

Diss. ETH NO. 12460

**STOCHASTIC AND NON-STOCHASTIC EFFECTS OF
BETA-HOT PARTICLES IN TISSUE**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
Martina Noëlle Sigg
Eidg. dipl. pharm.

born 20. 12. 1960
citizen of Dörflingen, SH

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Chr. Schlatter, examiner
Prof. Dr. F. E. Würigler, co-examiner
Prof. Dr. W. Burkart, co-examiner
Dr. N. E. A. Crompton, co-examiner

1997

ZUSAMMENFASSUNG

Sogenannte "heiße Teilchen" sind kleine, hochradioaktive Partikel, zwischen 10 μm und 3 mm groß, unlöslich in Wasser, aber bedingt durch ihre Kleinheit leicht durch die Luft transportierbar. Sie bestehen meistens aus Aktiniden und Spaltprodukten, und ihre spezifische Aktivität kann bis zu Millionen von Becquerel hoch sein. Die erste Publikation über menschliche Strahlenbelastung durch radioaktive Partikel erschien bereits 1958, doch wurde die Thematik vor allem durch die Reaktorkatastrophe von Chernobyl aktualisiert.

Die Deposition eines heißen Teilchens auf menschlichem Gewebe (v.a. Haut, Lungenoberfläche, Gastrointestinaltrakt) wirkt sowohl aus dosimetrischer, wie auch aus strahlenbiologischer Sicht einige Probleme auf, die mit den üblichen Modellen nicht gelöst werden können. Wird die applizierte Dosis über ein ganzes Organ oder über den ganzen Körper gemittelt, so wird sie verschwindend klein. Die α - und β -Teilchen, die beim Zerfall der Nuklide entstehen, haben im Gewebe nur eine sehr beschränkte Reichweite. Im Gegensatz zum α -Teilchen, das seine ganze Energie innerhalb weniger μm deponiert, verliert ein β -Teilchen seine Energie konstant, d.h. es kommt zu einem Energiegefälle innerhalb seiner maximalen Reichweite von wenigen mm. Das bedeutet, dass abhängig von der Gesamtaktivität und von der Art des β -Nuklids, Zellen ab einer gewissen Distanz nicht mehr lethal geschädigt werden. Ionisierende Strahlung kann verschiedene Effekte auf zellulärer Ebene haben, sie entstehen entweder direkt durch Interaktion mit der DNS oder nach der Bildung freier Radikale, die wiederum die DNS oder andere zelluläre Strukturen schädigen können. Beinahe jede Zelle hat die Fähigkeit, entstandene Schäden bis zu einem gewissen Grade zu reparieren. Ist die Reparatur unvollständig, aber die Zelle bleibt reproduktionsfähig, so resultieren mutierte oder transformierte Zellen, dies kann je nachdem genetische Mutationen oder Krebs ergeben.

Bei Tierversuchen mit heißen Teilchen auf der Haut konnte in vielen Fällen außer einer Nekrose nichts beobachtet werden, doch gab es auch einige Hinweise darauf, dass Mutationen in überlebenden Zellen stattgefunden haben. Die Entstehung eines Tumors ist ein mehrstufiger Prozeß, bei dem im Tiermodell nur das Endprodukt bewertet werden kann, die Vorstufen aber nur sehr bedingt erkannt werden können. Hier bietet das Zellkulturmodell einige Vorteile, da es sich viel besser eignet, um mechanistische Studien zu betreiben. Insbesondere die C3H 10T1/2 Maus Fibroblasten bieten sich an als weltweit anerkanntes und reproduzierbares System zur Untersuchung von

Transformationen. Diese Zellen wachsen unter normalen Bedingungen nur so weit, bis sie andere Zellen berühren. Man spricht von einer Kontaktinhibition. Die Zellen können durch verschiedenen Agentien transformiert werden. Dadurch verlieren sie ihre Fähigkeit zur Kontaktinhibition, sie bilden sogenannte Foci, das sind Zellwucherungen, die sich klar vom nicht transformierten Zellrasen abheben. Das Hauptziel dieser Dissertationsarbeit war es also, ein Zellkulturmodell zu entwickeln, in dem Effekte heißer Teilchen untersucht werden können. Aus theoretischen Überlegungen war es sinnvoll, als Strahlenquelle einen β -Emitter zu wählen, und zwar in einer solchen Aktivität, dass gewisse Zellen tödliche Dosen erhalten, die meisten Zellen aber nicht tödlich geschädigt werden. Die Frage war dann, ob die Schädigung der letzteren stärker oder schwächer ist verglichen mit einem System, in dem alle Zellen die selbe Strahlendosis erhalten.

Als Strahlenquelle wurde ein schmaler Yttriumdraht gewählt, der durch Neutronenbeschuss aktiviert wurde. Das entstandene Y-90 ist ein reiner β -Emitter. Der Draht wurde unterhalb einer Zellkulturplatte mit einem speziell dünnen Boden fixiert. Die errechnete wie auch die gemessene Dosimetrie ergaben ein extrem inhomogenes Strahlenfeld, mit 24 h-Dosen direkt über dem Draht von mehr als 750 Gy, die mit Distanz sehr schnell abnahmen bis zu 0 Gy bei ca. 20 mm Abstand. Als biologische Versuche wurden Überlebenstests und Transformationsstudien unternommen. Für die Überlebenstests wurden die Zellen in Abständen von jeweils 1 mm isoliert und ihre Reproduktionsfähigkeit bestimmt. Die so gemessenen Überlebensraten ergaben eine klare Übereinstimmung mit dem extremen Dosisabfall.

Mit Hilfe dieser Tests konnte die Zone bestimmt werden, in der die Überlebensrate so zwischen 60 und 70 % war, ein Bereich, in dem Transformationen wahrscheinlich sind. Im inhomogenen Yttriumsystem war dies in 9 bis 11 mm Abstand vom Draht. Die Zellen in diesem Bereich wurden nach der Bestrahlung isoliert und ihre Transformationsrate wurde bestimmt. Die Transformationsrate betrug 1 transformierte Zellen pro 1'000 überlebende Zellen. Im Vergleich dazu wurde die Transformationsrate von Zellen bestimmt, die im genau gleichen Dosisbereich wuchsen, die aber während der Bestrahlung isoliert waren. Sie betrug 1 transformierte Zelle auf 10'000 Zellen, war also 10 x niedriger als im anderen System. Dies bedeutet also, dass im ersten System, in dem während der Bestrahlung Zellen mit unterschiedlichen Schädigungen Kontakt untereinander haben, die Transformationsrate höher ist, als wenn dieser Kontakt nicht stattfinden kann.

Diese Dissertationsarbeit umfaßt auch Untersuchungen von transformierten C3H 10T1/2 Zellen. Die Zellen wurden isoliert und kloniert. Darauf wurde ihre DNS-Verteilung, ihre Strahlenempfindlichkeit und ihre genomische Instabilität untersucht. Die verschiedenen Klone zeigten sehr unterschiedliche DNS-Verteilungen. Einige waren extrem instabil. Die Strahlenempfindlichkeit von transformierten Zellen war gegenüber nicht transformierten Zellen nicht verändert.

SUMMARY

So called hot particles are small and highly radioactive fragments, with a diameter between 10 μm and 3 mm, insoluble in water and small enough to become airborne. Generally, they are made up of fission products or actinides with a specific activity of up to millions of Becquerels. The first article about human exposure due to radioactive particles was published in 1958, but the main discussion about human risk due to hot particles started after the Chernobyl catastrophe in 1986.

The desposition of a hot particle onto human tissue (mainly skin, lung surface and gastrointestinal tract) poses problems, which cannot be solved with current models of dosimetry and radiobiology. Alpha- and β -particles have only a defined range in tissue. Contrary to α -particles, which deposit their energy within a few microns, β -particles gradually loose their energy within a few millimeters. Therefore, the dose distribution around β -hot-particles is skewed, so that cells in the nearest vicinity receive an extremely high dose, but cells a few cell-diameters distant receive much lower doses. In such a situation, averaging dose over the whole organ or whole body underestimates the exposure situation.

Ionizing radiation damages living cells. It has been postulated to induce its multiple biological effects either by direct interaction with DNA or through the formation of free radical species and subsequent interaction with DNA or other cellular structures. Cells have the capability to repair DNA-damage. Incomplete repair can result in mutated or transformed cells, and later in mutations or cancer.

Experimental exposure of animal skin to hot particles induces primarily tissue necrosis, but there are some indications of mutations induced in surviving cells. Evolution of a tumour is a multistep process and in animal experiments only the final product, the tumour, can be evaluated. In cell culture models, however, the mechanisms involved in the transformation process can be examined. Particularly the C3H 10T1/2 mouse fibroblast transformation assay is recognized worldwide as a reproducible and acceptable cell model. Under normal growth conditions, the C3H 10T1/2 cells stop dividing after touching neighbouring cells, a process referred to as contact inhibition. The cells can be transformed by diverse agents, and after transformation they loose contact inhibition and build so called foci, which are cell aggregates clearly distinguishable from the untransformed monolayer of parent cells. The main aim of this thesis was to develop a cell culture model which permits

investigations of hot particle effects. On theoretical grounds a β -emitting radiation source was chosen. The activity should be sufficiently high, so that some cells receive a lethal dose, but most cells should not be lethally damaged. The question to be answered was whether in such a system the damage was higher than in a system where all cells receive the same radiation dose.

As a radiation source, a small yttrium-wire was chosen, which was activated by thermal neutrons. Y-90 is a pure β -emitter. The wire was fixed below a cell culture plate with a thin basement growth foil. The estimated and measured dosimetry yielded an extremely inhomogeneous radiation field, with 24-hour doses directly above the wire of more than 750 Gy, rapidly decreasing to 0 Gy within 20 mm. As biological endpoints, survival and transformation rate were determined. For the survival assay, cells at 1 mm distances were isolated and their reproducibility was determined. The measured surviving fraction reflected the extreme decrease of dose.

The area displaying a surviving fraction between 60% and 70% (between 9 and 11 mm distance from the wire) was chosen for investigation with the transformation assay. After irradiation, the cells in this area were isolated and their transformation rate was determined. One transformed cell per 1'000 surviving cells was observed. For a control, the transformation rate was determined of cells growing in the same dose area but being isolated during the irradiation. Here, the transformation rate was 1 transformed cell per 10'000 surviving cells, 10 times lower than in the other system. This means that the transformation rate is higher in a system permitting between differently damaged cells contact during irradiation than in a system without such contact. The thesis also describes investigations of transformed C3H 10T1/2 cells which have been isolated and cloned. The investigations of their DNA distribution, their radiation sensitivity and their genomic instability showed very different DNA distributions in the various clones. Some of the clones were genetically extremely unstable. Radiation sensitivity, however, was identical when compared with untransformed cells.