

# Change of Surviving Fractions based on the Recovery of Potentially Lethal Damage in HFL-I Cell Line

Eunae Choi

Department of Bio-convergence Engineering, Korea university

Received: May 21, 2017. Revised: June 15, 2017. Accepted: June 30, 2017

## ABSTRACT

Potentially lethal damage repair (PLDR) in HFL-I was investigated by delayed plating experiments. The surviving fraction data were fitted to the linear Quadratic equation ( $\text{Log}S_n = -n\gamma(\alpha d + \beta d^2)$  where  $\gamma=1$  for immediate plating). And a repair factor  $\gamma$  was developed to compare survival for immediate and delayed plating. When we only took into account the repair factor of PLDR  $\gamma$  which was derived from the delay assay, the cell survival response to fractionated carbon ion irradiation was not fully matched. This gap suggested that consideration of another repair process is necessary. So this suggests that the various repair process plays an important role in the fractionated irradiations.

Keywords: Potentially lethal damage repair, Marchese model, Surviving fraction, HFL-I

## I. INTRODUCTION

탄소빔은 비정의 끝부분에서 에너지 전달 상승에 의한 흡수 방사선량이 높은 구역인 브래그 피크가 발생하는 특이성이 있다. 이는 X선과는 극히 대조적인 방사선량 분포를 갖는다. 실제 임상 적용 시에는 넓은 암 부위에 균일한 방사선량이 전달되도록 하기 위해 여러 깊이에서 발생시켜 브래그 피크를 중첩시킨 SOBP(Spread Out Bragg Peak)를 사용한다. SOBP 구간은 월등히 높은 생물학적 효과비를 (Relative Biologic Effectiveness, RBE)를 가지기 때문에 정확한 선량 분포가 요구된다.<sup>[1]</sup>

이러한 SOBP 구간의 높은 RBE는 암 조직 주변의 정상조직 손상에 대한 우려로 이어져 이에 대한 해결책으로 분할조사를 시행하고 있으며 interval 시간 동안 정상조직이 회복과 재생의 가능성을 지원해준다. 그러나 interval 시간 동안 암 조직 역시 회복과 재생의 가능성이 있다. 즉 interval 시간을 주는 것은 Hypoxic tumor cells의 Repopulation과 Reoxygenation 허락해

춤으로써 역선량 효과가 될 수 있음을 뜻한다.<sup>[2]</sup>

이에 대해 Regrowth, Resensitization, Sublethal damage Repair가 치료 성적에 지대한 영향을 미친다고 보고되고 있지만 대부분 치료결과의 modeling 과정에서 static tumor만 고려되고 있다.<sup>[3]</sup> 또한 Tumor control probability (TCP) model은 일반적으로 surviving cells의 Poisson approximation 분포를 기본으로 한 정의로써 세포사는 single hit mechanism 혹은 Linear Quadratic model (LQ model)을 따르는데 이러한 이론은 분할 조사 사이의 interval 시간 동안 세포가 완전한 회복이 되었다고 가정한다.<sup>[4]</sup> 완전한 회복에 성공하였다고 가정할 시 100 keV/μm 탄소빔을 조사하여 single 조사와 fraction 조사에서 다른 결과를 보이는 오류를 보인다.<sup>[5]</sup> 즉 X선과 달리 탄소빔 분할 조사 시 회복량의 변화가 있음을 알 수 있으며 다양한 회복의 구조를 가지고 있어 이를 반드시 고려하여야 한다.<sup>[6]</sup> 오류를 해결하고자 다양한 생물리학적 모델이 제안되어져 오고 있으며 치료성적향상을 위한 다양한 시도가 되어지고 있다.<sup>[7,8]</sup>

본 연구는 HFL-I 셀라인에 13.18keV/ $\mu\text{m}$ 의 탄소빔 조사 후 immediate assay와 delayed assay를 시행하였다. 그리고 세포생존율의 데이터를 얻어 이를 바탕으로 12시간, 36시간, 48시간 후 발생한 Potentially Lethal Damage Repair (PLDR)의 양을 측정하였다. 또한 탄소빔 분할 조사 시 interval 시간 안에 발생하는 회복의 양과 비교하였다. PLDR만 고려된 marchese model에 적용하여  $\gamma$ 값을 계산한 후 비교해봄으로써 다른 회복 매커니즘의 존재를 확인하고 이를 적용할 수 있는 새로운 파라미터를 고려하고자 한다.

## II. MATERIAL AND METHODS

### 1. 조사 전 준비

본 연구에서는 RIKEN BRC cell bank에서 분양받은 HFL-I 셀라인을 사용하였다. (Cell No. RCB0521) 미디어는 10% fetal bovine serum를 함유한 Eagle's minimum essential medium (MEM; Nissui Pharmaceutical)를 사용하였다. 75cm<sup>2</sup> 플라스틱 플라스크(BD Falcon)에서 37°C의 온도와 5% CO<sub>2</sub>를 제공하는 환경에서 배양하였다.

탄소빔 조사 3일 전에 0.15 ~ 5.5Gy 선량별로 다양한 세포의 농도로 25cm<sup>2</sup> 플라스틱 플라스크에 플레이팅하였다. 이 세포들은 플레이팅 후 탄소빔 조사 직전에 거의 confluent한 상태가 된 후 방사선 조사가 진행되었다. 방사선 조사는 일본의 National Institute of Radiological sciences(NIRS) 내에 위치한 Heavy Ion Medical Accelerator(HIMAC)로 가속한 탄소빔을 사용하였다. 탄소빔의 initial energy는 290MeV/u이었다. Lucite absorber를 활용하여 13.18keV/ $\mu\text{m}$ 의 저 LET 에너지의 탄소빔을 만들어 사용하였다. 방사선량은 25cm<sup>2</sup> 플라스틱 플라스크에 담긴 HFL-I셀라인의 위치로 조절하였다. 선량률은 1.2Gy/min이었다.

### 2. PLDR 측정

PLDR의 양은 immediate plating과 delayed plating을 시행한 후 그 차이를 비교하여 측정할 수 있다. 각각 다른 농도의 셀라인 샘플은 탄소빔 조사 후 즉시 한 dish당 약 70개의 콜로니 생성을 위해 10cm dish에 플레이팅하였다. 그리고 PLDR 발생을 제공하지 않기 위

해 탄소빔 조사된 세포를 즉시 colony assay를 시행하는 immediate plating을 하였다. 또한 delay plating 함으로써 PLDR을 지원해주고 생존율을 측정하여 immediate plating의 양과 비교하여 측정하였다. delayed time 동안 세포는 37°C의 온도와 5% CO<sub>2</sub>를 제공하여 인큐베이션하였다. 12시간, 36시간, 48시간 후 delayed plating하여 colony를 형성시켰다.

### 2. 분할조사 후 확인

분할조사는 24시간의 interval 시간으로 총 1~4번으로 조사하였다. 마지막 조사가 끝나면 1시간 안에 colony assay를 시행하였다. 2주후 colony가 형성이 되면 20% 메탄올로 고정시키고 0.2% 크리스탈 바이올렛으로 염색하였다. 생존하였다고 판단하는 colony는 최소 50개 이상의 세포이며 interval 시간동안 HFL-I 셀라인은 37°C의 온도와 5% CO<sub>2</sub>를 제공하는 incubator에 두어 S LDR와 PLDR을 동시에 지원해 주었다.

## III. RESULT

HFL-I 셀라인에 13.18keV/ $\mu\text{m}$ 의 탄소빔 조사 후 immediate assay와 delayed assay를 시행하였다. immediate assay를 시행한 실험값은 PLDR이 발생하지 않았으므로 marchese model에서  $\gamma$ 는 1이 되어 LQ survival model과 동일하다. mathematica software (ver.9.0)를 이용하여 Table 1과 같이  $\alpha, \beta, \alpha/\beta$  파라미터 값을 얻었다.

그리고 colony assay를 통해 세포생존율의 데이터를 얻어 이를 바탕으로 12시간 후 발생한 Fig 2와 같이 PLDR의 양을 측정하였다. 그리고 36시간 후 발생한 PLDR의 양을 확인하고 Fig 3 과 같이 3 $\gamma$ 값을 확인하였다. 48시간 후 발생한 PLDR의 양을 Fig 4와 같이 측정하였다. delayed time 동안 cell이 confluent 한 상태로 두어 PLDR을 적극적으로 지원해주고 marchese model을 이용하여  $\gamma$ 값을 얻었다. delayed time이 길어질수록  $\gamma$ 값은 감소하여 PLDR의 증가를 확인하였다.

또한 HFL-I 셀라인을 활용하여 24시간의 interval 시간으로 탄소빔 분할조사를 시행하였다. 한번의 interval 시간을 가지는 2fraction 조사 후 marchese model을 이용하여  $\gamma$ 값을 계산하였다. 두 번의 interval time을 가지는 3fraction 조사 후, 세 번의 interval time을 가지는

4fraction 조사 후 marchese model을 이용하여  $\gamma$ 값을 계산하였다.  $\gamma$ 값이 감소함을 확인하였으며 fraction 수가 많아 질수록 Table 2와 같이 PLDR의 양이 증가하고 있음을 확인하였다.

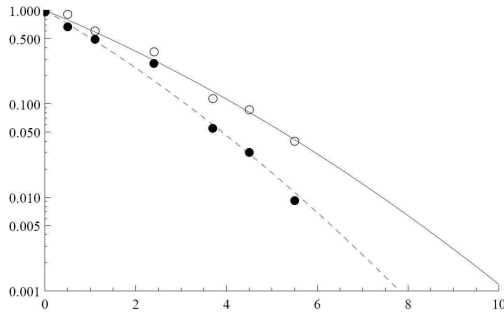


Fig. 1. Dose-response curves of the HFL-I death by 12hour delayed plating. filled circle: immediate assay, open circle: 12hour delayed assay. (horizontal axis: absorbed dose, vertical axis: surviving fraction)

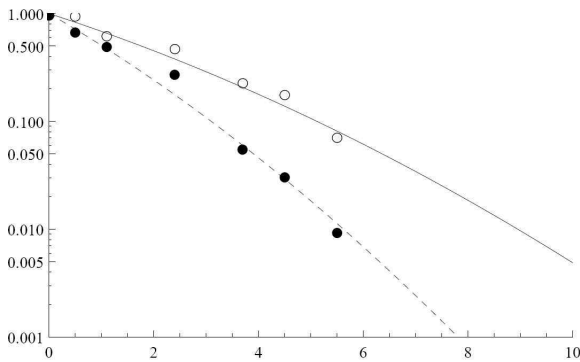


Fig. 2. Dose-response curves of the HFL-I death by 36hour delayed plating. filled circle: immediate assay, open circle: 36hour delayed assay. (horizontal axis: absorbed dose, vertical axis: surviving fraction)

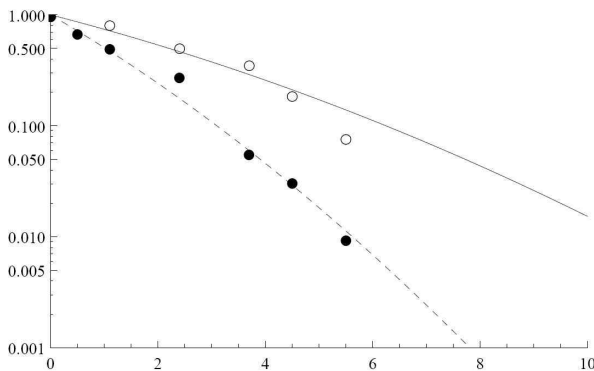


Fig. 3. Dose-response curves of the HFL-I death by 48hour delayed plating. filled circle: immediate assay, open circle: 48hour delayed assay. (horizontal axis: absorbed dose, vertical axis: surviving fraction)

Table 1.  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\alpha/\beta$  values of single fraction derived by the LO fit to the data

13keV HFL-I	$\alpha(\text{Gy}^{-1})$	$\beta(\text{Gy}^{-2})$	$\alpha/\beta(\text{Gy})$
	0.65	0.03	21.67

Table 2.  $\gamma$  values derived by the marchese model fit to the data

$\gamma$ $\text{LogSn}=-n\gamma(\alpha d+\beta d^2)$		
12h delay	36h delay	48h delay
0.71	0.56	0.44
2fraction	3fraction	4fraction
0.67	0.40	0.37

#### IV. DISCUSSION AND CONCLUSION

PLDR은 cell이 confluent한 상태이거나 세포 분할이 연기될 때 나타난다.<sup>[9]</sup> 따라서 본 연구에서는 탄소빔 조사 후 12시간, 36시간, 48시간 동안 cell을 confluent하게 두고 delayed assay를 시행하고  $\gamma$ 값을 구하였다. delayed time에 따라 PLDR이 증가함을 보였다. PLDR을 고려한 파라미터를  $\gamma$ 라 두었을 때 n번 분할조사 시 PLDR은 n번 반복되어  $\text{LogSn}=-n\gamma(\alpha d+\beta d^2)$ 로 계산할 수 있다.<sup>[10,11]</sup> 분할 조사 시 interval 시간에 일어나는 PLDR은 방사선 조사 후 cell cycle이 6시간 이상 되면 고려된다. 분할 횟수에 따라 회복 양을 합한 값으로 나타낼 수 있다.<sup>[12]</sup>

탄소빔의 1분할, 2분할, 3분할, 4분할 조사 시 각각의 interval 시간동안 나타나는  $\gamma$ 값 역시 감소하고 있음을 확인하였다. 그러나  $\gamma$ 값만 감안한 marchese model을 surviving fraction값에 적용 시 오류를 보인다. 이는 탄소빔 분할조사 시 다른 회복의 매커니즘이 존재함을 뜻하여 이를 적용할 수 있는 새로운 파라미터가 고려되어야 함을 뜻한다. 실제 탄소빔 분할조사시의 세포 생존율은 더 많은 회복양이 감안되어져 surviving fraction값을 상승함을 알 수 있었다. PLDR의 발생양을 나타내는  $\gamma$ 값 뿐만 아니라 또 다른 repair의 발생양이 있었음을 나타내며 다른 과정의 repair의 양을 포함하는 파라미터가 감안되어야 탄소빔 분할조사 시 적용 가능할 수 있음을 알 수 있다. 다양한 회복의 매커니즘

이 존재함으로 이를 적용할 수 있는 새로운 파라미터가 고려되어야 할 것이다.

### Reference

- [1] Masau Suzuki, Yoko Kase, Tatsuaki Kanai, Koichi Ando "Change in radiosensitivity with fractionated-dose irradiation of carbon-ion beams in five different human cell lines" *Radiation Oncology Biology. Physics.* Vol. 48, pp 251-258, 2000.
- [2] Travis EL, Thames HD, Watkins TL, Kiss I, "The kinetics of repair in mouse lung after fractionated irradiation" *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry, and Medicine*, pp. 903-919, 1987.
- [3] Thames HD, "An 'incomplete-repair' model for survival after fractionated and continuous irradiations" *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry, and Medicine*, pp 319-339, 1985.
- [4] Nilsson P1, Thames HD, Joiner MC, "A generalized formulation of the 'incomplete-repair' model for cell survival and tissue response to fractionated low dose-rate irradiation" *Radiation biology*, pp.127-142, 1990.
- [5] Dale RG1, Fowler JF, Jones B., "A New Incomplete-repair Model Based on a "Reciprocal-time" Pattern of Sublethal Damage Repair" *Acta Oncologica*, pp 919-929, 1999.
- [6] Taku Inaniwaa, Masao Suzuki, Takuji Furukawa, Yuki Kase, Nobuyuki Kanematsu, Toshiyuki Shirai and Roland B. Hawkins, "Effects of Dose-Delivery Time Structure on Biological Effectiveness for Therapeutic Carbon-Ion Beams Evaluated with Microdosimetric Kinetic Model" *Radiation Research*, pp. 44-59, 2013.
- [7] 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.
- [8] Seonghee Kang, Jeonghwan Kim, Dokyung Kim, Bosun Kang, "A Research on Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles' Toxicity to U373MG Cell and its Effect on the Radiation Survival Curve" *Journal of the Korean Society of Radiology*, Vol. 6, No. 6, pp. 507-513, 2012.
- [9] Ang K, Thames HD Jr, van der Kogel AJ, van der Schueren E., "Is the rate of repair of radiation-induced sublethal damage in rat spinal cord dependent on the size of dose per fraction?", *Radiation Oncology Biology. Physics.* pp. 557-562, 1987.
- [10] Michael J. Marchese, "Potentially lethal damage repair in cell lines of radioresistant human tumours and normal skin fibroblasts" *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry, and Medicine*, Vol. 48, No. 3, pp. 431-439, 1985.
- [11] Michael J. Marchese, "Potentially lethal damage repair in human cells" *Radiotherapy and Oncology*, Vol. 9, pp. 57-65, 1987.
- [12] Jack E Fowler, "Is Repair of DNA Strand Break Damage from Ionizing Radiation Second Order Rather Than First-Order? A Simpler Explanation of Apparently Multiexponential Repair", *Radiation research*, pp. 124-136, 1999.

# HFL-I 세포의 잠재적 치사 손상 회복에 따른 세포 생존율 변화

최은애

고려대학교 바이오융합공학과

## 요 약

HFL-I 세포를 이용하여 immediate assay를 시행하였다. 발생한 repair의 양이 없기 때문에  $\text{LogSn} = -n\gamma(ad + \beta d^2)$ 에서  $\gamma$ 의 값은 1이며 이는 LQ model과 같다. 그리고 세포생존율의 데이터를 바탕으로  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\alpha/\beta$ 의 값을 얻었다. 또한 12시간, 36시간, 48시간 후 delayed assay를 시행하여 marchese model 통해  $\gamma$ 값을 도출한 후 Potentially lethal damage repair (PLDR)가 발생한 양을 확인하였다. delay time이 길어질수록  $\gamma$ 값은 감소함으로써 PLDR의 양이 증가함을 확인하였고 이에 따라 세포생존율은 상승됨을 보였다. 탄소빔의 1분할, 2분할, 3분할, 4분할 조사 시 각각의 interval 시간동안 나타나는  $\gamma$ 값 역시 감소하고 있음을 확인하여 PLDR의 발생을 확인할 수 있었지만  $\gamma$ 값만 감안한 marchese model을 surviving fraction값에 적용 시 오류 발생함을 보였다. 이는 탄소빔 분할조사 시 다른 회복의 매커니즘이 존재함을 뜻하여 이를 적용할 수 있는 새로운 파라미터가 고려되어야 할 것이다.

중심단어: 잠재적치사손상회복, marchese model, 세포생존율, HFL-I