

Università degli Studi di Napoli “Federico II”

Scuola Politecnica e delle Scienze di Base
Area Didattica di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali

Dipartimento di Fisica “Ettore Pancini”



Laurea triennale in Fisica

La biosimetria come strumento a supporto dell’esplorazione umana del cosmo

Relatore:

Prof. Lorenzo Manti

Candidato:

Rita Camilla Buono
Matricola N85/1412

A.A. 2020/2021

Indice

Introduzione	3
1. Radiazioni cosmiche ed esplorazione umana dello spazio	6
1.1. Composizione dei raggi cosmici	
1.2. Principali danni biologici di rilevanza nell'esplorazione spaziale	
1.2.1. Effetti deterministici	
1.2.2. Effetti stocastici	
1.3. Possibili fattori che influenzano l'azione biologica della radiazione cosmica	
1.3.1. <i>Microgravity</i>	
1.3.2. <i>HZE radiation</i>	
1.3.3. <i>Mixed field</i>	
2. Biodosimetria ed esposizione umana alla radiazione cosmica	21
2.1. Definizione di biodosimetria	
2.2. Principali metodiche usate nella dosimetria biologica	
2.3. Tecniche biodosimetriche basate sulle aberrazioni cromosomiche radioindotte	
2.3.1. Dicentrici	
2.3.2. Traslocazioni	
2.4. Principali problematiche	
2.4.1. Tempo dall'esposizione	
2.4.2. Sensibilità	
3. Alcuni risultati sperimentali	35
3.1. Alcuni studi <i>ex vivo</i> con tecniche biodosimetriche	
Conclusioni	44
Bibliografia	47

Introduzione

La natura umana, che spinge l'uomo a desiderare di conoscere l'ignoto, muove anche la ricerca scientifica e lo studio delle leggi che regolano l'universo.

L'esplorazione umana del cosmo, stadio successivo della esplorazione "visiva" e della teorizzazione "matematica" delle leggi fondamentali, è necessariamente subordinata alla concreta verifica ed alla sperimentazione.

Il tema dei viaggi spaziali ha è recentemente tornato di attualità perché diverse agenzie spaziali nazionali e, ultimamente, anche privati in corsa per lo sviluppo del cosiddetto "turismo spaziale", hanno iniziato programmi per missioni che dovrebbero partire nei prossimi anni, alcune delle quali prevedono anche lunghe percorrenze. Come è noto, accanto al ritorno sulla Luna, la nuova frontiera dell'esplorazione spinge l'uomo fino a Marte.

Questo rinnovato interesse verso l'esplorazione umana del nostro sistema solare ripropone la considerazione che l'ambiente extraterrestre è particolarmente ostile e che, pertanto, la salute degli astronauti è esposta ad una serie di rischi, specie a lungo termine: l'esposizione al campo di radiazioni cosmiche pone senza dubbio una delle sfide più impegnative. Gli effetti biologici cui possono andare incontro gli astronauti per effetto dell'esposizione alle radiazioni cosmiche di fatto non sono dissimili da quelli conosciuti e studiati sulla Terra nell'ambito della Biofisica delle Radiazioni e possono essere, per comodità, raggruppate in due categorie: gli effetti deterministici (ad esempio, la cataratta) e quelli stocastici, quali il cancro, ma anche degenerazioni a livello cardiovascolare e celebrale.

Tuttavia, il campo di radiazione nello Spazio presenta delle peculiarità che lo rendono di gran lunga più insidioso rispetto all'esposizione naturale alla radiazione sulla Terra. Se la principale differenza fra l'ambiente spaziale e quello terrestre è ovviamente l'assenza di gravità, alcuni dei cui effetti sulla fisiologia umana sono già noti dalle precedenti missioni spaziali, è soprattutto la natura del campo di radiazione a destare le principali preoccupazioni in ambito radioprotezionistico. Questo nello Spazio non solo è più intenso di quello cui l'uomo è naturalmente esposto sulla superficie terrestre, ma è inoltre costituito da una piccola percentuale di particelle pesanti altamente energetiche e densamente ionizzanti. Dalle conoscenze in ambito radiobiologico maturate negli ultimi 50 anni sulla Terra è noto che la radiazione particolata densamente ionizzante ha una maggiore efficacia nell'induzione di una moltitudine di danni al DNA. Inoltre, non è ancora del tutto chiaro il ruolo che l'assenza di gravità (*microgravity*) potrebbe avere in combinazione con la durata dell'esposizione, sugli effetti radioindotti sugli astronauti. Sono, tuttavia, soprattutto le conseguenze radiobiologiche delle reazioni di frammentazione nucleare cui tali particelle possono andar soggette nella loro interazione con il materiale schermante (*shielding*) ad

essere accompagnate dalle maggiori incertezze in termini di stime del rischio complessivo. Infatti, tali reazioni producono all'interno dell'astronave o di possibili strutture abitative extraterrestri uno sciame di particelle, aventi minore energia rispetto a quelle incidenti ma con maggiore densità di ionizzazione per unità di percorso (LET, *Linear Energy Transfer*) che concorrono così alla formazione di un campo misto di radiazione. Poiché le attuali conoscenze sugli effetti radioindotti che sono alla base delle norme radioprotezionistiche sono state ottenute in genere mediante esperimenti con fasci monoenergetici di particelle, in modo da poterne caratterizzare la dipendenza dell'efficacia biologica relativa (RBE, *Relative Biological Effectiveness*) dall'energia e quindi dal LET, si deduce immediatamente una prima difficoltà nell'estrapolare agli scenari di esplorazioni spaziali le stime di rischio vigenti sulla Terra. Fondamentale è, ovviamente, la conoscenza dell'esatta dose assorbita dagli astronauti ed il contributo che ad essa forniscono le diverse componenti (fotoni, protoni e ioni pesanti, ad esempio). In particolare, la misurazione della dose assorbita è effettuata normalmente mediante la dosimetria fisica. Essendo, però, la dose fisica in linea di principio diversa da quella biologicamente efficace, per quanto detto sopra tale dosimetria fisica potrebbe essere, a maggiore ragione, insufficiente per una corretta valutazione dei possibili rischi per la salute degli astronauti derivanti dalla loro protratta esposizione al campo di radiazione nello Spazio.

A tale scopo, è stato proposto l'utilizzo di una tecnica normalmente utilizzata sulla Terra per la stima retrospettiva della dose biologicamente rilevante come surrogato, o ad integrazione, della dosimetria fisica, ossia la biodosimetria.

La biodosimetria si basa sul fatto che i principali effetti biologici radioindotti sono quantificabili mediante delle curve dose-risposta: l'analisi riferita ad uno specifico "endpoint" in un opportuno campione di cellule prelevato dagli astronauti prima e dopo la permanenza nello Spazio permette la stima della dose assorbita. Tra gli endpoint comunemente usati per la quantificazione dei danni provocati dalla radiazione sul DNA, un ruolo particolare è riservato alle aberrazioni cromosomiche strutturali (che sono categorizzate sulla base delle configurazioni cui danno origine, quali traslocazioni, dicentrici, etc), attraverso varie tecniche, tra cui le più avanzate si basano su metodiche di ibridizzazione con fluorocromi come nel caso della m-FISH (*multicolor-Fluorescence in Situ Hybridization*). Confrontando il livello del particolare danno radioindotto esaminato con opportune curve di calibrazione realizzate in laboratorio, si risale alla dose assorbita.

Questo lavoro di tesi si prefigge pertanto di fornire una parziale panoramica delle problematiche fin qui esposte. Esso si compone di un primo capitolo nel quale viene presentato la tematica dell'esposizione alla radiazione cosmica in relazione alle previste missioni spaziali e si descrivono i principali effetti radiobiologici di rilevanza per la salute degli astronauti. Nel secondo capitolo viene descritta la biodosimetria, dando dei cenni sulle differenze sostanziali con la dosimetria fisica; inoltre, vengono presentati i principali saggi biodosimetrici comunemente utilizzati, evidenziandone vantaggi e limiti.

Nel terzo ed ultimo capitolo si analizzano alcuni studi empirici a mo' di esempio dell'utilità della biodosimetria nella stima dei rischi legati all'esposizione alla radiazione cosmica, nello specifico due ricerche note come *Twins Study* e *One Year Mission*, entrambe condotte dalla NASA. Seguono le Conclusioni.

Capitolo 1

1. Radiazioni cosmiche ed esplorazione umana dello Spazio

La vita sulla Terra si è evoluta in costante presenza di un fondo di radiazione ionizzante (RI) naturale (*natural background radiation*), cui l'emissione associata al decadimento radioattivo contribuisce in gran parte. L'esposizione alla RI, difatti, rappresenta uno dei principali limiti (non tecnologici) per l'esplorazione umana oltre la Terra. Il campo di radiazione cosmica è composto principalmente da particelle e nuclei atomici di alta energia di origine sia galattica che extragalattica [1].

La gran parte della radioattività inizialmente conosciuta veniva attribuita ad elementi primordiali della Terra. Tuttavia, grazie agli esperimenti con palloni aerostatici di Hess, condotti tra il 1911 e il 1913, si scoprì che all'aumentare dell'altitudine la radioattività non diminuiva, come ci si aspettava, ma, al contrario, aumentava; conseguentemente, si cominciò a ritenere che la radioattività rilevata non fosse determinata esclusivamente dagli elementi primordiali presenti nella crosta terrestre ma che vi contribuisse anche un fattore extraterrestre [1]. Queste osservazioni, rafforzate da ulteriori esperimenti con palloni ad altezze superiori, spinsero R.A. Millikan a definire questo flusso di fondo come la "radiazione cosmica" [1].

Così come sulla Terra, la radiazione cosmica può interagire con il mezzo attraverso il quale si propaga e, conseguentemente, depositare la propria energia anche nel materiale biologico, specificatamente nel nucleo delle cellule, potenzialmente alterando la struttura del DNA e quindi dare origine ad una serie di effetti deleteri, il più temuto dei quali è il cancro radioindotto.

Molte delle conoscenze dell'azione della RI sulla salute umana sono ovviamente riferite al campo di radiazione terrestre, considerando che nell'ultimo secolo l'esposizione alle RI è significativamente aumentata grazie all'impiego diagnostico e terapeutico della radiazione stessa. Tuttavia, come si vedrà nel seguito, il campo associato alla radiazione cosmica pone una serie di problematiche peculiari per quanto riguarda i potenziali rischi per la salute umana.

In estrema sintesi, gli effetti biologici dell'esposizione alla RI, e quindi le conseguenze a livello della salute umana, sono funzione sia della quantità di energia assorbita nel tessuto (o cellula), trasportata dalla RI, e cioè la dose, che, a parità di quest'ultima, dalla "qualità" della radiazione, cioè dalla sua densità di ionizzazione, che distingue i fotoni dalle particelle cariche pesanti.

Come verrà ampiamente descritto, i rischi più preoccupanti a cui possono andare incontro gli astronauti, per quanto riguarda i danni che si manifestano a lungo termine, sono malattie dell'apparato cardio-cerebrovascolare e l'insorgenza di tumori; questi sono i tipici effetti

stocastici delle RI. Altri effetti ricadono nell'ambito di quelli deterministici, quali l'induzione precoce di cataratta. La differenza sostanziale è che mentre per questi ultimi è possibile definire una dose soglia oltre la quale è possibile prevedere l'effetto e la sua severità, i danni stocastici sono per definizione privi di dose soglia e associati ad una stima di rischio piuttosto che ad una precisa dipendenza dalla dose assorbita.

Le principali differenze tra il campo di radiazione nello Spazio e quello terrestre fanno appunto riferimento alla dose e alla qualità della radiazione. Come riportato nel paragrafo 1.2, mentre sulla Terra la dose media assorbita è di circa 2,4 mSv/annui, nello Spazio, per assenza dell'atmosfera e quindi del suo potere schermante, la dose cumulativa annua può essere anche fino a due ordini di grandezza maggiore [1]. Inoltre, mentre la radiazione di fondo terrestre ha una importante componente, che ammonta a circa 2/3, da particelle α , le quali si formano in seguito al decadimento del radon [2], la radiazione cosmica è, per la maggior parte, costituita da protoni di elevata energia (nell'ordine dei GeV), ma anche di particelle cariche pesanti, praticamente con tutti gli Z previsti dalla tavola periodica degli elementi. Se è vero che queste rappresentano, in termini quantitativi, solo una minima frazione, in fluenza, delle particelle della radiazione cosmica (circa l'1% della *Galactic Cosmic Radiation* o GCR) come si vedrà in seguito, la loro rilevanza radiobiologica è notevole. La differenza principale, almeno in prima approssimazione¹, risiede quindi nel fatto che il campo di radiazione cosmica è di "qualità" diversa da quello cui l'uomo è esposto sulla Terra.

In primo luogo, nel caso della radiazione particolata l'andamento della perdita di energia per unità di cammino percorso dalla particella (*stopping power*) segue la legge di Bethe e Bloch, per la quale si definisce una proporzionalità inversa della perdita di energia dal quadrato della velocità della particella (β):

$$-\frac{dE}{dx} = 2\pi N_a r_e^2 m_e C^2 \rho \frac{Z}{A} \frac{z}{\beta^2} \left[\ln \left(\frac{2m_e \gamma^2 v^2 W_{max}}{I^2} \right) - 2\beta^2 - \delta - 2\frac{C}{z} \right]$$

¹ In prima approssimazione perché, come si vedrà nel seguito, all'interno dell'astronave o di possibili basi abitative sulla Luna o su Marte, il campo di radiazione finale è più complesso a causa di fenomeni legati alla frammentazione nucleare originata da ioni pesanti, che contribuiscono in misura esigua alla fluenza totale ma hanno un impatto radiobiologico notevole.

$$\gamma = 1/\sqrt{1 - \beta^2}$$

$$\beta = v/c$$

r_e e m_e : raggio classico e massa dell'elettrone

N : numero di Avogadro = $6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$

I : potenziale di eccitazione

Z : numero atomico del materiale assorbente

ρ : densità del materiale assorbente

z : carica della particella incidente

δ : correzione di densità

C : correzione di shell

W_{max} : energia massima trasferita in una singola collisione

Ne consegue che l'andamento della perdita di energia presenti un massimo, chiamato picco di Bragg; questa caratteristica rende i fasci di particelle cariche accelerate molto utile in radioterapia (in questo caso, detta adroterapia) poiché consente di massimizzare il rilascio di dose solo sul volume dove si trova la massa tumorale, risparmiando il tessuto sano più di quanto consentano i fotoni o gli elettroni usati nella radioterapia convenzionale come si evince dall'andamento esponenziale negativo del loro deposito di dose con la profondità di penetrazione (Figura 1).

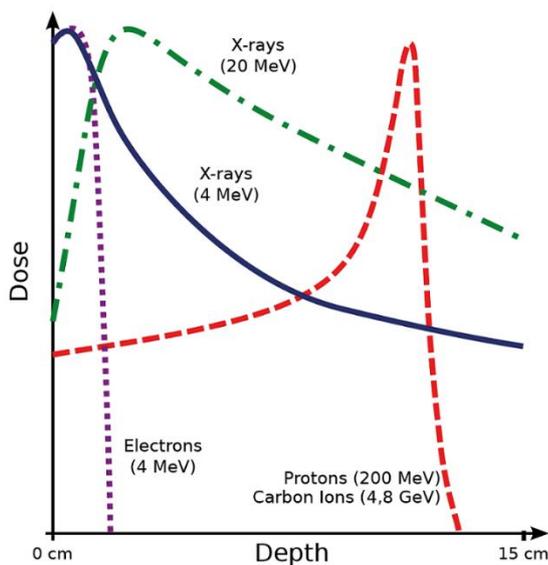


Figura 1: Curve dose-profondità di elettroni, radiazione elettromagnetica di fondo (raggi X) e radiazione cosmica (protoni).

In secondo luogo, le particelle cariche che si possono incontrare al di fuori dell'atmosfera terrestre e la radiazione di fondo sulla Terra si differenziano per un parametro fondamentale, il LET (*Linear Energy Transfer*) [2].

Il trasferimento lineare di energia (LET) è l'energia trasferita per unità di lunghezza del percorso, anche detto *restricted stopping power*. Il LET può essere definito operativamente come il rapporto tra l'energia media rilasciata dalla particella carica (dE) in una distanza media percorsa (dl):

$$LET = \frac{dE}{dl}$$

L'unità solitamente utilizzata nel SI (Sistema Internazionale) per questa quantità è il keV / μm di materiale a densità unitaria [3].

Si noti che, per un dato tipo di particella carica, maggiore è l'energia, minore è il LET e quindi minore è la sua efficacia biologica, come dettagliato in seguito [3]. Pertanto, in radiobiologia, in termini di efficacia biologica, si introduce una distinzione basata proprio sul LET:

- radiazioni ad alto LET (*high-LET*), tipicamente composte da ioni pesanti, caratterizzate da una elevata densità di ionizzazione, altamente efficaci dal punto di vista radiobiologico;
- radiazioni a basso LET (*low-LET*), costituite generalmente da fotoni, che, al contrario, producono sono meno efficaci biologicamente.

La distinzione sopra riportata riflette il fatto che le conseguenze dell'azione della RI a livello biologico sono profondamente influenzate dalla qualità della RI, che è appunto descritta dal LET, al crescere del quale cresce la complessità del danno radioindotto al DNA (Figura 2), e quindi l'efficacia biologica relativa o RBE (*Relative Biological Effectiveness*).

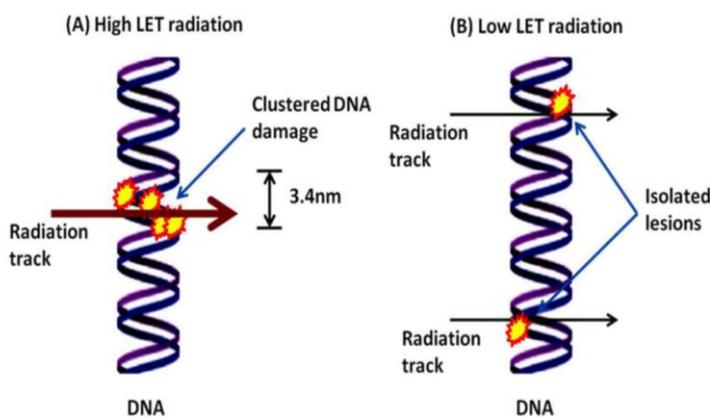


Figura 2 Esempio di produzione di danno al DNA da parte di tracce di radiazione con diversa densità di ionizzazione (LET): a destra radiazione di basso LET produce tipicamente danni isolati e facilmente riparabili; al crescere del LET (sinistra), multiple lesioni diventano concentrate in pochi nm (clustered DNA damage), che la cellula ripara meno efficientemente. Figura tratta da Zhu et al. [4].

Generalmente la quantità di radiazione in funzione della quale si quantifica il danno biologico radioindotto è espressa in termini di dose assorbita, che si misura in Gray (Gy) ed equivale all'energia assorbita per unità di massa del tessuto irraggiato (1 Gy= 1 Joule/kg). Tuttavia, per quanto appena detto sopra, dosi uguali di radiazioni di diversa qualità non producono effetti biologici uguali [5]. Per tener conto di ciò, il parametro RBE è largamente impiegato nella radiobiologia per comparare l'efficacia di radiazioni di 'qualità' diverse, adoperando come standard di riferimento radiazioni a basso LET quali fotoni (tipicamente raggi X prodotti da tubi radiogeni a 250 kV o raggi γ emessi da sorgenti di ^{60}Co).

Nello specifico, l'RBE è definito come il rapporto D_{test}/D_r , dove D_{test} e D_r sono, rispettivamente, la dose della radiazione standard di cui sopra ('test') e la dose della radiazione di prova, necessarie per indurre lo stesso livello (e quindi avere la stessa "efficienza") dell'effetto biologico indotto considerato; tipicamente, in questo contesto, viene considerata la morte cellulare come danno radioindotto. L'RBE di radiazione a basso LET si assume pari a 1, mentre per radiazione ad alto LET il valore del parametro RBE aumenta [6].

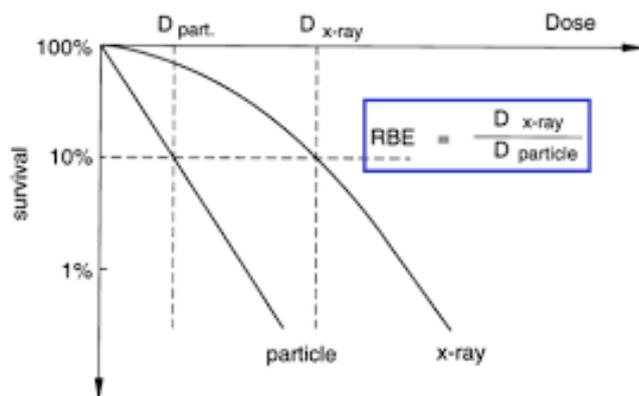


Figura 1: Tipiche curve ricavate da un saggio, detto clonogenico, per la misura della morte cellulare radioindotta, che riportano la frazione di cellule sopravvissute alla radiazione in funzione della dose per due tipi di radiazione, particelle ad alto LET e raggi X.

La Figura 4 descrive la tipica relazione tra l'RBE e il LET, in cui si vede che al crescere del LET, aumenta rapidamente anche l'RBE fino ad arrivare ad un massimo corrispondente ad un valore del LET attorno ai 100-120 keV/ μm (*Optimal Linear Energy Transfer*) [6]. La radiazione a questa densità di ionizzazione ha la più alta probabilità di causare una rottura doppia al filamento del DNA col passaggio di una singola particella carica, e questi danni sono tipicamente letali per la cellula, ossia ne provocano la perdita della capacità di proliferazione.

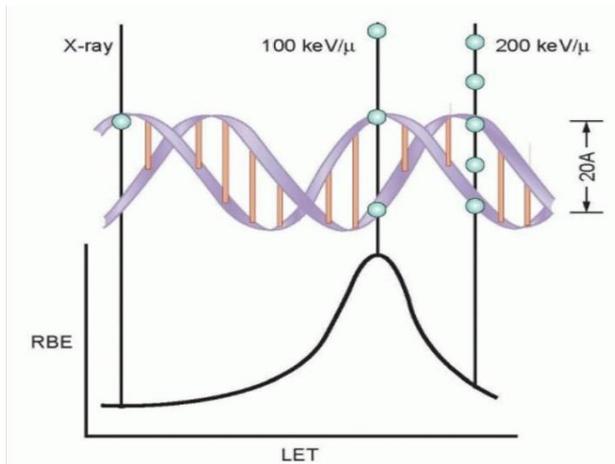


Figura 2: grafico che riporta la relazione tra RBE e LET e, qualitativamente, i possibili danni indotti al DNA da valori differenti di LET.

Le particelle cariche che compongono la radiazione cosmica sono soggette ad una serie di processi nucleari (*fragmentation*) che danno origine a particelle secondarie, generalmente ioni pesanti che possono presentare anche valori elevati LET che, quindi contribuiscono a generare un campo misto, come verrà ampiamente descritto nel paragrafo 1.2.3 della presente disamina, la predizione del cui RBE complessivo non è affatto banale e fa tipicamente affidamento a codici di trasporto ed altri metodi computazionali [7]. Una possibile alternativa è, appunto, rappresentata dalla biodosimetria, che è il soggetto di questo lavoro di tesi e sarà discussa nel secondo capitolo.

1.1. Composizione della radiazione cosmica

È possibile classificare i raggi cosmici in base alle energie ed alla sorgente che li caratterizza:

- GCR, *Galactic Cosmic Radiation*;
- SCR, *Solar Cosmic Radiation*;
- ACR, *Anomal Cosmic Radiation*.

In particolare, la GCR è composta per la maggior parte da protoni, che ne costituiscono l'85%, per il 14% da nuclei di elio (particelle α), e per l'1% da nuclei pesanti (detti anche HZE, come in seguito descritto) [4]. Generalmente, quando si parla di radiazione cosmica ci si riferisce alla GCR. Questa ha un'energia minima delle decine di MeV (misurate con l'esperimento Voyager²); si suppone siano originate da eventi astrofisici come esplosioni di supernove che generano appunto una grande quantità di nuclei di elio (He), idrogeno (H) e nuclei pesanti [8].

² L'esperimento Voyager è partito nel 1977 per compiere il *Planetary Grand Tour* (esplorazione dei pianeti), in tempi recenti ha superato il Sistema Solare e continua a viaggiare nello Spazio, inviando dati alla Terra e probabilmente l'ultima componente cesserà di funzionare nel 2030.

Il flusso di particelle cariche che compone i GCR è soggetto a fenomeni esterni che ne attenuano l'energia e ne variano le traiettorie; questi sono principalmente: interazioni con campi magnetici, vento solare e campi geomagnetici.

L'effetto combinato di campi magnetici e venti solari determina uno spostamento delle traiettorie dei GCR, che, conseguentemente, ne fa variare lo spettro a basse energie nel tempo e nello Spazio. La modulazione nel tempo è una variazione periodica del flusso che non è dovuta ad attività solare, mentre la modulazione nello Spazio causa la diminuzione dell'energia del flusso di CR (*Cosmic Radiation*). Infine, i campi geomagnetici provocano effetti dipendenti dalla latitudine [4].

Si verifica l'esistenza di un'ulteriore tipologia di radiazione cosmica, che viene definita UHECR (*UltraHigh-Energy Cosmic Radiation*), con un'energia dell'ordine di 10^{21} eV, più elevata di circa 10^{15} ordini di grandezza della GCR sopra descritta, il flusso risulta quindi caratterizzato da particelle molto leggere [8].

L'origine è a tutt'oggi sconosciuta, ma esistono diverse indicazioni che fanno pensare ad un'origine all'esterno della nostra galassia. Una possibile sorgente di questi raggi sono i *jets* provenienti da *Black Holes* super massivi, esplosioni di nuclei galattici pesanti oppure da monopoli magnetici [8].

Negli anni sono state proposte diverse ipotesi che verificherebbero la natura extragalattica degli UHERC come l'impossibilità dei campi magnetici, presenti nella Via Lattea, ad intrappolare la CR di energia elevata. I protoni di energia superiore ai 10^{15} eV sfuggono, infatti, al confinamento galattico.

Questo fenomeno è verificato da diverse osservazioni riguardanti le traiettorie dei protoni che arrivano sulla Terra; se i protoni con un'energia così elevata fossero originati all'interno della nostra galassia riuscirebbero a sfuggire ai campi magnetici e avrebbero traiettorie allineate al piano galattico, e questo non è verificato sperimentalmente.

Un'altra conferma della provenienza extragalattica dei UHERC è nella interazione dei protoni energetici con le microonde di fondo (originatesi dal *Big Bang*). Atteso che questi perdono un'energia tale per cui non riuscirebbero più ad essere rivelati e osservati sulla Terra se la sorgente fosse posta a più di 50 Mpc^3 (megapersec), e siccome gli elettroni sono invece rivelati, deve ritenersi che la sorgente si trovi nel range di 50 Mpc (Paradosso GZK⁴) [8].

Di seguito vengono illustrate le ulteriori componenti dei Raggi Cosmici prima elencate.

³ Il megapersec è un'unità di misura della distanza uguale a un milione di persec o a 3,26 milioni di anni luce.

⁴ Il paradosso GZK (Greisen-Zatsepin-Kuzmin) riguarda il limite dell'energia dei protoni attestata per la teoria omonima a 10^{19} MeV mentre si verifica anche la presenza di protoni di energia superiore.

I SCR sono caratterizzati da eventi solari, come esplosioni, che riescono ad accelerare le particelle oltre qualche GeV in meno di 10 secondi. Sono per lo più formati da protoni, nuclei pesanti ed elettroni e per questo motivo risultano essere più rilevanti nell'esplorazione umana dello Spazio poiché non è presente uno schermo protettivo come l'atmosfera [8].

Gli ACR, identificabili con la parte anomala dei raggi cosmici a basse energie, sono caratterizzati da ioni di elementi che includono elio (He), azoto (N), ossigeno (O) e argento (Ar), generati nel luogo dello Spazio dove il vento solare è subsonico [8].

1.2. Principali danni biologici di rilevanza nell'esplorazione spaziale

Negli ultimi anni la progettazione di viaggi spaziali ha subito una decisa accelerazione, specie per quanto concerne l'esplorazione di Marte, oppure lo stanziamento di future stazioni spaziali permanenti sulla Luna [9].

Nonostante il soggiorno medio di un astronauta nello Spazio è attualmente di circa sei mesi (limite stabilito dalla NASA) la sua durata comporta comunque svariati rischi alla salute degli astronauti [10]. Conseguentemente, analizzando i danni provocati dall'esposizione alla RI si riuscirebbe ad avere un modello di previsione dei rischi cui sono soggetti gli astronauti, che affrontano un lungo viaggio spaziale.

Gli astronauti sono esposti alla radiazione cosmica, che è peculiare per dosi medie assorbite e qualità delle sue componenti, in condizioni altrettanto peculiari (microgravità). In aggiunta, i materiali schermanti (*shielding*) come verrà descritto nei paragrafi successivi, rappresentano un ulteriore problema legato alla radiazione cosmica stessa.

Gli effetti immediati dell'esposizione a radiazione cosmica possono includere danni al DNA, attivazione redox e risposte di trasduzione del segnale. In un secondo momento vengono attivati altri effetti delle radiazioni su alcuni principali processi biologici, tra cui la riparazione del DNA, che conduce a mutazioni, e la perturbazione del ciclo cellulare, con possibile morte cellulare. Questi effetti ricadono tipicamente nella categoria degli effetti deterministici (vedi in seguito).

Tuttavia, gli effetti che più destano preoccupazione sono quelli che si possono manifestare anche dopo molto tempo dall'esposizione (*late effects*), che ricadono nella categoria dei cosiddetti effetti stocastici, i più importanti dei quali sono la carcinogenesi radioindotta[11], ma anche l'insorgenza di malattie dell'apparato cardiovascolare[12] e la compromissione delle funzioni cerebrali[13].

La radiazione HZE (*High Atomic number and Energy*), come si vedrà nello specifico nel paragrafo seguente, è una delle componenti della CR maggiormente rischiosa per la salute perché ha mediamente un LET elevato, essendo costituita da ioni pesanti. È stato infatti dimostrato da studi radiobiologici sulla Terra che l'RBE anche per l'induzione degli effetti tardivi sopraindicati è maggiore per radiazioni ad alto LET.

Come detto prima, tutti gli effetti radiobiologici sono tipicamente legati alla dose assorbita e, a parità di questa, al LET. Pertanto, per una stima dei rischi alla salute associati all'esplorazione dello Spazio, questi due parametri devono essere noti o determinati. In ambito radioprotezionistico, alla dose misurata in Gy si preferisce la dose equivalente H che si misura in Sievert (Sv) [14], e che rappresenta la dose pesata per i diversi contributi da radiazioni di varia qualità. Essa è pertanto definita come:

$$H = DW_R$$

dove D è la dose fisica assorbita e W_R un fattore di peso, che sostanzialmente riflette l'RBE.

Generalmente in un anno un uomo è esposto a circa 2,4 mSv (media mondiale) che se confrontati con alcuni dati di missioni spaziali, esposti nella tabella che segue, consentono di accertare che - anche solo nel corso della breve missione dello Space Shuttle - in soli 8 giorni gli astronauti hanno assorbito la dose efficace⁵ generalmente assorbita in oltre 2 anni sulla superficie terrestre [10].

Missione	Dose di radiazione (mSv)
Space Shuttle 41C (8 giorni in orbita intorno alla Terra a 460 km di altitudine)	5,59
Skylab (87 giorni in orbita intorno alla Terra a 473 km di altitudine)	11,4
Skylab 4 (87 giorni in orbita intorno alla Terra a 473 km di altitudine)	178
ISS (più di 6 mesi in orbita intorno alla Terra a 353 km di altitudine)	160
Estimated Mars (3 anni)	1200

Tabella 1: Valori di dosi assorbite durante alcune missioni Spaziali [9].

Come accennato sopra, anche nel caso dei danni provocati dalla radiazione cosmica, gli effetti possono essere classificati in due categorie:

- deterministici, che si verificano solo se la dose della radiazione supera un certo livello di soglia, stabilito per quel tipo di radiazione e la gravità del danno indotto cresce al crescere della dose [14]. Al di sotto della soglia gli effetti sono trascurabili, ossia, non sono particolarmente significativi;
- stocastici, per i quali è solo possibile stimare la probabilità che si verifichino come funzione della dose assorbita, ma non è possibile individuare una dose soglia, e riguardano anche solo una cellula [14].

⁵ La dose efficace è sostanzialmente diversa dalla dose equivalente, che tiene conto della radiosensibilità del tessuto, perché, al contrario, è la somma di tutte le dosi equivalenti di tutti gli organi e tessuti, irraggiati con la rispettiva dose fisica, pesate con i relativi valori di radiosensibilità.

1.2.1. Effetti deterministici

Tra gli effetti deterministici si possono distinguere due sottocategorie dipendenti dal tempo di manifestazione [14]:

- precoci, sono effetti locali (danni a singoli tessuti o organi) o generalizzati (sindrome acuta);
- ritardati, tra cui la cataratta.

I principali sono, per l'appunto, la morte cellulare e l'insorgenza di cataratta.

La morte cellulare risulta essere il danno meglio definito dell'esposizione a RI, e si può manifestare in diverse modalità che definiscono anche la metodica opportuna per la sua quantificazione, e comprende la morte clonogenica, l'apoptosi e la senescenza prematura. La morte cellulare, per esempio, è una delle responsabili degli effetti acuti in radioterapia quali eritemi da radiazione. La senescenza, d'altro canto, è stata implicata in effetti tardivi quali la fibrosi. In effetti, la maggior parte degli effetti tardivi deterministici si riferiscono ad organi e la cataratta ne è un chiaro esempio. Essa è una malattia che riguarda l'apparato visivo e consiste nella formazione di un'opacità sulla lente dell'occhio che determina una perdita parziale della vista. Come è noto, la cataratta si manifesta fisiologicamente con l'avanzare dell'età ma la sua insorgenza può essere invece indotta precocemente appunto per effetto dell'esposizione alle RI. La dose di radiazione di soglia dopo la quale si aumenta la probabilità di insorgenza di cataratta è posta a 0,5 Gy, per cui si verifica che per gli astronauti anche solo dopo 8 giorni di permanenza aumenta di gran lunga il rischio, con l'aggravante del maggior contributo, in questo caso, di radiazione ad alto LET.

1.2.2. Effetti stocastici

È possibile riscontrare due distinte classi di effetti c.d. "stocastici". La prima riguarda le cellule somatiche, e conduce allo sviluppo di un tumore nel soggetto esposto [14]. La seconda categoria si verifica nelle cellule dei tessuti germinali, dando luogo a disordini ereditari nei discendenti delle persone irradiate [14].

Generalmente, gli effetti dovuti all'esposizione a radiazione cosmica sono di tipo stocastico e riguardano principalmente lo sviluppo di disturbi al sistema nervoso e tumori. Recentemente sono state avanzate ipotesi sulla possibile connessione tra esposizione alla radiazione e problemi cardiovascolari [12].

La carcinogenesi radioindotta sicuramente rappresenta l'effetto più temuto ma anche quello più estensivamente studiato, almeno sulla Terra. I maggiori effetti di

carcinogenesi provengono da un'esposizione alla radiazione di particelle HZE [11]. Come vedremo, in mancanza di dati specifici per la radiazione cosmica, il rischio di carcinogenesi può essere stimato mediante tecniche biodosimetriche.

Essendo frutto di un tale tipo di analisi "statistica", non sono ben rappresentativi della reale esposizione. Perciò, studiare gli effetti degli HZE su campioni di cellule *in vitro* è di fondamentale importanza, in quanto si riesce a stimare la probabilità di insorgenza di tumori in seguito all'esposizione [11].

I linfomi⁶ indotti da particelle HZE (ioni pesanti) hanno mostrato un aumento della frequenza di grandi delezioni interstiziali in vari siti del genoma rispetto a quella dei linfomi indotti dalla comune radiazione elettromagnetica [15].

L'esposizione a particelle HZE ha determinato l'insorgenza di tumori più aggressivi. Ciò suggerisce che gli effetti delle particelle HZE sono più efficaci della radiazione γ o X di riferimento, come detto prima a proposito del maggior RBE esibito da questo tipo di radiazione. Purtroppo, c'è ancora una scarsità di dati su questo argomento [11].

Oltre al rischio di insorgenza di tumori, più recenti studi condotti dalla NASA hanno verificato una possibile correlazione tra esposizione alla radiazione ionizzante e il riscontro di disturbi al sistema nervoso centrale [13].

Determinare eventuali danni al cervello o all'apparato del sistema nervoso è molto complesso essendo stato di solito considerato, *in primis*, l'organo più radioresistente e, *in secundis*, essendo costituito da meccanismi di funzionamento tra i più articolati. Gli studi fatti su animali (topi) hanno evidenziato che l'effetto degli HZE riguarda soprattutto tessuti e funzioni neuronali (si è verificato, ad esempio, che inabilitano le connessioni neuronali) [15]. Tuttavia, le ricerche effettuate riguardano effetti per esposizioni brevi ed a elevato rateo di dose, che simulano solo in parte le radiazioni reali dello Spazio. Gli effetti sul sistema nervoso centrale di una lunga esposizione a raggi cosmici sono in gran parte ignoti [13].

Lo studio condotto da Acharya *et al.* [16] ha evidenziato che una prolungata esposizione a radiazione compromette la connessione all'ippocampo e anche disfunzioni della corteccia frontale responsabile dell'apprendimento. Lo studio ha poi mostrato che 1 astronauta su 5, in seguito ad un lungo viaggio nello Spazio profondo, mostra disturbi di ansia grave e 1 astronauta su 3 anche disfunzioni legate alla memoria. Le evidenze sperimentali disponibili suggeriscono che probabilmente esiste una relazione tra esposizione prolungata e danni al sistema nervoso e nei

⁶ I linfomi sono tumori che riguardano il sistema linfatico e, più precisamente, i linfociti, cellule preposte alla difesa di infezioni.

prossimi anni sarà verosimilmente necessario aumentare la quantità di dati acquisiti per dimostrare una connessione rilevante dal punto di vista statistico.

1.3.Possibili fattori che influenzano l'azione biologica della radiazione cosmica

I danni provocati dalla radiazione cosmica, descritti organicamente nei paragrafi precedenti, dipendono essenzialmente da alcuni fattori dipendenti o meno dalla radiazione stessa.

In generale, si ipotizza che esistono dei fenomeni correlati alla radiazione cosmica o che caratterizzano la radiazione stessa, i quali potrebbero influenzare l'esito dell'azione della radiazione su un soggetto, accentuando, in alcuni casi, i danni provocati.

1.3.1. Microgravity

L'esplorazione umana oltre la Terra è fortemente influenzata dalla radiazione e al contempo anche dalla gravità, la quale potrebbe in qualche modo modificare la funzionalità della cellula ed eventualmente i meccanismi enzimatici intracellulari di riparo delle lesioni radioindotte al DNA. Questi sono fondamentali perché è dalla loro efficienza che dipende se la dose inizialmente assorbita si traduce poi in un effetto biologico a livello cellulare o tissutale [17]. Poiché tali sistemi di riparo si sono evoluti sulla terra, è lecito chiedersi se possono essere influenzati dalla principale caratteristica della permanenza umana nello Spazio, ossia l'assenza di gravità.

Se l'assenza di gravità mina il corretto assemblaggio delle unità catalitiche alla base del funzionamento degli enzimi preposti a riparare le rotture della doppia elica, per esempio, ciò porterebbe ad esacerbare i possibili effetti della radiazione.

È infatti noto che l'assemblaggio di tessuti o organi, la trasduzione dei segnali intercellulari e processi di diffusione controllata possono essere fenomeni dipendenti dalla gravità [18].

A tutt'oggi gli effetti della radiazione sulle cellule in assenza di gravità sono indeterminati e molti esperimenti sono stati condotti *in vitro* volti a simulare le condizioni dello Spazio su culture di cellule, ed in tal senso si parla quindi di microgravità, per verificare se risulta esserci una differenza dell'azione della radiazione tra ambiente con gravità e microgravità.

Pertanto, siccome realizzare un esperimento *in vivo* o anche *in vitro* di cellule nello Spazio è un'operazione molto complessa, si sono spesso studiate colture di cellule

sulla Terra ricreando le condizioni di assenza di gravità, per esempio utilizzando apparati della NASA (“microgravità modellizzata”)⁷.

Tra questi studi si cita l’esperimento condotto da Manti *et al.* nel 2005 [19], in cui linfociti dal sangue di donatori sani furono esposti a protoni con energia di 60 MeV e poi lasciati riparare sia in condizioni di gravità normali che di microgravità, misurando la frequenza di aberrazioni cromosomiche, un danno che è causato da un cattivo riparo delle rotture della doppia elica del DNA. Questo studio non rilevò significative differenze tra le due condizioni nelle curve dose-risposta delle aberrazioni cromosomiche radioindotte (Figura 5).

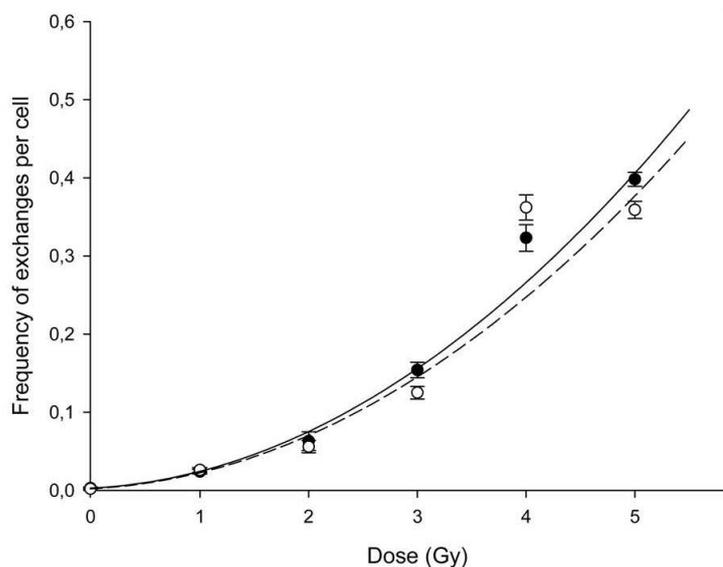


Figura 5: Frequenza di scambi cromosomici indotti da protoni in presenza di gravità (cerchi neri) o in condizioni di assenza di gravità modellata (cerchi bianchi), in funzione della dose [19]. È evidente l’assenza di un effetto della microgravità sul riparo del danno radioindotto.

Più recentemente, uno studio condotto da Yatagai *et al.* nel 2019 [18], si propose di definire un nuovo modello di analisi con il quale determinare la correlazione tra radiazione cosmica e microgravità sfruttando alcune risposte cellulari, quali, ad esempio, risposte di danno sul DNA (riparazione, replicazione e trascrizione) o espressione di geni e proteine. Irraggiando colture di cellule con una comune RI (raggi X), in condizioni di simulata assenza di gravità, si evidenziò che i danni al cromosoma provocati da una esposizione a RI non è aggravata dalla microgravità, confermando anche studi precedenti.

⁷ Uno di tali dispositivi è un bioreattore (Synthecon, Inc., Houston, TX, USA) che ricrea le condizioni di assenza di gravità, è costituito da un gas all’interno di una camera che ruota su sé stessa (caduta infinita).

1.3.2. HZE

Tra le varie componenti della radiazione nello Spazio, gli ioni pesanti sono di particolare interesse per i possibili effetti radiobiologici anche se solo l'1% delle particelle componenti raggi cosmici sono appunto particelle HZE (*High Atomic number and Energy*). Esse posseggono energie nell'ordine dei GeV/n, quindi tale da riuscire a penetrare attraverso lo *shielding* (astronave o tute spaziali) [2].

Una delle possibili conseguenze, in seguito all'esposizione a radiazione di particelle altamente energetiche, è l'insorgenza di tumori provocati da danni multipli al DNA (che conducono a traslocazioni e crossover dei cromosomi) che possono indurre un malfunzionamento del meccanismo di riparo della cellula stessa [11].

Numerosi studi hanno tentato di quantificare il danno indotto dagli HZE al DNA, tra cui quello di Pignalosa *et al.* del 2008 [20], il quale saggia le aberrazioni in una cultura di linfociti esposti a fasci di particelle accelerati sulla terra atti a simulare le condizioni della radiazione HZE. Un parametro impiegato nella analisi è il tasso F che stabilisce la relazione tra scambi inter e intra cromosomici. A causa dell'elevata energia depositata dai raggi ionizzanti questi producono più rotture a doppio filamento rispetto alle radiazioni non ionizzanti a parità di dose. Nell'esperimento innanzi menzionato si studia il danno citogenico residuo nei linfociti esposti *in vitro* a radiazione di ioni di ferro e contemporaneamente a raggi Gamma, usando specifiche sonde per verificarne eventuali differenze. La scelta di particolari classi di biomarcatori risulta essere più efficace di altre per determinare la maggiore incidenza degli HZE nella formazione di tumori. Le sonde non solo riescono a rilevare interscambi semplici e complessi ma anche inversioni altrimenti rilevabili solo con sonde di cromosomi colorati (mFISH, descritta nello specifico nel paragrafo 2.3.).

Si è visto che gli ioni inducono una frequenza maggiore di eventi che coinvolgono contemporaneamente inter e intra scambi. Ne consegue un sostanziale aumento del tasso di morte delle cellule esposte. Inoltre, la presenza di entrambi gli scambi nel DNA può rappresentare la caratteristica identificativa dell'esposizioni agli ioni pesanti.

1.3.3. *Mixed field*

I protoni, come detto, costituiscono la maggior parte dei raggi cosmici e il loro spettro energetico ha picchi dell'ordine di 1 GeV. I protoni così energetici quando colpiscono un bersaglio, interagendoci, creano un fascio di particelle secondarie. Questo flusso secondario ha una composizione mista, per lo più ignota, e, inoltre, assume energie minori, che equivalgono ad un elevato LET. Generalmente si verifica, attraverso esperimenti, che dalla interazione dei protoni con bersagli più o meno spessi si crea un campo di particelle misto (*mixed field*) costituito per lo più da particelle cariche,

pioni, muoni e ulteriori protoni. Il fenomeno appena descritto è un problema chiave nell'analisi della radioprotezione per gli astronauti nello Spazio. Nonostante lo studio del fenomeno e delle possibili soluzioni, non si è ancora in grado di determinare con certezza il rischio ad esso correlato [21].

Negli anni sono stati analizzate le interazioni dei protoni con bersagli di materiale e spessore diverso per comprendere l'entità dei danni causati dalla radiazione in relazione al campo misto generato. Si verifica che, in effetti, materiali idrogenati, come il polietilene, riducono l'efficienza della radiazione rispetto alla formazione delle aberrazioni cromosomiche.

Al contempo risulta impossibile creare la struttura della navicella in modo tale da evitare l'interazione dei protoni con la stessa e, conseguentemente, che le particelle secondarie irraggino le cellule degli astronauti.

Al fine di tentare di costruire una struttura più schermante alla radiazione si utilizzano le misurazioni dei danni citogenetici di cellule esposte a raggi di protoni che colpiscono prima un bersaglio di caratteristiche variabili e si determina, di conseguenza, il *quality factor*⁸ della radiazione dello Spazio.

Nell'articolo di Bertucci *et al.* del 2008 [21] viene analizzato il *quality factor* di un fascio di protoni energetici a 980 MeV accelerati al *NASA Space Radiation Laboratory* e fatti interagire con una lastra di Lucite (Polimetilmetacrilato)⁹ oltre che di Alluminio (Al), per evidenziarne le eventuali differenze. È possibile notare che il tasso della dose assorbita di un fascio di protoni interagente con il bersaglio aumenta rispetto ad un fascio "puro", nelle vicinanze del bersaglio stesso. In particolare, il tasso cresce del 40% e del 60% rispettivamente quando il fascio è filtrato dal bersaglio di PMMA e di Alluminio, in corrispondenza di distanze inferiori ai 20 cm dal bersaglio stesso. Al contrario, i protoni a distanze più elevate non hanno un'energia così elevata, per cui l'effettiva incidenza biologica di fasci di protoni di 1 GeV per l'induzione di aberrazioni cromosomiche è compatibile con i raggi X.

In effetti, a tali distanze i danni provocati non sono aggravati dallo *shielding* ancorché sarebbe opportuno riprodurre l'esperimento in ambiente spaziale o più simile a questo, in modo tale da avere dei dati più realistici per determinare il rischio degli astronauti.

⁸ Il *quality factor* (QF) è un parametro adimensionale inteso come il rapporto tra la dose efficace e la dose totale assorbita.

⁹ Il polimetilmetacrilato (in forma abbreviata PMMA) è una materia plastica formata da polimeri del metacrilato di metile, estere metilico dell'acido metacrilico. È un polimero termoplastico. È noto anche con i nomi commerciali di Plexiglas, Amanite, Lucite.

Capitolo 2

2. Biodosimetria ed esposizione umana alla radiazione cosmica

La biodosimetria (dosimetria biologica) permette una stima retrospettiva della dose biologicamente efficace. Pertanto, insieme alla dosimetria fisica che viene di routine effettuata, costituisce una possibile tecnica di analisi attraverso la quale, dalla conoscenza del danno radioindotto al DNA, è possibile quantificare i possibili rischi dell'esposizione a radiazione cosmica degli astronauti e, di conseguenza, costruire adeguati dispositivi per proteggere gli stessi o migliorare l'efficienza di quelli esistenti.

Obiettivo della dosimetria biologica è quello di determinare il livello di un particolare danno indotto dall'esposizione alla radiazione cosmica che sia noto essere correlato a possibili rischi per la salute degli astronauti [22]. Esistono un serie di indicatori biologici dell'esposizione alla radiazione, come mutazioni, cambiamenti del funzionamento delle proteine, intermediatori metabolici. Tra questi, i biomarcatori citogenetici, nello specifico le alterazioni strutturali del DNA sotto forma di aberrazioni cromosomiche radioindotte risultano essere quelli più utili ed affidabili per la rivelazione dell'esposizione alla radiazione e sono i più comunemente usati [23]. Come è stato più volte ricordato, il più temuto tra gli effetti sull'organismo degli astronauti è senza dubbio l'insorgenza di tumori. Questi sono provocati da alterazioni del patrimonio genetico e sono pertanto correlati alla presenza delle aberrazioni cromosomiche, come dimostrato da molti studi sintetizzati in Bonassi *et al.* [24], secondo cui una maggiore baseline frequency (ossia spontanee, non radioindotte) di aberrazioni cromosomiche in un individuo correla con un suo maggior rischio di sviluppare un tumore. Dal momento, nel caso dell'esposizione alle RI l'incidenza di tale danno è correlabile alla dose mediante precise curve dose-risposta e dal momento, come vedremo, che le aberrazioni cromosomiche possono persistere per lungo tempo in alcuni tipi di cellule dell'organismo, utilizzando la biodosimetria, è possibile, altresì, risalire alla dose di radiazione alla quale è stato esposto il soggetto. Dalla conoscenza della dose, è quindi possibile stimare l'incremento di rischio di tumori radioindotti che, secondo il *Linear-no Threshold* (LNT) model il cardine della radioprotezione umana almeno sulla base delle conoscenze attuali, è una funzione lineare della stessa [3].

Lo scopo della biodosimetria è quindi, misurando il livello di uno specifico tipo di danno, e per quanto detto sopra le aberrazioni cromosomiche sono state il biomarcatore più ampiamente utilizzato, risalire alla dose legata all'esposizione ai diversi tipi di radiazioni ionizzanti [23].

2.1. Definizione di biodosimetria

La biodosimetria è una tecnica che sfrutta il fatto che il danno indotto dalle radiazioni nel DNA è quantificabile attraverso relazioni funzionali tra dose e risposta biologica: analizzando i danni provocati dalla radiazione ed interpolandoli in tali curve dose-risposta

è possibile risalire alla dose di radiazione alla quale è stato esposto il soggetto. La biodosimetria è stata pertanto utilizzata in tutti quei casi in cui, per esempio, la dosimetria fisica non è disponibile, come per le esposizioni accidentali, l'ultimo esempio dei quali è stato l'incidente di Fukushima in Giappone nel 2011 [25].

Lo schema concettuale della biodosimetria è mostrato in Figura 6.

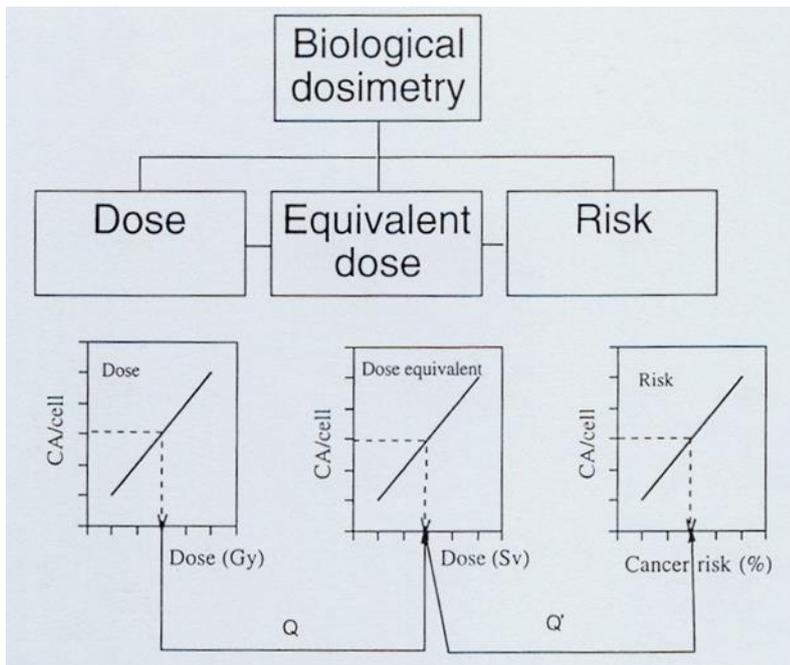


Figura 6: Schema concettuale alla base della biodosimetria basata sulla quantificazione di danno citogenetico radioindotto.

Nel caso di esposizioni accidentali, ed in scenari in cui si temono dosi significative, l'analisi biodosimetria consente di effettuare un vero e proprio triage clinico così che individui in tempi brevi coloro che abbiano assorbito dosi significative e che necessitano quindi di cure mediche volte a mitigare gli effetti acuti dell'esposizione. Per dosi basse, la biodosimetria al più permette di stimare di quanto l'esposizione abbia contribuito ad innalzare il rischio di sviluppare effetti tardivi, appunto, secondo quanto detto sopra, il cancro, ma ovviamente, data la natura stocastica di esso nel caso della radiazione, non permette di stabilire se e quando il soggetto lo svilupperà.

Fondamentale in tutto questo discorso è quindi è la realizzazione in laboratorio di una curva dose –risposta che funga da curva di calibrazione. In Figura 7 è riportato un esempio per un tipo particolare di aberrazione cromosomica (vedi in seguito) ossia il dicentrico, usata proprio nel caso della valutazione della dose assorbita da personale non provvisto di dosimetro fisico nell'area di Fukushima all'indomani dell'incidente (giornalisti, soccorritori, etc).

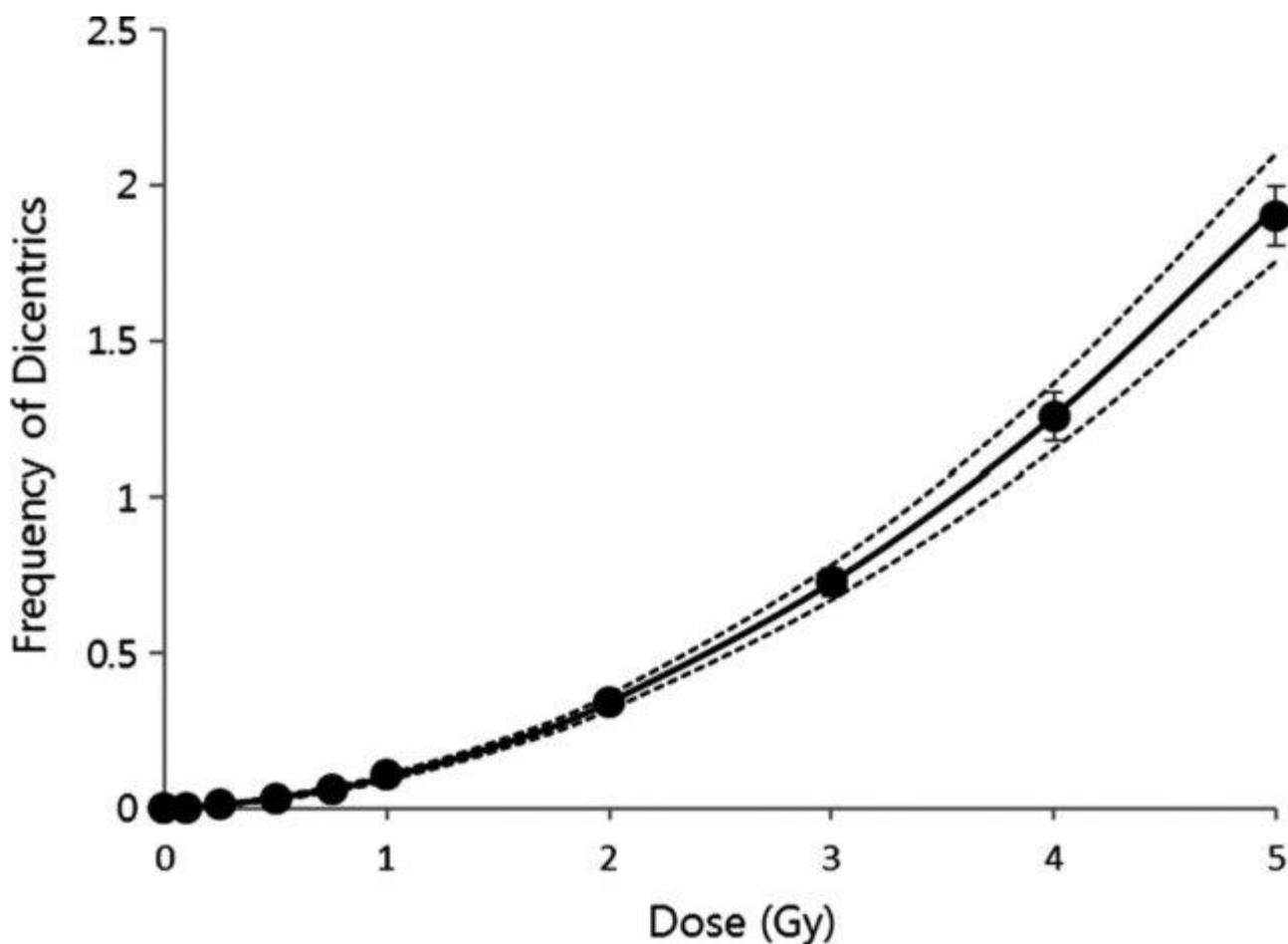


Figura 7: Esempio di una curva dose-riposta di calibrazione per dieci dosi e di corrispondenti limiti di confidenza (inferiore e superiore) al 95%. Tratta da [25]

2.2. Principali metodiche usate nella dosimetria biologica

Ad oggi, diversi indicatori biologici vengono utilizzati per determinare i rischi che si generano in seguito ad una prolungata esposizione alla RI [26]. Siccome la dosimetria biologica è una tecnica specialmente utilizzata in ambito di esposizione incontrollata e ignota alla radiazione, la scelta dei biomarcatori deve essere adeguata. In questa situazione, è necessario un biomarcatore molto sensibile alla radiazione, in modo da avere una dipendenza dalla dose di ampio range e, soprattutto, una frequenza di *baseline* bassa per rilevare anche basse dosi di radiazione dell'ordine dei decimi di Gy, e molto stabile nel tempo, tale che si riesce a trovare traccia dell'esposizione anche trascorso molto tempo. Per questo motivo i più comuni saggi sui micronuclei sono in gran parte sostituiti da saggi su aberrazione cromosomiche (dicentrici e traslocazioni), che verranno ampiamente descritte nel paragrafo 2.3, oppure da una tecnica di recente sviluppo, ovvero, il saggio *foci*.

Per questo motivo, un saggio veloce e semplice da analizzare è costituito dai micronuclei (MNi) [26]. I micronuclei sono delle alterazioni strutturali che si originano come effetto di frammenti del cromosoma formati in seguito alla rottura del DNA, che avviene a causa di agenti esterni, come la RI [27]. In generale, durante l'anafase, i frammenti cromatidici acentrici non riescono ad essere agganciati dal fuso mitotico e pertanto andrebbero persi

ossia non verrebbero inglobati nei nuclei delle cellule figlie. Lo stesso dicasi per cromosomi interi per una difettosa segregazione. Queste porzioni di DNA, poco prima del completamento della divisione cellulare, vengono rivestiti da membrane nucleari e quindi, se si trova un modo per arrestare la cellula madre in uno stadio opportuno, detto di binucleazione, ossia prima che i due nuclei figli si separino completamente, sono visibili come corpi di dimensione sferica più piccoli dei nuclei e pertanto detti micronuclei [26].

La prima tecnica di analisi dei MNi fu proposta da Schmid negli anni 70 [27]; questa fu poi rivista e modificata da Fenech nel 2000 [28]. Siccome, i MNi sono aberrazione molto instabili è importante individuare cellule che hanno subito solo una divisione cellulare, per questo motivo Fenech individuò un metodo per saggiare che si basasse su l'impiego della *cytochalasin-B* (CytB), la quale inibisce la divisione citoplasmatica, fatta agire in seguito al completamento di una divisione [28]. In questo modo vengono visualizzate le cellule binucleate, come riportato nella Figura 8 [28].

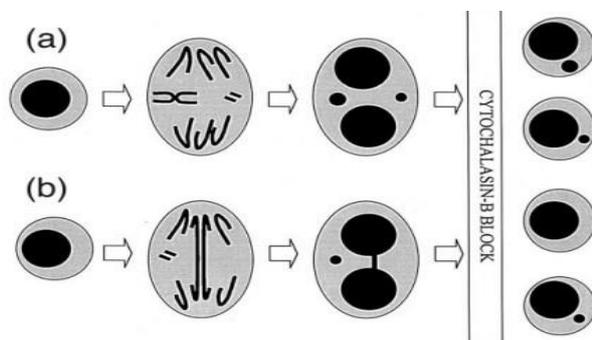


Figura 8: (a) Origine dei micronuclei da frammenti cromosomici acentrici all'anafase [28]. b) Formazione di un ponte nucleoplasmatico da un cromosoma dicentrico in cui i centromeri sono tirati ai poli opposti della cellula [28].

Recentemente, lo sviluppo di nuovi biosensori efficienti potrebbe superare i limiti della sensibilità alle dosi e i tempi necessari da attendere per un'analisi con aberrazione cromosomiche [29]. Tra questi si possono enumerare le proteine specifiche che vengono coinvolte in seguito ad un'esposizione a RI, che causa rotture doppie al filamento di DNA (*Double-Strand Breaks*, DSB), H2AX è una di queste [29]. Poco dopo la formazione dei DSB, la fosforilazione dell'istone γ -H2AX produce dei siti attivi (*foci*) dove avviene il riparo del danno (Figura 9).

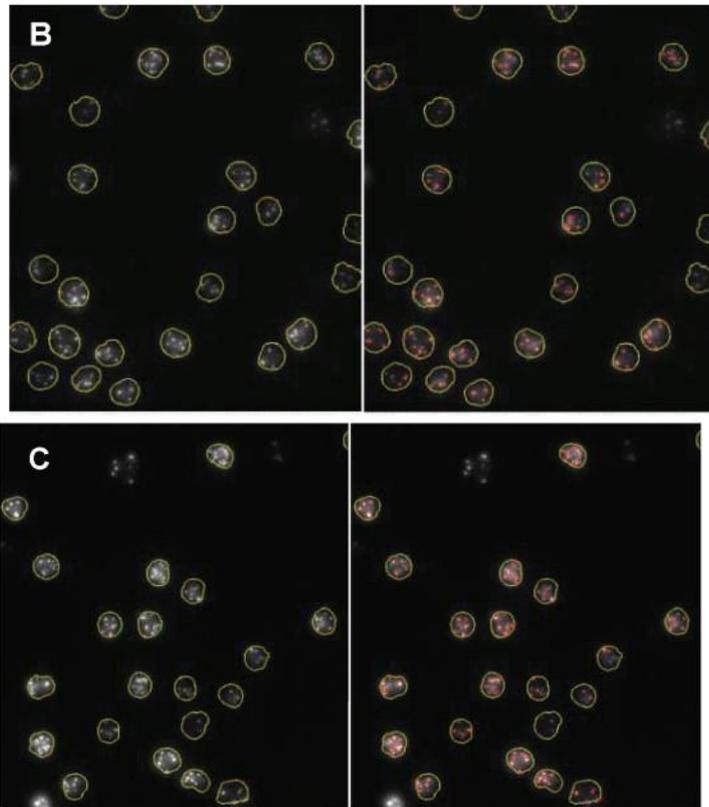


Figura 9: B) γ -H2AX foci nei linfociti 5 min dopo l'esposizione a 0,5 Gy di raggi γ . C) γ -H2AX foci nei linfociti 30 min dopo l'esposizione a 0,5 Gy di raggi γ . Tratte da [30]

Le *foci* possono essere visualizzate attraverso dei coloranti fluorescenti analizzando le cellule dei linfociti campionati e si verifica che il numero di questi è proporzionale alla dose irradiata delle cellule in esame. Tuttavia, si può notare che il numero di *foci* diminuisce repentinamente nel tempo (Figura 10), conseguentemente l'analisi dei danni radioindotti con questa tecnica è limitata a poco dopo l'esposizione.

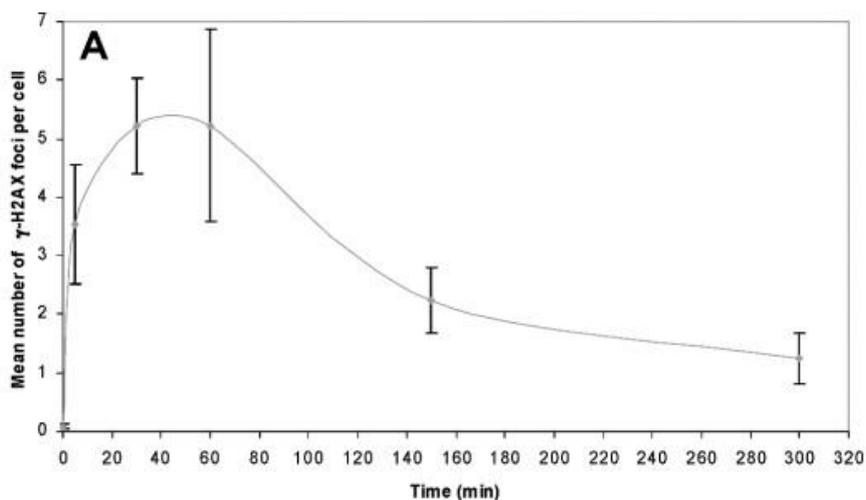


Figura 10: Grafico che riporta il numero di foci nei linfociti in funzione del tempo trascorso dopo l'irraggiamento a 0,5 Gy di raggi γ . Tratta da [30].

2.3. Tecniche biodosimetriche basate sulle aberrazioni cromosomiche radioindotte

Uno dei requisiti affinché la dosimetria biologica possa efficacemente determinare dosi cui si è stati esposti anche a tempi relativamente lontani dal momento del saggio è che la frequenza del biomarcatore utilizzato sia stabile nel tempo.

Le aberrazioni cromosomiche rappresentano uno dei biomarcatori di recente più ampiamente utilizzati, soprattutto perché, pur richiedendo metodiche relativamente più complesse di quelle, per esempio, necessarie per il saggio dei micronuclei, sono specifiche per l'esposizione alla RI e, come detto sopra, peculiarmente connesse con il rischio di cancro. Esse derivano da un'erronea o assente riparazione delle rotture del doppio filamento del DNA (i già citati Double-Strand Breaks, o DSB), e si presentano in varie configurazioni che sono il risultato di riarrangiamenti di "pezzi" del DNA che appunto la cellula non è riuscita a ricollocare nelle sequenze originarie (Figura 11). Le aberrazioni cromosomiche più comunemente indotte dalla radiazione sono i cosiddetti dicentrici e le traslocazioni

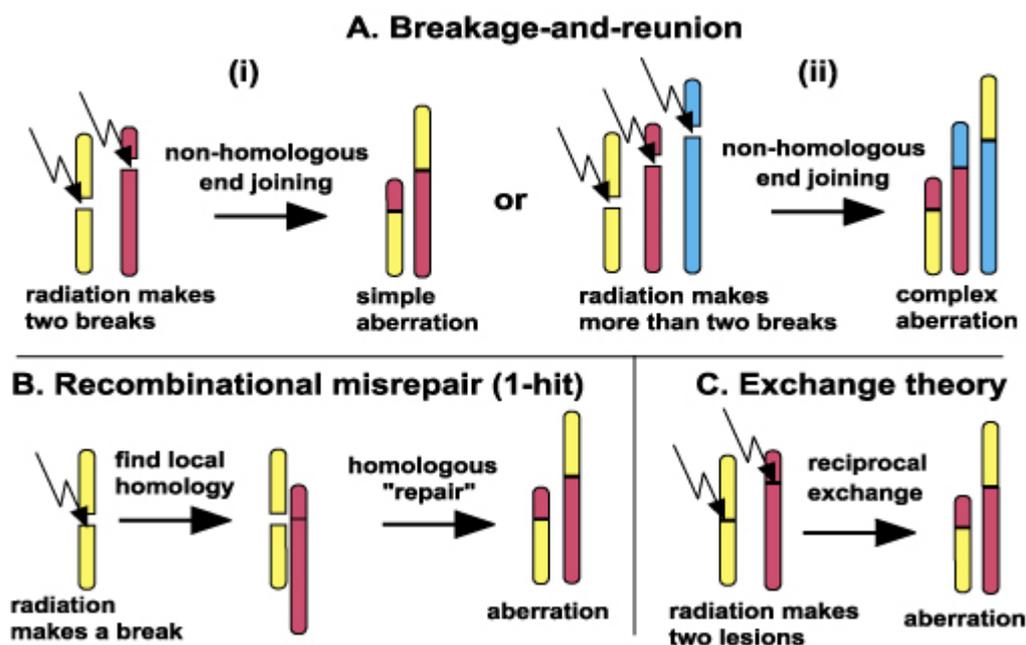


Figura 11: Modelli biofisici alla base della genesi delle aberrazioni cromosomiche radioindotte, da [31].

La specificità delle aberrazioni cromosomiche deriva dal fatto che derivando da rotture del materiale genetico su scala nanometriche, la loro tipologia riflette fortemente la natura del deposito energetico che le ha causate. Mentre quindi dicentrici e traslocazioni sono indotte praticamente in maniera equiprobabile da una determinata dose di radiazione a basso LET, al crescere di questo e cioè in presenza di particelle densamente ionizzanti, cresce la probabilità di aver scambi cosiddetti complessi. Quindi, in senso lato, analizzando lo spettro di aberrazioni cromosomiche radioindotte in un campione cellulare, si può anche ricavare un'informazione della qualità della radiazione che le ha causate.

Il tipo di aberrazione rivelabile dipende dalla tecnica usata. Le prime tecniche di colorazione (*solid staining*) erano aspecifiche e permettevano la rivelazione solo di particolari tipi di aberrazioni. Lo sviluppo di tecniche di ibridizzazione molecolare ha poi permesso di ampliare la gamma di scambi rilevabili. Quindi, in particolare:

- La colorazione cosiddetta Giemsa fu la prima ad essere adoperata ed è anche la più semplice dal punto di vista operativo. Consiste nella colorazione dei cromosomi in modo aspecifico che ne permette la visualizzazione mediante normali microscopi ottici. In tal modo si riescono ad individuare unicamente aberrazioni più evidenti di forma come dicentrici o *ring*;
- FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*) e mFISH (*multicolor FISH*) sono tecniche più recenti ed efficaci, attraverso le quali vengono colorate specifiche coppie di cromosomi (*Whole Chromosome FISH Painting*), oppure è possibile visualizzare l'intero cariotipo (mFISH) usando quattro o cinque fluorocromi: un *software* crea i restanti colori combinando tra di loro i primi colori per evidenziare tutte le coppie di cromosomi. Con queste tecniche si riescono a visualizzare anche le traslocazioni oltre che aberrazioni di struttura più complessa.

Ognuna delle tecniche sopra evidenziate è funzionale ad una particolare analisi che si vuole effettuare su un campione di popolazione. Generalmente la tecnica basata su colorazioni tipo Giemsa è maggiormente usata per avere più velocemente una quantificazione del danno.

Come desumibile dal grafico nel paragrafo 2.1 in cui veniva mostrata una classica curva di calibrazione per l'induzione dei dicentrici, l'andamento della frequenza di aberrazioni in funzione della dose segue tipicamente la relazione:

$$y = \alpha D + \beta D^2 \text{ }^{10}$$

Come illustrato in Figura 12, questa equazione descrive l'induzione delle aberrazioni cromosomiche sulla base di un modello detto lineare-quadratico, dove il termine lineare nella dose descrive tipicamente eventi intratraccia, mentre quello responsabile per la curvatura alle alte dosi riflette meccanismi di interazione tra due o più tracce. A seconda della qualità della radiazione o del rateo di dose, la forma cambia, con una perdita del termine quadratico ad alto LET ed una sua forte attenuazione nel caso di esposizioni croniche (basso rateo di dose). Pertanto, è importante costruire nel proprio laboratorio più curve di calibrazione se si intende eseguire biodosimetria per tali svariate condizioni di esposizione.

¹⁰ Si indica con D la dose, αD e βD^2 sono parametri che tengono conto, rispettivamente, eventi di singola traccia e di doppia traccia, mentre y rappresenta il numero di aberrazioni.

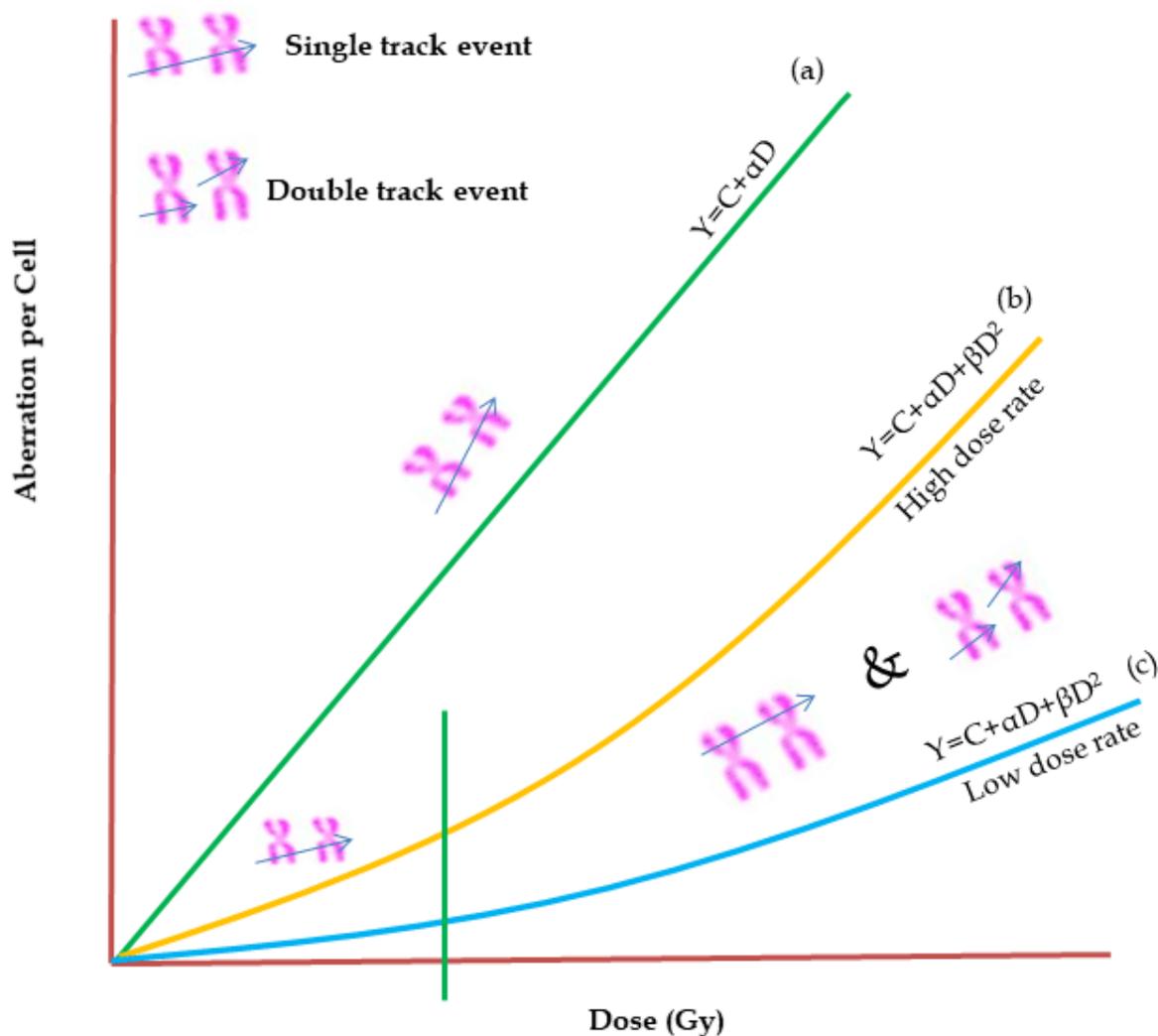


Figura 12: Generiche curve dose-risposta per aberrazioni cromosomiche radioindotte. Tratto da [32].

Per analizzare l'azione della radiazione su una popolazione di cellule si deve avere a disposizione un campione vasto di molecole *target*, che fungono da rivelatori di particolari tessuti o cellule e sono denominati biomarcatori [33].

La scelta del sistema cellulare su cui studiare il biomarcatore risulta fondamentale. I saggi biodosimetrici basati sulle aberrazioni cromosomiche utilizzano comunemente i linfociti estratti dal sangue periferico (globuli bianchi) per tre motivi principali:

1. il campionamento è facile, bastando un prelievo ematico;
2. i globuli bianchi circolano ovunque nell'organismo; dal momento che solitamente non si conosce la zona dell'irraggiamento, in questo modo si riesce ad analizzare un eventuale irraggiamento ovunque sia avvenuto;
3. un'elevata frazione di linfociti si trova nello stadio G_0 del ciclo cellulare, ossia non si dividono; ciò comporta che un eventuale danno indotto prima del saggio si conservi

Infatti, in vitro i linfociti vengono stimolati e quando raggiungono la metafase, in cui il DNA si condensa sotto forma di cromosomi, se ne può analizzare il contenuto di aberrazioni.

I tipi di aberrazioni cromosomiche più usati in biodosimetria sono i dicentrici e le traslocazioni.

2.2.1. Dicentrici

La prima aberrazione cromosomica utilizzata nella tecnica biodosimetrica è stata il dicentrico perché più facile da visualizzare anche senza l'utilizzo di sostanze fluorescente (appunto, tramite colorazione Giemsa), come visibile in Figura 13.

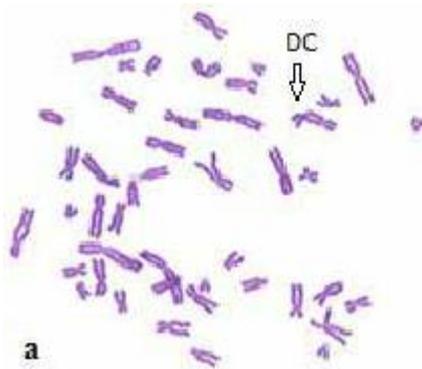


Figura 13: Esempio di metafase colorata in Giemsa che contiene un dicentrico (DC).

I dicentrici sono particolari aberrazioni cromosomiche che si formano solitamente in fase G₀ o G₁¹¹ e possono essere letali per la cellula perché consistono in un cromosoma che è la fusione dei due cromosomi coinvolti nello scambio e quindi presentano due centromeri, che pone un ostacolo meccanico alla corretta segregazione cromosomica durante la divisione cellulare portando spesso alla morte mitotica della cellula (Figura 14).

¹¹ Le fasi G₀ e G₁ sono entrambe fasi del ciclo di divisione cellulare, la G₀ è la fase detta di quiescenza mentre G₁ (gap 1) è una fase preparatoria alla fase S (sintesi).

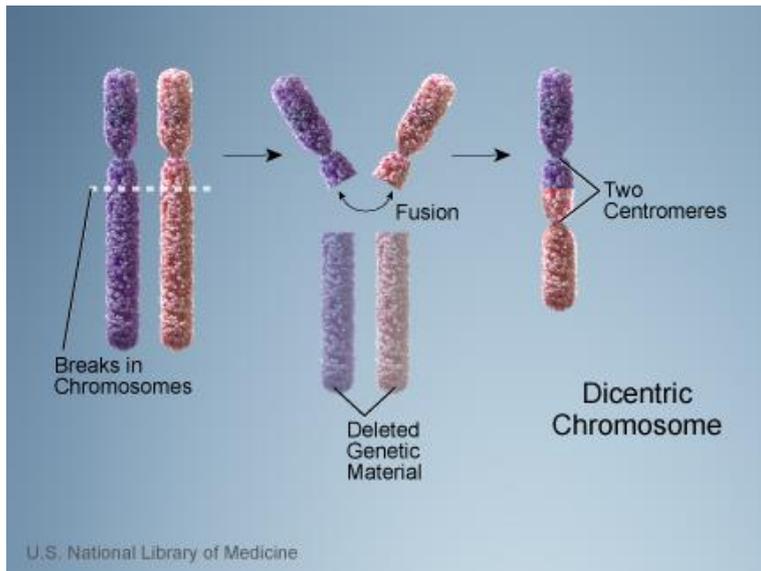


Figura 14: Processo di formazione del dicentrico.

Calcolata la frequenza dei dicentrici si risale alla dose assorbita utilizzando le curve dose-risposta, descritte precedentemente; quindi, attraverso lo standard definito dal campione noto si interpolano i dati ottenuti e si risale al valore della dose.

Dall'analisi delle aberrazioni si evince che esiste una certa *baseline*, ovvero sussistono danni preesistenti non dovuti alla radiazione incidente [34]. Occorre tenere conto che, nella determinazione della relazione tra aberrazioni e dose, ad un valore di irraggiamento 0 Gy si misura un valore diverso da 0 in termini di frequenza di dicentrici (y_0). La relazione indicata nel precedente paragrafo, pertanto, si modifica e diventa:

$$y = y_0 + \alpha D + \beta D^2$$

Questa risulta essere la forma più completa ed esplicativa, che rappresenta la connessione tra numero di aberrazioni e dose di radiazione.

2.2.2. Traslocazioni

Le traslocazioni si formano come conseguenza di uno scambio simmetrico tra due cromosomi (Figura 15).

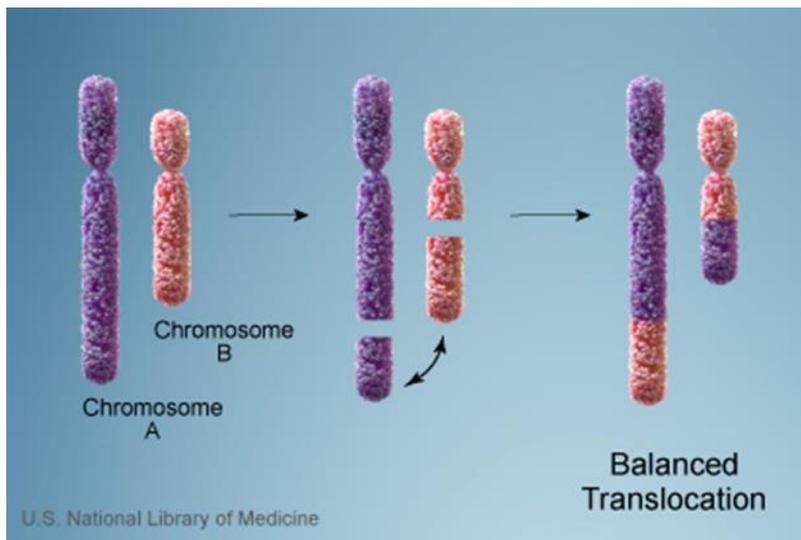


Figura 15: Processo che porta alla formazione di uno scambio simmetrico o traslocazione

Nonostante il test dei dicentrici sia una valida tecnica di determinazione della dose assorbita, questo tipo di aberrazione presenta un problema fondamentale perché essendo tipicamente letale per la cellula che lo contiene, esse sono poco stabili e, di conseguenza, se l'irraggiamento è avvenuto molto prima dell'analisi, la loro frequenza fornirà una sottostima dell'effettivo valore della dose con cui l'individuo o il tessuto sono stati irradiati [35]. Al contrario, come è intuitivo considerando la tipologia di questo scambio, le traslocazioni possono essere trasmesse durante la divisione cellulare e quindi persistono più a lungo nell'organismo di un individuo esposto alla RI. Per questo motivo sono preferite ai dicentrici ed hanno un largo impiego nella dosimetria biologica.

Dal momento che sono più stabili, le traslocazioni permettono di risalire ad una esposizione alla radiazione fino a 40 anni prima dell'analisi. Allo stesso tempo la stabilità delle traslocazioni permette di analizzare in modo affidabile anche cellule esposte a radiazione poco tempo prima dell'analisi dei danni procurati dalla radiazione stessa [22].

In questo caso le tecniche di visualizzazione sono più complesse dei dicentrici (generalmente è utilizzata la FISH o mFISH) poiché è necessario rendere visibile lo scambio di materiale genetico tra cromosomi. Per l'analisi si procede come per i dicentrici, ovvero contando il numero di aberrazioni che si visualizzano e costruendo le curve di dose-risposta. Le tecniche FISH possono poi essere abbinate al metodo della cosiddetta *Premature Chromosome Condensation* (PCC) in cui i linfociti vengono trattati con sostanze che permettono di ottenere delle piastre metafasiche in cui in realtà si osservano cromosomi condensati prima che la cellula avesse raggiunto la mitosi. In questo modo è possibile analizzare scambi anche in cellule dalla fase G1 e G2, il che permette di ampliare la base statistica del campione e di ovviare ad un fenomeno molto noto in radiobiologia, che è il ritardo del ciclo radioindotto: le cellule

più danneggiate tendono a raggiungere più lentamente la mitosi; pertanto, semplici saggi basati sull'analisi dei soli cromosomi metafasici rischierebbero di sottostimare il danno. L'abbinamento PCC+FISH è particolarmente utile nel caso quindi di esposizioni a radiazioni ad alto LET, come è il caso della radiazione cosmica.

2.3. Principali problematiche

Allo stato attuale gli astronauti hanno in dotazione, come unici strumenti di misura della dose di radiazione assorbita, i dosimetri fisici. Questi non sempre forniscono informazioni utili per la stima del rischio per le questioni illustrate prima, ossia la sostanziale differenza fra dose fisica e dose biologicamente efficace e per il fatto che il campo di radiazione nello Spazio ed ancor di più all'interno dell'astronave è un campo misto. Ciò complica la valutazione dell'RBE in quanto si avrà uno spettro di possibili valori del LET se si volessero usare i modelli radioprotezionistici in uso sulla Terra. Gli strumenti dosimetrici consistono in un dispositivo che rivela la dose assorbita, quindi accumulata, non distinguendo la dose rilevante da quella non rilevante per l'organismo. Pertanto, la biodosimetria potrebbe rappresentare uno strumento ad integrazione della dosimetria fisica.

Sono diversi gli studi condotti su un campione di astronauti esposti a radiazione cosmica nei quali vengono saggiate le cellule prima, durante e dopo il viaggio spaziale. Tuttavia, rimangono alcune questioni fondamentali che devono essere considerate per la scelta della tecnica biodosimetria più appropriata [23].

2.3.1. Tempo dell'esposizione

Uno dei problemi legati alla tecnica biodosimetrica è il tempo che intercorre tra l'esposizione ed il saggio, che è quindi anche legato alla durata della missione. Questo si ripercuote sulla scelta del tipo di aberrazione dal momento che la stabilità temporale dei dicentrici è molto minore rispetto a quella delle traslocazioni (Figura 16).

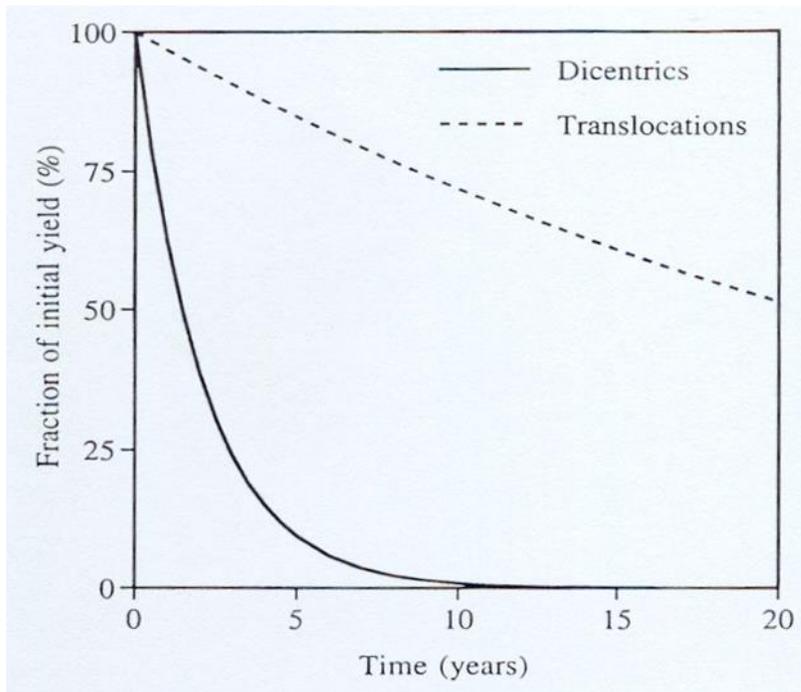


Figura 16: Decadimento nel tempo della frequenza di dicentrici e traslocazioni.

Generalmente le missioni spaziali non hanno durate elevate poiché la NASA fissa dei limiti massimi, oltre i quali si incorrerebbe in rischi importanti, per cui il tempo durante il quale il corpo assorbe radiazione non è così prolungato da avere effetti rilevanti, ovvero misurabili.

La suddetta circostanza determina punto critico della dosimetria biologica, la sensibilità del saggio.

2.3.2. Sensibilità del saggio biodosimetrico

Se i tempi dell'esposizione non sono troppo elevati si rischia di avere una dose assorbita vicina al limite di sensibilità del saggio biodosimetrico, definito come la minima dose apprezzabile in maniera staticamente robusta sulla base della baseline frequency del danno la cui frequenza si sta misurando.

In Tabella 2, si riportano alcuni valori tipici della sensibilità come desunta dalla letteratura esistente.

Method	Lower (Sv)	Upper (Sv)
Dicentrics $T_{1/2} \sim 3$ years	0.1	4 (acute)
Translocations $T_{1/2} > 10$ years	0.1-0.3	2.5 (acute) 10 (chronic)
PCC+FISH	As for translocations	20

Tabella 2: Sono sinotticamente confrontate le principali metodiche basate sull'analisi delle aberrazioni cromosomiche, dove sono riportati i tempi di "dimezzamento" tipici per la frequenza di dicentrici e traslocazioni (vedi anche Figura 14) ed i limiti inferiori e superiori di dose stimabili (per le traslocazioni è possibile stabilire due limiti superiori a seconda che l'esposizione sia acuta o cronica).

Capitolo 3

3. Alcuni risultati sperimentali

Come più volte ricordato, stimare con accuratezza i rischi correlati ai possibili effetti indotti dall'esposizione (acuta o prolungata) al campo di radiazione cosmica è fondamentale in vista, soprattutto, della ripresa dell'esplorazione umana dello Spazio con il ritorno sulla Luna o la prima missione verso Marte.

Tali stime di rischio si devono basare sulla conoscenza della dose assorbita e, a parità di questa, del contributo o peso in termini di efficacia biologica delle varie componenti del campo misto presente nello Spazio. Questo non è un compito facile poiché le attuali conoscenze sulla relazione fra dose e qualità della radiazione con effetti quali la carcinogenesi radioindotta o altre patologie quali malattie cardiovascolari e disfunzioni cognitive sono basate su modelli validi sulla Terra. La pratica più comune è l'utilizzo di particolari modelli che fanno uso di codici di trasporto della radiazione estrapolando alcune delle conclusioni ottenute appunto in studi classici radiobiologici [36].

Un'alternativa, o comunque un approccio per integrare e migliorare tali modelli predittivi, è costituita dall'utilizzo della biodosimetria in quanto essa, pur con le limitazioni cui si accennava nel precedente capitolo, offre la possibilità di stimare la *dose biologicamente efficace* ottenuta misurando danni al DNA ed interpolando tali livelli di danno con curve di calibrazione dose-risposta. Il vantaggio è che tale danno è di fatto la conseguenza dell'esposizione all'intero campo di radiazione per l'intero periodo di permanenza. Il limite sostanziale è che tuttavia le curve di calibrazione sono per lo più realizzate in laboratorio (sulla Terra) e quindi una derivazione diretta della stima di rischio, come si fa per la biodosimetria quando applicata ad esposizioni accidentali, per esempio, non ha molto significato. Comunque, le informazioni possono utilmente integrare quelle desumibili dalla dosimetria fisica e comunque dare un quadro dell'entità dell'effetto radiobiologico.

Per questo motivo non esiste una chiara e diretta correlazione tra esposizione alla CR (*Cosmic Radiation*) e insorgenza di malattie gravi, quali tumori. Inoltre, non si è riuscito a definire quali siano le reali conseguenze di una lunga esposizione alla radiazione, dal momento che i dati a disposizione sono stati ottenuti con tempi di esposizione non più lunghi di un anno (mentre i viaggi interspaziali richiederebbero una permanenza di gran lunga superiore) e attraverso riproduzioni *in vitro* della condizione di irraggiamento da parte della radiazione cosmica.

L'obiettivo prospettico è quello di stimare, attraverso ulteriori studi, l'effettiva efficacia biologica della CR e quindi le sue possibili conseguenze a lungo termine sulla salute degli astronauti in modo da intervenire migliorando, laddove possibile, le misure di radioprotezione, per esempio attraverso la scelta dei materiali di *shielding* che minimizzino gli effetti della frammentazione nucleare, oppure attraverso terapie mediche *post* viaggio.

Di seguito verranno illustrati alcuni studi a mo' di esempio dell'applicazione di tecniche biosimetriche nel contesto dell'esplorazione spaziale umana.

3.1. Alcuni studi *ex vivo* con tecniche biosimetriche

Il panorama degli studi condotti su astronauti esposti per tempi più o meno lunghi a RI nello Spazio è ampio seppur con le criticità, cui si è fatto cenno in precedenza. In questa sede verranno sinteticamente esposti alcuni di essi ed i relativi risultati, non nel loro ordine cronologico ma partendo da uno degli studi più completi in materia di biosimetria.

Il primo studio che si intende presentare è stato condotto da Cucinotta *et al.* nel 2008 [37], nel quale è presentata un'analisi biologica e fisica della dose equivalente per gli astronauti della ISS. Più volte si è detto che l'esposizione a RI può causare gravi danni al DNA, che comportano la formazione di aberrazioni cromosomiche, che in questo studio sono funzionali per determinare la dose equivalente e quindi fornire una stima di rischio per la salute. Il numero di danni al DNA nei linfociti degli umani è rilevabile, come noto, attraverso la tecnica FISH menzionata nel Capitolo 2, che è stata la tecnica adoperata nel presente studio, saggiando i linfociti del sangue periferico prelevate dai soggetti dello studio. Questi sono, per l'appunto, astronauti dell'equipaggio della ISS che hanno trascorso un periodo di circa 180 giorni in *low-Earth orbit* (LEO). In questa condizione, le componenti della CR a cui si è maggiormente esposti sono la radiazione HZE (*High Atomic number and Energy*), descritta nel dettaglio al paragrafo 1.3.2, e la radiazione secondaria, che costituisce i *mixed fields*. Queste componenti sono caratterizzate mediamente da un elevato valore del LET, il quale è strettamente legato all'efficacia biologica relativa (RBE) di un certo tipo di radiazione. Una misurazione diretta del danno biologico è importante alla luce dei processi di assorbimento e interazioni nucleari che si verificano quando la RI passa attraverso il tessuto e che tiene conto della 'qualità' della radiazione [38]. Oltre all'analisi dei linfociti esposti *in vivo* alla CR, una parte del campione prelevato prima della missione venne esposto *in vitro* ai raggi γ , utilizzando una sorgente di cesio (^{137}Cs), così da costruire la necessaria curva di calibrazione per stimare la dose assorbita dal confronto con la frequenza delle aberrazioni misurate nel campione prelevato dall'individuo esposto. Il sangue degli astronauti è stato soggetto a campionamento tra 2 e 6 mesi prima della missione e 15 giorni dopo il ritorno sulla Terra. Per visualizzare le aberrazioni cromosomiche si è adoperata la tecnica FISH, marcando (*labeling*) 3 cromosomi con sonde specifiche per le loro sequenze coniugate con fluorocromi che se eccitati da UV emettono con colori differenti. Le aberrazioni visualizzate sono state principalmente dicentrici, traslocazioni e scambi complessi (riguardano scambi tra almeno due cromosomi con almeno tre rotture, indicativi dell'esposizione a radiazione ad alto LET), delle quali la frequenza è stata poi valutata come il numero tra aberrazioni trovate e quello delle cellule analizzate in totale. Il modello che è

stato impiegato per calcolare le curve dose-risposta di calibrazione dei linfociti esposti ai raggi γ è la regressione lineare:

$$y_i = A_i + B_i D$$

In cui y_i è la frequenza di aberrazioni del singolo astronauta (i), A_i e B_i sono i coefficienti della regressione lineare. Contemporaneamente, in volo è stata misurata la dose fisica attraverso strumenti che rilevano la dose di radiazione superficiale che quindi non tiene conto della sensibilità e della profondità del tessuto irraggiato. Tuttavia, queste misure sono utili per avere un parametro di controllo nella misurazione della dose equivalente. Le dosi equivalenti sono state stimate da modelli di trasporto di CR supponendo che fosse costituita principalmente da due componenti: la GCR e la componente secondaria. Il programma della nasa (HZETRN) utilizza modelli dell'ambiente di radiazione spaziale come condizione al contorno per risolvere le di Boltzmann che descrivono il trasporto di radiazioni nei materiali [39]. È stata calcolata una matrice bidimensionale corrispondente agli spessori di schermatura del veicolo e dei tessuti per il flusso di ioni j di energia E (unità di MeV/nucleone) di spessore x (unità di g/cm²) nella schermatura del veicolo spaziale e lo spessore z (unità di g/cm²) del tessuto indicato come $\phi_j(E, x, z)$. La dose assorbita (D) ed equivalente (H) sono stati calcolati nel seguente modo:

$$D(x, z) = \sum_j \int dE \phi_j(E, x, z) S_j(E)$$

$$H(x, z) = \sum_j \int dE \phi_j(E, x, z) S_j(E) Q(S_j(E))$$

È stato applicato successivamente un modello statistico per ottenere la risoluzione delle equazioni di cui sopra. Per cui dalla dose equivalente specifica per ogni tessuto si è risalito alla dose equivalente totale facendo una somma pesata di queste. Siccome le dosi assorbite durante le missioni della ISS sono relativamente basse, la calibrazione, al fine di determinare la dose equivalente, con la curva dose-risposta ottenuta con l'esposizione ai raggi γ è stata complessa (Figura 17).

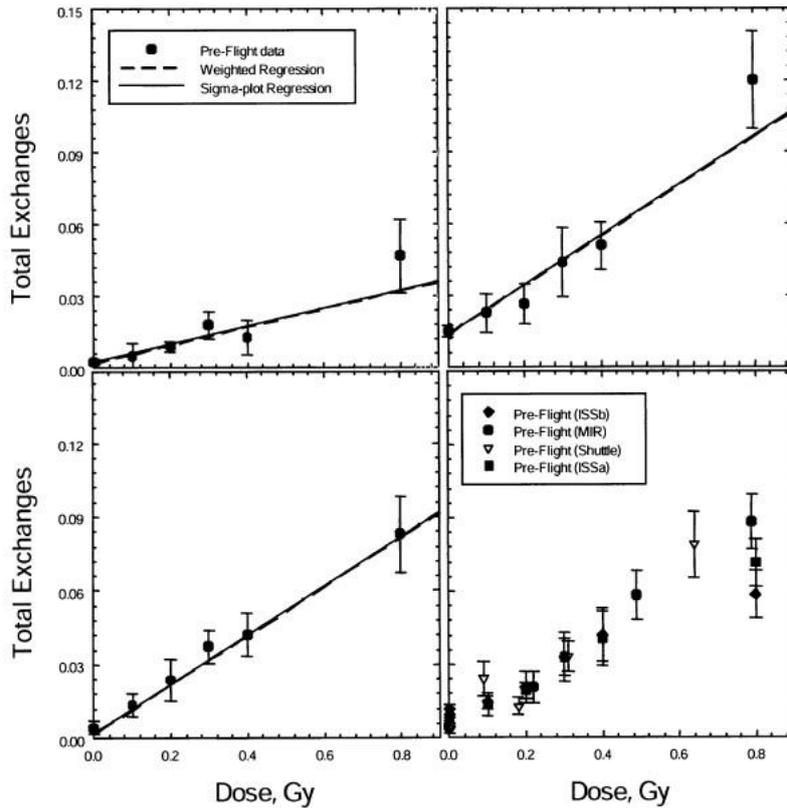


Figura 17: Curve di calibrazione pre-volo dell'astronauta rappresentativo per la frequenza degli scambi totali per campioni di sangue esposti a raggi γ . Il pannello in basso a destra mostra le curve di calibrazione pre-volo per un singolo astronauta per quattro volte in 7 anni. Tratta da [37].

Lo standard utilizzato per le curve di calibrazione include un saggio di linfociti proveniente da astronauti della ISS che hanno affrontato diverse missioni, quattro astronauti sulla stazione spaziale Mir e due astronauti dello Space Shuttle [40]. La Figura 18 mostra i risultati per le frequenze pre-volo e post-volo di traslocazioni, aberrazioni complesse e scambi totali. Gli scambi totali sono aumentati dopo il volo in tutti i casi, le traslocazioni sono aumentate in tutti gli astronauti della ISS ma non in altri due astronauti, uno di ritorno dalla stazione spaziale Mir e uno in una missione dello Space Shuttle.

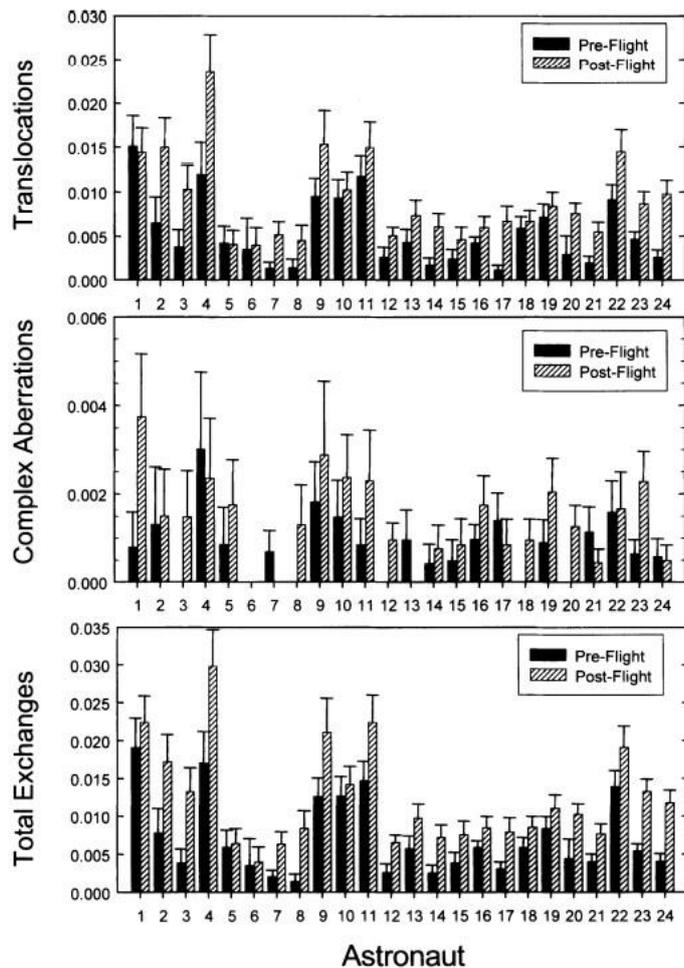


Figura 18: La frequenza delle traslocazioni, delle aberrazioni complesse o degli scambi totali misurati nei linfociti del sangue di ciascun astronauta sia prima e dopo la rispettiva missione spaziale sulla ISS, Mir o Shuttle. Aumenti degli scambi totali sono stati osservati per tutti gli astronauti. Tratta da [37].

La Figura 19 mostra due esempi di aberrazioni cromosomiche di tipo complesso che coinvolgono tre o più cromosomi che sono stati rivelati dopo la missione. La frequenza di aberrazioni cromosomiche è aumentata dopo il volo in 13 dei 19 astronauti della ISS. Per determinare la sussistenza di una correlazione tra l'aumentata frequenza totale delle aberrazioni cromosomiche e la radiazione spaziale, sono stati confrontati con tutti i risultati ottenuti da altre missioni della NASA ed è stato verificato che l'aumento osservato delle aberrazioni cromosomiche è altamente significativo, così come l'aumento della frequenza di traslocazione.

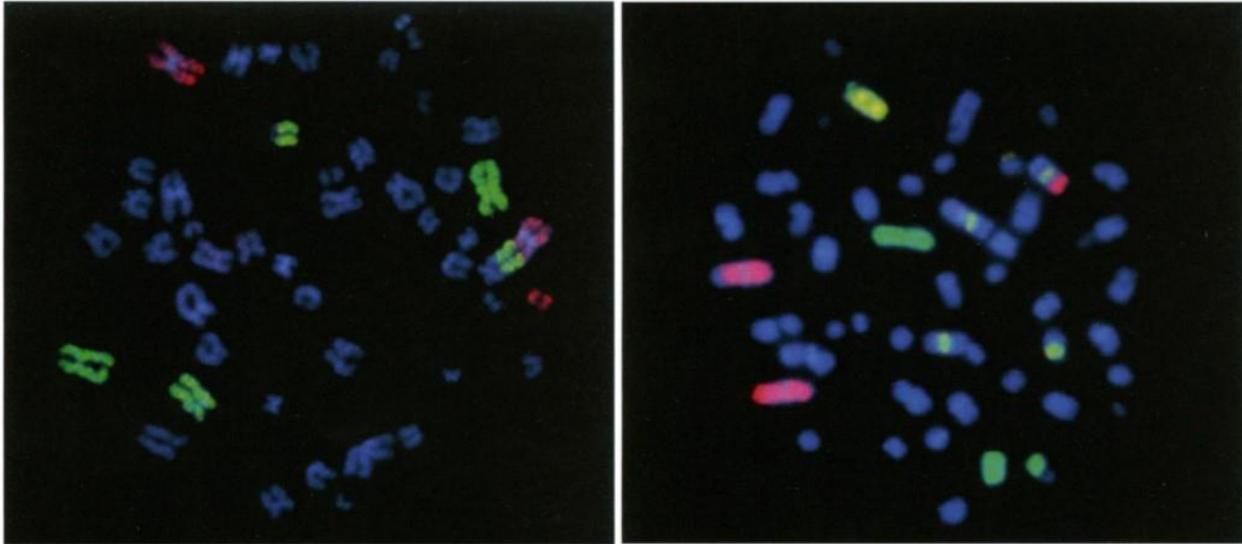


Figura 19: Esempi di due aberrazioni complesse che coinvolgono tre o più cromosomi osservati dopo la missione negli astronauti della ISS. I cromosomi sono stati ibridati con sonde dipinte per il cromosoma 1 (rosso), il cromosoma 2 (verde) e il cromosoma 4 (giallo). Tutti gli altri cromosomi sono contrassegnati con sonde blu. Tratta da [37].

La Tabella 3 mostra i risultati della dose biologica ottenuta impiegando la relazione di cui sopra, considerando come aberrazioni gli scambi totali, e i risultati dosimetrici del modello di predizione per la dose equivalente superficiale e la dose effettiva degli astronauti. Attraverso questa tabella si può verificare che la dose misurata attraverso strumenti dosimetrici risulta essere una sottostima della dose effettiva e quindi biologicamente rilevante, perché non tiene conto di tutte le interazioni con i tessuti biologici e la sensibilità di questi alla RI.

Astronaut	Biological dose equivalent, mGy-Eq		Astronaut dosimeter, mGy	Skin dose equivalent, mSv	Effective dose, mSv
	Individual based	Population based			
1	94 ± 12	128 ± 25	30.9	89.9	77.6
2	127 ± 57	84 ± 41	29.7	86.5	73.7
3	78 ± 16	81 ± 19	33.1	96.4	82.1
4	60 ± 24	87 ± 20	31.8	93.8	79.9
5	36 ± 15	54 ± 26	29.1	85.1	72.5
6	59 ± 19	61 ± 21	31.5	90.8	80.0
7	40.9 ± 19	72 ± 27	29.0	83.3	70.6
8	83 ± 29	40 ± 21	30.9	88.3	74.7
9	113 ± 17	130 ± 25	39.6	115	98.6
10	—	75 ± 26	30.7	88.3	74.5
11	74 ± 32	55 ± 26	22.2	64.5	54.7
12	128 ± 40	71 ± 24	22.5	65.4	55.7
13	134 ± 45	88 ± 29	22.3	64.7	59.8
14	66 ± 21	59 ± 15	26.3	78.0	66.3
15	83 ± 27	125 ± 52.0	29.8	88.6	75.2
16	10 ± 24	15 ± 35	20.4	56.8	47.5
17	147 ± 48	134 ± 66	36.4	103.0	86.3
18	113 ± 26	109 ± 34	29.9	83.7	76.9
19	119 ± 32	69 ± 23	23.8	70.1	59.5
Average ^a	85 ± 38	81 ± 32	28.9 ± 4.9	83.8 ± 14.1	71.9 ± 12.0

^a Errors listed are the variation in the column means and do not include measurement error.

Tabella 3: Risultati della dose biologica equivalente e della dose stimata degli astronauti presentati. Tratta da [37].

Un ulteriore studio che rappresenta l'antesignano dello studio appena illustrato (infatti ha un approccio simile nell'analisi) è stato condotto da Yang *et al.* [41] nel 1997, nel quale sono stati analizzati i linfociti di alcuni membri dell'equipaggio che parteciparono alla missione spaziale Mir-18 della durata di 115 giorni. Come già detto, per avere una stima immediata della dose alla quale gli astronauti sono esposti è fondamentale l'impiego dei dosimetri fisici, i quali, in questa specifica missione, sono dosimetri a termo-luminescenza (TLD)¹², i quali tengono traccia della RI che interagisce con il dispositivo. Tuttavia, questo tipo di dosimetro non considera alcuni peculiari fenomeni o condizioni che possono aumentare il rischio dell'esposizione per gli astronauti e per questo motivo lo studio presentato ha proposto un'analisi degli effetti citogenetici in seguito alla esposizione alla CR dei linfociti prelevati dai campioni ematici dei astronauti e al contempo parte dei linfociti prelevati prima della missione furono irraggiati con raggi γ , per ottenere le curve di calibrazioni necessarie per stimare la dose biologicamente rilevante. Questo studio aveva come obiettivo la misurazione delle aberrazioni cromosomiche, in particolare le traslocazioni, nei linfociti umani prima e dopo il volo, correlare i risultati delle analisi delle aberrazioni cromosomiche dopo il volo con la dose di radiazioni in volo (misurata con dosimetri fisici) e determinare l'RBE, confrontando le frequenze delle aberrazioni cromosomiche determinate dopo il volo con gli studi condotti sulla Terra (curve di calibrazione). È stato prelevato un campione ematico dagli astronauti, dal quale sono stati estratti i linfociti da cui sono stati raccolti e ibridizzati i cromosomi. Per calcolare la frequenza delle traslocazioni nei cromosomi è stata impiegata la tecnica della FISH, adoperando coloranti specifici per i cromosomi 2 e 4, successivamente visualizzati mediante microscopia a fluorescenza (Figura 20).

¹² Un dosimetro termoluminescente, o TLD, è costituito da un pezzo di materiale cristallino termoluminescente all'interno di un pacchetto radiolucido. Il cristallo termoluminescente quando interagisce con la RI assorbe parte dell'energia della radiazione. Riscaldato, il cristallo rilascia l'energia sotto forma di luce che è quindi proporzionale all'intensità della radiazione. Un rivelatore specializzato misura l'intensità della luce e restituisce la misura della radiazione.

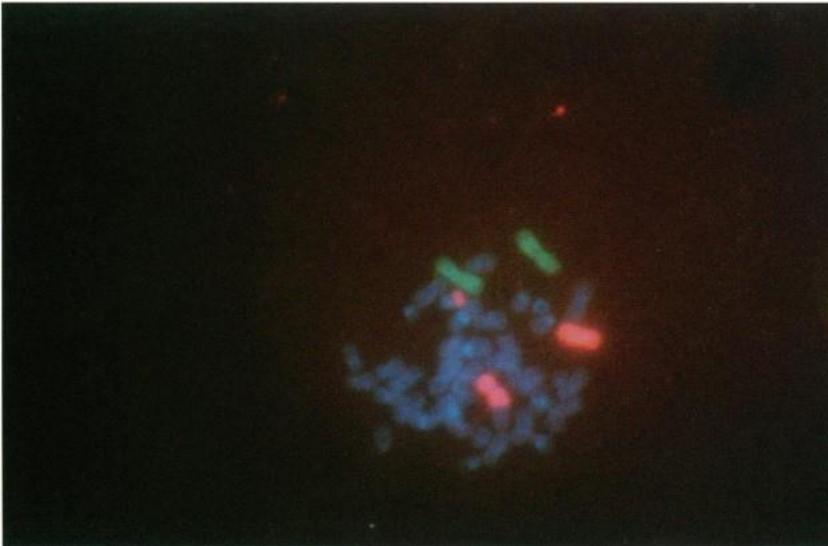


Figura 20: Scambio reciproco tra il cromosoma 4 (in arancione) e un altro cromosoma. Questo tipo di aberrazione è stato osservato in diversi campioni di linfociti dopo la missione. In verde il cromosoma 2. Tratta da [41].

Nello studio è stata stimata anche la frequenza dei dicentrici, impiegando la tecnica Giemsa, descritta dettagliatamente nel Capitolo 2.

Il campione di sangue prelevato prima della missione spaziale è stato poi esposto ai raggi γ *in vitro* con dosi dai 0 ai 62 cGy, per ottenere le curve di calibrazione e determinare la dose equivalente. Inoltre, il programma per il prelievo del campione di sangue ne prevedeva uno a 14 giorni prima dal lancio (L-14), uno all'atterraggio (R+0), uno dopo 9 giorni dall'atterraggio (R+9) e uno 3 mesi dopo. La Tabella 4 mostra i risultati ottenuti studiando l'influenza degli ioni (HZE) sulla frequenza delle aberrazioni cromosomiche nei linfociti umani e quindi riporta una stima della dose assorbita confrontata con la dose misurata dai dosimetri (TLD). Si nota dai risultati riportati nella Tabella 4 che una prima differenza sostanziale è tra il valore della dose stimata attraverso la biodosimetria e la dose ottenuta con strumenti dosimetrici, che ne rappresenta qualitativamente una sottostima (non considerando la diversa unità di misura utilizzata). Inoltre, si verifica che il RBE diminuisce dopo qualche tempo dal ritorno sulla Terra e quindi si può ipotizzare che i meccanismi di riparo della cellula si attivino per ristabilire le condizioni fisiologiche terrestri.

Sample	End point	Dose by biodosimetry	Dose by physical monitor (TLD)	RBE
R + 0	Reciprocal exchanges	14	4.16	3.49
	Dicentrics	17	4.16	4.08
R + 9	Reciprocal exchanges	13	4.16	3.13
	Dicentrics	15	4.16	3.60
	Average:	14.75	4.16	3.57

Tabella 4: Confronto della dose stimata con la biodosimetria (mSv) e la dose misurata con un dosimetro fisico (Gy) in dotazione per gli astronauti. Tratta da [41].

Una validazione del metodo della biodosimetria (in particolare l'analisi citogenetica) come strumento per la determinazione del rischio di esposizione a RI è stata fornita da uno studio, successivo allo studio Yang *et al.* [41], condotto da Cucinotta *et al.* [42] nel 2000, nel quale viene trattato il metodo più comunemente impiegato nella biodosimetria, ovvero saggio delle aberrazioni cromosomiche nei linfociti, fornendo dei dati sui valori della dose efficace alla quale gli astronauti della stazione spaziale Mir, sui quali è stata svolta la sperimentazione, sono stati esposti durante le varie missioni. Il modello che è stato impiegato per l'analisi è il lineare quadratico ampiamente trattato nel Capitolo 2. In breve, si definisce una dipendenza lineare-quadratica della frequenza delle aberrazioni (y) dalla dose (D):

$$y = y_0 + \alpha D + \beta D^2$$

Per l'esposizione alla radiazione nello Spazio siccome è di minore entità, per brevi permanenze, è stato considerato nello studio trascurabile il termine quadratico e inoltre il coefficiente α è stato valutato proporzionale al LET. Quindi, attraverso le interpolazioni con le curve di calibrazioni, si è riusciti a risalire alla dose efficace, i cui valori sono riportati nella Tabella 5.

	GCR			Trapped protons			Total		
	Dose (mGy/day)	Dose equivalent (mSv/day)	Q	Dose (mGy/day)	Dose equivalent (mSv/day)	Q	Dose (mGy/day)	Dose equivalent (mSv/day)	Q
TEPC Model:	0.142	0.461	3.2	0.153	0.298	1.9	0.295	0.759	2.6
Naussica	0.138	0.535	3.9	0.191	0.295	1.5	0.329	0.830	2.5
Naussica ^a + 4 g/cm ²	0.141	0.526	3.7	0.140	0.219	1.6	0.281	0.745	2.7
Lyulin	0.134	0.547	4.1	0.254	0.391	1.5	0.388	0.938	2.4

Tabella 5: Confronto di calcoli e misurazioni per dose (fisica) e dose equivalente su Mir-18. Tratto da [42].

Lo studio ha anche verificato che considerare la dipendenza del parametro α dal LET risulta funzionale per la determinazione della dose efficace poiché è stata considerata la 'qualità' della CR.

Conclusioni

L'esposizione alla radiazione ionizzante (RI) costituisce al presente l'ostacolo maggiore per una permanenza prolungata dell'uomo dello Spazio. Il presente lavoro di tesi ha avuto come scopo verificare, attraverso una seppur parziale disamina della letteratura esistente, le modalità radiobiofisiche con cui è possibile risalire alla dose della radiazione cosmica (*Cosmic Radiation* o CR) assorbita durante le missioni spaziali e così tentare di fornire stime di rischio per gli effetti deleteri per la salute degli astronauti, principalmente il cancro radioindotto.

La peculiarità della CR risiede non solo nel fatto che a parità di tempo trascorso nello Spazio, si riceve una dose maggiore di quella cui si è esposti sulla Terra per effetto della radiazione di fondo (*natural background radiation*) ma soprattutto nel fatto che la sua composizione, e quindi 'qualità' con conseguenti effetti radiobiologici, è profondamente diversa da quella presente naturalmente sulla Terra. In generale, la CR è costituita per la maggior parte da protoni di elevatissima energia (nell'ordine dei GeV), particelle α e una piccola parte di ioni pesanti ad alta energia (HZE). Dal momento che è nota la dipendenza dell'efficacia biologica relativa (RBE) dalla densità di ionizzazione descritta dal parametro LET (che deriva dallo *Stopping Power* legato ai processi di deposizione energetica descritti dall'equazione di Bethe-Bloch) e che tale RBE cresce al crescere del LET, la presenza di una componente ad alto LET rappresenta un fattore di rischio aggiuntivo. A questo si aggiunga che alle energie della CR le particelle cariche danno luogo a reazioni di frammentazione nucleare con i materiali che costituiscono il rivestimento delle astronavi, ma anche delle tute degli astronauti (*shielding*), generando uno sciame di particelle con un ampio spettro in energia e quindi in LET (*mixed field*). Inoltre, è appurato che l'esposizione cronica alla RI possa indurre anche effetti stocastici come diverse disfunzioni dell'apparato cardiovascolare e del sistema nervoso centrale, insorgenza di cataratta e tumori. Il problema della radioprotezione nello Spazio è legato al fatto che le stime di rischio per gli effetti radioindotti più preoccupanti, ossia quelli stocastici come appunto i tumori, ma anche le insorgenze di patologie cardiovascolari e neurodegenerative che sono pure legate all'esposizione, sono state ottenute sulla Terra con esperimenti radiobiologici in vitro o in vivo simulando gli effetti della CR mediante l'uso di fasci di ioni pesanti monoenergetici cui campioni cellulari sono stati esposti in presenza o assenza di materiali schermanti. Ciò ha permesso di quantificare il danno citogenetico. Tuttavia, questo deve essere correlato alla dose che effettivamente è assorbita dagli astronauti, che normalmente è misurata mediante la dosimetria fisica, che però non tiene conto delle peculiarità radiobiologiche dette sopra. La biodosimetria è quindi una tecnica radiobiofisica che è stata impiegata nel tentativo di integrare queste informazioni. Essa fa largo uso di una dei principali biomarcatori radioindotti del rischio di tumore, cioè le aberrazioni cromosomiche strutturali

Come mostrato nel capitolo 3, attraverso la biodosimetria si riesce a risalire alla dose efficace di radiazione assorbita. Nonostante la biodosimetria sia un valido strumento di supporto per la descrizione dell'azione biologica della RI, la determinazione di alcuni parametri fondamentali, ad esempio l'RBE, è complessa, in quanto *in vivo* la risposta varia in base al tessuto irraggiato, non solo per la tipologia, ma anche in base alle profondità alla quale si trova, le quali caratteristiche determinano la 'sensibilità' alla RI.

Infatti, per proteggere la salute degli astronauti da effetti letali della radiazione cosmica è necessario stabilire un massimo della dose di radiazione permessa [43]. Si stima che la dose alla quale gli astronauti sono esposti all'interno della ISS sia di circa 1 mSv al giorno, valore 150 volte più alto di quelli stimati sulla Terra [44]. In particolare, siccome la dose di radiazione cresce al crescere dall'altitudine, risulta chiaro che, per futuri viaggi interspaziali oppure la costruzione di basi permanenti sulla Luna, le dosi crescono velocemente (vedi Tabella 1) fino ad arrivare a 1 Sv per un'ipotetica missione su Marte. Ad oggi la ICRP (*International Commission on Radiobiological Protection*) fissa il limite di dose permessa annuale a circa 50 mSv, per cui sembrano proibite da questo limite, le lunghe permanenze nello Spazio [43]. Tuttavia, alcuni studi condotti dalla NASA [45], nonostante non siano studi biodosimetrici che determinano la dose efficace, provano che i danni radioindotti rientrano nei limiti 'normali' poco dopo la missione, ma sono dati ottenuti per permanenze brevi rispetto alla durata ipotetica delle future missioni.

È impegno degli enti di ricerca aumentare gli studi sugli effetti della CR sugli astronauti, anche utilizzando tecniche biodosimetriche sia *in vivo* che *in vitro* affinando i modelli statistici di predizione.

In conclusione, con la presenta disamina si è verificato che l'impiego della biodosimetria risulta fondamentale in materia di analisi del rischio indotto dalla CR, poiché questo non è legato in maniera lineare alla dose fisica di radiazione ma alla dose biologicamente rilevante, ed alcuni fenomeni (ad esempio legati allo *shielding*) non sono stimabili o modellizzabili con precisione allo stato attuale delle conoscenze radiobiologiche.

Bibliografia

- [1] Barrati M. R. *et al.*, *Principles of Clinical Medicine for space flight*, Springer (2020)
- [2] Nelson A., *Fundamental space radiobiology*, Gravitation and Space Research, Vol. 16, No. 2 (2003)
- [3] Hall E. J. *et al.*, *Radiobiology for the radiobiologist*, Lippincott Williams & Wilkins (2006)
- [4] Zhu J. *et al.*, *The biological effects induced by high-charged and energy particles and its application in cancer therapy*, Int J Radiat Res., Vol. 14., No. 1, pp. 1-7 (2016)
- [5] Goodhead DT., *Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA*, Int J Radiat Biol., Vol. 65, No. 1, pp. 7-17 (1994)
- [6] Barendsen GW. The relationships between RBE and LET for different types of lethal damage in mammalian cells: biophysical and molecular mechanisms, Radiat Res., Vol. 139. No. 3, pp. 257-70 (1994)
- [7] Townsend LW *et al.*, *Galactic cosmic ray transport methods and radiation quality issues*, Int J Rad Appl Instrum D, Vol. 20, No. 1, pp. 65-72 (1992)
- [8] Ferrari F. *et al.*, *Cosmic Rays: A review for Astrobiologists*, ASTROBIOLOGY, Vol. 9, No. 4, (2009)
- [9] www.nasa.gov
- [10] Rask J. *et al.*, *Space faring: The radiation challenge*, NASA Education, Mod. 1, p. 8 (2008)
- [11] Aravindan N. *et al.*, *High Energy Particle Radiation-associated Oncogenic Transformation in Normal Mice: Insight into the Connection between Activation of Oncotargets and Oncogene Addiction*, Sci Rep, Vol. 6 (2016)
- [12] Sylvester C.B. *et al.*, *Radiation-Induced Cardiovascular Disease: Mechanisms and Importance of Linear Energy Transfer*, Front Cardiovasc Med, Vol. 5, No. 5 (2018)
- [13] Grosshans D.R. *et al.*, *Particle Radiation Induced Neurotoxicity in the Central Nervous System*, Int J Part Ther, Vol. 5, No. 1, pp. 74-83 (2018)
- [14] Blakely A., *Biological effects of cosmic radiation: deterministic and stochastic*, Health Physics, Vol. 79, pp. 495-506 (2000)
- [15] Furukawa S. *et al.*, *Space Radiation Biology for "Living in Space"*, Hindawi BioMed Research International (2020)
- [16] Acharya M. *et al.*, *New concerns for neurocognitive function during deep space exposures to chronic, low dose-rate, neutron radiation*, eNeuro, Vol. 6, No. 4 (2019)

- [17] Willers H. *et al.*, *Repair of radiation damage to DNA*, Br J Cancer, Vol. 90, pp. 1297–1301 (2004)
- [18] Yatagai F. *et al.*, *Biological effects of space environmental factors: A possible interaction between space radiation and microgravity*, Life Sciences in Space Research (2018)
- [19] Manti L. *et al.*, *Modelled microgravity does not modify the yield of chromosome aberrations induced by high-energy protons in human lymphocytes*, Int. J. Radiat. Biol., Vol. 81, No. 2, pp. 147 – 155 (2005)
- [20] Pignalosa D. *et al.*, *Chromosome Inter- and Intrachanges Detected by Arm-Specific DNA Probes in the Progeny of Human Lymphocytes Exposed to Energetic Heavy Ions*, RADIATION RESEARCH, Vol. 170, pp. 458–466 (2008)
- [21] Bertucci A. *et al.*, *Shielding of relativistic protons*, Radiat Environ Biophys, Vol. 46, pp. 107–111 (2007)
- [22] Herate C. *et al.*, *Retrospective biodosimetry techniques: Focus on cytogenetics assays for individuals exposed to ionizing radiation*, Mutation Research (2019)
- [23] Leonard A. *et al.*, *Usefulness and limits of biological dosimetry based on cytogenetic methods*, Radiation Protection Dosimetry, Vol. 115, No. 1–4, pp. 448–454 (2005)
- [24] Bonassi S. *et al.*, *Chromosomal aberrations and risk of cancer in humans: an epidemiologic perspective*, Cytogenet Genome Res, Vol. 104. No. 1-4, pp. 376-82 (2004)
- [25] Lee J.K. *et al.*, *Cytogenetic biodosimetry for Fukushima travelers after the nuclear power plant accident: no evidence of enhanced yield of dicentrics*, J Radiat Res, Vol. 53, No. 6, pp. 876-881 (2012)
- [26] Muller W. U. *et al.*, *Micronuclei: a biological indicator of radiation damage*, Mutation Research, Vol. 366, pp. 163-169 (1996)
- [27] Schmid W., *The micronucleus test*, Mutation Research, Vol. 31, pp. 9-15 (1975)
- [28] Fenech M., *The in vitro micronucleus technique*, Mutation Research, Vol. 455, pp. 81-95 (2000)
- [29] Marchetti F. *et al.*, *Candidate protein biodosimeters of human exposure to ionizing radiation*, Int. J. Radiat. Biol., Vol. 82, pp. 605–639 (2006)
- [30] Roch-Lefèvre S. *et al.*, *Quantification of γ -H2AX Foci in Human Lymphocytes: A Method for Biological Dosimetry after Ionizing Radiation Exposure*, Radiation Research, Vol. 174, No. 2, pp. 185–194 (2010)
- [31] Hlatky L. *et al.*, *Radiation-induced chromosome aberrations: insights gained from biophysical modeling*, Bioessays, Vol. 24, No. 8, pp. 714-23 (2002)

- [32] Perumal V. *et al.*, *Radiation signature on exposed cells: Relevance in dose estimation*, World journal of radiology, Vol. 7, pp. 266-78 (2015)
- [33] Ainsbury E. A., *Review of retrospective dosimetry techniques for external ionizing radiation exposures*, Radiation Protection Dosimetry, Vol. 147, No. 4, pp. 573–592 (2011)
- [34] Liu J., *Accurate cytogenetic biodosimetry through automated dicentric chromosome curation and metaphase cell selection*, F1000 Research, Vol. 6 (2017)
- [35] Giussani A., *Eurados review of retrospective dosimetry techniques for internal exposures to ionising radiation and their applications*, Radiat Environ Biophys, Vol. 59, No. 3, pp. 357–387 (2020)
- [36] Chancellor J.C. *et al.*, *Limitations in predicting the space radiation health risk for exploration astronauts*, Microgravity, Vol. 4, No. 8 (2018)
- [37] Cucinotta F. A. *et al.*, *Physical and Biological Organ Dosimetry Analysis for International Space Station Astronauts*, Radiation Research, Vol. 170, No. 1, pp. 127-138 (2008)
- [38] Wilson J. W. *et al.*, *Issues in space radiation protection*, Health Phys, Vol. 68, pp. 50-58 (1995)
- [39] Wilson J. W. *et al.*, *Transport Methods and Interactions for Space Radiations*, Technical Report, NASA Langley Research Center (2003)
- [40] George M. *et al.*, *Chromosome aberrations in the blood lymphocytes of astronauts after space flight*, Radiat. Res., Vol. 156, pp. 731-738 (2001)
- [41] Yang T. C. *et al.*, *Biodosimetry Results from Space Flight Mir-18*, Radiation Research, Vol. 148, No. 5 (1997)
- [42] Cucinotta F. A. *et al.*, *Analysis of MIR-18 results for physical and biological dosimetry: radiation shielding effectiveness in LEO*, Radiation Measurements, Vol. 32 (2000)
- [43] Ohnishi K. *et al.*, *The biological effects of space radiation during long stays in Space*, Biological Sciences in Space, Vol. 18, No. 4, pp. 201-205 (2004)
- [44] Durante M. *et al.*, *Chromosome aberration dosimetry in cosmonauts after single or multiple space flights*, Cytogenet. Genome Res., Vol. 103, pp. 40-46 (2003)
- [45] Francine E. Garrett-Bakelman *et al.*, *The NASA Twins Study: A multidimensional analysis of a year-long human spaceflight*, Science, Vol. 364 (2019)