

Biophysical Evaluation of Radiosensitization by AuNPs Nanoparticles Irradiated Photon beam

Eunae Choi,^{1,*} Jaeman Son²

^{1,2}Department of Bio-convergence Engineering, Korea university

Received: September 11, 2016. Revised: November 10, 2016. Accepted: November 30, 2016

ABSTRACT

The purpose of this study is to investigate whether gold nanoparticles had radiosensitization when combined with gamma and x ray beam. Cytotoxicity was measured with comparing survival fraction after incubated time 6,12,18 and 24 hours. Clonogenic assay was employed to assess survival fraction of cells with and without gold nanoparticles treatment following gamma ray irradiation. The most of gold nanoparticles were distributed in the cytoplasm. And the toxicity of gold nanoparticles used this study were found to be non-cytotoxic. And we also observed enhancement by about 40% in RBE value for gamma ray irradiation of cells treated with gold nanoparticles. Dose reduction of about half for gamma ray irradiation is demonstrated for gold nanoparticles treated cells as compared to untreated cells. In cells with exposed to gamma ray, DNA damage was increased when compared to only radiation exposed cells. The study revealed a significant reduction in radiation dose for killing the cells with internalized gold nanoparticles as compared to the cells without gold nanoparticles. The gold nanoparticles treatment resulted in enhancement of radiation effect as evident from increase in relative biological effectiveness values for photon irradiated cells.

Keywords: Radiosensitization, Nanoparticle, Clonogenic assay, MC simulation

I. INTRODUCTION

전 세계적으로 인간의 평균 수명 증가와 대부분 암의 약 60%가 60세 이후 발병한다는 사실에 근거하여 새로이 진단되는 암환자가 연평균 현재 대비 2020년 약 1.5배로 급증할 것으로 예상하고 있다.^[1] 우리나라의 경우 역시 고령화 사회에 진입하였고 전체 인구 중 노령 인구의 비율이 상당히 높아질 전망으로 보이며 이에 따라 암환자의 급증이 예상된다. 이러한 암 환자의 꾸준한 증가 추세에 따라 진단 기술의 발달과 다양한 치료 기술의 개발로 이어져 왔다. 암 질환 조기 진단의 중요성이 시간이 지날수록 크게 부각되고 있으며 아울러 암 질환 진단 및 치료제에 대한 제약, 치료기술의 연구비중이 커지고 있다.^[2]

암 치료의 3대 치료법인 외과적 수술, 항암화학요법

과 함께 방사선 치료는 다양한 장점을 가지고 있어 사용 수준이 높아지고 있으며 치료 성적 향상을 위해 다양한 융합 기술의 시도가 이어지고 있다. 고식적인 방사선 치료방법의 가장 일반적인 약점은 악성 세포와 건강한 세포 사이의 선택성이 부족하다는 것이다.^[3,4] 이의 해결책으로 나노기술을 활용한 다양한 융합기술이 발전하고 있다. 암 세포 위에 나노입자가 위치해서 단일 세포 정확성으로 암을 파괴 할 수 있는 나노입자 기술은 계속해서 다양한 시도가 이루어지고 있다.^[5,6] 지름이 1~100 nm인 입자 형태의 비독성의 나노 물질을 방사선과 함께 활용하여 방사선의 생물학적 효율을 매우 향상시켜 암 조직에 방사선 감수성을 높이는 것이다.^[7,8]

본 연구에서는 다양한 크기의 AuNPs가 γ 선 및 X선 조사 시 방사선 감수성의 변화를 측정해 보고자 하였

*Corresponding Author: Eunae Choi

E-mail: eunae0815@gmail.com

Tel: +82-10-4578-0146

다. AuNPs 입자의 인큐베이션 시간에 따른 세포생존율 값의 변화를 확인하여 독성 유무를 확인한 후 콜로니 어세이를 통해 AuNPs 입자의 존재 유무에 따른 세포생존율의 차이 및 변화를 측정하고자 한다. 그리고 Gate version 6.1을 이용하여 몬테카를로 시뮬레이션을 시행하여 150 keV의 x ray 조사 후 30nm의 AuNPs의 percent depth dose를 측정함으로써 방사선 감수성의 변화에 따른 선량변화를 확인해 보고자 한다.

II. MATERIAL AND METHODS

1. 독성검사 및 세포생존율 측정

AuNPs 입자의 독성유무를 확인하기 위해 Hep3B 세포로 콜로니 어세이를 시행한 후 시간이 지난 후의 세포생존율(Surviving Fraction, SF) 변화를 확인하였다. Hep3B 세포는 한국 세포주 은행에서 분양 받았으며 Table. 1의 정보를 가진다. 20 nm 크기의 AuNPs 를 Hep3B 세포에 시딩한 후 6시간, 12시간, 18시간, 24시간 incubation하여 Hep3B 세포가 배양되고 있는 플레이트 상에 AuNPs를 처리하였다. 그리고 각각 시간별로 세포생존율(Surviving Fraction, SF)값의 변화를 비교하였다. AuNPs 시딩 후 값의 변화가 보이지 않아 입자 자체가 Hep3B 세포에 영향을 주지 않음을 확인하였다.

Table 1. Hep3B information in KCLB

Origin	Species	Cellular morphology	Growth pattern
liver	human	epithelial	monolayer
Histopathology		Original media	
carcinoma, hepatocellular		Medium Eagle	
Freezing media		KCLB media	
RPMI1640, 52.5% FBS, 40% DMSO, 7.5%		DMEM Medium heat inactivated fetal bovine serum (FBS), 10%	

그리고 ^{137}Cs 의 γ 선 조사 시 세포생존율(Surviving Fraction, SF)값의 변화를 확인해보았다. 각각의 조사 조건에서 Hep3B 세포를 5개의 샘플을 준비하고 20 nm 크기의 AuNPs 를 시딩하였다. 방사선량 0~10 Gy의 γ 선을 조사하였다. 그리고 AuNPs 의 제거를 위해 트립신 용액으로 60 mm 디쉬에서 Hep3B 세포를 분리한 후 감마선을 조사한 Hep3B 세포를 0~10 Gy의 방사선량에 따라 600, 1200, 2400, 4800, 10000개의 cell을 시딩 하였다. 세포를 10-12일 동안

인큐베이터(37 °C, 5 % CO₂)에서 배양하였다. 0.25 % 메틸렌 블루 용액으로 염색시킨 후 콜로니는 최소 50개의 세포의 집단으로 식별 가능한 콜로니들을 카운트했다. 각각의 선량 레벨에 해당하는 세포생존율(Surviving Fraction, SF)은 다음의 과정으로 계산되었다. 비처리세포를 배양할 때 이것이 육안으로 인정할 수 있는 colony로 성장할 수 있는 비율을 집락형성률(plating efficiency, PE)이라 하고 Eq. (1)을 사용하였다.

$$PE = (\text{완성된 콜로니 수} \times 100) / (\text{심은 세포 수}) \quad (1)$$

세포의 생존확률(SF)은 심은 세포의 얼마만큼이 육안적으로 확인할 수 있는 colony로 성장했는가로 정해지고 Eq. (2)을 사용하였다.^[9,10]

$$SF = (\text{완성된 콜로니 수}) / (\text{심은 세포 수} \times PE / 100) \quad (2)$$

그리고 세포생존율(Surviving Fraction, SF)의 값을 이용하여 Eq. (3)을 사용하여 LQ 모델로 피팅한 후 각각의 파라미터 값을 구하였다.^[11]

$$\text{Log}S_n = -n\gamma(ad + \beta d^2) \quad (3)$$

2. percent depth dose(PDD) 측정

자체 제작한 팬텀을 사용하여 AuNPs의 유무에 따른 선량의 변화를 확인하고 방사선 감수성을 평가하기 위해 Gate version 6.1을 이용하여 몬테카를로 시뮬레이션을 시행하였다. AuNPs는 30 nm의 사이즈를 사용하였으며 150 keV x-ray를 조사하였다. dosimetry tool은 GD-302 m glass dosimeter (AGC Techno Glass Corp., Shizuoka, Japan) 모델을 사용하였다. FGD-1000 automatic reader는 흡수선량을 측정하기 위해 사용하였다.

III. RESULT

생물학적 방사선 감수성의 평가에 앞서 6시간, 12시간, 18시간, 24시간, incubation한 후 Surviving Fraction (SF)값을 비교하여 20 nm 크기의 AuNPs 입자의 독성 여부를 확인한 후 Hep3B 세포에 AuNPs가 세포질에

골고루 분포하였는지 확인하였다.[Fig. 1]

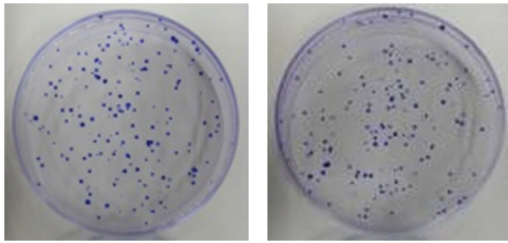


Fig. 1. clonogenic assay of two sample.

Incubation time에 따라 SF값이 낮아지지 않았고 이는 입자 자체가 Hep3B 세포에 영향을 주지 않았으며 독성유무를 확인하였다. [Fig. 2] γ 선 조사 후 Clonogenic assay 실시하고 세포생존율(Surviving Fraction, SF)값을 구하여 방사선 감수성을 비교 평가하였다. γ 선의 선량이 증가함에 따라 방사선 감수성의 차이는 커졌으며 8 Gy조사 시 약 30 % 세포생존율(Surviving Fraction, SF)값이 낮아짐을 확인하였다. [Fig. 3]

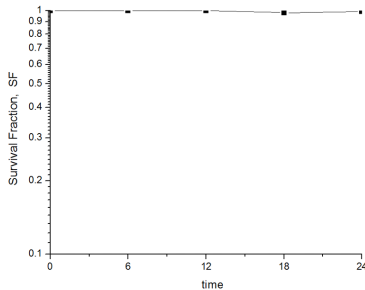


Fig. 2 SF of Hep3B cells after different incubated time. (horizontal axis: absorbed dose, vertical axis: surviving fraction)

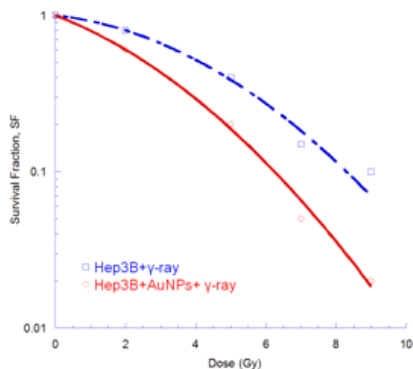
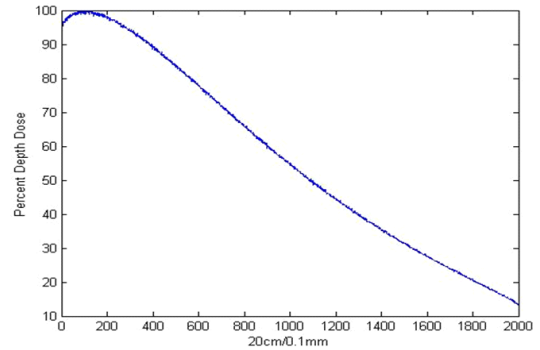
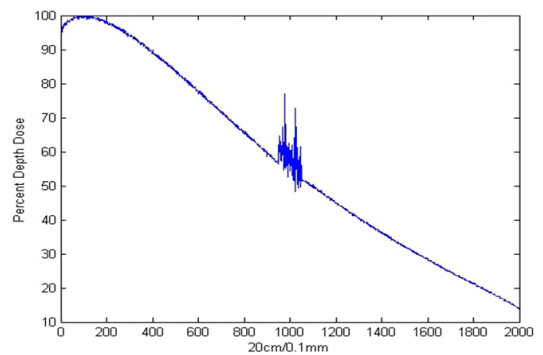


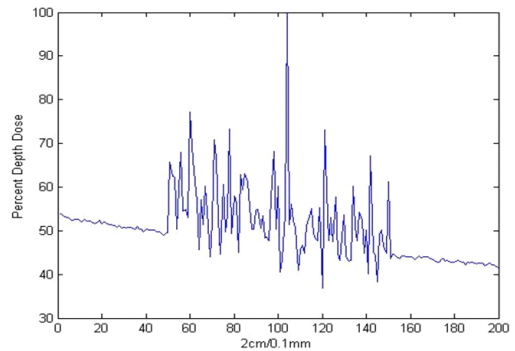
Fig. 3 SF of Hep3B cells and the γ -ray irradiated cells pretreated with and without AuNPa. (horizontal axis: absorbed dose, vertical axis: surviving fraction) open circle: not treated Hep3B. open square: treated Hep3B.



(a) Percent depth dose in water phantom for 150 keV x-ray.



(b) Percent depth dose in water phantom with 30nm diameter AuNPs.



(C) Magnification of dose enhancement.

Fig. 4 . Dose enhance factor (DEF) in 30nm diameter AuNPs.

또한 Gate v6.1을 사용하여 몬테카를로 시뮬레이션 후 percent depth dose(PDD)를 구한 뒤 선량 평가하였다. 150 keV x-ray beam에서 30nm크기의 AuNPs 이용 시 Dose enhance factor (DEF) 16 % 증가 하였다.[Fig. 4]

IV. DISCUSSION AND CONCLUSION

기존의 방사선 치료방법의 일반적인 약점을 보완하고자 암 세포 위에 나노입자가 위치해서 단일 세포 정 확성으로 암을 파괴 할 수 있는 나노입자 기술은 계속 해서 다양한 시도가 이루어지고 있다. 지름이 1~100 nm 인 입자 형태의 비독성의 나노 물질을 방사선과 함께 활용하여 방사선의 생물학적 효율을 매우 향상시킬 암 조직에 방사선 감수성을 높이는 nanoparticle radiation 치료가 각광받고 있음에 따라 본 연구에서는 나노 수 준 크기의 AuNPs에 γ 선 및 X선 조사 시 방사선 감수 성의 변화를 확인해 보았다.

γ 선 및 x선 조사 시 AuNPs 입자의 방사선감수성의 향상을 생물물리학적으로 평가하기 위해 진행하였다. 생물학적 방사선 감수성의 평가에 앞서 시간별로 incubation 후 Surviving Fraction(SF)값을 비교하여 AuNPs 입자의 독성 여부를 확인한 후 AuNPs가 세포질에 골 고루 분포하였는지 확인 해 보았다. incubation time에 따라 SF값이 낮아지지 않음을 확인한 다음 γ 선 및 x선 조사 후 Clonogenic assay 실시하고 surviving Fraction(SF)값을 구하여 방사선 감수성을 비교 평가하였다. γ 선의 선량이 증가함에 따라 방사선 감수성의 차이는 점 차 커졌으며 8 Gy조사 시 약 30 % 세포생존율(Surviving Fraction, SF)값이 낮아짐을 확인하였다. 또한 Gate v 6.1을 사용하여 몬테카를로 시뮬레이션 후 percent depth dose(PDD)를 구한 뒤 선량 평가하여 Dose enhancement factor (DEF) 16 % 증가함으로써 Dose Enhancement가 있음을 확인하였다.

두 가지 실험결과에 따라 생물물리학적으로 AuNPs 입자는 방사선 감수성이 향상되도록 함을 발견하였다. 다양한 종류와 크기의 나노입자와 현재 각광받고 있는 고LET 방사선의 융합 치료 시 치료 성적 향상에 더욱 큰 도움이 될 것으로 보이며 이러한 시도는 성공적인 나노입자의 활용 가능성을 제시해줄 것이다.

ble-conditionally repairable, multi-target and linear-quadratic models in converting hypofractionated radiation doses to single doses" JRR, pp 367-373, 2013.

- [3] B. K. Lind et al, "Repairable-Conditionally Repairable Damage Model Based on dual poisson processed" Radiation research, pp 366-375, 2003.
- [4] Howard D. Thames, "An 'incomplete-repair' model for survival after fractionated and continuous irradiations" INT.J. RADIAT. BIOL, Vol. 47, pp 319-339, 1985.
- [5] Akifumi Miyakawa, "Applicability of the linear-quadratic model to single and fractionated radiotherapy schedules: an experimental study" Journal of Radiation, pp. 1-4, 2013.
- [6] Cornelius A. Tobias, "The Repair-Misrepair model in radiobiology: Comparison to other models" Radiation Research, pp. 77-95, 1985.
- [7] Stanley B. Curtis, "Lethal and potentially lethal lesions induced by radiation - A unified repair model", Radiation research, pp. 252-270, 1986.
- [8] M. Wedenberg, "Analytical Description of the LET dependence of cell survival using the repairable-conditionally repairable damage model", Radiation Research, pp. 517-525, 2010.
- [9] Alejandro carabe-fernandez et al, "The incorporation of the concept of minimum RBE into the linear-quadratic model and potential for improved biological analysis of high-LET treatments" int. j. Radiat. Biol, Vol. 83, No. 1, pp. 27-39, 2006.
- [10] Hiromitsu Iwata et al, "Estimation of errors associated with use of linear-quadratic formalism for evaluation of biologic equivalence between single and hypofractionated radiation doses: an in vitro study" Int J. Radiation Oncology, Vol. 75, No. 2, pp. 482-488, 2009.
- [11] Eunae Choi, "Comparison of Linear-Quadratic model, Incomplete-Repair model and Marchese model in fractionated carbon beam irradiation" Journal of the Korean society of radiology, Vol. 9, No. 6, pp. 417-420, 2015.

Reference

- [1] Mami wada et al, "Modeling the biological response of normal human cells, including beam irradiation" JRR, pp.1-10, 2013.
- [2] Hiromitsu IWATA et al, "Compatibility of the repair

photon빔 조사 후 AuNPs 입자의 방사선 감수성 향상에 관한 생물물리학적 평가

최은애,^{1,*} 손재만²

^{1,2}고려대학교 바이오융합공학과

요 약

이 연구는 γ 선 및 x선 조사 시 AuNPs 입자의 방사선감수성의 향상을 생물물리학적으로 평가하기 위해 두 가지 실험을 시행하였다. 생물학적 방사선 감수성의 평가에 앞서 6시간, 12시간, 18시간, 24시간 incubation한 후 세포생존율(surviving Fraction, SF)값을 비교하여 AuNPs 입자의 독성 여부와 세포질에 입자의 균일된 분포 여부를 확인 해 보았다. incubation time에 따라 세포생존율(surviving Fraction, SF)이 낮아지지 않음을 확인한 다음 γ 선 및 x선 조사 후 Clonogenic assay 실시하고 세포생존율(surviving Fraction, SF)을 구하여 방사선 감수성을 비교 평가하였다. 방사선량 증가 시 세포생존율(surviving Fraction, SF)이 계속해서 낮아졌고 8Gy 조사 시 최대치로 약 30%의 차이가 있음을 확인하였다. 또한 Gate v6.1을 사용하여 몬테카를로 시뮬레이션 후 percent depth dose(PDD)를 구한 뒤 선량 평가하여 약 40% Dose Enhancement가 있음을 확인하였다. 두 가지 실험에 따라 생물물리학적으로 AuNPs 입자는 방사선 감수성이 향상되도록 하며 이는 nanoparticle을 이용한 방사선 병합 치료 시 치료 성적 향상에 큰 도움이 될 것으로 보인다.

중심단어: 방사선감수성, 나노입자, clonogenic assay, MC simulation