

Sezione di Napoli

INFN/TC-85/4
2 Maggio 1985

R. Moro : STUDIO DI ELEMENTI IN TRACCIA DI INTERESSE BIOLOGICO
CON TECNICHE NUCLEARI: STATO ATTUALE E PROSPETTIVE

I.N.F.N. - ISTITUTO NAZIONALE DI FISICA NUCLEARE

Sezione di Napoli

INFN/TC-85/4
2 Maggio 1985

LXX CONGRESSO NAZIONALE DELLA SOCIETA' ITALIANA DI FISICA

Genova, 4-9 Ottobre 1984

RELAZIONE SU INVITO

STUDIO DI ELEMENTI IN TRACCIA DI INTERESSE BIOLOGICO CON TECNICHE

NUCLEARI: STATO ATTUALE E PROSPETTIVE

R. Moro

Istituto di Fisica Sperimentale dell'Università di Napoli
e Istituto Nazionale di Fisica Nucleare -Sezione di Napoli

ABSTRACT

The present status and perspectives of research on trace elements in biomedicine carried out in Italy at Catania, Naples, Milan and Padua-Legnaro are discussed. The use of Proton Induced X-ray Emission (PIXE), Proton Activation Analysis (PAA) and Prompt Radiation Analysis (PRA) as analytical methods is briefly described. The available facilities, the field of investigation and the main findings are discussed for each institution.

Catania (2 MV Van de Graaff) - PIXE and PRA methods are used to investigate dental materials. The composition of tooth enamel and dentine and tartar were determined. By using the $^{19}\text{F}(p, \alpha)$ reaction the fluorine depth distribution in dental enamel was obtained.

Naples (3 MV TTT-3 Tandem) - The PIXE method is used for studying the role of zinc in infant nutrition and in the immune function in children. The postnatal dependence of plasma copper and zinc levels on gestational age and maturity was studied in infants fed a high zinc content formula. The investigation on the immune function of zinc is carried out by measuring, on the same subject, Cu and Zn contents in serum and hair. Children affected by pathological status caused by immune deficiency were studied and results

compared with those relative to a control group.

Milan (AVF Cyclotron) - A method for trace elements analysis in biological samples based on medium energy proton nuclear activation has been developed. Concentrations of Sr, Cu, Fe, Zn, Se, Cd and Ti in human serum were measured.

Padua-Legnaro (2 MV Van de Graaff) - The role played by selenium in tumors has been investigated by the PIXE method. Measurements of serum selenium levels in subjects with malignant lymphoproliferative diseases were carried out and low serum selenium contents were correlated to a reduced activity of the glutathione peroxidase enzyme. A preconcentration technique for selenium has been developed. An investigation on trace elements in neurobiology is currently under way.

1. - PREMESSA

In questa relazione vengono illustrati lo stato attuale e le prospettive delle ricerche sugli elementi in traccia in matrici biologiche effettuate con tecniche nucleari. Tali ricerche, che si svolgono presso le Università di Catania, Milano, Napoli e Padova, sono state coordinate negli ultimi 2 anni a livello nazionale.

Gli elementi alla base di questo coordinamento sono rappresentati dal campo di ricerca comune, che è quello biomedico, nonché dalle tecniche nucleari utilizzate per la misura delle concentrazioni degli elementi in traccia (PIXE, PAA e PRA). Queste tecniche comportano tutte l'impiego di acceleratori di bassa energia e si sono sviluppate in Italia presso laboratori propri o di interesse dell'INFN, a stretto contatto con le attività di ricerca in fisica nucleare fondamentale.

2. - GLI ELEMENTI IN TRACCIA IN MATRICI BIOLOGICHE

L'attenzione rivolta allo studio degli elementi in traccia in matrici biologiche è andata via via aumentando negli ultimi dieci anni. Esso rappresenta un ponte tra la biochimica e la biologia molecolare da una parte e la fisiologia dall'altra.

Gli elementi in traccia vengono generalmente suddivisi, in modo schematico, in essenziali, tossici e neutri a seconda della loro funzione primaria nel metabolismo umano.

Il ruolo fisiologico degli elementi essenziali (allo stato attuale delle conoscenze in numero di 15) è rappresentato da 4 funzioni primarie: essi agiscono come stabilizzatori, elementi strutturali, elementi essenziali per le funzioni ormonali e cofattori negli enzimi. In Fig. 1 sono riportati i valori delle concentrazioni degli elementi in traccia, nonché degli elettroliti, nel siero di un adulto sano. Va notato come le concentrazioni degli elementi essenziali variano, da elemento ad elemento, dall'ordine di 1 ppm all'ordine di 10^{-3} ppm.

Come in molti altri casi in biologia, anche per gli oligoelementi il poter definire il "valore normale" é problematico in quanto la loro concentrazione varia da individuo ad

individuo, dipende da un grande numero di parametri (età, apporto dietetico, area geografica, etc.) ed é influenzata dall'ambiente. A ciò si aggiunge la difficoltà di misura che fa sì che i risultati presenti in letteratura dipendano dal metodo usato e talvolta anche dal laboratorio dove é stata eseguita la misura. In Fig. 2 sono mostrati, per alcuni elementi essenziali, i dati di concentrazione riportati in letteratura per siero in adulti sani. Anche per elementi molto studiati, quali Cu e Zn, la variabilità é di un ordine di grandezza.

Molte informazioni sull'essenzialità e sull'interferenza degli oligoelementi provengono da studi su animali dove é possibile seguire le alterazioni indotte. Esiste quindi il problema, da un lato di definire i limiti di tollerabilità degli elementi tossici, soprattutto per la valutazione degli effetti a lungo termine, e dall'altro di verificare le informazioni esistenti a livello umano in presenza di carenze marginali.

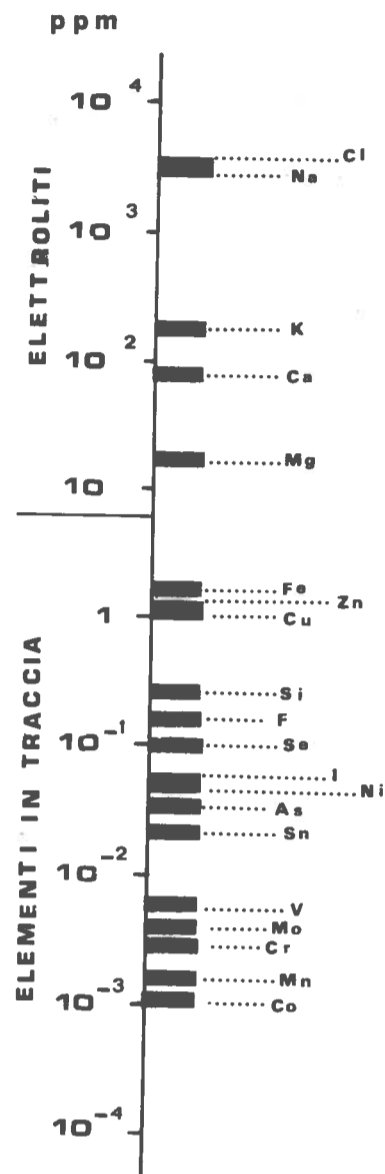


FIG. 1 - Valori medi in ppm delle concentrazioni degli oligoelementi essenziali e degli elettroliti in siero di adulto sano.

3. - METODI DI RIVELAZIONE DEGLI ELEMENTI IN TRACCIA

Nel seguito sono rapidamente descritti i metodi di rivelazione utilizzati dai gruppi di ricerca facenti parte del coordinamento. Essi rientrano tra i cosiddetti metodi "nucleari" per la microanalisi elementare, pur senza esaurire tutte le possibili tecniche; ad esempio non sarà fatto cenno della Neutron Activation Analysis che pur

rappresenta una tecnica di grande utilità e di largo uso.

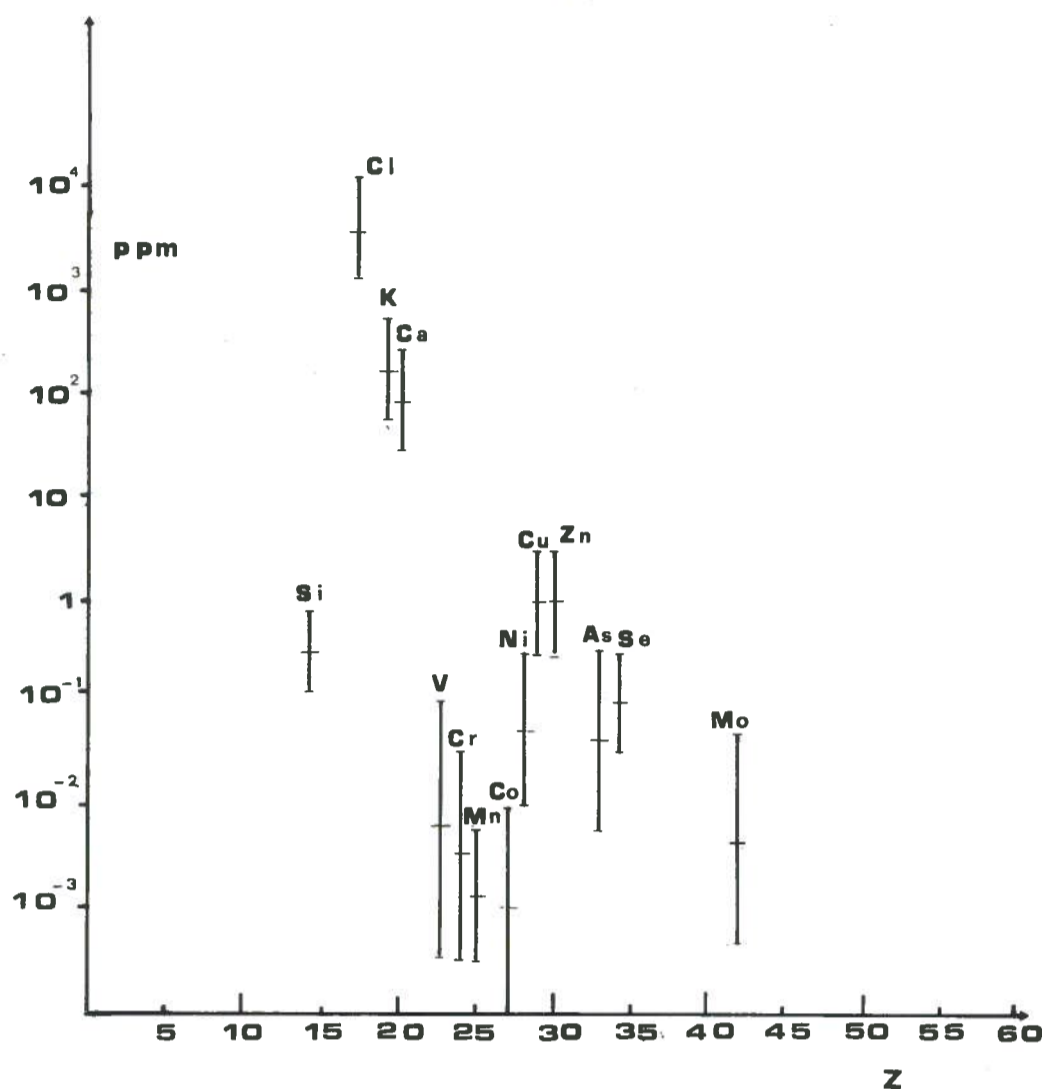


FIG. 2 - Intervalli di variabilità dei valori in letteratura per le concentrazioni di alcuni elementi essenziali e degli elettroliti in siero di individui sani.

Le tecniche descritte sono la Proton Induced X-ray Emission (PIXE), la Proton Activation Analysis (PAA) e la Prompt Reaction Analysis (PRA). Tali tecniche possono essere considerate complementari sotto certi aspetti e alternative sotto altri. Peraltro la scelta dell'una o dell'altra non può essere sempre una scelta legata al problema di interesse, ma talvolta (o spesso) è dovuta anche al quadro di condizioni esterne in cui si è costretti ad operare.

Vale comunque la pena di tentare un esame dei criteri di valutazione delle diverse tecniche in relazione alla loro utilità per la determinazione degli elementi di interesse, tenendo presente, peraltro, che la rivelabilità di un elemento è fortemente condizionata dalla matrice in cui si trova e dalla concentrazione relativa degli altri elementi presenti.

Tali criteri possono essere schematicamente elencati come segue:

- a)-Sensibilità, intesa come minima concentrazione rivelabile
- b)-Riproducibilità
- c)-Accuratezza
- d)-Numero di elementi rivelabili in assoluto e relativamente alla matrice in esame
- e)-Possibilità di misura contemporanea di più elementi (multielementalità)
- f)-Possibilità di misura delle concentrazioni, localizzata in superficie e/o in profondità
- g)-Adattabilità del metodo allo stato fisico del campione, intesa come limitazione degli eventuali trattamenti chimici e manipolazioni.

4. - EMISSIONE DI RAGGI X INDOTTA DA PROTONI (PIXE)

4.1. - Processo fisico

Il processo su cui si fonda il metodo analitico è la produzione di raggi X nell'interazione elettromagnetica tra le particelle cariche (generalmente protoni) incidenti e gli elettroni legati negli atomi del bersaglio. Al processo di ionizzazione, con espulsione di un elettrone dalle shells interne, fa seguito l'emissione di una radiazione X, caratteristica dei livelli atomici coinvolti, con probabilità ω , detta resa in fluorescenza.

La sezione d'urto di produzione di raggi X, ad esempio dalla shell K può, pertanto, essere scritta

$$\sigma_K = \sigma_K^{\text{ionizz.}} \cdot \omega_K$$

Nella Fig. 3 sono riportate le sezioni d'urto K ed L in funzione dell'energia dei protoni, al variare del numero atomico Z del bersaglio. Dai grafici si vede chiaramente che i valori delle sezioni d'urto crescono molto rapidamente al di sotto di 10 MeV e già per energie incidenti di qualche MeV sono molto elevati (decine di barn).

4.2. - Scelta dei parametri

I parametri da scegliere per massimizzare il rapporto segnale-fondo, tenuto conto dell'energia della radiazione X emessa dagli elementi di interesse, sono: l'energia dei protoni incidenti, l'angolo di rivelazione e lo spessore degli assorbitori da interporre tra bersaglio e rivelatore.

La maggiore sorgente di fondo è la bremsstrahlung degli elettroni secondari che domina lo spettro fino al valore massimo, $E_e = 4 \frac{m_e}{M_p} E_p$, dell'energia trasferibile a un elettrone libero ($E_e \approx 4 \text{ KeV}$ per $E_p = 2 \text{ MeV}$; $E_e \approx 20 \text{ KeV}$ per $E_p = 10 \text{ MeV}$). La forte anisotropia in avanti della bremsstrahlung permette di ridurre l'entità di tale tipo di fondo ponendo

il rivelatore a grande angolo (tipicamente 90° per motivi di posizionamento). Ciò nonostante è conveniente utilizzare energie al di sotto dei 10 MeV (tipicamente 2-3 MeV per avere un buon rapporto segnale-fondo per elementi fino a $Z \approx 35$).

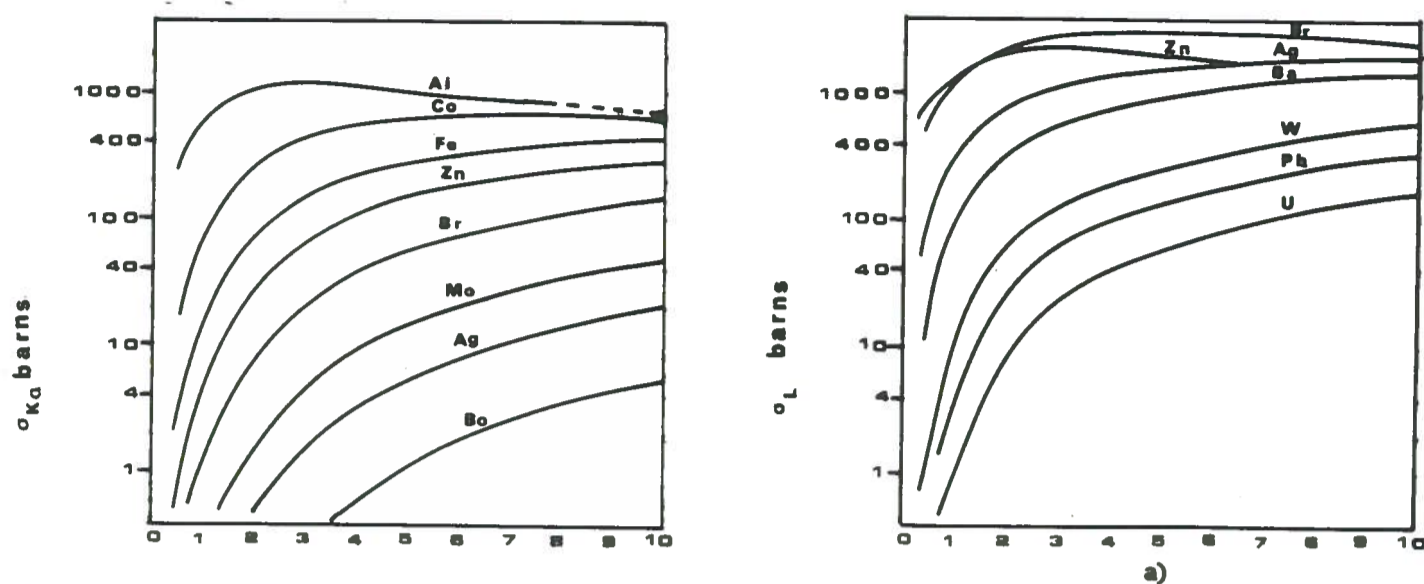


FIG. 3 - Sezioni d'urto di produzione di raggi X in funzione dell'energia dei protoni incidenti per vari elementi relative alle righe a) K e b) L.

Contributi minori al fondo sono dovuti all'effetto Compton di radiazioni gamma prodotte in reazioni nucleari e alla bremsstrahlung del proiettile.

Il limite di rivelabilità di un elemento, definito dalla relazione $N_X > 3\sqrt{B}$

N_X = numero di X nel picco caratteristico

B = numero di X di fondo sotto al picco

dipende dalle condizioni sperimentali (angolo solido e efficienza del rivelatore, tipo di matrice, spessore di assorbitore) e può essere calcolato o misurato.

In Fig. 4 sono riportati i limiti di rivelabilità, nel caso di protoni incidenti al variare del numero atomico Z del bersaglio e per X emessi dalla shell K ed L. Come si vede, è possibile migliorare il limite di rivelabilità, entro certi limiti, scegliendo opportunamente l'energia del fascio incidente e, per Z elevati, analizzando le righe L.

Qualora gli X di interesse abbiano tutti energia elevata, l'uso di un assorbitore di spessore opportuno davanti al rivelatore permette di diminuire in misura maggiore l'efficienza di rivelazione per le basse energie. La sensibile riduzione della bremsstrahlung, che si ottiene in tal modo, permette di aumentare l'intensità del fascio incidente e di conseguenza la resa degli X di interesse senza provocare l'affollamento del rivelatore. D'altra parte, la necessità di una finestra sul vuoto del rivelatore impedisce la rivelazione di X di energia di circa 2 KeV, con conseguente impossibilità

di misurare gli elementi di $Z \leq 13$.

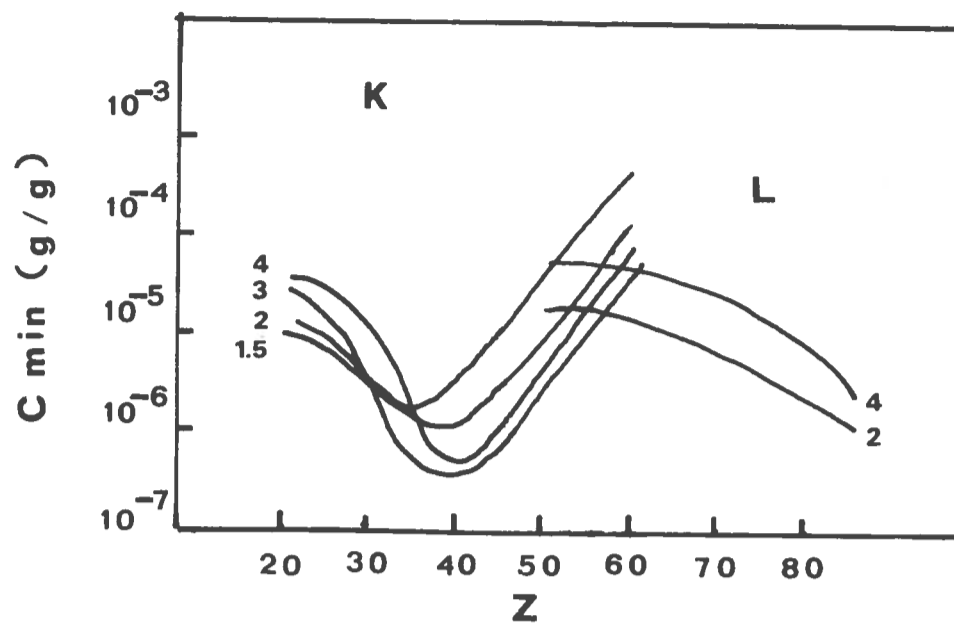


FIG. 4 - Concentrazione minima rivelabile in funzione del numero atomico degli elementi, al variare dell'energia in MeV dei protoni incidenti.

Le dimensioni del fascio incidente determinano la risoluzione spaziale delle misure. Non sono, in pratica, possibili misure di concentrazione a diverse profondità del campione.

4.3. - Misure assolute e relative

La resa in X (Y_x) relativa ad una massa per $\text{cm}^2 (T_A)$ di un dato elemento di numero di massa A é espressa da:

$$Y_x = \frac{\epsilon \Omega N_o}{4 \pi A} \sigma_x T_A N_p$$

in termini di sezioni d'urto del processo (σ_x), efficienza di rivelazione ($\frac{\epsilon \Omega}{4 \pi}$) (incluso l'assorbimento del materiale interposto tra bersaglio e rivelatore) e flusso delle particelle incidenti N_p .

La misura della resa, dell'efficienza e del flusso permette una determinazione assoluta delle quantità presenti, una volta nota la sezione d'urto. Tuttavia, allo scopo di migliorare l'accuratezza delle misure, si preferisce utilizzare un metodo relativo nel quale si definisce un fattore di resa R per unità di massa dell'elemento in istudio:

$$R = \frac{Y_x A}{T_A N_o} = \frac{\epsilon \Omega}{4 \pi} N_p \sigma_x$$

nelle stesse condizioni sperimentali prescelte per le determinazioni sui campioni incogniti. In pratica, la determinazione di R viene fatta misurando le rese relative a quantità note, dell'elemento in esame, aggiunte allo stesso tipo di matrice. La misura del flusso di particelle incidenti, non sempre agevole, viene generalmente sostituita con l'introduzione nella matrice di uno standard di normalizzazione.

4.4. - Preparazione dei bersagli

I campioni, se solidi, possono essere analizzati senza alcuna manipolazione tramite una misura assoluta. Se sono liquidi, o riducibili a fase liquida, possono essere depositati su supporti sottili (filtri) ed essiccati, ovvero liofilizzati e mescolati con sostanze inerti e conduttrici (grafite, ad esempio) per ottenere bersagli sotto forma di pastiche.

E' importante assicurare una buona conducibilità termica ed elettrica del bersaglio per limitare il riscaldamento, che può produrre il deterioramento e/o l'evaporazione differenziale degli elementi, e il caricamento elettrico che produce un aumento del fondo di bremsstrahlung di energia elevata. Infatti la tensione di decine di kV che può raggiungere il bersaglio carico accelera gli elettroni circostanti durante la scarica.

Nel caso di campioni in forma liquida, é possibile migliorare la sensibilità con metodi chimici di preconcentrazione selettiva. In tal caso si perde la possibilità di compiere determinazioni multielementali, cosa che é, altrimenti, sempre possibile.

5. - ANALISI PER ATTIVAZIONE PROTONICA (PAA)

5.1. - Processo fisico

Il metodo consiste nel produrre un nucleo instabile, tramite una reazione nucleare indotta da protoni su un isotopo dell'elemento di interesse. L'analisi successiva della radiazione gamma, emessa nel decadimento del nuclide instabile, permette l'identificazione dell'elemento di partenza e la misura della sua concentrazione.

Il numero di di decadimento misurati é dato da

$$N_{\gamma} = \alpha \frac{\epsilon \Omega}{4 \pi} \sigma \frac{N_A^m}{A_x} \Phi_p \tau (1 - e^{-t_i/\tau}) (1 - e^{-t_m/\tau}) (1 - e^{-t_w/\tau})$$

α = percentuale della transizione γ per ogni decadimento

ϵ = efficienza del rivelatore

Ω = angolo solido sotteso dal rivelatore

σ = sezione d'urto di produzione del nuclide radioattivo

m_x, A_x = massa e numero di massa dell'elemento

ϕ_p = flusso di protoni incidenti

τ = vita media del nuclide radioattivo

t_i = tempo di irradiazione

t_w = tempo di attesa

t_m = tempo di misura (dello spettro di decadimento)

In linea di principio il metodo é sensibile a tutti gli elementi, data la grande varietà di reazioni nucleari disponibili; può essere multielementale a condizione che i parametri sperimentali siano selezionati opportunamente.

5.2. - Scelta dei parametri

Si possono dare alcuni criteri guida che peraltro vanno vagliati caso per caso, per ogni elemento di interesse e, soprattutto, per ogni matrice in istudio.

Si deve selezionare

- 1)-isotopo dell'elemento di interesse
- 2)-tipo di reazione
- 3)-energia del fascio
- 4)-tempi di irradiazione, di attesa e di misura

tenendo presente le seguenti richieste:

- 1)-che l'isotopo di partenza sia abbondante
- 2)-che il nuclide radioattivo prodotto abbia vita media sufficientemente lunga da consentire la riduzione del fondo dovuto a nuclidi con vite medie brevi, ma non così lunga da limitare la resa dei γ emessi
- 3)-che non vi sia interferenza tra le righe γ di interesse e quelle dovute a fondo prodotto da altre reazioni e/o ambientale
- 4)-che l'energia del fascio sia, possibilmente, sotto la soglia per reazioni su elementi contaminanti, ma permetta una elevata resa per quella di interesse. Tipicamente si utilizzano energie di protoni di qualche decina di MeV.

Gli intervalli di tempo t_i , t_w e t_m determinano l'intensità dei γ misurata e possono essere utilizzati per migliorare il rapporto segnale-fondo.

I limiti di rivelabilità sono strettamente legati all'elemento e alla matrice specifici e alla scelta di realizzare, o meno, misure multielementali; sostanzialmente variano tra 5-10 parti per milione (ppm) e 10^{-3} ppm.

5.3. - Misure assolute e relative

Anche con questa tecnica generalmente si preferisce prescindere dalla misura delle sezioni d'urto, dell'efficienza e del flusso di protoni. La calibrazione si ottiene, come nel caso del metodo PIXE, dalla misura della resa in γ corrispondente ad aggiunte di quantità note dell'elemento in istudio e la normalizzazione al flusso incidente mediante l'introduzione di uno standard.

5.4. - Preparazione dei bersagli

I problemi che si incontrano, e i modi di affrontarli, sono analoghi a quelli già descritti per il metodo PIXE. Va menzionata la possibilità di separazione radiochimica che permette di migliorare la sensibilità e l'accuratezza del metodo.

6. - ANALISI DI RADIAZIONE PRONTA (PRA)

6.1 - Processo fisico

Il metodo consiste nel misurare, sotto fascio, la radiazione γ o le particelle emesse a seguito di reazioni nucleari prodotte da particelle cariche su un isotopo dell'elemento in esame.

Come per i metodi precedentemente descritti, dalla resa della radiazione emessa si può risalire alla concentrazione dell'elemento di interesse tramite misure assolute o relative. Inoltre, questo metodo presenta il vantaggio di permettere la determinazione di profili di concentrazione in profondità.

Questa possibilità si basa sul fatto che le caratteristiche (intensità e/o energia) della radiazione emessa dipendono dal sito dove avviene la reazione. Infatti, lo spessore attraversato influenza sia l'energia a cui avviene la reazione sia l'energia delle particelle cariche emesse.

Particolarmente utili per la determinazione delle concentrazioni medie e dei profili di concentrazione sono le reazioni risonanti. In questo caso l'andamento con l'energia della sezione d'urto è espresso da:

$$\sigma(E) = \sigma_0 \frac{\Gamma^2/4}{(E-E_R)^2 + \Gamma^2/4}$$

dove E_R è l'energia di risonanza, Γ è la larghezza totale della risonanza a mezza altezza e σ_0 è il valore della sezione d'urto all'energia di risonanza. Pertanto, in queste reazioni si hanno notevoli variazioni di resa in corrispondenza di piccole variazioni di

energia, il che determina una buona risoluzione in profondità.

6.2. - Scelta dei parametri

Per quanto riguarda la scelta della reazione e dell'isotopo valgono considerazioni generali analoghe a quelle illustrate per l'attivazione indotta da particelle cariche. Naturalmente i parametri legati alla vita media (t_i , t_w e t_m) non possono essere usati per discriminare gli elementi interferenti. Si deve invece tener conto del meccanismo nucleare, che determina la reazione, per la scelta dell'energia della particella incidente e dell'angolo di rivelazione della radiazione da analizzare. Esistono numerose reazioni utili, a energia di qualche MeV, indotte da protoni, fotoni, deutoni e particelle alfa.

L'energia di risonanza, essendo caratteristica di una particolare reazione, può servire per identificare un elemento nel campione in presenza di interferenze dovute ad altri elementi. Nel caso di misure in profondità la risoluzione dipende da vari fattori (perdita di energia per unità di percorso, allargamento cinematico, risoluzione del rivelatore, etc.) e dall'andamento della sezione d'urto in funzione dell'energia.

In generale la sensibilità di questo metodo per l'analisi quantitativa del contenuto medio sul volume di un dato elemento è inferiore a quella degli altri metodi (PIXE e PAA), ma ciò è compensato dalla possibilità di ottenere informazioni in profondità.

E' possibile eseguire la PRA contemporaneamente all'analisi col metodo PIXE, in modo da avere anche informazioni sugli elementi leggeri.

6.3. - Misure assolute e relative

Per la misura di concentrazioni medie valgono le stesse considerazioni fatte per il PIXE e il PAA.

Per misure relative di profili di concentrazione si usa uno standard a concentrazione costante dell'elemento e con un potere frenante (dE/dx) il più possibile simile a quello del campione da esaminare.

6.4. - Reazione $^{19}\text{F}(p,\alpha)^{16}\text{O}$

Come illustrazione del metodo, esaminiamo il caso della reazione $^{19}\text{F}(p,\alpha)^{16}\text{O}$ utilizzata dal gruppo di Catania per misure in profondità della concentrazione di fluoro nei denti⁽¹⁾.

La sezione d'urto per questa reazione presenta una risonanza ad $E_p = 1.35$ MeV ($\Gamma = 45$ keV) con una resa a 150° sei volte maggiore rispetto al valore praticamente costante nell'intervallo $E_p = 1.1 \div 1.3$ MeV. Le particelle α emesse hanno un'energia di 6.93 MeV.

Nella Fig. 5 sono riportati gli spettri delle particelle α , all'energia di risonanza, ottenuti sia con bersaglio spesso che con uno sottile di CrF_3 .

L'energia massima misurata delle particelle α é di 3950 KeV tenuto conto della perdita di energia subita nell'attraversare un assorbitore di mylar di $27 \mu\text{m}$ posto davanti al rivelatore allo scopo di fermare i protoni diffusi elasticamente.

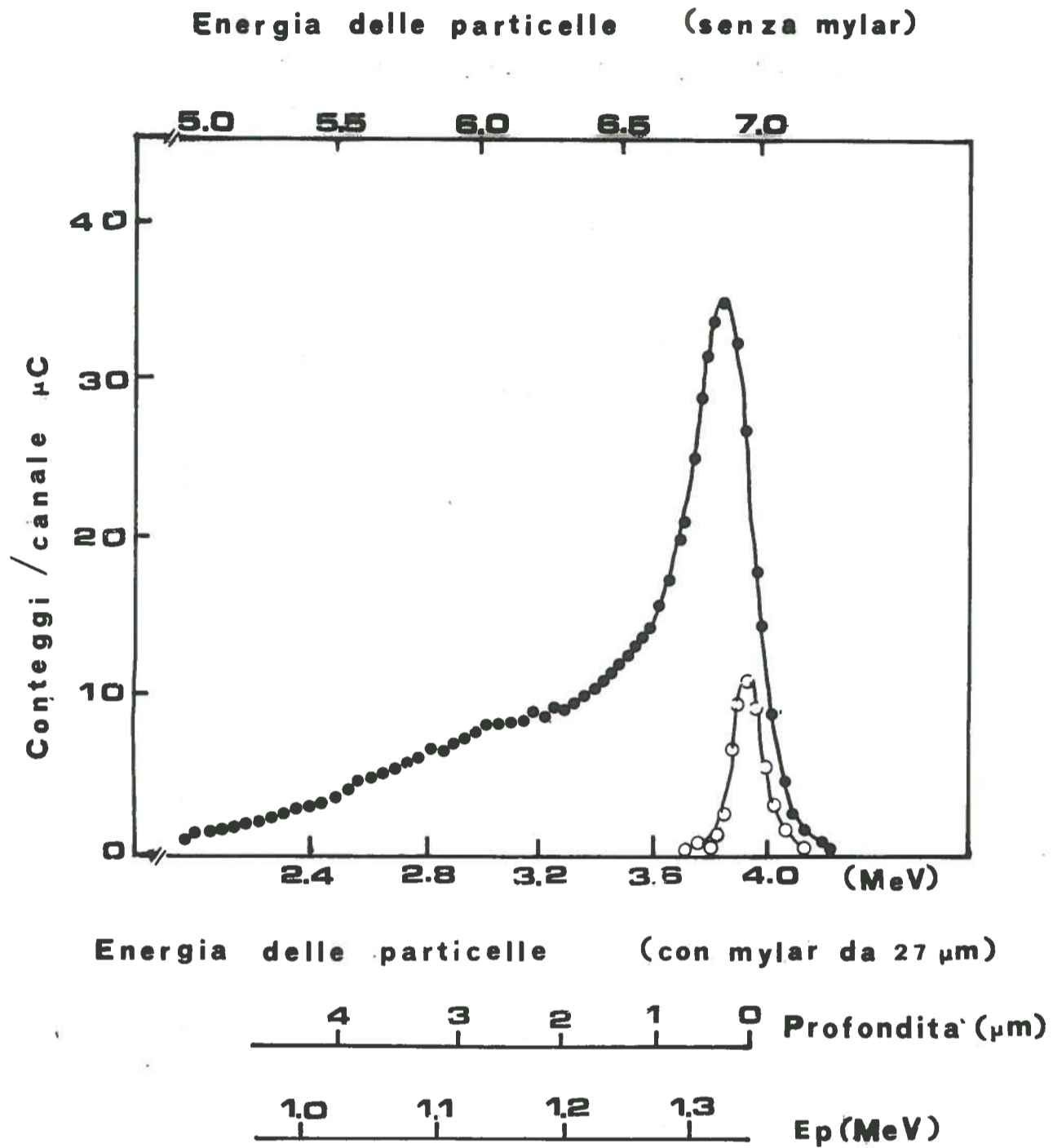


FIG. 5 - Spettri delle particelle α emesse nella reazione $^{19}\text{F}(p,\alpha)$ all'energia incidente $E_p = 1.35 \text{ MeV}$ da parte di un bersaglio spesso (\bullet) e di uno sottile (\circ) di CrF_3 . Sono anche presentate le scale in profondit  ed in energia dei protoni incidenti in corrispondenza alla scala dell'energia delle particelle.

Lo spettro ottenuto con bersaglio sottile permette di stabilire l'origine della scala di profondità poiché lo strato è sufficientemente sottile da poter trascurare la perdita di energia in esso da parte dei protoni incidenti e delle particelle α uscenti.

Dalle energie delle particelle α misurate con il campione spesso si ricava la scala di profondità tramite la relazione

$$E_{\alpha_{\text{mis}}} = E_{\alpha_0} - \int_0^{x/\cos\phi} S_{\alpha t} dx - \int_0^{x_m} S_{\alpha m} dx$$

dove

$$E_{\alpha_0} = 6930 \text{ KeV}$$

$$\phi = \text{angolo di rivelazione (150^\circ)}$$

x_m = spessore (27 μm) di mylar posto davanti al rivelatore per eliminare il fondo di protoni diffusi

$S_{\alpha t}, S_{\alpha m}$ = potere frenante ($\text{KeV}/\mu\text{m}$) per α del bersaglio e del mylar.

Successivamente ad ogni profondità può essere associata l'energia posseduta dai protoni incidenti in quel punto. Infine dal confronto del contenuto canale per canale tra lo spettro ottenuto misurando lo standard e quello ottenuto misurando il campione incognito, si può ricavare la concentrazione $|C_t(x)|$ del campione, in funzione della profondità x tramite la relazione

$$C_t(x) = C_s \frac{h_t / Q_t}{h_s / Q_s} \frac{S_{\alpha t}}{S_{\alpha s}}$$

h_t, h_s = altezze nello spettro da campione e da standard, misurate alle profondità x_s e x_t dove i protoni hanno la stessa energia

Q_t, Q_s = carica totale del fascio incidente per il campione e per lo standard

$S_{\alpha t}, S_{\alpha s}$ = Potere frenante, per particelle α , del campione e dello standard

In campioni di denti (v. par.7) si sono misurate concentrazioni di fluoro ad una profondità di 4.6 μm con una sensibilità di 0.3 μm . La minima concentrazione rivelabile è risultata 300 ppm.

7. - MISURE DEL GRUPPO DI CATANIA

Il gruppo del Dipartimento di Fisica dell'Università di Catania é impegnato in problematiche in campo odontoiatrico, in collaborazione con ricercatori della Clinica Odontoiatrica della stessa Università.

I metodi di analisi utilizzati sono il metodo PIXE per la determinazione della composizione elementale di denti, saliva e tartaro e la PRA per la misura della concentrazione di fluoro in profondità nei denti, tramite la reazione $^{19}\text{F}(p,\alpha)^{16}\text{O}$.

Le ricerche sono svolte utilizzando l'acceleratore Van de Graaff da 2 MeV dell'Università di Catania.

Sono state osservate alterazioni dei livelli di selenio, calcio e fluoro in denti cariati rispetto a denti sani e misurati i profili di concentrazione in profondità nello smalto di denti sani e fluorotici^(1,2).

E' stata determinata la composizione del tartaro salivare ed ematico, senza osservare nessuna differenza significativa tra essi. I risultati sono stati confrontati con le diverse teorie esistenti sulla formazione del tartaro⁽³⁾.

E' stato misurato il livello di piombo in denti decidui, in relazione al problema più generale dei livelli di Pb nei bambini, indotti dalla contaminazione ambientale. Nel 30% dei campioni misurati (6 su 16) si sono trovate quantità significative di Pb⁽⁴⁾.

8. - MISURE DEL GRUPPO DI MILANO

Il gruppo del Dipartimento di Fisica dell'Università di Milano é impegnato nello studio della correlazione dei contenuti sierici di zinco con particolari stati patologici in bambini⁽⁵⁾, in collaborazione con la Clinica Pediatrica dell'Università, e nella messa a punto del metodo dell'attivazione protonica per l'analisi, multielementale e non, di campioni di siero, per elementi poco studiati (Cd, Ti, Sr).

Le ricerche sono svolte utilizzando il Ciclotrone AVF dell'Università di Milano.

Nella Tabella 1 sono riportate le reazioni (p,n) e (p,2n) utilizzate per l'analisi di alcuni elementi, con le caratteristiche e i valori scelti per i parametri. Si noti come l'isotopo e i tempi selezionati siano diversi a seconda della scelta, fatta a priori, di analisi multielementale o di elemento singolo.

TABELLA 1

Isotopo	Abbondanza relativa	Reazione nucleare	Nucleo radioattivo	Linee (KeV) (h)	Vita media (h)	T _i (h)	T _w
Zn ⁶⁶	27.81	p,n	Ga ⁶⁶	1039.4	13.70	0.8	12
Cd ¹¹¹	12.75	p,n	In ¹¹¹	245.3	97.92	5	71
Ti ⁴⁸	73.94	p,n	V ⁴⁸	983.5	552.96	5	310
				1311.9			
Cu ⁶³	69.09	p,2n	Zn ⁶²	548.4	13.7	3	18
Fe ⁵⁶	91.66	p,2n	Co ⁵⁵	1408.3	26.25	3	18
Se ⁷⁸	23.52	p,2n	Br ⁷⁷	238.9	82.23	3	24
Sr ⁸⁸	82.56	p,2n	Y ⁸⁷	338.4	115.84	3	47
				484.8			
Zn ⁶⁸	18.57	p,2n	Ga ⁶⁷	184.6	115.53	3	18

Nella Tabella 2 sono indicati gli elementi e i loro isotopi, selezionati come elementi di riferimento per misure relative. Anche tale scelta dipende dall'elemento da analizzare e dal tipo di reazione prescelta.

TABELLA 2

Isotopo	Abbondanza relativa (%)	Reazione nucleare	Nucleo radioattivo	Linee (KeV) (h)	Vita media (h)
Cd ¹¹⁰	12.39	p,n	In ¹¹⁰	884.7	4.9
Sn ¹²⁰	32.85	p,n	Sb ¹²⁰	1023.2	200.86
Cr ⁵³	9.55	p,2n	Mn ⁵²	744.1	197.28

I valori misurati⁽⁶⁾ della concentrazione sierica di alcuni elementi sono riportati nella Tabella 3. Da notare che per alcuni di essi (Ti, Cd e Sr) esistevano in letteratura solo determinazioni grossolane o semplici stime.

TABELLA 3

Elemento	Contenuto in siero($\mu\text{g/ml}$)
Cd	0.025 ± 0.005
Ti	0.090 ± 0.009
Cu	0.57 ± 0.06
Fe	1.69 ± 0.31
Se	0.19 ± 0.06
Sr	0.076 ± 0.008
Zn	1.45 ± 0.14

Sono stati misurati i livelli di zinco nel siero di bambini normali, diabetici e con scarso accrescimento corporeo. Si é trovato che i bambini diabetici hanno un contenuto medio di zinco nel siero ($1,32 \pm 0,20$ ppm) significativamente minore di quello dei bambini normali ($1,65 \pm 0,40$ ppm). Il contenuto di zinco in bambini con scarso accrescimento ($1,74 \pm 0,49$ ppm) é risultato invece essere nella norma.

9. - MISURE DEL GRUPPO DI NAPOLI

Il gruppo dell'Istituto di Fisica Sperimentale dell'Università di Napoli é impegnato in ricerche sul ruolo di alcuni oligoelementi, in particolare lo zinco, nell'accrescimento dei neonati e in patologie croniche dell'infanzia. Tali ricerche sono svolte in collaborazione con ricercatori della Clinica Pediatrica della 1^a Facoltà di Medicina e Chirurgia.

Le determinazioni sono state eseguite nel plasma e nei capelli con il metodo PIXE utilizzando l'acceleratore Tandem da 3 MV dell'Università di Napoli.

Il ruolo dello zinco come fattore di accrescimento é stato analizzato misurando le concentrazioni plasmatiche a 10 giorni di vita e dopo 120 giorni di alimentazione controllata con una formula arricchita in zinco ($450 \mu\text{g/dl}$, da confrontare con il contenuto del latte materno dell'ordine di $200 \mu\text{g/dl}$).

Si é trovato^(7,8) un diverso andamento dei contenuti plasmatici di zinco in funzione dell'età gestazionale tra i neonati di peso appropriato e quelli di basso peso (relativamente all'età gestazionale). Ciò dimostra che l'im maturità limita l'assorbimento di zinco e può quindi provocare patologie indotte da carenze di zinco. Non si é trovata

invece correlazione tra accrescimento corporeo (peso, lunghezza, pliche cutanee e circonferenza cranica) ed assorbimento di zinco.

Il ruolo dello zinco come fattore immunitario é stato studiato misurando la concentrazione nel siero e nei capelli in un gruppo di bambini affetti da patologie croniche (asma ed eczema atopico) e per confronto in un gruppo di bambini sani.

Si é trovato che il contenuto medio di zinco nei capelli dei soggetti affetti da asma ed eczema (102 ± 10 ppm) é significativamente minore del contenuto medio (156 ± 14 ppm) in bambini sani⁽⁹⁾. Una simile differenza non é stata invece rivelata nel siero degli stessi soggetti. Ciò indica che sangue e capelli riflettono, almeno in questo caso, il carico corporeo degli oligoelementi in modo diverso.

La tecnica usata prevede la preparazione di bersagli spessi ottenuti liofilizzando il siero (o il plasma) dopo aggiunta degli elementi di calibrazione e dello standard di riferimento. I capelli sono stati prima digeriti con una soluzione di acido nitrico e perclorico, per rendere omogeneo il mescolamento con gli standard di calibrazione, e successivamente liofilizzati. I bersagli sono stati resi conduttori mescolando il campione con grafite, prima della preparazione delle pasticche.

Sfruttando la multielementalità del metodo é stato misurato il contenuto di piombo nel siero e nei capelli degli stessi soggetti. I risultati trovati saranno utilizzati nell'ambito di un'analisi di correlazione tra livelli corporei di piombo e ambiente di vita. E' questo un problema che comincia ad essere seriamente considerato. A titolo indicativo si riporta l'osservazione, fatta nel 1980 in USA, che il 4% dei bambini in età prescolare avevano concentrazioni di Pb, nel sangue intero, maggiori del limite accettato di 0.3 ppm ⁽¹⁰⁾, corrispondente a 0.06 ppm nel siero.

Nei soggetti analizzati a Napoli, mentre si sono trovate concentrazioni inferiori al limite di rivelabilità (0.01 ppm) nel plasma dei neonati, si sono osservati valori notevolmente maggiori, alcuni anche al di sopra del citato limite, in bambini di età scolare. Livelli medio-alti, relativamente ai valori trovati negli USA⁽¹¹⁾, sono stati osservati anche nei capelli. Nella Fig. 6 sono riportati alcuni risultati preliminari dei contenuti di piombo nel siero e nei capelli di bambini tra 3 e 12 anni di età.

10. - MISURE DEL GRUPPO DI PADOVA

Il Gruppo del Dipartimento di Fisica dell'Università di Padova é impegnato da lungo tempo in ricerche sul ruolo di alcuni oligoelementi, in particolare del selenio in oncologia, in collaborazione con ricercatori dell'Istituto di Patologia Medica di Padova

e Verona. Le determinazioni sono eseguite nel siero, con il metodo PIXE, utilizzando l'acceleratore Van de Graaff da 2 MeV dei Laboratori Nazionali di Legnaro dell'INFN.

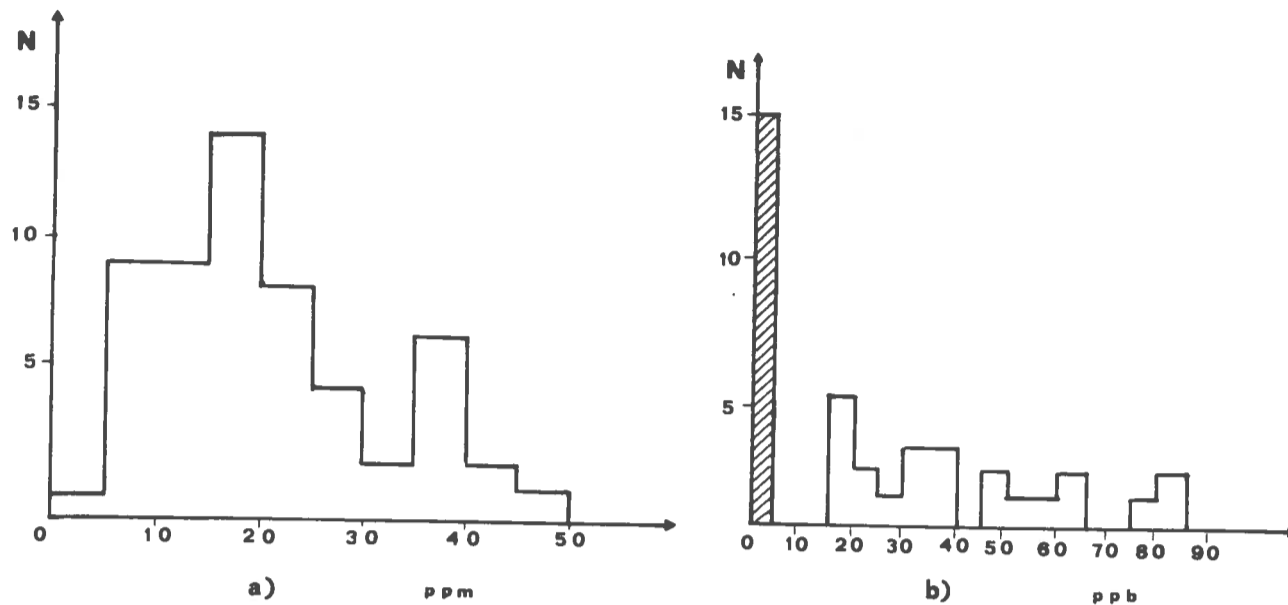


FIG.6 - Contenuto di piombo nei capelli (a) e nel siero (b) di bambini tra 3 e 12 anni di età. Il limite di rivelabilità è di 10 ppm nei capelli e di 15 ppb nel siero. La zona tratteggiata in (b) corrisponde ai campioni nei quali non si è osservata presenza di piombo.

Tra le problematiche affrontate di particolare rilevanza è quella della correlazione dei livelli ematici di selenio a stati tumorali. Il selenio, considerato inizialmente come tossico è ora riconosciuto giocare un ruolo biologico essenziale. E' il componente dell'enzima glutation perossidasi e ci sono indicazioni che abbia un ruolo protettivo sull'insorgere di stati tumorali.

Il contributo del gruppo di Padova⁽¹²⁾ è stato di aver evidenziato la correlazione diretta tra livelli di selenio e attività di detto enzima. E' stata inoltre dimostrata⁽¹³⁾ la presenza di livelli di selenio, in soggetti affetti da leucemia linfocitica cronica (0.052 ± 0.007 ppm) significativamente più bassi dei livelli in individui sani (0.079 ± 0.003 ppm).

La piccola differenza di concentrazione esistente tra livelli di tossicità e di deficienza, ha indicato la necessità di migliorare il metodo per renderlo più veloce, affidabile e sensibile. Si è ricorsi a un metodo di preconcentrazione chimica⁽¹⁴⁾ avente lo scopo di eliminare il bromo che emette X di energia prossima a quelli del selenio. Si utilizza il tellurio come precipitante e standard interno. Il precipitato viene raccolto

su filtro e misurato. In tal modo la minima quantità rivelabile di selenio é dell'ordine di 10^{-3} ppm con volumi di siero dell'ordine del millilitro.

Il gruppo é attualmente impegnato in un ampio programma di ricerca sulla distribuzione degli oligoelementi nel cervello e nel liquido cefalo-rachidiano in soggetti deceduti per cause non neurologiche e in soggetti deceduti per cause neurologiche, in particolare neoplasie cerebrali.

11. - CONCLUSIONI

I metodi nucleari qui descritti, per la determinazione degli elementi in traccia presentano una notevole potenzialità purché siano mantenuti e sviluppati ad un elevato livello tecnologico. In particolare la realizzazione di un fascio di protoni di dimensioni trasverse dell'ordine del micron e l'uso combinato del metodo PIXE con altri metodi (Rutherford backscattering e reazioni nucleari) permette la misura di profili di concentrazione in superficie e in profondità e un'analisi multielementale più completa.

La precisione dei metodi va tenuta sotto controllo, soprattutto per quanto riguarda i valori assoluti dei risultati, per mezzo di misure di intercalibrazione, tra metodi e tra laboratori, e con l'impiego di campioni standard.

E' necessario procedere alla stesura di protocolli adeguati e verificati per la preparazione dei bersagli. Tale problema é di soluzione non banale per la diversità dei tessuti, degli elementi e delle concentrazioni da analizzare.

Per quanto riguarda le prospettive scientifiche, esse sono molto ampie ed interessanti, data la varietà dei problemi aperti in campo biomedico. Negli ultimi anni lo studio degli elementi in traccia ha subito un'evoluzione così rapida e diversificata da rendere necessario, oltre che opportuno, un coordinamento almeno a livello nazionale. Tra l'altro, anche a livello internazionale sono già in progetto iniziative per rendere più facile lo scambio di informazioni e più coerenti gli sforzi.

12. - BIBLIOGRAFIA

- (1) L.Torrise, K.L. Sheng, G.Rapisarda, G.Foti:"Depth distribution of fluorine in enamel teeth by $^{19}\text{F}(p,\alpha)^{16}\text{O}$ reaction", Preprint 1984
- (2) E.Rapisarda, L.Torrise:"Analisi quantitativa del selenio presente nello smalto di denti umani sani e cariati eseguita con il metodo PIXE", Minerva stomatologica 32, 1 (1983)
- (3) E.Rapisarda, F.Sortino, L.Torrise:"Indagine qualitativa e quantitativa sugli elementi costituenti il tartaro", Stomatologia Mediterranea, 3, 385 (1983)
- (4) L.Torrise e R.Rapisarda:"Analisi fisica per la ricerca del piombo disperso nei denti decidui e permanenti", Preprint 1984
- (5) M.C.Cantone, N.Molho, L.Pirola:"Trace elements in biological samples by proton

- nuclear activation", Clin.Phys.Physiol.Meas. 3, 67(1982)
- (6) M.C.Cantone, N.Molho, L.Pirola:"Determination of Cadmium and Titanium in human serum by proton nuclear activation", INFN/TC 82/3
- (7) G.Gialanella, R.Moro, G.F.Grossi, L.Perrone, F.Rea, R.Di Toro:"Livelli plasmatici di zinco in lattanti nati pretermine alimentati con formula arricchita", Aggiornamento Pediatrico 34, 1(1983)
- (8) R.Di Toro, C.Moro, L.Perrone, F.Rea, G.Gialanella, G.F.Grossi, R.Moro:"Postnatal dependence of plasma copper and zinc levels on gestational age and maturity observed in infants fed a high zinc content formula", J. Ped. Gastr. Nutr. (in press)
- (9) R.Moro, G.Gialanella:"Thick target PIXE analysis of serum and hair in children", Proceeding of International Symposium on three-day in depth review on the nuclear accelerator impact in the interdisciplinary field, Legnaro May 30th-June 1st 1984
- (10)J.S.Lin-Fu:"Children and Lead. New findings and concerns", New Engl. J. Medic. 307, 615(1982)
- (11)J.M. McKenzie:"Alteration of the zinc and copper concentration of hair", Am. J. Clin. Nutr. 31, 470, 1978
- (12)G.Perona, R.Cellerino, G.C.Guidi, G.Moschini, B.M.Stievano, C.Tregnaghi:"Erythrocytic Glutathione Peroxidase: its relationship to plasma Selenium in man", Scand. J. Haematol. 19, 116 (1977)
- (13)P.Colautti, G.Moschini, B.M.Stievano, L.Tomio, F.Calzavara, G.Perona:"Serum Selenium levels in malignant lymphoproliferative diseases", Scand. J. Haematol. 24, 63(1980)
- (14)G.P.Busso, P.Colautti, G.Moschini, H.Xusheng, B.M.Stievano: "High Sensitivity PIXE determination of Selenium in biological samples using a preconcentration technique", Nucl. Instr. Meth. B3, 177 (1984).