



LNF-04/ 09 (P)
6 Maggio 2004

**ACQUA PESANTE (D₂O) IRRADIATA:
DAL REATTORE NUCLEARE ALLA CELLULA**

C. Catena¹, D. Pomponi², G. Trenta², F. Celani³, P. Marini⁴,
G. De Rossi⁵, E. Righi²

¹ *Divisione BIOTEC-MED, Centro Ricerche Casaccia, ENEA*

² *Gruppo INTRABIO, LNF – INFN*

³ *Gruppo FREEDOM, LNF - INFN*

⁴ *Soc. EURESYS, Via Lero 40, Roma*

⁵ *Divisione di Ematologia, Ospedale Bambino Gesù, Roma*

Parole chiave: acqua pesante, D₂O, letalità cellulare, apoptosi, radiolisi
Key words: heavy water, D₂O, cellular lethality, apoptosis, radiolysis

*Submitted to
Rivista "Il Nuovo Saggiatore"*

Riassunto

Ricerche effettuate per spiegare la forte variabilità del pH di D₂O utilizzata nell'iper caricamento del Deuterio nel Palladio e le cause della scomparsa del Mercurio introdotto per colmare le microinfrazioni dei filamenti del Palladio stesso hanno portato alla scoperta di due nuove specie batteriche denominate: *Ralstonia detusculanense* e *Stenotrophomonas detusculanense* che sono risultate responsabili delle anomalie rilevate. Si è proceduto pertanto ad eliminare gli inconvenienti irraggiando D₂O con alte dosi di radiazioni gamma. Queste osservazioni hanno fornito una solida giustificazione per avviare uno studio sperimentale comparativo sugli effetti biologici di D₂O come tale e irraggiata con alte dosi. La ricerca ha chiaramente dimostrato il forte incremento dell' effetto biologico di D₂O irraggiata rispetto a quello prodotto da D₂O non irraggiata. La maggiore efficacia della D₂O irraggiata è stato valutato attraverso la misura della riduzione della sopravvivenza cellulare e dell'entità dell'apoptosi. Esperienze congiunte hanno dimostrato che H₂O irraggiata presenta nel tempo una perdita di efficacia maggiore rispetto a quella manifestata dalla D₂O irraggiata. Dalle osservazioni sperimentali raccolte emerge il quesito su quali possano essere i meccanismi che inducono un danno cellulare letale a basse concentrazioni di D₂O irraggiata con alte dosi e in particolare sull'esistenza di radicali liberi deuterati e sulla possibilità di un loro diverso coinvolgimento biologico. Un ulteriore aspetto emerso in questo studio riguarda la lunga persistenza nel tempo dell'elevata capacità citotossica di D₂O irraggiata. Questo aspetto del comportamento "radiomimetico" di D₂O irraggiata giustifica l'estensione della sperimentazione nei riguardi dei composti molecolari prodotti dall'irraggiamento (ROS o altre molecole) da condurre tramite metodologie chimico-fisiche, anche allo scopo di acquisire utili indicazioni sui meccanismi di interazione cellulare nel campo specifico.

Summary

Researches carried out to justify the strong pH variability of D₂O utilized to overloading deuterium in palladium and to investigate the reason for the disappearance of mercury dispersed in the electrolytic solution to patch the microslit of palladium wires, led us to a discovery of a new bacterial species, we named: *Ralstonia detusculanense* e *Stenotrophomonas detusculanens*; they turned out to be responsible of the noticed anomalies. Therefore, to remove these inconveniences, we sterilized the D₂O using high doses of gamma radiation. All this was a solid justification to start an experimental study to compare the biological effects of D₂O not irradiated and irradiated at high doses. This research clearly demonstrated a greater increase of the biological effects due to irradiated with respect to the non irradiated heavy water. This greater effectiveness was evaluated by means of the cell survival reduction and of the apoptosis increase. At the same time the experiment indicates that normal irradiated water loss in time hits efficacy in a greater extent with respect to the heavy irradiated water. Looking at the experimental results the question comes out on what mechanisms could be responsible of the cellular lethal damages at low concentrations of heavy irradiated water. We are pointing out our attention on deuterated free radicals and on the possibility of their implications in some biological structures or processes. A further aspect that came out was the persistence in the long run of the high cytotoxic efficacy of irradiated D₂O. This "radiomimetic" behaviour of irradiated D₂O is justifying the experimental extension to the molecular compounds produced by irradiation (ROS or/and other molecules); we intend reach this aim through chemical-physical methodologies and, at the same time, we hope also to obtain useful indications on cellular interaction mechanisms involved in the specific field of cancer cell lethality.

Introduzione

L'acqua pesante (D_2O) ha avuto il suo largo impiego con lo sviluppo dei reattori nucleari a fissione. Infatti, D_2O , come la grafite, associa le due caratteristiche fisiche necessarie per facilitare il sostentamento della reazione nucleare di fissione in maniera controllata: a) buona capacità di rallentare la velocità dei neutroni (moderazione); b) bassa probabilità di assorbimento dei neutroni (Box 1).

Il Deuterio è l'isotopo stabile dell'Idrogeno (l'isotopo radioattivo è il Trizio). Nell'acqua pesante l'Idrogeno è sostituito dal Deuterio: D_2O . L'acqua leggera (H_2O) congela a 0° centigradi, passa allo stato di vapore a $100^\circ C$ ed ha un peso specifico di 1. D_2O congela a $3,82^\circ C$, passa allo stato vapore a $101,4^\circ C$ ed ha un peso specifico di 1,104. In natura il Deuterio è in equilibrio con l'Idrogeno nel rapporto di 1:4000 – 1:7000.

Nell'ambito degli studi riguardanti “anomalie” termiche e/o nucleari del sistema Deuterio-Palladio, la cosiddetta “fusione fredda”, uno dei parametri principali necessari per ottenere effetti di interesse scientifico è il valore della concentrazione di Deuterio nel Palladio.

Nei LNF-INFN è stata messa a punto negli ultimi anni una nuova tecnica di “caricamento” elettrolitico dell'Idrogeno nel Palladio, basata sul deposito *in situ* di strati submicrometrici di metalli alcalino-terrosi sul catodo di Palladio filiforme e ultrasottile (Celani et al., 1996). I risultati ottenuti usando H_2O sono stati estremamente interessanti (H/Pd circa 1) e riproducibili. Gli esperimenti sono stati confermati presso qualificati Laboratori nazionali (Pirelli, Centro Ricerche Avanzate, Milano) e internazionali (Stanford Research Institute International, USA).

La stessa metodologia è stata successivamente utilizzata per il caricamento del Deuterio nel Palladio impiegando D_2O . Tale metodologia è risultata, in questo caso, meno efficace. Nella ricerca delle cause di questo fenomeno è stata formulata l'ipotesi non usuale della presenza di microrganismi in D_2O responsabili degli abnormi cambiamenti del pH della soluzione elettrolitica e dell'inefficacia di elettroliti specifici immessi nella soluzione per la formazione del deposito submicrometrico (Stronzio e soprattutto Mercurio).

L'ipotesi è stata confermata dall'isolamento e dall'identificazione di batteri del genere *Ralstonia* e *Stenotrophomonas*. Attraverso tecniche biomolecolari è stato dimostrato che i batteri isolati appartengono a due nuove specie. Con la denominazione di *Ralstonia detusculanense* e *Stenotrophomonas detusculanense** queste due nuove specie batteriche sono state accettate per la registrazione dalle Istituzioni internazionali all'uopo preposte quali la GenBank di Bethesda (USA) e la DNA DataBank Japan (DDBJ) di Mishima (Giappone). I codici di registrazione delle due nuove specie batteriche sono rispettivamente AF 280433 e ABO 45277.

(*) *detusculanense*: de per Deuterio; *tusculanense* in onore dei Laboratori Nazionali di Frascati dell'INFN.

La suddetta scoperta ha portato all'adozione di specifici accorgimenti metodologici che hanno permesso di migliorare la riproducibilità degli esperimenti con D_2O e, più recentemente, di modificare sostanzialmente le procedure di ipercaricamento attraverso l'impiego di nuovi tipi di elettroliti (risultati sperimentali confermati presso il Centro Ricerche Pirelli). Tra gli interventi inizialmente adottati va annoverato l'irraggiamento gamma di D_2O con alte dosi (17kGy) presso l'impianto Calliope (ENEA Casaccia) allo scopo di eliminare la componente batterica evidenziata.

Gli studi finora condotti orientano verso possibili impieghi dei nuovi batteri nel biorisanamento ambientale nei confronti dei metalli pesanti. In particolare, gli esperimenti hanno posto in evidenza che *Ralstonia detusculanense* sopravvive in soluzioni acquose contenenti, in concentrazione millimolare, ioni di Cobalto, Nichel, Cadmio, Piombo e Uranio e per concentrazioni minori, anche ioni Mercurio. Misure effettuate presso il Centro Sviluppo Materiali di Castel Romano hanno mostrato che, dopo 8 ore di coltura, l'Uranio era pressochè scomparso dalla soluzione. Cioè si è constatato che la flora batterica, separata per centrifugazione, aveva accumulato il 99% dell'Uranio originariamente presente.

Nel corso di questo studio i ricercatori del Gruppo INTRABIO (denominato attualmente FREETHAI-DEUTER) hanno rivolto la loro attenzione anche alle molteplici proprietà biologiche di D_2O descritte in letteratura e sulle relative possibilità di impiego biomedico.

Merita precisare al riguardo che fin dalla scoperta di D_2O i suoi effetti biologici sono stati estensivamente studiati, ma raramente approfonditi (Altermatt et al., 1988).

Nello studio degli effetti di D_2O sugli animali, sulle cellule e sui microrganismi vanno considerati sia i "solvent isotope effects" (non metabolici), dovuti alle particolari proprietà di D_2O come solvente; sia i "deuterium isotope effects" dovuti alla sostituzione degli atomi di Idrogeno con atomi di Deuterio nelle molecole biologiche (Kushner et al., 1999). D_2O presenta complessivamente, rispetto a H_2O , una minore proprietà solvente nei confronti di sali e gas e una viscosità maggiore.

D_2O può sostituire, solo in parte, la più abbondante H_2O in organismi biologici inferiori e superiori senza modificarne la sopravvivenza. Al di sopra di una determinata concentrazione, ampiamente variabile tra le diverse componenti biologiche (virus, batteri, eucarioti, tessuti, organi e organismi), si può osservare una interferenza con la normale fisiologia fino ad arrivare ad un effetto letale.

La completa sostituzione di H_2O con D_2O non è compatibile con la vita. Ratti alimentati esclusivamente con acqua pesante, pur avendo un forte apporto idrico, muoiono letteralmente "di sete" (Kushner et al., 1996). D_2O è stata ampiamente usata nelle misure dello "spazio idrico" corporeo nei bambini e negli adulti in varie condizioni di nutrizione e di esercizio fisico (Kushner et al., 1999).

Negli animali da esperimento gli effetti tossici da D_2O comparivano quando il contenuto di Deuterio nel sangue, nei fluidi organici e nei tessuti superava il 20%. Per raggiungere tale

concentrazione un uomo adulto di circa 70 kg di peso dovrebbe bere rapidamente più di 10 litri di D₂O (Kushner et al., 1996).

D₂O e farmaci deuterati sono stati ampiamente usati in studi sul metabolismo dei farmaci e di sostanze tossiche negli animali e nell'uomo. Le forme deuterate dei farmaci hanno dimostrato spesso azioni differenti rispetto alle forme protonate. Alcuni farmaci deuterati mostrano processi di trasporto cellulare diversi. La deuterazione può anche far variare i percorsi metabolici del farmaco (metabolic switching) (Kushner et al., 1999). Livelli non tossici di D₂O riducono in animali di laboratorio l'ipertensione indotta dal NaCl e da etanolo e i danni associati (Vasdev et al., 1993). La conservazione in soluzione con D₂O mostra una capacità biostabilizzante su molecole organiche, macromolecole, virus e vaccini (Chakrabarti et al., 1999).

Per questa sua proprietà D₂O è stata raccomandata per la conservazione di organi, tessuti, proteine o enzimi, preparati del sangue, come pure per la perfusione di organi destinati ai trapianti. D₂O ha anche una capacità crioprotettiva nei confronti di cellule, tessuti e organi conservati a bassa temperatura. Microrganismi che crescono in D₂O possono produrre un gran numero di composti deuterati (Kushner et al., 1999).

D₂O può influenzare a livello cellulare la mitosi e le funzioni di membrana. Alcuni studi *in vitro* (Lamprecht et al., 1991; Somlyai et al., 1993) e *in vivo* (Altermatt et al., 1988 e 1990; Gaeng et al., 1995) hanno dimostrato la capacità di D₂O di indurre letalità cellulare e di formare proteine deuterate con comportamenti metabolici anomali tuttora poco conosciuti.

L'effetto letale a livello cellulare è stato caratterizzato ampiamente in esperienze di crescita cellulare *in vitro* per concentrazioni di D₂O nel terreno di coltura molto elevate. Una marcata inibizione della crescita di cellule L5178Y (linfoma murino) *in vitro* è stata osservata in presenza nel terreno di coltura di D₂O ad una concentrazione superiore al 45% (Ueno et al., 1984). Nelle stesse condizioni è aumentata la capacità delle radiazioni ionizzanti di indurre mutazioni del DNA (Furuno-Fukushi and Matsudaira 1985).

Cellule irradiate e immerse immediatamente dopo in terreno contenente 90% di D₂O hanno presentato un potenziamento dell'effetto letale e una incapacità di riparare il danno sub-letale (Ben-Hur et al., 1980; Utzumi e Elkind, 1991). Inoltre, è stato dimostrato un effetto sinergico di D₂O con le radiazioni ionizzanti nell'induzione di letalità in cellule tumorali (Bogdahn et al., 1989; Coligan et al., 1992). Per contro, una pre-incubazione in un terreno di coltura contenente il 20% di D₂O ha determinato un effetto radioprotettivo (Laeng et al., 1991). Un effetto letale nei confronti di cellule di astrocitoma murino è stato ricondotto alla capacità di D₂O di indurre apoptosi e accumulo cellulare in G2/M** (Uemura et al., 2002). In cellule tumorali coltivate *in vitro* è stata osservata una correlazione diretta tra inibizione della sintesi del DNA e concentrazione di D₂O maggiore del 50% nel terreno di coltura (Takeda et al., 1998).

(**) Il ciclo di riproduzione cellulare comprende: la fase gap1 (G1) in cui si realizzano i fenomeni biochimici preparatori della sintesi del DNA; la fase di raddoppio della macromolecola del DNA (S); la fase gap2 in cui si completano i meccanismi biochimici preparatori della divisione cellulare (G2); la fase della mitosi in cui la cellula madre, con DNA raddoppiato, si suddivide nelle due cellule figlie (M).

Altri esempi di effetto combinato dimostrano che D_2O , nella concentrazione del 30% nell'acqua di alimentazione, diminuisce l'effetto inibitorio del Metotrexato (MTX) sulla crescita di cellule tumorali trapiantate in cavie da esperimento (Laissue et al., 1982) e protegge inoltre le cellule nei trattamenti termici potenzialmente letali (Lin et al., 1984; Smith et al., 1994).

In esperienze effettuate *in vivo* su topi, è stato dimostrato che la presenza della concentrazione “naturale” di D_2O nell'acqua “leggera” (circa 150 ppm) è condizione favorente per la crescita tumorale, mentre in condizioni alimentari con acqua depleta della componente di D_2O si osserva una riduzione dello stesso fenomeno. A tale riguardo è stato ipotizzato che i sistemi regolatori del ciclo cellulare siano capaci di riconoscere il cambiamento del rapporto D/H e che questo rapporto possa essere una “finestra” ottimale per favorire il ciclo riproduttivo cellulare (Somlyai et al., 1993).

All'incremento di concentrazione di D_2O nell'acqua alimentare corrisponde un rallentamento della crescita di cellule tumorali trapiantate *in vivo* in topi, ma solo per concentrazioni molto elevate ($D_2O >50\%$). In tali casi si osservano per dosi crescenti anche complicanze di natura tossica che possono confondere l'apprezzamento dell'effetto (Barbour and Allen, 1938; Altermatt et al., 1988). Analogamente, tre linee cellulari tumorali, con istotipo pancreatico, trapiantate in topi nudi (soggetti con sistema immunitario depresso) mostrano una inibizione della crescita se nell'acqua di alimentazione dell'animale è presente il 30% di D_2O . Anche in questo caso sono state osservate complicanze di natura tossica (Omori et al., 1996).

Nella “Boron neutron capture therapy” (BNCT) la perfusione con D_2O del cervello dei pazienti affetti da tumore cerebrale ha potenziato notevolmente il grado di penetrazione del fascio dei neutroni nel tessuto (Nakagawa et al., 1994).

Dalla rassegna bibliografica non risulta alcun riferimento agli effetti biologici di D_2O preventivamente irraggiata con alte dosi, mentre sono noti gli effetti biologici di H_2O similmente irraggiata la cui citotossicità radioindotta è attribuibile alla produzione di radicali liberi (Box 2).

Pertanto, preso atto delle attuali conoscenze in materia e in considerazione della disponibilità di D_2O irraggiata con dose di 17kGy di radiazioni gamma nel contesto dell'esperimento di “fusione fredda”, sono stati effettuati esperimenti per valutare comparativamente la citotossicità di D_2O come tale e irraggiata.

Questo studio è stato integrato con esperimenti paralleli con H_2O irraggiata con pari dose. Gli indicatori biologici adottati sono stati: il test della sopravvivenza cellulare (Box 3) e il test dell'apoptosi “conclamata” (Box 4) applicati *in vitro* su tre linee cellulari stabilizzate di derivazione ematologica (Box 5). L'analisi comparativa dei dati sperimentali è stata sviluppata mediante il metodo del rapporto delle concentrazioni isoeffetto (Box 6).

Effetto biologico di D₂O (come tale)

Sopravvivenza cellulare

L'effetto citotossico (letalità cellulare) indotto da un agente chimico o fisico si esprime con la diminuzione della sopravvivenza delle cellule. Il grado di letalità indotta da D₂O, sulle tre linee cellulari, è mostrato in figura 1. Basse concentrazioni di D₂O sono ben tollerate con effetti letali quasi nulli, mentre all'aumentare della concentrazione si osserva un progressivo aumento della letalità cellulare.

Una possibile interpolazione, che ben rappresenti l'andamento dell'effetto, può essere formulata utilizzando la seguente espressione polinomiale:

$$\log(\text{SF}) = \text{alfa} \cdot C + \text{beta} \cdot (C)^2 + \text{intercetta},$$

dove C è la percentuale di D₂O che sostituisce parte dell'acqua leggera presente nel terreno di coltura, mentre alfa e beta sono i parametri della polinomiale interpolante.

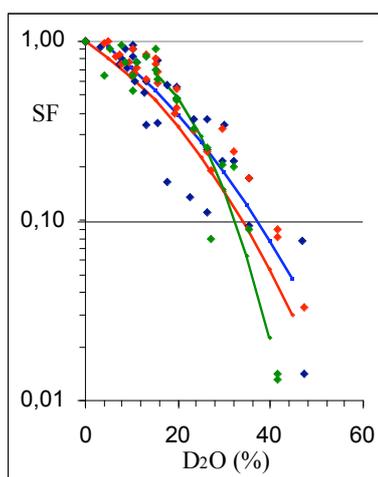


Fig. 1 - Frazione di cellule sopravvivenenti (SF) dopo trattamento con D₂O che sostituisce parzialmente H₂O nel terreno di coltura. RPMI (leucociti normali): curva blu, CEM (leucemia linfoblastica acuta): curva rossa, DAUDI (linfoma di Burkitt): curva verde.

Nella tabella 1 sono riportati i suddetti valori parametrici ed il valore della concentrazione letale 50 (CL50)*** per le tre linee cellulari utilizzate.

Questi dati sperimentali sono in accordo con i seguenti riferimenti bibliografici:

- inibizione della crescita *in vitro* di cellule L5178Y (linfoma murino) in presenza del 45% di D₂O nel terreno di coltura (Ueno et al., 1984);
- inibizione della sintesi del DNA osservata a concentrazioni di D₂O maggiori del 50% in cellule tumorali coltivate *in vitro* (Bogdahn et al., 1989);
- capacità di D₂O di indurre letalità cellulare, misurata con colorante vitale trypan blu, concentrazione- e tempo-dipendente (Smith et al., 1992).

(***) CL50: a questa concentrazione di D₂O nel terreno di coltura si osserva la morte del 50% delle cellule.

Tab. 1. Valori della CL50 di D₂O dedotti dai parametri delle curve interpolanti.

	Alfa	SE	Beta	SE	Interc.	CL50
						D ₂ O %
RPMI	-0,0181	0,0102	-0,0003	0,0002	0,062	16,0
CEM	-0,0112	0,0046	-0,0004	0,0001	0,061	19,0
DAUDI	0,0264	0,0130	-0,0016	0,0003	-0,225	19,5

SE: errore standard.

Apoptosi

Nella tabella 2 sono mostrati i valori dell'apoptosi spontanea (basale) e quelli dell'apoptosi indotta dalla campotechina (CAM), quale controllo positivo del fenomeno. Quest'ultimo trattamento indica una maggiore sensibilità della linea cellulare RPMI.

Tab. 2. Percentuale di cellule in apoptosi spontanea (basale) e dopo trattamento con campotechina (CAM).

	basale	SD	CAM	SD
RPMI	5,5	2,4	64,0	11,2
CEM	1,9	1,1	42,5	6,0
DAUDI	5,4	2,3	24,8	8,1

SD: deviazione standard.

Nella figura 2 sono mostrate le curve relative all'effetto apoptotico in funzione della concentrazione di D₂O dell'apoptosi, come osservato nelle nostre condizioni sperimentali. Il fenomeno apoptotico si coniuga bene con l'effetto letale indotto da D₂O sopra riscontrato alle stesse concentrazioni. L'andamento delle curve che rappresentano l'effetto apoptotico dimostrano che la linea cellulare RPMI appare più sensibile rispetto alle altre due.

Questi dati sperimentali sono in accordo con l'osservazione che D₂O è in grado di indurre aumento del volume cellulare, picnosi e vacuolizzazione citoplasmatica con inibizione della sintesi del DNA e delle proteine (Takeda et al., 1998). Inoltre, la citotossicità di D₂O verso le cellule di astrocitoma è riconducibile alla capacità di D₂O di indurre apoptosi e accumulo cellulare in fase G2/M (Uemura et al., 2002).

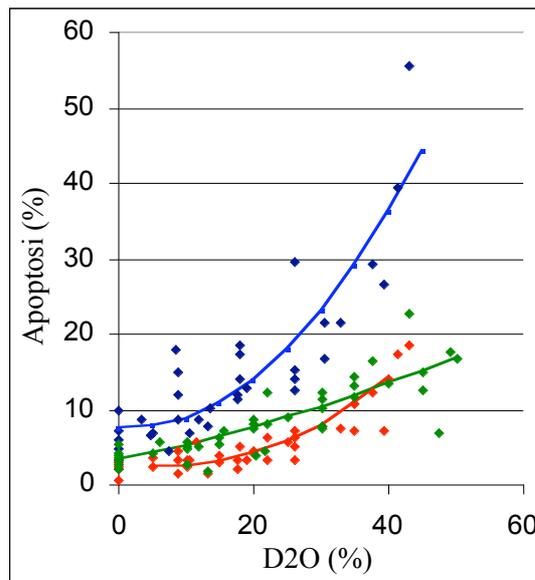


Fig. 2. Apoptosi in funzione della concentrazione di D_2O nel terreno di coltura. RPMI: curva blu, CEM: curva rossa, DAUDI: curva verde.

Effetto biologico della D_2O e H_2O irraggiate

Nella figura 3 sono riportate le curve concentrazione-effetto relative al trattamento con D_2O irraggiata (17 kGy) delle tre linee cellulari: RPMI, CEM e DAUDI. La sperimentazione con D_2O , condotta rispettivamente dopo 1-6 mesi (D_2O irraggiata nel dicembre del 2002) e dopo 20-36 mesi (D_2O irraggiata nel settembre del 2000) dall'irraggiamento, ha permesso di valutare il "peso" della variabile temporale sull'effetto citotossico indotto. La linea RPMI è stata saggiata solo con D_2O dopo 20-36 mesi dall'irraggiamento.

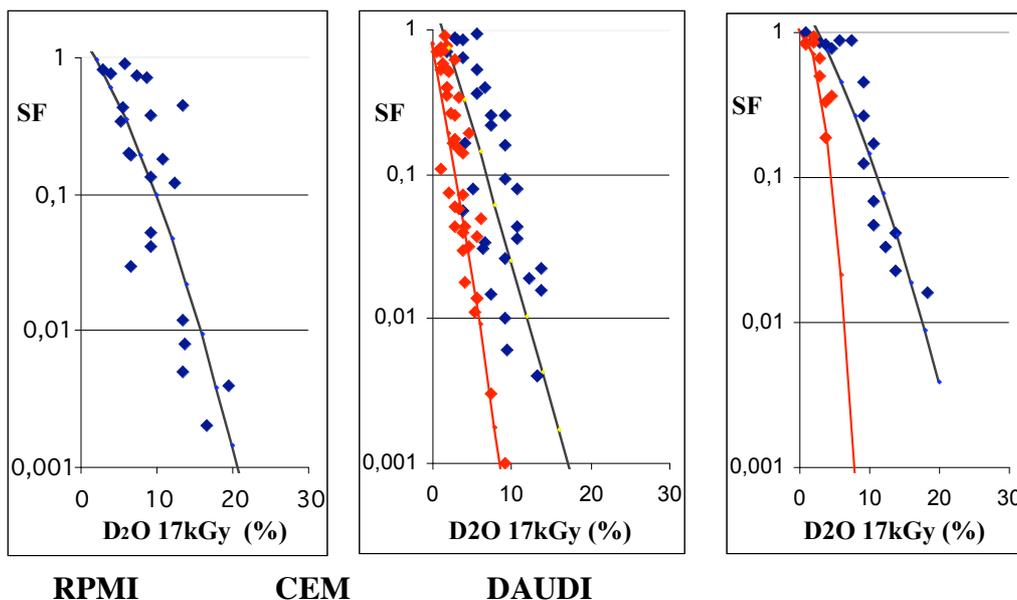


Fig. 3 - Frazione di cellule sopravvivenenti (SF) dopo trattamento con D_2O irraggiata (17 kGy) aggiunta al terreno di coltura. (•): D_2O dopo 1-6 mesi dall'irraggiamento; (•): D_2O dopo 20-36 mesi dall'irraggiamento.

Nella tabella 3 sono riportati i coefficienti parametrici delle curve meglio interpolanti i dati della sopravvivenza cellulare e la CL 50 calcolata sulla base di tali curve. E' evidente l'esistenza di un decadimento tempo-dipendente dell'effetto citotossico indotto da D₂O irraggiata. In particolare, per la linea cellulare CEM la numerosità dei punti sperimentali ha permesso di rilevare una efficacia citotossica invariata fino a 6 mesi dopo l'irraggiamento di D₂O, mentre dopo circa 2 anni è rilevabile una riduzione dell'efficacia stessa. Infatti, mediante una stima comparativa basata sul criterio del rapporto delle concentrazioni isoeffetto (tratte dalle curve relative ai periodi di 1-6 mesi e 20-36 mesi dall'irraggiamento di D₂O) (Box 6) risulta una efficacia citotossica residua dell'ordine del 40% per il periodo più lungo. La linea cellulare DAUDI non è stata attualmente considerata a scopo comparativo per la scarsità dei punti sperimentali relativi all'utilizzazione dopo 1-6 mesi di D₂O irraggiata (figura 3). Sono previste ulteriori sperimentazioni per approfondire le modalità di decadimento dell'efficacia di D₂O irraggiata anche con l'ausilio di misure chimico-fisiche riguardanti la presenza dei ROS (Reactive Oxygen Species).

Tab. 3 - Valori della CL50 dopo trattamento con D₂O irraggiata (17kGy).

Trattamento sperimentale dopo 1-6 mesi dall'irraggiamento

	Alfa	SE	Beta	SE	Intercetta	CL50 D ₂ O (%)
CEM	-0,3047	0,0939	-0,0035	0,0109	-0,090	0,7
DAUDI	0,0177	0,2311	-0,0498	0,0318	-0,012	2,6

Trattamento sperimentale dopo 20-36 mesi dall'irraggiamento

	Alfa	SE	Beta	SE	Intercetta	CL50 D ₂ O (%)
PMI	-0,0842	0,1279	-0,0033	0,0058	0,171	4,7
EM	-0,1741	0,1065	-0,0008	0,0067	0,228	3,1
UDI	-0,0829	0,0447	0,0025	0,0025	0,250	5,7

Un primo confronto eseguito sulla linea cellulare CEM tra l'effetto indotto da D₂O e quello indotto da H₂O, entrambe irradiate nel dicembre del 2002 con dose gamma di 17kGy, dimostra che entro i primi sei mesi dal trattamento l'entità dell'effetto è simile (figura 4). Inoltre, esperienze condotte con D₂O e H₂O dopo circa un anno dall'irraggiamento, evidenziano un effetto letale di D₂O maggiore rispetto a quello osservato utilizzando H₂O (figura 5 A). La concentrazione prescelta di 3,85% si presta per una migliore discriminazione del diverso effetto prodotto dai due agenti.

Per una stima comparativa più puntuale dell'efficacia delle suddette varianti di acqua è possibile applicare il criterio del rapporto delle concentrazioni isoeffetto (Box 6) in precedenza utilizzato (figura 5 B). Il maggiore effetto letale indotto da D₂O irraggiata rispetto a quello prodotto da D₂O non irraggiata si coniuga bene con l'andamento del fenomeno apoptotico. Nella figura 6 sono mostrate le curve concentrazione-effetto apoptotico nelle nostre condizioni sperimentali (linee cellulari RPMI, CEM e DAUDI).

Dal confronto tra gli andamenti dell'apoptosi dopo trattamento con D₂O non irraggiata (figura 2) e D₂O irraggiata (figura 6) appaiono evidenti due principali aspetti: a) maggiore effetto apoptotico di D₂O irraggiata; b) maggiore sensibilità al fenomeno apoptotico della linea cellulare RPMI rispetto alle altre due linee cellulari CEM e DAUDI.

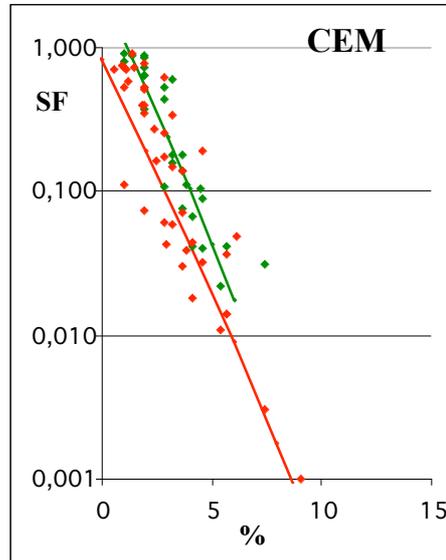


Fig. 4 - Frazione di cellule sopravvivenenti (SF) dopo trattamento con D₂O o H₂O irraggiate (17 kGy) in esperienze eseguite entro 6 mesi dall'irraggiamento. (•):D₂O; (•):H₂O.

Nella tabella 4 sono riportate le percentuali di D₂O necessarie per indurre un livello di apoptosi doppio (2x) o quadruplo (4x) rispetto al valore basale, con ciò consentendo un migliore apprezzamento comparativo tra le tre linee cellulari.

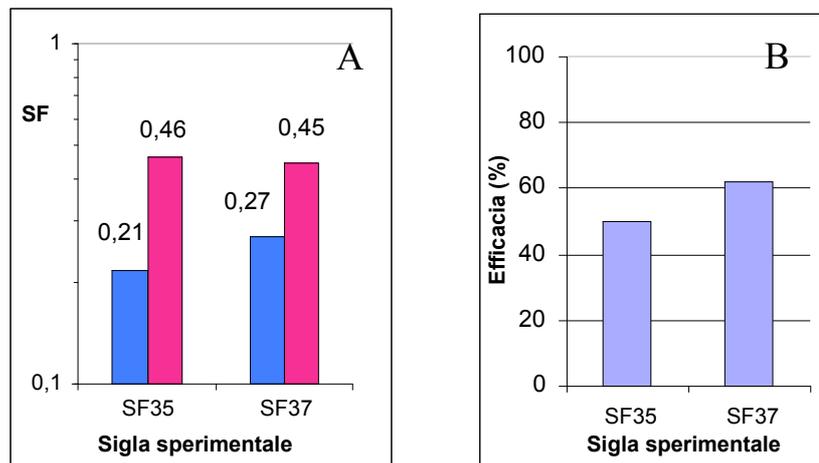


Fig. 5 – A) Frazione di cellule sopravvivenenti (SF) della linea CEM dopo trattamento con D₂O (blu) e H₂O (rosso) irraggiate (17 kGy) e alla concentrazione di 3,85% negli esperimenti SF35 e SF 37 eseguiti dopo 1 anno dall'irraggiamento. B) Efficacia di H₂O nei confronti di D₂O calcolata negli stessi esperimenti.

Per quanto riguarda D₂O non irraggiata emerge che la linea cellulare DAUDI appare meno sensibile all'apoptosi rispetto alle altre due linee. L'effetto apoptotico indotto da D₂O irraggiata è

aumentato rispetto a quello prodotto da D₂O non irradiata analogamente a quanto osservato con le misure di letalità cellulare.

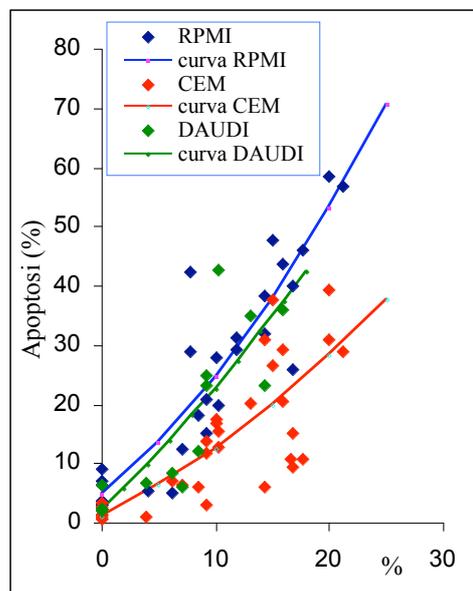


Fig. 6 - Apoptosi indotta da D₂O irradiata con 17 kGy (dopo 20-36 mesi dall'irraggiamento).

Dal confronto dell'effetto apoptotico osservato in esperienze condotte sulla linea cellulare CEM, al cui terreno di coltura sono state aggiunte D₂O e H₂O irradiate da meno di 3 mesi, viene confermata una risposta concentrazione-dipendente sovrapponibile per ambedue le varianti (figura 7). Anche in questo caso devono essere effettuate ulteriori esperienze per verificare l'eventuale differente decadimento, per periodi superiori ai 3 mesi, dell'azione apoptotica tra D₂O e H₂O irradiate.

Tab. 4 - Percentuale di D₂O (irradiata e non) in grado di indurre un valore di apoptosi doppia o quadrupla rispetto a quella basale.

	Apoptosi 2x		Apoptosi 4x	
	D ₂ O (%)	D ₂ O 17 (%)	D ₂ O (%)	D ₂ O 17 (%)
RPMI	15,7	3,8	29,3	9,0
CEM	20,2	2,8	30,7	6,3
DAUDI	32,1	4,6	62,7	9,6

I prodotti della radiolisi comunque formati in D₂O e H₂O dopo irraggiamento con alte dosi (diversi kGy) sono verosimilmente alla base dell'effetto citotossico osservato (letalità cellulare e apoptosi). Per una verifica dell'atteso contributo dei ROS nell'induzione di tali fenomeni sono state condotte esperienze di sopravvivenza cellulare sulla linea CEM con l'aggiunta di catalasi (a concentrazioni biocompatibili) in considerazione della sua funzione di "scavenger".

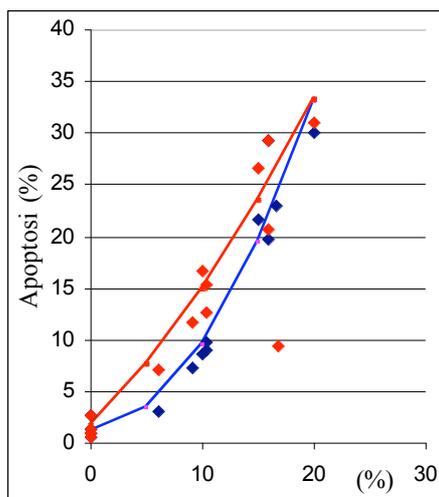


Fig. 7 – Apoptosi, nella linea cellulare CEM, dopo trattamento con D₂O e H₂O irradiate (17kGy) in esperienze eseguite nei 3 mesi successivi all'irraggiamento. (•): D₂O 17kGy; (•): H₂O 17kGy.

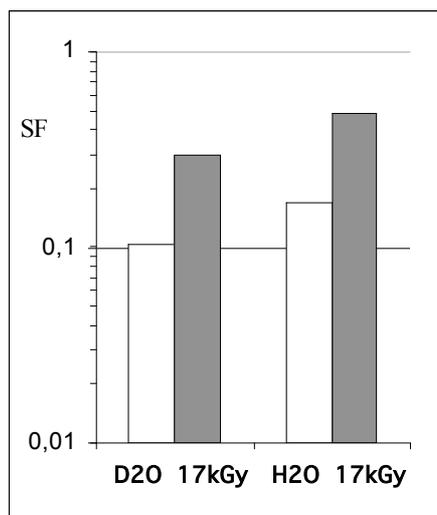


Fig. 8 - Effetto della catalasi (0,37 U/ml) sulla SF della linea CEM dopo trattamento con D₂O e H₂O irradiate (17kGy) e alla concentrazione di 3,2%: senza catalasi (colonne chiare), con catalasi (colonne scure).

In una esperienza condotta dopo 6 mesi dall'irraggiamento delle due varianti dell'acqua è risultato che la catalasi, alla concentrazione di 0,37 U/ml, ha ridotto parzialmente l'effetto citotossico. L'azione di "scavenger" della catalasi, a questa concentrazione, è apparsa più efficiente su H₂O irradiata che su D₂O irradiata (figura 8). Questa osservazione conferma l'importanza di esplorare con sistemi chimico-fisici (spettrometria ottica IR-VIS-UV, EPR, ecc.) le eventuali differenze qualitative e/o quantitative tra i prodotti della radiolisi formati in D₂O e H₂O.

Conclusioni

La prima conclusione da trarre da questo studio riguarda il suo peculiare carattere di serendipity (*). Partito da verifiche microbiologiche mirate ad accertare, in un esperimento di “fusione fredda”, i motivi della forte variabilità del pH di D₂O utilizzata nell’iper-caricamento del Deuterio nel Palladio e le cause della scomparsa del Mercurio introdotto per colmare le microinfrazioni dei filamenti del Palladio stesso, lo studio ha portato alla scoperta di due nuove specie batteriche risultate responsabili delle lamentate disfunzioni sperimentali.

Queste specie batteriche, denominate dagli scopritori *Ralstonia detusculanense* e *Stenotrophomonas detusculanense*, provocano infatti con i loro cataboliti organici l’instabilità del pH di D₂O e, mostrando una particolare “voracità” per i metalli pesanti, rendono ragione della scomparsa dalla soluzione deuterata delle tracce di Mercurio. Per migliorare la riproducibilità sperimentale si è provveduto ad aggredire gli indesiderati ospiti microbiologici mediante trattamento di D₂O con alte dosi di radiazioni gamma (17kGy).

Questo incontro scientifico con D₂O, non programmato, ha stimolato una forte attenzione nei riguardi delle qualità biologiche di questo composto. Dalla rassegna della letteratura, nel frattempo intrapresa, sono emersi numerosi dati di indubbio interesse biochimico, biologico e biomedico. Al riguardo appare pienamente condivisibile il giudizio su questa tematica espresso da autorevoli Ricercatori, secondo i quali gli effetti biologici di D₂O sono stati estensivamente studiati, ma raramente approfonditi.

Non è escluso che il “valore strategico” di D₂O abbia contribuito a condizionare in tal senso questo tipo di ricerca. Nel contempo è emerso chiaramente che mancano tuttora riferimenti bibliografici sugli effetti biologici inducibili da D₂O irraggiata con alte dosi, mentre sono molto numerosi, com’è noto, i dati riguardanti la radiolisi indotta in H₂O.

Questa constatazione, di indubbio interesse scientifico, ha fornito ai Ricercatori del Gruppo INTRABIO e del Gruppo FREEDOM (attualmente aggregati nel Gruppo FREETHAI/DEUTER) una solida giustificazione per avviare, con la dovuta gradualità, uno studio sperimentale comparativo sugli effetti biologici di D₂O come tale e irraggiata con alte dosi, stante l’acquisizione di queste due varianti in virtù delle originarie esigenze sperimentali della “fusione fredda”.

Un nostro primo lavoro sperimentale *in vitro*, condotto sulla linea cellulare stabilizzata U937 (originata da un linfoma pleurico istiocitario), ha confermato, nella prospettiva attesa, l’effetto citotossico di D₂O (Catena et al., 2001). Questa sperimentazione ha dimostrato che concentrazioni di D₂O fino al 10% nel terreno di coltura sono compatibili con la crescita cellulare, mentre concentrazioni superiori al 30% sono da considerare sicuramente citotossiche. In questa prima fase di studio non veniva ancora del tutto percepita l’estensione della maggiore efficacia citotossica di D₂O irraggiata rispetto a D₂O come tale.

(*) *Serendipità (serendipity): lo scoprire casualmente e in modo imprevisto un fenomeno di importanza fondamentale durante prove o esperimenti effettuati per tutt’altro scopo o su basi teoriche che nulla hanno a che vedere con quanto è scoperto (da A. Gabrielli: Grande Dizionario Illustrato della Lingua Italiana, Mondadori).*

L'indagine sperimentale è proseguita misurando su altre linee cellulari (RPMI, CEM, DAUDI) l'effetto citotossico di D₂O come tale e irraggiata con alte dosi (17kGy) per meglio apprezzare la "diversità" biologica tra queste due varianti. In un primo momento, utilizzando D₂O irraggiata nel settembre del 2000, è stato possibile sviluppare una sperimentazione biologica nell'intervallo temporale di circa 20-36 mesi dall'avvenuto irraggiamento. In questa fase è stato chiaramente diagnosticato il forte incremento dell'effetto biologico di D₂O irraggiata rispetto a quello prodotto da D₂O non irraggiata. Più precisamente l'effetto citotossico indotto da D₂O irraggiata, espresso come CL50, risultava pari a 4,7%; 3,1%; 5,7% rispettivamente per le linee cellulari RPMI, CEM e DAUDI. In questo studio, accanto alla sopravvivenza cellulare è stato valutato un ulteriore parametro biologico, l'apoptosi (o morte cellulare programmata), allo scopo di acquisire indicazioni maggiormente approfondite sull'effetto citotossico indotto dalle due varianti di D₂O.

Per approfondire questo aspetto della citotossicità, riconducibile agli effetti della radiolisi, sono stati condotti ulteriori esperimenti utilizzando D₂O irraggiata nel dicembre 2002 (17 kGy) e sviluppando una sperimentazione nell'intervallo di 1-6 mesi dopo l'irraggiamento. Concentrazioni di D₂O irraggiata inferiori al 5% hanno determinato sulla linea cellulare CEM un forte effetto letale con una CL50 pari a 0,7%. La linea DAUDI, per la ridotta numerosità dei dati sperimentali, appare meno significativa, indicando tuttavia un "trend" coerente con la risposta attesa.

Per interpretare il potenziamento dell'effetto letale indotto da D₂O irraggiata con alte dosi è necessario un preliminare e inevitabile confronto con la letteratura riguardante analogo irraggiamento di H₂O. A tale scopo sono state condotte esperienze congiunte con H₂O anch'essa irraggiata nel dicembre 2002 con dosi di 17 kGy di radiazioni gamma. Le prime esperienze effettuate anche in questo caso nell'intervallo di 1-6 mesi dopo l'irraggiamento, dimostrano che le due varianti (D₂O e H₂O irradiate) presentavano, in quest'ambito temporale, la stessa efficacia citotossica. In tempi successivi (circa 1 anno dall'irraggiamento) H₂O irraggiata mostravano invece una maggiore perdita di efficacia (circa il 50%) se confrontata con quella di D₂O irraggiata.

Dalle osservazioni sperimentali emerge il quesito su quali possano essere i meccanismi che inducono un danno cellulare letale a basse concentrazioni di D₂O irraggiata con alte dosi e in particolare sull'esistenza di radicali liberi deuterati e sulla possibilità di un loro diverso coinvolgimento biologico.

Un ulteriore aspetto emerso in questo studio riguarda la lunga persistenza nel tempo (20-36 mesi) dell'elevata capacità citotossica di D₂O irraggiata. In effetti, i dati riportati in letteratura sulla durata di vita dei radicali liberi prodotti in H₂O dalle radiazioni ionizzanti (radiolisi) indicano valori temporali di decadimento molto brevi, per cui può essere di particolare interesse procedere all'identificazione di molecole stabili nel tempo e ancora reattive.

Questo aspetto del comportamento "radiomimetico" di D₂O irraggiata giustifica l'estensione della sperimentazione nei riguardi dei composti molecolari prodotti dall'irraggiamento (ROS o altre molecole) condotta tramite metodologie chimico-fisiche, anche allo scopo di acquisire utili indicazioni sui meccanismi di interazione cellulare nel campo specifico. Questo tipo di indagine, svolto in tempi diversi dopo l'irraggiamento di D₂O e H₂O, permetterà anche di valutare in modo differenziato la stabilità nel tempo dei radicali liberi (o di altre molecole).

Bibliografia

ALTERMATT H.J., J. GEBBERS, J.A. LAISSUE, *Heavy water delays growth of human carcinoma in nude mice*, in *Cancer*, 62, 462 (1988).

ALTERMATT H.J., J. GEBBERS, J.A. LAISSUE, *Heavy water enhances the antineoplastic effect of 5-fluoro-uracil and bleomycin in nude mice bearing human carcinoma*, in *Int. J. Cancer*, 45, 475 (1990).

BARBOUR H. AND E. ALLEN, *Tumor growth one fifth saturated with deuterium oxide (heavy water)*, in *American J. of Cancer*, 32, 24 (1938).

BEN-HUR E., H. UTSUMI, M.M. ELKIND, *Potentially lethal and DNA radiation damage: similarities in inhibition of repair by medium containing D₂O and by hypertonic buffer*, in *Radiation Research*, 84, 25 (1980).

BOGDAHN U., R. APFEL, M. HAHN, M. GORLACH, C. BOHL, J. HOPPE, R. MARTIN, *Autocrine tumor cell growth inhibiting activities from human malignant melanoma*, in *Cancer Res.* 49, 5358 (1989).

CATENA C., D. POMPONI, S. PANE, G. TRENTA, E. RIGHI, F. CELANI, P. MARINI, M. NAKAMURA, *Effetti indotti dall'acqua pesante (come tale o in associazione con raggi X) su cellule tumorali umane coltivate "in vitro"*, in *LNF-01-030 (IR), INFN* (2001).

CELANI F., P. MARINI, V. DI STEFANO, A. MANCINI, *Deuterium overloading of palladium wires by means of high power is pulsed electrolisys and electromigration: suggestion of a "phase transition" and related excess heat*, in *Physics Letters A* 214, 1 (1996).

CHAKRABARTI G., S. KIM, M.L. GUPTA, J.S. BARTON, R.H. HIMES, *Stabilization of tubulin by deuterium oxide*, in *Biochemistry*, 38, 3067 (1999).

COLIGAN J.E., A.M. KRUISBEEK, D.H. MARGULIES, E.M. SHEVAQCH, W. STROBER, *Current Protocols Immunology. NIH Monography. J. Wiley and Sons, NewYork*, (1992).

FURUNO-FUKUSHI I., H. MATSUDAIRA, *Mutation induction by tritiated water and effects of deuterium oxide in cultured mouse leukemia cells*, in *Radiat. Res.*, 103, 466 (1985).

GAENG D.P., M. GEISER, L.M. CRUZ-ORIVE, S.E. LARSEN, T. SCHAFFNER, J.A. LAISSUE, H.J. ALTERMATT, *Paradoxical effects of bleomycin and heavy water (D₂O) in mice*, in *International Journal Cancer*, 62, 784 (1995).

KUSHNER D.J., A. BAKER, T.G. DUNSTALL, *Biotechnological potential of heavy water and deuterated compounds* (1996);www.nbiap.vt.edu/brarg/brasym96/kushner96.htm

KUSHNER D.J., A. BAKER, T.G. DUNSTALL, *Pharmacological uses and perspectives of heavy water and deuterated compounds*, in *Can J. Physiol Pharmacol*, 77, 79 (1999).

LAENG R.H., R.L. MINI, J.A. LAISSUE, R. SCHINDLER, *Radioprotection of cultured cells by preincubation in medium containing deuterium oxide*, in *Inter. J. Radiat. Biol.*, 59, 165 (1991).

LAISSUE J.A., H. BURKI, W. BERCHTOLD, *Survival of tumor-bearing mice exposed to heavy water or heavy water plus methotrexate*, in *Cancer Res.*, 42, 1125 (1982).

LAMPRECHT J., D. SCHROETER, N. PAWELETZ, *Derangement of microtubule arrays in interphase and mitotic PtK2 cells treated with deuterium oxide (heavy water)*, in *J. of Cell Science*, 98, 463 (1991).

LIN P.S., K. HEFTER, K.C. HO, *Modification of membrane function, protein synthesis, and heat killing effect in cultured Chinese hamster cells by glycerol and D2O*, in *Cancer Res.*, 44, 5776 (1984).

NAKAGAWA Y., H. HATANAKA, M. MORITANI, K. KITAMURA, K. MATSUMOTO, M. KOBAYASHI, *Partial deuteration and blood-brain barrier (BBB) permeability*, in *Acta Neurochir. Suppl. (Wien)*, 60, 410 (1994).

OMORI H., Y. NIO, H. TAKEDA, K. TAMURA, *Application for therapeutic use of deuterium oxide (D2O) against human pancreatic cancer*, in *Gan To Kagaku Ryoho*, 23, 1665 (1996).

SMITH N.N., W.F. HARVEY, J.S. BEDFORD, R.A. COSS, *Heat protection by deuterium oxide of heat sensitive and wild-type Chinese hamster ovary cells*, in *Int. J. Hyperthermia*, 10, 73 (1994).

SOMLYAI G., G. JANCSON, G. JAKLI, K. VASS, B. BARNA, V. LAKICS, T. GAÁL, *Naturally occurring deuterium is essential for the normal growth rate of cells*, in *Federation of European Biochemical Societies*, 317, 1 (1993).

TAKEDA H., Y. NIO, H. OMORI, K. UEGAKI, N. HIRAHARA, S. SASAKI, K. TAMURA, H. OHTANI, *Mechanisms of cytotoxic effects of heavy water (deuterium oxide: D2O) on cancer cells*, in *Anticancer Drugs*, 9, 715 (1998).

UEMURA T., K. MORITAKE, Y. AKIYAMA, Y. KIMURA, T. SHINGU, T. YAMASAKI, *Experimental validation of deuterium oxide-mediated antitumoral activity of relates to apoptosis in murine malignant astrocytoma cells*, in *J. Neurosurg.* 96, 900 (2002).

UENO A.M., O. TANAKA, H. MATSUDAIRA, *Inhibition of gamma-ray dose-effects by D2O and inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase in cultured mammalian L5178Y cells*, in *Radiat. Res.*, 98, 574 (1984).

UTSUMI H., M.M. ELKIND, *Caffeine and D₂O medium interact in affecting the expression of radiation-induced potentially lethal damage*, in *Int. J. Radiat. Res.*, 60, 647 (1991).

VASDEV S., GUPTA I.P., SAMPSON C.A., LONGERICH L., PARAL S. *Deuterium oxide normalized blood pressure and elevated cytosolic calcium in rats with ethanol-induced hypertension*, in *Can. J. Cardiol.* 9, 802 (1993).

Box 1: Acqua pesante

Il deuterio e l'acqua pesante entrano nel mondo della chimica e della fisica nel 1931 a seguito della loro scoperta ad opera di H. C. Urey che, per questa scoperta ha ricevuto il premio Nobel per la chimica nel 1934. La preparazione dell'acqua pesante al 99% a prezzo relativamente modesto fu iniziata già negli anni 30 a Riukan in Norvegia attraverso l'elettrolisi dell'acqua naturale, utilizzando la sovrapproduzione notturna di energia elettrica.

Nello stesso periodo negli anni 30-40, l'impegno e l'intuizione di molti ed illustri nomi della fisica hanno portato a rilevare che la fissione dell'uranio 235 poteva dar luogo ad una reazione a catena autosostenentesi qualora i neutroni emessi nel corso della fissione avessero avuto una energia bassa (neutroni lenti). In particolare, Fermi aveva rilevato nel 1939 che una reazione a catena nell'uranio naturale era più facilmente fattibile, rappresentando quindi la via da preferire, rispetto a quella ottenibile impiegando uranio sufficientemente arricchito in U235. Questa più facile fattibilità del raggiungimento della reazione autosostenentesi richiedeva però lo sfruttamento di valori di sezioni d'urto di fissione più alti, valori che si potevano ottenere attraverso il "rallentamento" dei neutroni. La riduzione dell'energia cinetica, cioè la "moderazione", dei neutroni era ottenibile facendo urtare elasticamente i neutroni contro bersagli di piccola massa, come per esempio l'idrogeno contenuto nell'acqua. Però si era pure rilevato che l'acqua normale ha una capacità di assorbimento neutronico elevata e tale da sottrarre un gran numero di neutroni dal processo di fissione, fatto che non consentiva, nel caso dell'uranio naturale, l'autosostentamento della reazione a catena. Con misurazioni più precise fatte in epoca successiva risulta che le sezioni di cattura neutronica per l'acqua normale e per l'acqua pesante sono rispettivamente:

$$3,2 \cdot 10^{-24} \text{ cm}^2 \quad 9,2 \cdot 10^{-28} \text{ cm}^2$$

cioè un rapporto pari a circa 10000, che indubbiamente giustifica la sottrazione al processo di fissione di un gran numero dei neutroni, impedendo al sistema il raggiungimento delle condizioni di criticità. È Szilard che nel luglio del 1939 suggerisce come soluzione l'impiego dell'acqua pesante o della grafite. Però non è né facile, né economico produrre acqua pesante ed è invece più facile procurarsi la grafite; gli Stati Uniti adottano tale metodologia pur non abbandonando la via della fissione moderata da acqua pesante. Nell'altro versante Heisenberg per il Comitato Uranio tedesco prepara un rapporto in cui afferma che una reazione a catena autosostenentesi è altamente probabile con l'impiego di acqua pesante come moderatore. È in questo clima di rincorsa alla produzione della pila per giungere alla bomba atomica che l'acqua pesante assume il ruolo di materiale strategico. Grafite ed acqua pesante in competizione vengono utilizzati nei vari progetti che all'epoca erano essenzialmente finalizzati agli impieghi bellici della fissione. A conflitto terminato l'interesse è stato spostato sulla produzione di energia; vari prototipi di reattore moderati ad acqua pesante sono stati progettati e realizzati, ma ad oggi solo il Canada ha portato a livello industriale la filiera di reattori CANDU (CANadian Deuterium Uranium), che hanno come moderatore appunto l'acqua pesante. Ricordiamo inoltre che applicazioni diversificate dell'acqua pesante nell'ambito nucleare sono principalmente effettuate da India e Pakistan.

Intuizione, curiosità scientifica e il "provando e riprovando" di galileiana memoria hanno anche guidato Fleischmann e Pons a provare l'elettrolizzazione dell'acqua pesante (anziché dell'acqua leggera) nel caricamento del palladio, con il risultato di evidenziare fenomeni alla verifica e interpretazione dei quali oggi molti laboratori stanno lavorando.

Per le finalità connesse con la propria filiera nucleare, oggi è pertanto il Canada il principale produttore di acqua pesante, e dal Canada abbiamo acquistato il campione che viene impiegato nelle ricerche che stiamo conducendo, sulla scia delle evidenze riscontrate da più parti, al fine di chiarire e di comprendere fenomeni che ormai sono ampiamente ripetibili e tali da ritenersi attendibili.

Box 2: I radicali liberi dell'H₂O

La principale reazione che si verifica in caso di irraggiamento di H₂O è la cosiddetta “radiolisi dell’acqua” che porta alla formazione di radicali liberi (Reactive Oxygen Species: ROS), elettroni e cationi. Questi prodotti della radiolisi sono molto reattivi e possono interagire fra loro o con le molecole del substrato biologico.

I radicali idrossilico e idrogeno sono potenti agenti ossidanti che agiscono soprattutto sui composti insaturi, forniti di doppi legami (come i costituenti delle membrane cellulari, le proteine, DNA e RNA), provocando il distacco di ioni idrogeno e di gruppi aminici (reazione di deaminazione). Nel caso dell’alanina, per esempio, ciò porta alla produzione di ammoniaca ed acido piruvico. È noto inoltre che alcuni aminoacidi, come cistina, cisteina e metionina reagiscono con i radicali liberi dell’acqua più attivamente e più velocemente di quanto non facciano gli aminoacidi non solforati, dotati di un gruppo alifatico aromatico come la fenilalanina e la tirosina. Gli elettroni idrati reagiscono per lo più con composti aromatici, acidi carbossilici, chetoni, aldeidi e tioli presenti nella cellula.

Gli effetti indiretti delle radiazioni ionizzanti derivano dalla combinazione dei radicali liberi con altre molecole, dalla formazione di dimeri (molecole doppie) e dalla cattura di elettroni da parte di ioni positivi. L’irraggiamento fatto in presenza di ossigeno fa sì che gli atomi di idrogeno diano origine a radicali idroperossidi. Per altro verso, dalla reazione degli elettroni solvatati con il radicale anionico ossigeno si formano anioni superossido. I radicali idroperossidi e gli anioni superossido possono portare alla formazione di perossido d’idrogeno (acqua ossigenata).

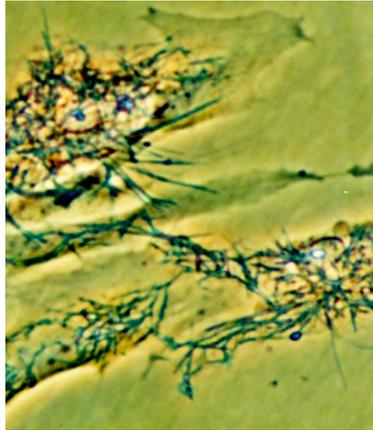
Sempre in corso di irraggiamento, l’ossigeno, sciolto in H₂O, può formare anche ozono (O₃), agente ossidante molto potente. Si è stimato sperimentalmente che una dose di 10 kGy può produrre 1 millimole di prodotti della radiolisi per litro di H₂O irradiato.

Il danneggiamento delle membrane cellulari indotto dai ROS, oltre ad inibire le attività biochimiche dei mitocondri, dell’apparato del Golgi e dello stesso DNA, si esprime anche con la distruzione delle membrane lisosomiali e conseguente liberazione di enzimi idrolitici tra cui le catepsine (enzimi in grado di scindere attivamente le proteine). Questo processo porta alla “digestione” autolitica della cellula. Si è stimato che una dose di 0,1 kGy può danneggiare il 2,8% del DNA presente in una cellula batterica, lo 0,14% degli enzimi e lo 0,005% degli aminoacidi.

Come riportato nell’introduzione, mentre sono abbastanza note le reazioni di ossidazione indotte dai radicali liberi idrogenati, non sono ancora disponibili in letteratura riferimenti significativi per i fenomeni biologici connessi alla sostituzione dell’idrogeno con il deuterio nell’acqua irradiata.

Box 3: La sopravvivenza cellulare

Una cellula è sopravvivente quando è in grado di produrre progenie. Un trattamento citotossico riduce questa capacità con la conseguenza che una frazione della popolazione cellulare non è più in grado di replicarsi.



Cristalli di formazan

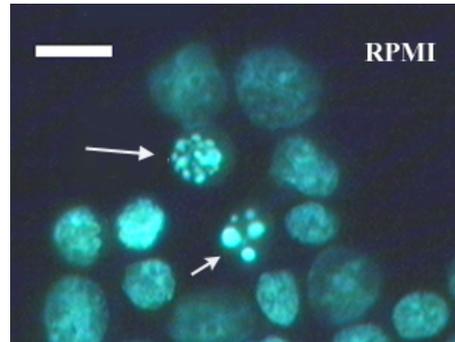
Il test di sopravvivenza utilizza il composto organico tiazolico (sale giallo solubile): 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Attraverso le deidrogenasi cellulari (enzimi mitocondriali presenti solamente nelle cellule metabolicamente attive), il sale tiazolico viene trasformato in un precipitato cristallino purpureo (insolubile in acqua) denominato formazan. Il formazan viene solubilizzato in dimetilsolfossido (DMSO) e misurato in spettrometria ottica (560 nm).

Presentazione dei dati

I dati sperimentali vengono rappresentati in un diagramma semi-log che interpreta la correlazione tra la concentrazione dell'agente citotossico (ascissa lineare) e l'effetto indotto (ordinata logaritmica).

Box 4: L'apoptosi

L'apoptosi è un fenomeno cellulare di morte programmata che si instaura in seguito ad uno stimolo specifico e all'intervento di processi enzimatici attivi.



Cellule in apoptosi (frece). Barra: 10 μ m

Il test si basa sull'uso di un colorante fluorescente (Hoeschst 33342) che in condizioni vitali si lega proporzionalmente con il DNA. L'osservazione di preparati citologici in microscopia a fluorescenza permette di distinguere le cellule apoptotiche da quelle normali. Il controllo positivo, in una determinata popolazione cellulare, si ottiene trattando le cellule con campotechina (CAM): 2 μ M per 19 ore.

Presentazione dei dati

La misura dell'apoptosi, in una coltura cellulare, viene espressa come percentuale, rispetto alle cellule totali osservate, delle cellule apoptotiche indotte da una determinata concentrazione dell'agente citotossico in esame aggiunto al terreno di coltura,.

Box 5: Le linee cellulari

Sono state impiegate tre linee cellulari umane stabilizzate, cioè cellule provenienti da prelievi biotici adattate a riprodursi *in vitro*, e precisamente: una linea di leucociti normali RPMI 1788 (G. More et al., J. Nat.Canc. Inst. 43, 1119-1128, 1969); una linea di leucemia linfoblastica acuta CCRF CEM (G.E. Foley, Cancer 18, 522-529, 1965); una linea di linfoma di Burkitt DAUDI (G. Klein, Cancer Research 28, 1300-1310, 1968). Per semplicità grafica le tre linee sono riportate nel testo rispettivamente con le sigle RPMI, CEM e DAUDI.

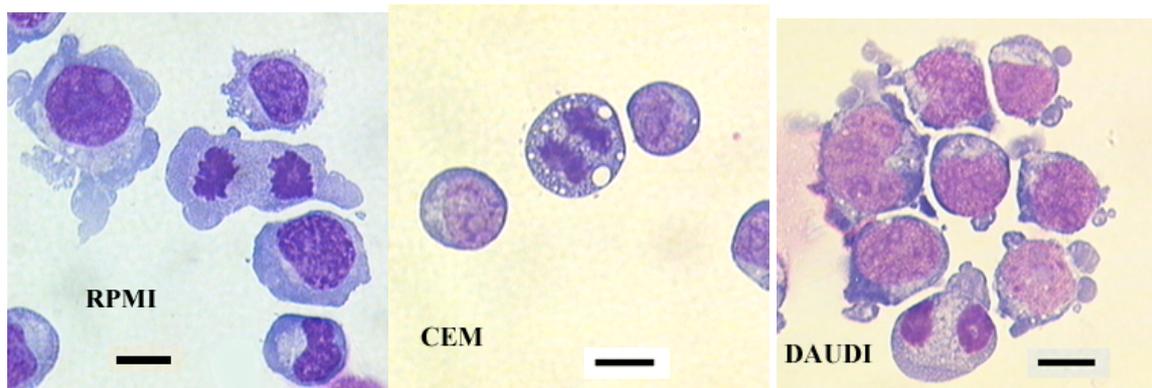


Foto in microscopia ottica in campo chiaro su campioni di cellule in sospensione preparati con la citocentrifuga e colorati con Giemsa. Barra: 10 μ m.

Le tre linee cellulari vengono mantenute in crescita esponenziale attraverso due trapianti cellulari alla settimana in fiasche per coltura cellulare (Cell-Cult 31060) alla temperatura di 37°C e in una atmosfera arricchita al 5% di CO₂. Il mezzo di coltura impiegato è costituito dal terreno RPMI 1640 (Sigma) addizionato con 75UI/75 μ g per ml di penicillina/streptomicina (Sigma) e con il 10% di siero fetale bovino (Sigma). Nelle nostre condizioni sperimentali le cellule mantengono una crescita esponenziale se gli inoculi iniziali sono di circa 50.000 cellule/ml. In queste condizioni i tempi di duplicazione cellulare sono di circa 24, 18 e 30 ore rispettivamente per la RPMI, CEM e DAUDI.

Box 6: Rapporto delle concentrazioni isoeffetto

La sopravvivenza cellulare (SF) è un fenomeno concentrazione-dipendente che generalmente viene rappresentato con una curva in un diagramma semi-log (ascissa lineare e ordinata logaritmica). Pertanto, la relazione algebrica più semplice che può rappresentare l'andamento del fenomeno può essere rappresentata da:

$$\log SF = S \times C + C_0$$

Dove S è la pendenza, C la concentrazione dell'agente e C_0 è una costante. Se si vuole calcolare l'efficienza (%) di un agente B (effetto minore) con un agente A (effetto maggiore) dai dati sperimentali di SF eseguire:

C1:	concentrazione dell'agente A
SF(A):	SF dopo trattamento con l'agente A alla concentrazione C1
log SF(A):	logaritmo decimale della SF(A)
SF(B):	SF dopo trattamento con l'agente B alla concentrazione C1
log SF(B):	logaritmo decimale della SF(B)
log SF(B)/C1:	pendenza della curva (S) dell'agente B
log SF(A)/S:	concentrazione dell'agente B (C2) necessaria per ottenere lo stesso effetto osservato dall'agente A
100/(C2/C1):	efficienza percentuale dell'agente B rispetto all'agente A

Modello di calcolo (grafico) per la concentrazione isoeffetto

