopio* pubblica lavori di carattere monografico a scopo didattico su temi di Medicina. La rivista segue i requisiti consigliati dall'*International Committee of Medical Journal Editors*. Gli Autori vengono invitati dal Direttore Responsabile. La rivista pubblica anche monografie libere, proposte direttamente dagli Autori, redatte secondo le regole della Collana.

TESTO. La monografia deve essere articolata in paragrafi snelli, di rapida consultazione, completi e chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati. E' opportuno evitare di riportare proprie opinioni dando un quadro limitato delle problematiche. La lunghezza del testo può variare dalle 60 alle 70 cartelle dattiloscritte. Si prega di dattilografare su una sola facciata del foglio formato A4 con margini di almeno 25 mm. Usare dovunque doppi spazi e numerare consecutivamente. Ogni sezione dovrebbe iniziare con una nuova pagina.

FRONTESPIZIO. Deve riportare il nome e cognome dell'Autore(i) -non più di cinque- il titolo del volume, conciso ma informativo, la Clinica o Istituto cui dovrebbe essere attribuito il lavoro, l'indirizzo, il nome e l'indirizzo dell'Autore (compreso telefono, fax ed indirizzo di E-mail) responsabile della corrispondenza.

BIBLIOGRAFIA. Deve essere scritta su fogli a parte secondo ordine alfabetico seguendo le abbreviazioni per le Riviste dell'*Index Medicus* e lo stile illustrato negli esempi:

1) Björklund B., Björklund V.: Proliferation marker concept with TPS as a model. A preliminary report. *J. Nucl. Med. Allied. Sci* 1990 Oct-Dec, VOL: 34 (4 Suppl), P: 203.

2 Jeffcoate S.L. e Hutchinson J.S.M. (Eds): *The Endocrine Hypothalamus*. London. Academic Press, 1978.

Le citazioni bibliografiche vanno individuate nel testo, nelle tabelle e nelle legende con numeri arabi tra parentesi. La Redazione è collegata on-line con le più importanti Banche Dati (Medline, Cancerlit, AIDS etc) e fornisce ogni eventuale assistenza agli Autori.

TABELLE E FIGURE. Si consiglia una ricca documentazione iconografica (in bianco e nero eccetto casi particolare da concordare). Figure e tabelle devono essere numerate consecutivamente (secondo l'ordine di citazione nel testo) e separatamente; sul retro delle figure deve essere indicato l'orientamento, il nome dell'Autore ed il numero. Le figure realizzate professionalmente; è inaccettabile la riproduzione di caratteri scritti a mano libera. Lettere, numeri e simboli dovrebbero essere chiari ovunque e di dimensioni tali che, se ridotti, risultino ancora leggibili. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro e dell'autorizzazione alla pubblicazione di figure o altro. Titoli e spiegazioni dettagliate appartengono alle legende, non alle figure stesse.

Su fogli a parte devono essere riportate le legende per le figure e le tabelle.

UNITÀ DI MISURA. Per le unità di misura utilizzare il sistema metrico decimale o loro multipli e nei termini dell'*International system of units (SI)*.

ABBREVIAZIONI. Utilizzare solo abbreviazioni standard. Il termine completo dovrebbe precedere nel testo la sua abbreviazione, a meno che non sia un'unità di misura standard.

PRESENTAZIONE DELLA MONOGRAFIA. Riporre le fotografie in busta separata, una copia del testo e dei grafici archiviati su un dischetto da 3.5 pollici preferibilmente Macintosh.

Il dattiloscritto originale, le figure, le tabelle, il dischetto, posti in busta di carta pesante, devono essere spediti al Direttore Responsabile con lettera di accompagnamento. L'autore dovrebbe conservare una copia a proprio uso. Dopo la valutazione espressa dal Direttore Responsabile, la decisione sulla eventuale accettazione del lavoro sarà tempestivamente comunicata all'Autore. Il Direttore responsabile deciderà sul tempo della pubblicazione e conserverà il diritto usuale di modificare lo stile del contributo; più importanti modifiche verranno eventualmente fatte in accordo con l'Autore. I manoscritti e le fotografie se non pubblicati non si restituiscono.

L'Autore riceverà le bozze di stampa per la correzione e sarà Sua cura restituirle al Direttore Responsabile entro cinque giorni, dopo averne fatto fotocopia. Le spese di stampa, ristampa e distribuzione sono a totale carico della Medical Systems che provvederà a spedire all'Autore cinquanta copie della monografia. Inoltre l'Autore avrà l'opportunità di presentare la monografia nella propria città o in altra sede nel corso di una serata speciale.

L'Autore della monografia cede tutti i pieni ed esclusivi diritti sulla Sua opera, così come previsti dagli artt. 12 e segg. capo III sez. I L. 22/4/1941 N. 633, alla Rivista *Caleidoscopio* rinunciando agli stessi diritti d'autore (ed acconsentendone il trasferimento ex art. 132 L. 633/41). Tutta la corrispondenza deve essere indirizzata al Direttore Responsabile al seguente indirizzo:

Dott. Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari

RINGRAZIAMENTO

Ringrazio il dott. Antonio Masala per la collaborazione prestata.

Figura 1. DEFINIZIONE DI ISOTOPI E NUCLIDI.

«Gli isotopi» vengono definiti come «specie atomiche che hanno lo stesso numero di protoni ma massa atomica differente». Un termine abbastanza simile che viene utilizzato è «nuclide». Un nuclide è «un qualsiasi nucleo, associato con elettroni orbitali, che è capace di esistere per una definita lunghezza di tempo (almeno 10 secondi)». Esistono approssimativamente 1.400 nuclidi per 103 elementi. I nuclidi o gli isotopi che subiscono una disintegrazione radioattiva sono chiamati «radionuclidi» o «radioisotopi» – si tratta di atomi che si disintegrano spontaneamente, con l'emissione dal nucleo di radioattività che può essere rappresentata da radiazioni alfa (α), beta (β), o gamma (γ), o da raggi -X che originano dal trasferimento di energia negli elettroni orbitali.

<p>* ISOTOPO</p> <p>Una specie atomica che ha lo stesso numero di protoni ma differente massa atomica.</p> <p>* NUCLIDE</p> <p>Qualsiasi nucleo, con gli elettroni orbitali associati, capace di esistere per un definito periodo di tempo.</p> <p>RADIOISOTOPO O RADIONUCIDE</p> <p>Qualsiasi atomo che si disintegra spontaneamente, con l'emissione dal nucleo di radioattività che può essere rappresentata da radiazioni, o raggi-X che originano dal trasferimento di energia negli elettroni orbitali.</p>
--

Figura 1. **DEFINIZIONE DI ISOTOPI E NUCLIDI.**

Figura 2. STABILITA' DEGLI ISOTOPI: NUCLEI DEGLI ISOTOPI DELL'IDROGENO.

L'isotopo più leggero è l'idrogeno (^1H), che ha una massa di uno dovuto al protone presente nel nucleo. Il Deuterio ha una massa di due poiché il suo nucleo è formato da un protone e un neutrone. Il Trizio (^3H) ha un nucleo formato da un protone e due neutroni. Questo neutrone aggiuntivo presente nel nucleo del trizio determina uno stato di instabilità, responsabile del decadimento o disintegrazione del nucleo. I nuclidi instabili subiscono un decadimento spontaneo fino a raggiungere uno stato più stabile. Questo porta al riassetto nucleare che determina un rapporto neutrone/protone uguale a uno. Il processo attraverso il quale viene raggiunto lo stato di stabilità è conosciuto come decadimento radioattivo.

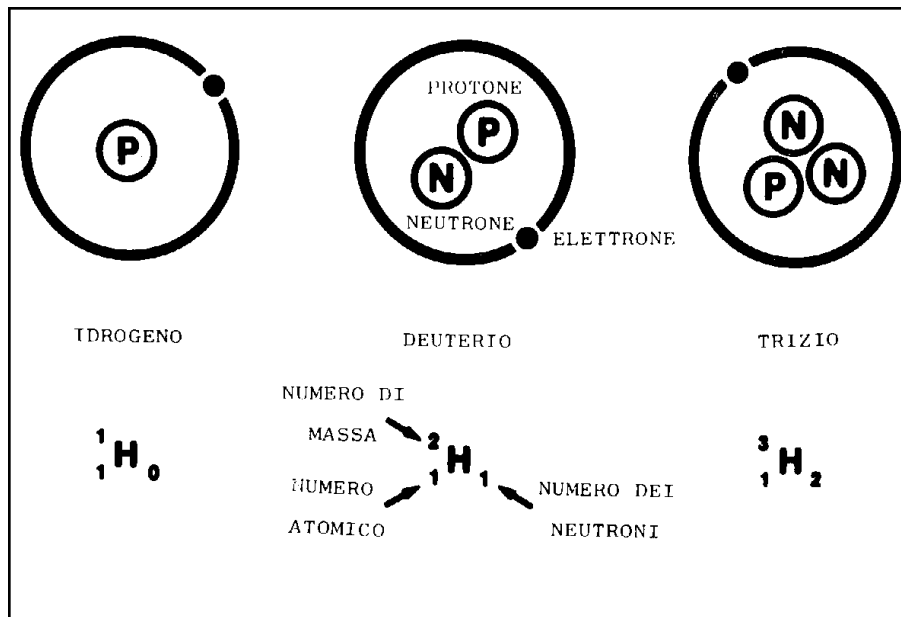


Figura 2. STABILITA' DEGLI ISOTOPI: NUCLEI DEGLI ISOTOPI DELL'IDROGENO.

Figura 3. TIPI DI EMISSIONI RADIOATTIVE.

I tre tipi più importanti di emissioni radioattive sono:

1) ALFA: Una particella alfa è una particella pesante formata da un nucleo di elio con una doppia carica (due neutroni e due protoni). A causa delle sue dimensioni essa viaggia solo per alcuni centimetri. Viene raramente utilizzata nei dosaggi radioimmunologici, e non verrà più discussa.

2) BETA: Una particella beta è un elettrone, ed è prodotto quando un neutrone all'interno di un nucleo si disintegra in un protone e un elettrone. Il trizio (^3H) è l'emittente beta più utilizzato nel laboratorio clinico.

3) GAMMA: I raggi gamma sono radiazioni elettromagnetiche simili ai raggi-X. Essi vengono emessi quando le particelle nel nucleo subiscono una modificazione che porta ad uno stato energetico inferiore. Gli emittenti gamma (principalmente ^{125}I e ^{57}Co) sono gli isotopi più comunemente utilizzati nel dosaggio RIA.

Figura 4. IL CURIE: UNITA' DI MISURA DELL'ISOTOPO.

Il curie viene definito come il numero di atomi che si disintegrano in un secondo (o in un minuto) in un grammo di ^{266}Ra puro.

ALFA	Una particella alfa è uguale al nucleo di elio (composto da due neutroni e due protoni).
BETA	Una particella beta è un elettrone con una energia caratteristica per ciascun isotopo.
GAMMA	I raggi gamma sono onde elettromagnetiche di radiazioni simili ai raggi-X.

Figura 3. TIPI DI EMISSIONI RADIOATTIVE.

Il curie...numero di atomi che si disintegrano in un secondo in un grammo di ²²⁶Ra radio puro.

	DPS Disintegrazioni per secondo	DPM Disintegrazioni per minuto
Curie (Ci)	$3,7 \times 10^{10}$	$2,22 \times 10^{12}$
Millicurie (mCi)	$3,7 \times 10^7$	$2,22 \times 10^9$
Microcurie (μ Ci)	$3,7 \times 10^4$	$2,22 \times 10^6$

Figura 4. IL CURIE: UNITA' DI MISURA DELL'ISOTOPO.

Figura 5. TEMPO DI DIMEZZAMENTO DEL RADIOISOTOPO (T1/2).

Il tempo di dimezzamento di un radioisotopo viene definito come «il tempo nel quale si disintegra la metà del nucleo originale». Questo tempo può essere espresso in secondi, minuti o anni, in relazione alla velocità con la quale un particolare isotopo va incontro a disintegrazione. Il tempo di dimezzamento è indipendente dal numero dei nuclei presenti, dalla pressione, dalla temperatura o altre condizioni esterne.

La metà degli atomi (o gli atomi rimanenti) si devono disintegrare entro il tempo di dimezzamento.

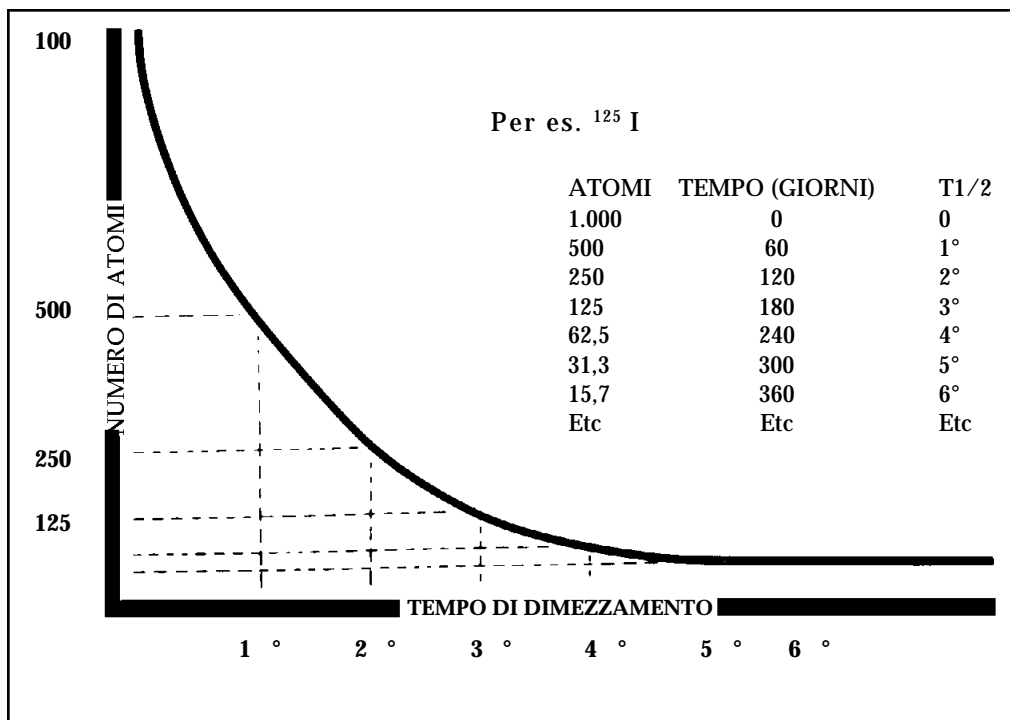


Figura 5. TEMPO DI DIMEZZAMENTO DEL RADIOISOTOPO (T1/2).

Figura 6. TEMPO DI DIMEZZAMENTO E SENSIBILITA'.

Le considerazioni sul tempo di dimezzamento giocano un ruolo importante nell'uso dei radioisotopi. Tanto più breve è il tempo di dimezzamento, tanto più un nucleo instabile verosimilmente si disintegrerà in un periodo di tempo ragionevole. Perciò, se il $T_{1/2}$ è piccolo può essere individuato un numero più piccolo di nuclei instabili, ed è maggiore la capacità di individuare quantità molto piccole di nuclei.

In questa figura viene fatto un raffronto dei limiti di individuazione di alcuni metodi analitici di analisi.

Si nota che il limite di sensibilità per gli isotopi può essere, a seconda dell'isotopo in esame, da cento a un milione di volte maggiore di quello di altre tecniche analitiche. Bisogna notare anche che tanto più piccolo è il $T_{1/2}$ tanto maggiore è la sensibilità dell'isotopo. Perciò si può affermare che il $T_{1/2}$ è inversamente proporzionale alla sensibilità. Questa sensibilità di misurazione è uno dei punti fondamentali della tecnica RIA.

METODO DI ANALISI	DI MOLECOLE/ATOMI NECESSARI PER LA INDIVIDUAZIONE	RIMARCA
IR, Spettroscopia UV	10^{15} molecole	Distruttivo
Assorbimento atomico, fotometria alla fiamma,, gas cromatografia	10^{13} molecole	Non distruttivo
Radioisotopi		
^{14}C	10^{11} atomi	T1/2= 5730 anni
^3H	10^9 atomi	T1/2= 12,2 anni
^{32}p	10^6 atomi	T1/2= 14,3 giorni

Figura 6. TEMPO DI DIMEZZAMENTO E SENSIBILITA'.

Figura 7. PRINCIPALI ISOTOPI UTILIZZATI NEL RIA.

Questa figura mostra i cinque più importanti isotopi utilizzati nei dosaggi RIA. Lo ^{131}I è stato l'isotopo utilizzato nei primi dosaggi RIA di routine. È stato rimpiazzato infatti dallo ^{125}I , un isotopo che ha una vita più lunga, non ha i rischi di elevate energie e non ha bisogno delle precauzioni che erano necessarie con lo ^{131}I .

Il trizio ha praticamente rimpiazzato il ^{14}C a causa della sua più breve emivita (il che ha determinato una migliore sensibilità). Il ^{57}Co viene utilizzato esclusivamente per il dosaggio della cobalamina (vitamina B12).

La maggior parte delle metodiche RIA utilizzano gli emittenti gamma piuttosto che quelli beta. Utilizzando lo ^{125}I è possibile ottenere conte più alte, e viene eliminata la necessità del costoso e fondamentale liquido di scintillazione. Tuttavia, le sostanze marcate con ^{125}I conservano un grado di radioattività sufficiente soltanto per alcuni mesi a differenza degli anni che invece si osservano con il ^{14}C e il ^3H .

L'unità utilizzata in questa figura per rappresentare l'energia è l'elettron volt (eV). Un eV è equivalente all'energia cinetica che un elettrone acquisirebbe se soggetto a un potenziale di 1 volt come gradiente. In genere, si usano unità maggiori:

$$10 \text{ eV} = 1 \text{ KeV (Kilo-elettron volt)}$$

NUCLIDE	EMIVITA	PRINCIPALE RADIAZIONE/ENERGIA
^{131}I	8,5 gg.	gamma / 360 KeV
^{125}I	60 gg.	gamma / 28,35 KeV
^{14}C	5730 aa.	beta / 156 KeV
^3H	12,36 aa.	beta / 18 KeV
^{57}Co	267 gg.	gamma / 122 KeV

Figura 7. PRINCIPALI ISOTOPI UTILIZZATI NEL RIA.

Figura 8. DISINTEGRAZIONE BETA: IL TRIZIO.

Il trizio è caratterizzato da un rapporto neutrone/protone di 2, e questo lo rende un isotopo instabile. Il ritorno ad una forma più stabile si verifica attraverso la disintegrazione beta con l'emissione di un elettrone negativo. Un neutrone viene convertito in un protone e un elettrone. Al momento della disintegrazione viene anche emesso un neutrino (ν) con una massa o carica irrilevante. La carica negativa di elettricità che viene emessa viene chiamata particella o radiazione beta, e ha tutte le proprietà fisiche di un elettrone. Perciò la sola differenza tra una particella beta e un elettrone, è la sua origine. Una particella beta origina da un neutrone nel nucleo dell'atomo, mentre un elettrone è una carica negativa orbitale vicina al nucleo.

La disintegrazione beta può anche verificarsi attraverso l'emissione di un elettrone positivo. In questa condizione un protone viene convertito in neutrone e un elettrone positivo (positrone).

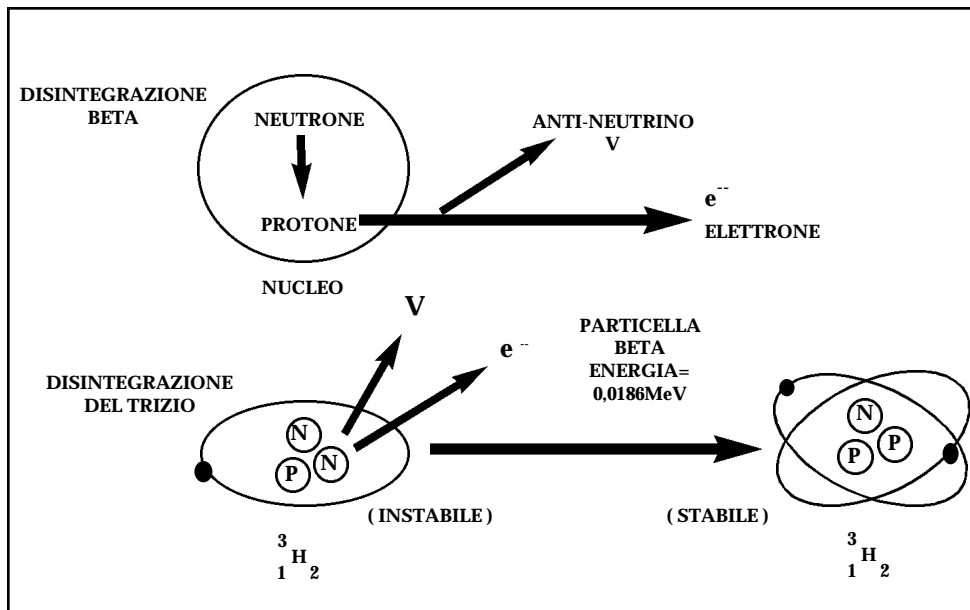


Figura 8. DISINTEGRAZIONE BETA: IL TRIZIO.

Figura 9. IL PROCESSO DI SCINTILLAZIONE LIQUIDA.

In rapporto all'energia di legame nucleare, vari tipi di radionuclidi emettono particelle beta con differente energia o differente velocità massima (MeV). Le particelle beta del trizio non hanno un'energia sufficiente (0.018 MeV) per viaggiare sino alla sede di rilevazione in un rivelatore Geiger (un mezzo comune di rilevazione delle radiazioni beta). Perciò deve essere usato un contatore più sensibile.

Per misurare il trizio è necessario un convertitore di energia ad elevata efficienza. Il processo a scintillazione liquida ha questo scopo. Come si può vedere nella figura, la particella beta emessa produce uno stato di eccitazione e ionizzazione di un solvente aromatico. Gli elettroni nei doppi legami coniugati carbonio-carbonio del solvente aromatico sono eccitati ad un livello energetico più elevato assorbendo parte dell'energia beta emessa, e emettono energia propria sotto forma di luce ritornando così ad uno stato energetico più basso. Questa conversione di energia cinetica in energia luminosa viene definita processo di scintillazione. Il valore di N dipende dalla energia di beta. Maggiore è l'energia di beta, maggiore il numero di collisioni. Poiché non è possibile individuare le radiazioni UV emesse nel range di 200-260 nm di lunghezza d'onda, vengono aggiunte sostanze organiche fluorescenti al solvente (perché capaci di assorbire le radiazioni UV). Denominate «scintillatori», queste riemettono l'energia con lunghezza d'onda maggiore (nel campo visibile). Queste ultime possono quindi essere misurate con un tubo fotomoltiplicatore.

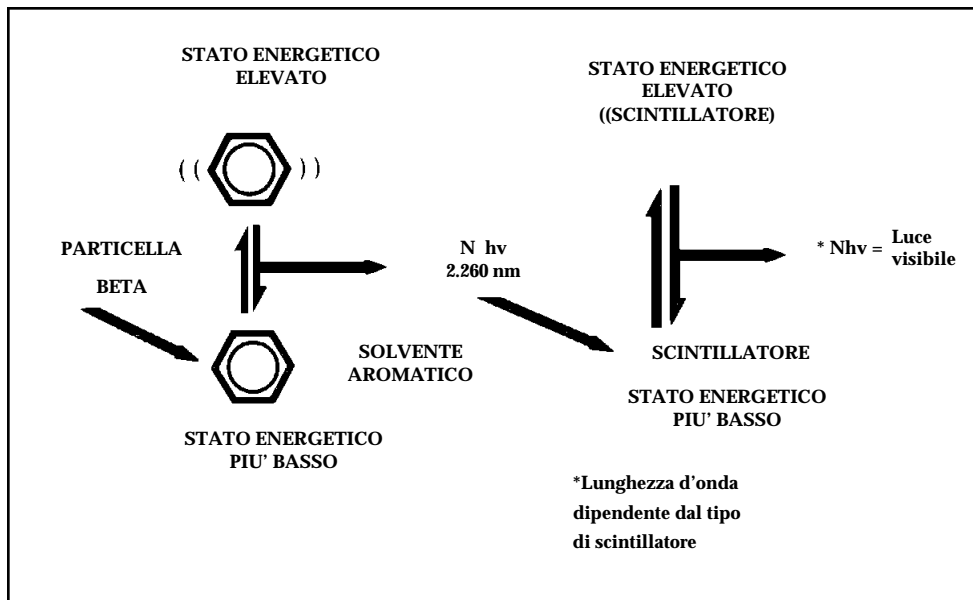


Figura 9. IL PROCESSO DI SCINTILLAZIONE LIQUIDA.

Figura 10. «COCKTAILS» DEL LIQUIDO DI SCINTILLAZIONE.

Oggi sono disponibili in commercio un grosso numero di solventi primari e scintillatori secondari da utilizzare nei «cocktails» di scintillazione. Il campione per essere contato deve essere mischiato con il cocktail, e i solventi devono accettare l'energia beta. Dei solventi primari comunemente utilizzati, i più soddisfacenti sono il toluene e lo xylene. Per trasformare efficientemente l'energia delle particelle beta in luce bisogna incorporare nel solvente primario soluti come il naftalene.

La scelta degli scintillatori usati nel cocktail dipende dal campione.

Vengono utilizzati scintillatori primari e secondari. Lo scintillatore primario accetta energia dal solvente e riemette questa energia sotto forma di luce nel campo ultra violetto e vicino a questo. Lo scintillatore secondario assorbe l'energia dai fotoni emessi dal fluoro primario e la riemette con una lunghezza d'onda maggiore (nello spettro visibile).

Questa luce può essere quindi individuata con un tubo fotomoltiplicatore.

Abbreviazioni per gli scintillatori mostrati nella figura:

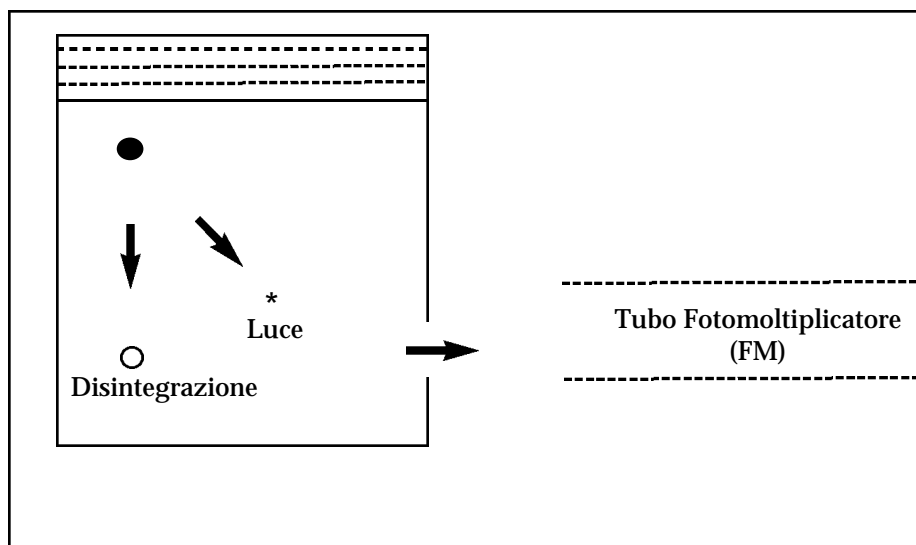
PPO: 2,5-difeniloxazolo

Dimetil POPOP:

1,4-bis [2-(4-metil-5-feniloxazolil)] -benzene

t-butilPBD: 2-(4'-t-butilfenil)-5-(4''-bifenil)-1,3,4-o xadiazolo

PBBO: 2-(4'-bifenil)-6-fenil-benzoxazolo



- * Il campione deve essere miscelabile con il cocktail
- * Il solvente deve avere la proprietà di ricevere l'energia beta
- Solventi primari: dioxano, benzene, toluene, xylene (con aggiunta di naftalene)
- Scintillatori: PPO, dimetil POPOP, t-butil PBD, PBBO, p-terfenil
- * I fotoni di luce sono ricevuti da un tubo fotomoltiplicatore (FM)

Figura 10. «COCKTAILS» DEL LIQUIDO DI SCINTILLAZIONE.

Figura 11. I CONTATORI A SCINTILLAZIONE LIQUIDA.

In questa figura viene illustrato lo strumento necessario per misurare le particelle beta emesse in un processo di scintillazione. La provetta in esame (che contiene il campione a concentrazione non nota che deve essere contato) viene mischiato nel cocktail del liquido di scintillazione e sistemato in una camera di piombo schermata per la luce tra due tubi fotomoltiplicatori. Quando i flashes di luce che vengono generati colpiscono la superficie del fotocatodo del tubo fotomoltiplicatore, si formano dei fotoelettroni. I fotoelettroni vengono attratti verso una serie di dinodi, polarizzati positivamente con circa 200 volts.

I fotoelettroni sono moltiplicati a ciascun dinodo così che per ciascun fotoelettrone iniziale, al dinodo finale arrivano circa 1 milione di elettroni.

Un circuito coincidente raccoglie tutti gli impulsi che arrivano simultaneamente da ciascun tubo FM. Il circuito in coincidenza elimina perciò gli impulsi casuali o termici (interferenze).

Gli impulsi validi sono quindi trasferiti ad un circuito analizzatore (di altezza di impulso). I flashes luminosi intensi (particelle beta ad alta energia) producono un forte impulso elettrico che è stretto e alto, mentre i flashes meno intensi (particelle beta a bassa energia) producono impulsi stretti e bassi. L'altezza di questi impulsi viene determinata separatamente, e i dati accumulati in un contatore di impulsi (scaler). L'analizzatore dell'altezza degli impulsi utilizza discriminatori elettronici per definire i limiti di altezza degli impulsi di ciascun scaler.

Per contare due isotopi simultaneamente è necessario un analizzatore di altezza di impulsi insieme a due scaler. Un altro scaler registra il tempo trascorso, e quando il processo di conteggio viene arrestato, il computer divide il numero degli impulsi accumulati per il tempo trascorso, e viene stampato il risultato finale.

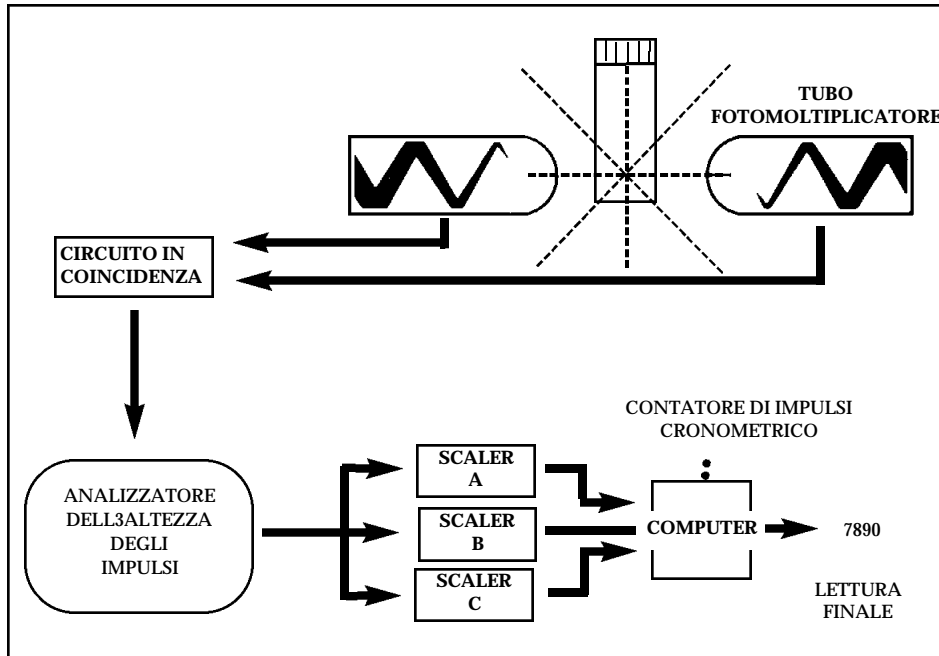


Figura 11. I CONTATORI A SCINTILLAZIONE LIQUIDA.

Figura 12. EFFICIENZA

L'isotopo che emette radiazioni beta si disintegra (DPM), l'energia che deriva da questo processo viene convertita in luce dal cocktail di scintillazione. I flasches di luce sono "conteggiati" (CPM dal contatore a scintillazione liquida, e possono essere correlati al valore originale di DPM presente nel campione con una semplice formula del percento di efficienza.

$$\text{Percento di efficienza} = \text{CPM/DPM} \times 100$$

Conoscendo i DPM, si può risalire anche alla quantità di radioattività (Curie) presente.

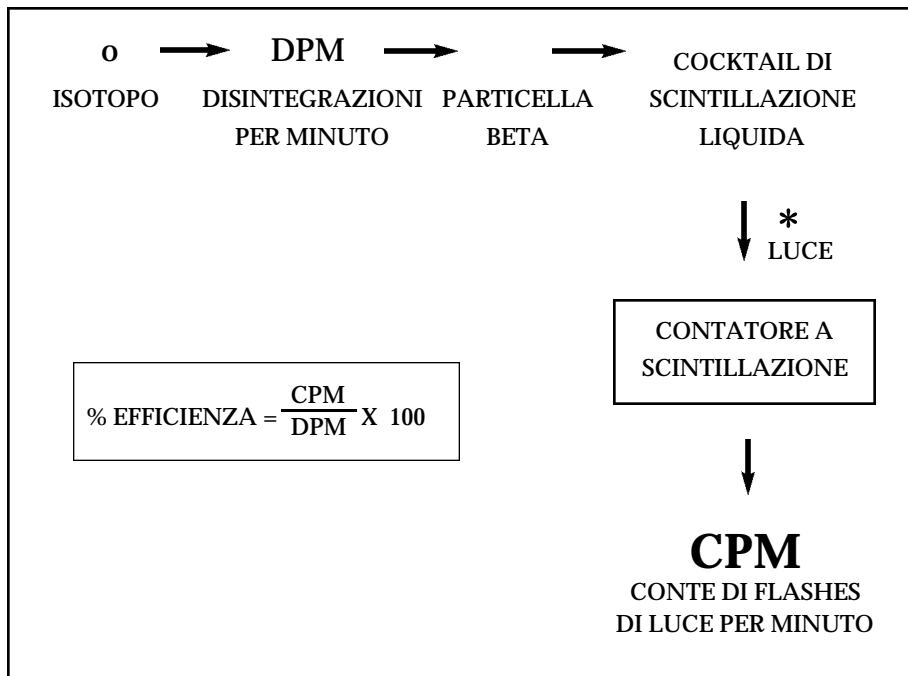


Figura 12. EFFICIENZA

Figura 13. QUENCHING

Il Quenching è “ogni processo che riduce l’output di fotoni nel sistema di scintillazione, riducendo così la conta finale del campione in esame”.

Due provette con il cocktail di scintillazione, possono contenere la stessa quantità di isotopo, ma se una provetta contiene un agente quenching (uno che assorbe i fotoni di luce generata), un numero inferiore di flashes raggiungeranno il tubo fotomoltiplicatore, così che verranno registrati dei valori di CPM falsamente bassi per la provetta che subisce l’effetto quenching. Le forme più comuni di quenching sono:

1. Il quenching di colore: L’assorbimento o l’interferenza ottica della luce ultravioletta e visibile prodotta dal processo di scintillazione. Questo è più frequentemente osservato nei RIA dove il campione è itterico o emolizzato.

I campioni itterici o emolizzati contengono cromogeni che assorbono la luce generata nel cocktail e, perciò, possono causare la registrazione di CPM erroneamente bassi.

2. Il quenching chimico: E’ causato generalmente da una alterazione nel sistema del cocktail che riduce l’output di fotone. Per esempio, gli acidi inorganici forti producono i sali di fluori, non fluorescenti.

3. Il quenching di diluizione: Questo viene determinato dalla diluizione del fluoro ad opera del campione, o dall’uso di fluoro ad una concentrazione iniziale troppo bassa. Il processo di trasferimento dell’energia deve viaggiare per una distanza troppo grande per raggiungere effettivamente la molecola di fluoro.

4. Il quenching ottico: Si può verificare quando il campione è torbido. L’ossigeno, l’acqua, e i composti polari sono importanti generatori di quenching.

Un qualsiasi processo che riduca l'output dei fotoni del sistema di scintillazione riducendo in conseguenza il numero delle conte.

- * COLORE
- * CHIMICO
- * DILUIZIONE
- * OTTICO

Figura 13. QUENCHING

Figura 14. CORREZIONE DEL QUENCHING CON.....

Il quenching dei cocktails del liquido di scintillazione può essere responsabile delle conte troppo basse osservate rispetto alla vera velocità di disintegrazione dell'isotopo presente nel campione. poiché è responsabile di erronei risultati, ciascun campione conteggiato col sistema del liquido di scintillazione deve essere analizzato per il fenomeno del quenching.

I tre più importanti metodi disponibili per correggere il quenching sono:

1. LA STANDARDIZZAZIONE INTERNA: Con questo sistema, viene aggiunto al cocktail un piccolo volume noto e una attività nota dello stesso isotopo che deve essere contato, dopo il conteggio del campione originale. Il campione viene ricontato, e viene valutato il recupero del campione noto aggiunto e questo viene utilizzato come indice di efficienza di conteggio per il campione.

2 LA TECNICA DEL RAPPORTO FRA CANALI: Nel processo di quenching, le particelle energetiche beta appaiono meno energetiche.

L'altezza dell'impulso di queste particelle beta sottoposte al quenching viene slittato, e se la distribuzione dell'altezza degli impulsi viene divisa in due canali (A e B), si può misurare il conteggio in ciascuno dei due canali e calcolare un rapporto B/A (rapporto fra canali). Utilizzando un grafico che relazioni il rapporto B/A con l'efficienza di conteggio ottenuta da una serie nota di standards sottoposti a quenching, si può calcolare l'efficienza di conteggio per ciascun campione in esame.

3. STANDARDIZZAZIONE ESTERNA: Questo è un metodo semplice e diffuso per correggere il quenching. Uno standard esterno che emette radiazioni gamma (per esempio il Cs) viene sistemato all'interno dello strumento. Questo funziona colpendo il vetro della provetta contenente il campione, producendo elettroni Compton. Gli elettroni Compton si comportano in una maniera simile agli elettroni beta. Dopo la conta del campione in esame, si sistema lo standard esterno vicino alla provetta del campione, e viene fatto un altro conteggio. Il valore dello standard esterno verrà riportato su un contatore di impulsi separato. Contando una serie nota di standards sottoposti a quenching, e riportando su un grafico i valori dello standard esterno in rapporto all'efficienza, si può calcolare l'efficienza di conteggio per ciascun campione in esame.

- 1) Standardizzazione interna
- 2) Tecnica del rapporto tra canali
- 3) Standardizzazione esterna

Figura 14. CORREZIONE DEL QUENCHING CON.....

Figura 15. DISINTEGRAZIONE GAMMA

I raggi gamma sono onde di radiazioni elettromagnetiche simili ai raggi X, ma originano dal nucleo, invece che dalla eccitazione o rimozione di elettroni orbitali.

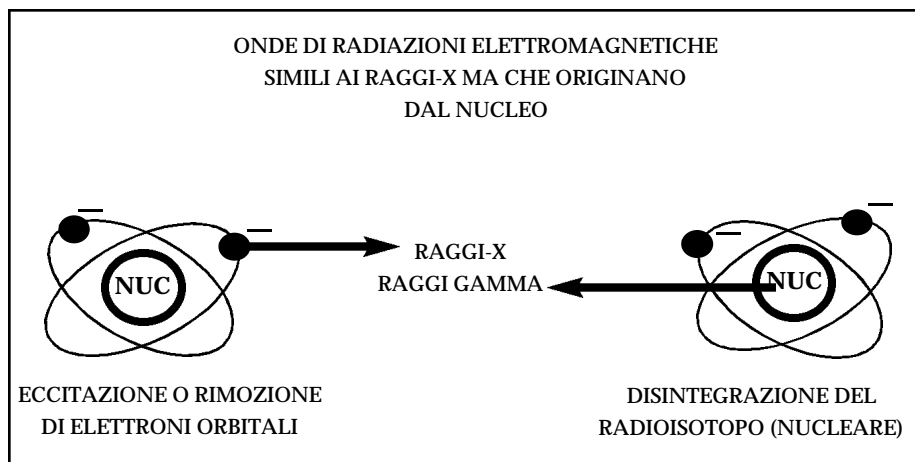


Figura 15. DISINTEGRAZIONE GAMMA

Figura 16. DISINTEGRAZIONE GAMMA: IL COBALTO-57

In questa figura viene riportato un esempio della disintegrazione del ⁵⁷Cobalto. le radiazioni sono emesse attraverso la cattura elettronica e la disintegrazione gamma. Nella disintegrazione con cattura elettronica, il nucleo cattura un elettrone e converte un protone in un neutrone.

L'isotopo stabile prodotto da questa complessa disintegrazione è il ⁵⁷ferro.

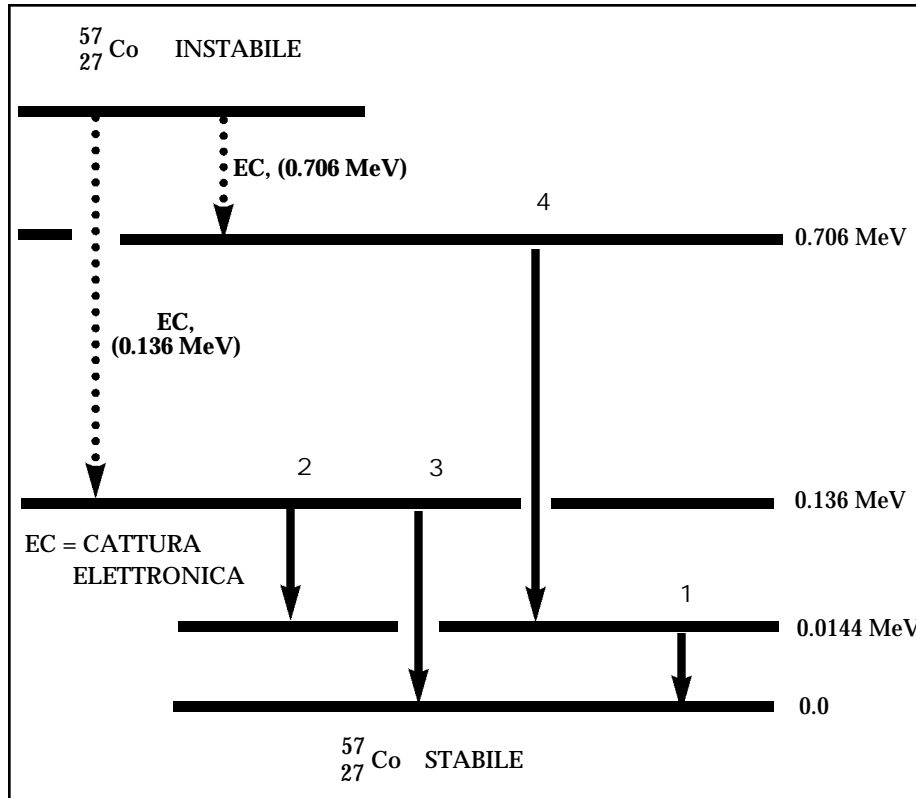


Figura 16. DISINTEGRAZIONE GAMMA: IL COBALTO-57

Figura 17. IL CRISTALLO DEL CONTATORE A SCINTILLAZIONE

Lo strumento impiegato per misurare le radiazioni gamma è simile a quello descritto precedentemente per il conteggio a scintillazione liquida - con la differenza per il processo a scintillazione liquida viene sostituito da un cristallo solido. Quando il cristallo solido (ioduro di sodio attivato al tallio) assorbe le radiazioni ionizzanti, viene prodotto un impulso luminoso (scintillazione) di breve durata. Il numero degli impulsi registrati è indice della velocità di disintegrazione dell'isotopo (emissione gamma). parte di questa luce (scintillazione) colpisce il catodo di un tubo fotomoltiplicatore, determinando l'emissione di elettroni. Gli elettroni sono amplificati nel tubo fotomoltiplicatore per un fattore di 10^5 sino a 10^8 .

In questa figura, vengono illustrati il tubo FM e il cristallo solido in stretto rapporto per avere il massimo di efficienza. L'output del tubo fotomoltiplicatore viene quindi portato dapprima ad un amplificatore e quindi ad un analizzatore delle dimensioni dei segnali che separa gli impulsi e li accumula in un contatore (scaler). Come per l'esempio mostrato per il conteggio del liquido di scintillazione, un contatore di impulsi a tempo, un computer e un sistema di lettura danno alla fine le conte in CPM.

In sintesi, la misurazione della scintillazione con cristallo può essere considerato come un processo costituito da cinque tappe.

1. Assorbimento della radiazione incidente.
2. Conversione dell'energia assorbita in emissione luminosa.
3. Raccolta di questi fotoni su una superficie fotosensibile.
4. Emissione dei fotoelettroni da una superficie fotosensibile.
5. Raccolta e moltiplicazione dei fotoelettroni per ottenere un segnale utile.

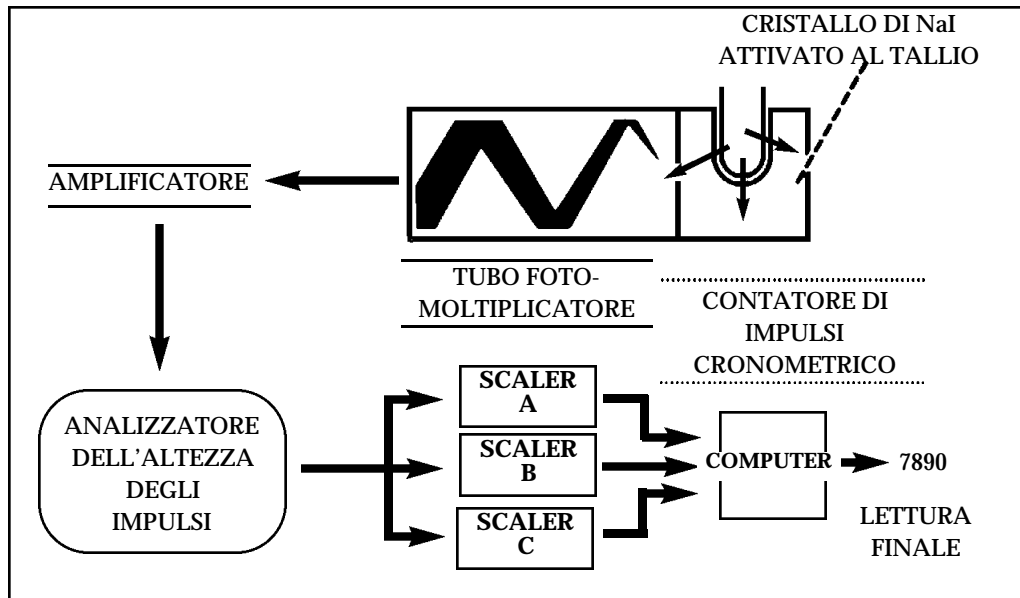


Figura 17. IL CRISTALLO DEL CONTATORE A SCINTILLAZIONE

Figura 18. COMUNI METODI DI RADIOMARCATURA CON ^3H E ^{125}I

In questa figura, vengono elencati i comuni metodi di radiomarcatura con trizio, e ^{125}I . La marcatura con trizio viene fatta raramente routinariamente in un laboratorio e i composti marcati con trizio vengono generalmente acquistati da ditte che commerciano radioisotopi.

Per questa ragione verranno discussi brevemente in questa figura.

Nella riduzione catalitica di una analita con gas di ^3H , in presenza di un catalizzatore il trizio si scambia con l'idrogeno dei doppi legami insaturi. Per ridotte i chetoni e le aldeidi degli ibridi di metallo ad alcoli con l'inclusione di un isotopo ^3H vengono utilizzati il sodio boridrato- ^3H o il litio alluminio boridrato- ^3H . Inoltre, il trizio può essere introdotto nei composti aromatici con uno scambio catalitico in un solvente idrossilico con un catalizzatore al platino. Altri due sistemi di marcatura con trizio, ma più deboli, sono le microonde e le scariche elettriche.

I più importanti metodi di iodinazione sono la clorammina-T, il metodo enzimatico, e le tecniche di marcatura con coniugazione. Queste verranno discusse nelle successive figure.

A prescindere dalla procedura di marcatura, è importante marcare in misura non eccessiva gli antigeni proteici. In genere un atomo di iodio per molecola di antigene è sufficiente per marcare la maggior parte delle molecole di antigene.

^3H	<ul style="list-style-type: none">* Riduzione catalitica con gas di trizio* Riduzione catalitica con ibridi di metalli* Scambio catalitico* Processo con microonde* Processo con scarica elettrica
^{125}I	<ul style="list-style-type: none">* Metodo della clorammina-T* Iodinazione enzimatica (lattoperossidasi)* Marcatura con coniugazione (Bolton e Hunter)

Figura 18. COMUNI METODI DI RADIOMARCATURA CON ^3H E ^{125}I

Figura 19. IODINAZIONE DI PROTEINE E POLIPEPTIDI

L'usuale sede di iodinazione è l'amino acido tirosina, un componente della catena polipeptidica o proteica; benchè la reazione dello iodio con i gruppi sulfidrilici o con l'istidina possa verificarsi in condizioni normali, questa non viene favorita cineticamente con i metodi di iodinazione chimico o enzimatico.

La maggior parte dei metodi di iodinazione in vitro comportano l'iniziale formazione di ^{125}I nello stato di ossidazione + 1, questo reagisce con il carbonio in posizione orto dell'anello fenolico della tirosina, con la formazione di un peptide marcato contenente monoiodotirosina. Nell'esempio mostrato in figura, la tirosina è localizzata, a scopo dimostrativo, all'estremità della catena peptidica. La tirosina viene illustrata anche nella sua forma ionizzata per evidenziare un meccanismo postulato tra il catione iodio e l'anione tirosina fenolato. La formazione dei peptidi marcati con diiodotirosina dipende dalla disponibilità sterica di entrambe le posizioni orto per il processo di iodinazione.

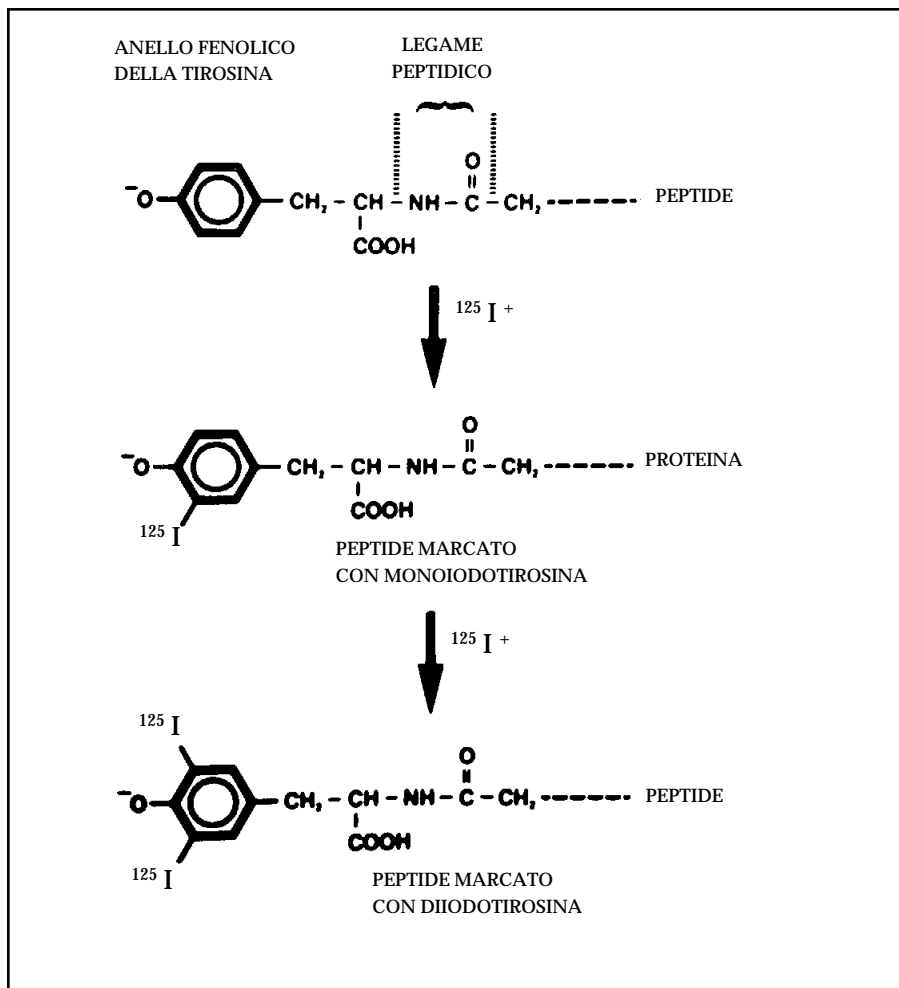


Figura 19. IODINAZIONE DI PROTEINE E POLIPEPTIDI

Figura 20. IODINAZIONE DEL TRACCIANTE: IL METODO DELLA CLORAMMINA -T

La clorammina è il sale sodico del p-toluene sulfamide N-monocloro-derivato che, in soluzione acquosa, forma lentamente acido ipocloroso, un modico ossidante necessario per ossidare il Na I.

La clorammina-T è utile per iodinare piccole quantità di peptidi e proteine, ma è influenzato dalla situazione topografica della tirosina all'interno della molecola proteica.

Nell'esempio mostrato in questa figura, si mette ad incubare da 10 secondi a 10 minuti (il tempo dipende dalla labilità della proteina che deve essere iodinata) la clorammina-T, una soluzione tampone fostato a pH 7,5 Na ^{125}I privo di carrier, la proteina e il peptide che deve essere iodinato. I volumi di tutti i reagenti sono mantenuti al minimo, poiché la percentuale di ^{125}I radioattivo incorporato dipende dalla concentrazione proteica. Generalmente viene utilizzato un rapporto tra clorammina-T e proteina di 10 μg per milligrammo di proteina. La radioiodinazione viene bloccata con l'aggiunta di una concentrazione simile (10 μg per microgrammo di proteina) di sodio metabisolfito.

Il sodio metabisolfito riduce tutto lo ^{125}I che non ha reagito. La purificazione del peptide/ proteina va effettuata generalmente subito dopo la radioiodinazione. Il processo di purificazione permette di separare il materiale marcato puro da qualsiasi altra frazione marcata danneggiata, che si è formata durante il processo di iodinazione, e dallo ^{125}I libero.

Questa figura mostra un quadro osservato utilizzando la cromatografia su colonne di Sephadex. Una purificazione estesa richiede sia colonne più lunghe sia differenti tecniche di cromatografia su gel.

la tecnica della clorammina-T è poco costosa, semplice, e necessita di reagenti facilmente reperibili. Inoltre è rapida, evita valori di pH troppo bassi o alti, e permette una esposizione alle radiazioni minima da parte dell'operatore. Tuttavia, in alcuni casi il metodo della clorammina-T causa una perdita della attività biologica o immunologica della specie iodinata. Perciò sono disponibili metodi alternativi meno grossolani (vedi figure 21 e 22).

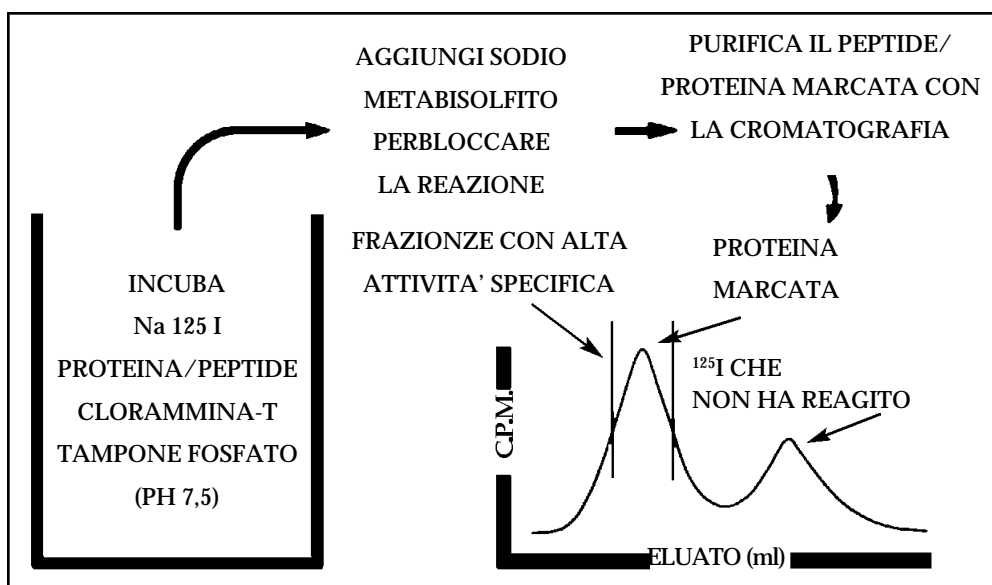


Figura 20. IODINAZIONE DEL TRACCIANTE: IL METODO DELLA CLORAMMINA -T

Figura 21. IODINAZIONE DEL TRACCIANTE: IL METODO DELLA LATTOPEROSSIDASI

L'enzima lattoperossidasi è una proteina del peso molecolare di 90.000 che si ottiene dal latte bovino non pastorizzato, ed è reperibile in commercio.

In presenza di perossido di idrogeno e ^{125}I , questa proteina favorisce una discreta radioiodinazione di proteine o peptidi senza significative modificazioni della attività biologica o immunologica. Con questo metodo non si verifica la possibilità di una esposizione in condizioni di brutale ossidazione o riduzione delle proteine come con la clorammina-T. Il metodo della lattoperossidasi ha inoltre minori reazioni collaterali rispetto a quelle della clorammina-T, e la reazione procede rapidamente e praticamente a completamento sinché c'è tirosina disponibile per la iodinazione. Inoltre, poiché la lattoperossidasi è una grossa molecola, essa favorisce la formazione di complessi enzima-substrato con le tirosine esterne, e non con le tirosine nascoste all'interno della molecola che possono essere indispensabili per l'integrità strutturale.

Nell'esempio mostrato in questa figura, si mette ad incubare per alcuni minuti, $\text{Na } ^{125}\text{I}$ privo di trasportatore, la proteina o peptide che deve essere iodinata, la lattoperossidasi, il perossido di idrogeno appena preparato, e un tampone a pH 7,4. La reazione può essere bloccata diluendo la miscela di incubazione con tampone, o procedendo alla immediata purificazione con la cromatografia delle proteine o peptidi marcati.

La immissione diretta di H_2O_2 può essere evitata associando il sistema della lattoperossidasi con il sistema glucoso-glucoso ossidasi che fornisce una produzione controllata e continua di H_2O_2 .

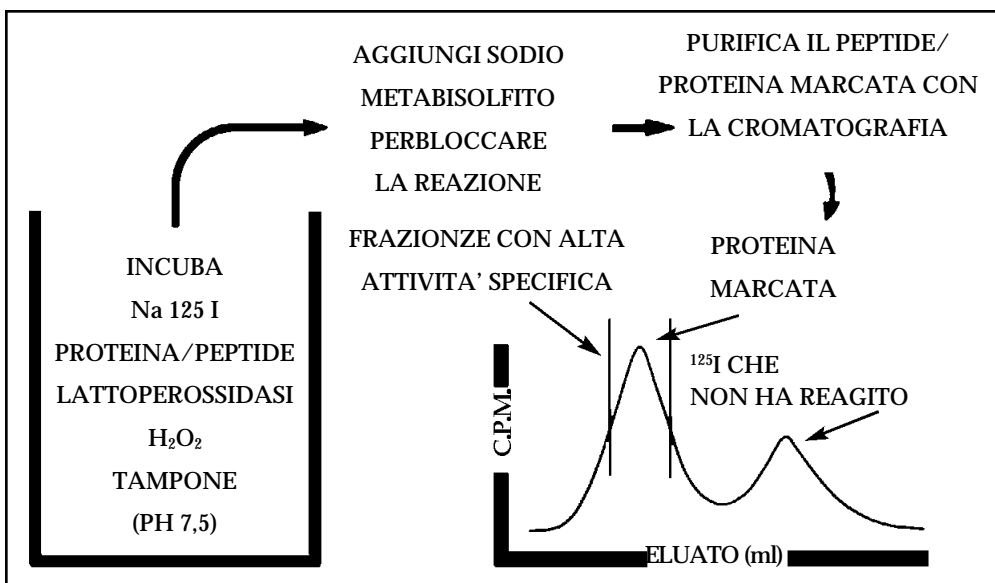


Figura 21. IODINAZIONE DEL TRACCIANTE: IL METODO DELLA LATTOPEROSSIDASI

Figura 22. IODINAZIONE DEL TRACCIANTE: IL METODO DELLA CONIUGAZIONE

Il reagente di Bolton-Hunter (acido p-idrossifenilpropionico iodinato, estere N-Idrossisuccinimide) può essere utilizzato per marcare indirettamente la proteina. Si eliminano così il contatto diretto di agenti ossidanti e riducenti che potenzialmente possono danneggiare la proteina che deve essere marcata (come con il metodo della clorammina-T).

Questo composto reagisce spontaneamente e, in condizioni accettabili, con i gruppi aminoacidici dei residui della lisina. Il reagente di Bolton-Hunter è utile quando la marcatura diretta della lisina potrebbe causare una perdita della attività immunologica, o quando la tirosina è assente nella sostanza che deve essere marcata.

Nell'Esempio mostrato nella figura, il reagente di Bolton-Hunter viene premarcato con l'uso della clorammina-T (o viene acquistato premarcato) prima di aggiungere la proteina. Per la purificazione della proteina marcata si utilizzano la cromatografia, la dialisi, o l'elettroforesi ad alto voltaggio.

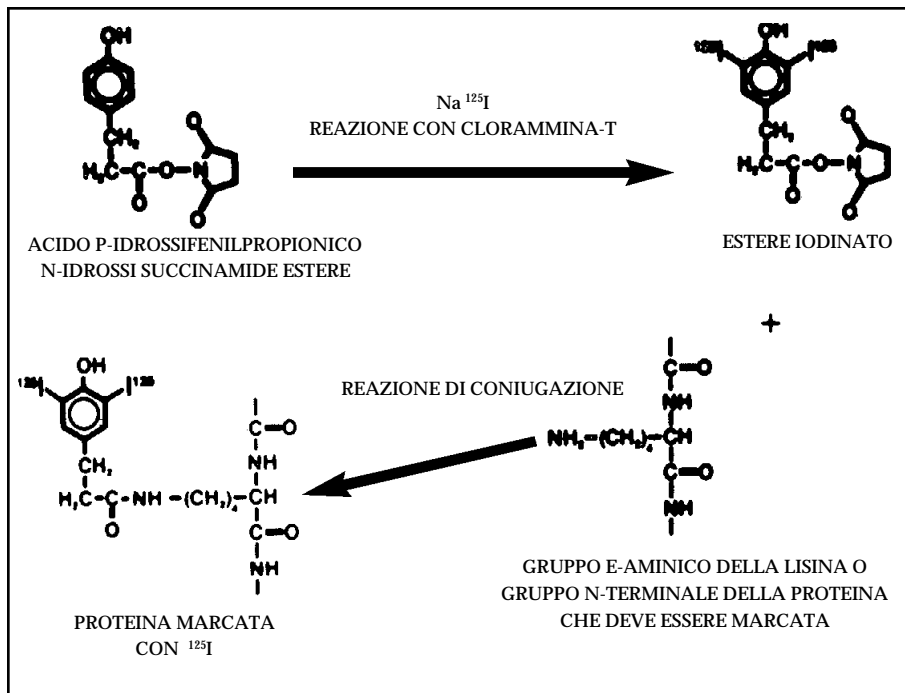


Figura 22. IODINAZIONE DEL TRACCIANTE: IL METODO DELLA CONIUGAZIONE

Figura 23. LA RADIOMARCATURA DEGLI APTENI

Le molecole più piccole non immunogeniche (apteni) come gli steroidi e i farmaci non hanno la tirosina endogena o l'istidina per la iodinazione. Queste molecole sono state utilizzate nei dosaggi Ria con l'impiego del trizio come tracciante. Il trizio, utilizzato come isotopo per la marcatura, sostituisce gli atomi di idrogeno, e non influenza l'antigenicità della molecola. Inoltre il trizio ha una lunga emivita e presenta pericoli minimi per la salute. In ogni caso, la maggiorparte dei dosaggi RIA per steroidi e farmaci utilizzano oggi lo ^{125}I come marcatore. La ragione di ciò sta nella maggiore attività specifica che è possibile ottenere (che determina un tempo di conteggio inferiore), e l'eliminazione dei cocktails di scintillazione e delle provette di conteggio necessarie con i contatori beta.

Generalmente, è necessario preparare un derivato dell'apteni che deve essere iodinato usando la tiramina, l'estere della metil tirosina, o l'istidina, e quindi iodinare il derivato con la clorammina-T o un altro metodo.

Questa figura mostra il tracciante aptenico marcante per il progesterone- il progesterone marcato con trizio e due sistemi differenti di iodinazione. Il derivato utilizzato per attaccare la tirosina allo steroide è chiamato molecola "ponte". Tutti e tre i traccianti possono essere utilizzati (con vari gradi di successo) nella tecnica RIA di dosaggio del progesterone.

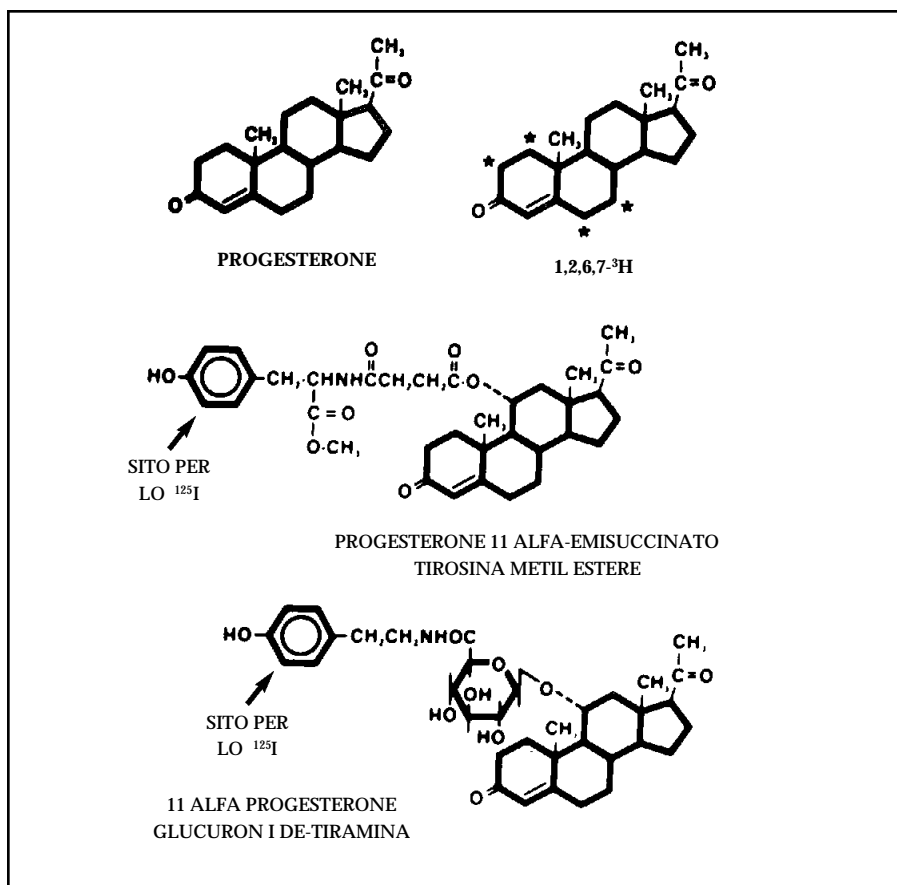


Figura 23. LA RADIOMARCATURA DEGLI APTENI

Figura 24. LA VALUTAZIONE DEGLI ANTIGENI MARCATI

Gli antigeni marcati dopo la preparazione e la purificazione, devono essere valutati per i parametri qui elencati al fine di stabilire la loro praticabilità nel dosaggio RIA:

1. **PUREZZA RADIOCHIMICA:** questa viene determinata dapprima con una cromatografia su colonna (individuando l'eluato di un picco singolo e stretto). Successivamente, si devono ricercare le conte aspecifiche (NSB) e il legame zero.

2. **IMMUNOREATTIVITA':** Questa può essere valutata direttamente facendo reagire una piccola quantità di antigene marcato con l'anticorpo in eccesso. Se una significativa porzione del marcato non si lega all'anticorpo, ciò sta a significare la presenza di specie non immunoreattive.

3. **ATTIVITA' SPECIFICA:** Questo è il numero di Curie dell'isotopo radioattivo per unità di peso della miscela totale del composto presente. (per esempio, 50 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$). Attività specifiche più basse contengono una maggiore quantità di sostanza fredda (non marcata), e perciò generalmente richiedono una modificazione della concentrazione di antisiero per avere risultati sovrapponibili a quelli ottenibili con traccianti ad elevate attività. Anche così, può andare perduta la sensibilità del dosaggio.

4. **STABILITA':** I fattori importanti che devono essere presi in considerazione qui sono l'emivita, la liberazione di iodio libero, e la perdita di immunoreattività nello stoccaggio.

1) PUREZZA RADIOCHIMICA

Cromatografia su colonna, legame zero, NSB

2) IMMUNOREATTIVITA'

Test con eccesso di anticorpo

3) ATTIVITA' SPECIFICA

La bassa attività specifica limita la sensibilità

4) STABILITA'

T1/2, liberazione dello iodio libero, perdita di immunoreattività.

Figura 24. LA VALUTAZIONE DEGLI ANTIGENI MARCATI

Indice

- Figura 1 Definizione di isotopi e nuclidi
- Figura 2 Stabilità degli isotopi: nuclei degli isotopi dell'idrogeno
- Figura 3 Tipi di emissioni radioattive
- Figura 4 Il curie: unità di misura dell'isotopo
- Figura 5 Tempo di dimezzamento dell'isotopo ($T_{1/2}$)
- Figura 6 Tempo di dimezzamento e sensibilità
- Figura 7 Principali isotopi utilizzati nel RIA
- Figura 8 Disintegrazione beta: il trizio
- Figura 9 Il processo di scintillazione liquida
- Figura 10 I "cocktails" del liquido di scintillazione
- Figura 11 I contatori a scintillazione liquida
- Figura 12 Efficienza
- Figura 13 Quenching
- Figura 14 Correzione del quenching con ...
- Figura 15 Disintegrazione gamma
- Figura 16 Disintegrazione gamma: il cobalto-57
- Figura 17 Il cristallo del contatore a scintillazione
- Figura 18 Comuni metodi di radiomarcatura con ^3H e ^{125}I
- Figura 19 Iodinazione di proteine e polipeptidi
- Figura 20 Iodinazione del tracciante: il metodo della clorammina-T
- Figura 21 Iodinazione del tracciante: il metodo della lattoperossidasi
- Figura 22 Iodinazione del tracciante: il metodo della coniugazione
- Figura 23 La radiomarcatura degli apteni
- Figura 24 La valutazione degli antigeni marcati
- Indice

Caleidoscopio

Italiano

1. **Rassu S.: *Principi generali di endocrinologia*. Gennaio '83**
2. **Rassu S.: *L'ipotalamo endocrino*. Giugno '83**
3. **Rassu S.: *L'ipofisi*. Dicembre '83**
4. **Alagna., Masala A.: *La prolattina*. Aprile '84**
5. **Rassu S.: *Il pancreas endocrino*. Giugno '84**
6. **Fiorini I., Nardini A.: *Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza)*. Luglio '84.**
7. **Rassu S.: *L'obesita'*. Settembre '84**
8. **Franceschetti F., Ferraretti A.P, Bolelli G.F., Bulletti C.: *Aspetti morfofunzionali dell'ovaio*. Novembre '84.**
9. **Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (1)*. Dicembre '84.**
10. **Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima*. Gennaio '85.**

Caleidoscopio
Rivista mensile di Medicina
anno 3, numero 10

Direttore Responsabile

Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
Tel.-Fax 079 270464
Tel. mobile 0338 2202502
E-mail: rassu@ssnet.it

Responsabile Ufficio Acquisti

Giusi Cunietti

EDITORE

Consulenti di Redazione

Giancarlo Mazzocchi ed
Angelo Maggio

Segretaria di Direzione

Letizia Cuccuru

Servizio Abbonamenti

Maria Grazia Papalia
Flavio Damarciasi

Via Rio Torbido, 40
16165 Genova (Italy)

Tel. (010) 83401 Numero Verde 800 801005 (senza prefisso);
Telefax (010) 803498- 809070.

Internet URL: <http://medicalsistemas.editoria.com> e <http://www.medicalsistemas.it>
La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Journal of Clinical Ligand Assay,
Guida Pratica Immulite®, Caleidoscopio, Kaleidoscope, Caleidoscopio letterario, Pandora,
Journal of Preventive Medicine and Hygiene, Tribuna Biologica e Medica.

Stampa

Tipolitografia ATA
16143 Genova - Via G. Torti, 32 c.r.
Tel. (010) 513120 - Fax (010) 503320

Registrazione Tribunale di Genova n. 34 del 31/7/1996
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989

Finito di stampare: Gennaio 1985
Sped. in Abb. Post. 45%

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e
scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento
professionale continuo e riservata ai medici.

Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:
"L'ECO DELLA STAMPA"
Via Compagnoni, 28 - Milano