

Implementation of Radiation Damage in Vitro Model using Swine Skin

Hongmoon Jung,¹ Doyeon Won,¹ Dong Kyung Jeong,² Jaeun Jung^{1,*}

¹Department of Radiological Science, Daegu Health College

²Radiation Oncology, Daegu Fatima Hospital

Received: February 11, 2016. Revised: February 25, 2016. Accepted: February 29, 2016.

ABSTRACT

The study of radiation-hazard in the human skin tissue is carried out by direct irradiating to experimental animals. The influences of a radiation to the animal's skin tissue are analyzed from this experiment. However, this also accompanies losses in terms of both time and economy. In this study, we simulated human tissue by using a swine skin tissue. The depth of the swine skin tissue for the experiment is determined, and the amount of the direct radiation below this skin depth is analyzed numerically. The amount of the radiation occurred by exposure below the skin tissue can be inferred. Moreover, it is possible to use only cells effectively and animal experiments to analyze the body-hazard by radiation.

Keyword: swine skin tissue, body-hazard by radiation, cells damage by radiation, swine subcutaneous

I. INTRODUCTION

방사선을 사용한 장해모델구현에 있어서 다양한 연구 방법이 제시되어진다. 대부분 동물실험을 통하여 방사선 연구모델이 구현되어지는데 대표적으로 사용되는 동물은 쥐, 마우스, 토끼 등이 대부분이다.^[1-3] 이러한 방사선 조사를 통한 실험은 *invivo* 상에서 이루어지는 것이 대부분이다. 또한 실험방법은 쥐의 경우에 대부분 방사선조사 후 초기 장해유도는 2-4주 정도를 실험을 하며 후기 방사선 장해 실험은 8주후까지 *post-radiation* 유도한 후 혈액을 채취하거나 조직을 적출하여 분자생물학적 기법으로 분석을 하게 된다.^[4,5] 따라서 많은 방사선 장해에 관한 연구자들은 동물실험에 관해 오랜 시간이 소요된다. 또한 동물에서 직접세포를 분리해내는 실험의 과정을 거치게 됨으로 경제적으로 시간적으로 많은 시행착오를 겪게 된다. 조직에서 분리해낸 세포를 따로 추출하여 RNA를 획득한 후 중합효소 연쇄반응(PCR)과 같은 실험을 통해서 다양한 연구가 이루어진다. 전리방사선은 세포에게 치명적으로 작용하는 표적이론을 통하여 세포내의 유리화와 DNA의 파괴를

수반한다. 이러한 DNA의 파괴는 염색체이상을 동반하여 각종 가교현상이나 2동원체들을 형성하여 돌연변이나 암을 유발하게 된다.^[6] 따라서 방사선이 조사된 장해조직의 세포연구는 필수적으로 대두되어진다. 만약에 인체의 최소 장해를 유발하는 전리 방사선량을 직접적으로 세포에게 조사한다면 세포는 민감하게 반응하여 24시간 이내에 사포사멸(Apoptosis)가 발생한다. Fig.1(a)을 통해 볼 수 있다. (사전 데이터) 따라서 방사선 생물학 연구자들은 직접적으로 방사선을 petridish에 배양되고 있는 세포에게 직접적으로 조사하지는 않는다. 현재에는 세포에게 방사선을 직접적으로 조사하는 것이 아닌 간접적인 세포피폭 연구에 관하여 아직까지 자세하게 보고된 바 없다. 인간의 피부는 입술이 가장 얇은 2mm 의 두께로 구성되어있으며 일반적인 피부는 4mm 두께 가장 두꺼운 허벅지 피부는 6mm 정도의 두께라고 알려져있다.^[7] 이번 연구에서는 이미 구축되어 있는 cell-line을 통하여 *iv-vitro*라 불리는 채외실험에 관한 기초실험법을 제공하고자 한다. 직접적으로 세포에게 방사선장해를 유도하는 것이 아닌 인체의 피부밀도에 있다는 조건하에 피부세포 및 피하 조직세포에 방

사선장해에 관한 연구를 제시하고자 한다. 인체의 등가 물질로는 조직공학적 실험으로 자주사용되고 있는 돼지피부를 적용하여 돼비 피부를 인간피부라고 간주하고 방사선조사 후 피부 아래의 선량을 측정하고자 하였다. 또한 방사선이 피부를 통과한 후에 정량화 가능한 수식을 유도하고자 한다.

II. MATERIAL AND METHODS

1. 엑스레이 장비 및 선량측정기

도시바(model:kox-15R)을 사용하여 방사선을 조사하였고 엑스레이 조사조건은 50Kvp 4mAs 거리 90cm 로 정하여 방사선조사를 시행하였다. 선량측정기는 radical corporation (model 206) 을 사용하여 측정하였다.

2. 세포 방사선조사실험

도시바 진단용 방사선발생장치(model:kox-15R)을 사용하여 방사선을 조사하였고 엑스레이 조사조건은 50 Kvp 4mAs 거리 90cm 로 정하여 방사선조사를 시행하였다. 세포의 cell-line은 C3H10T 1/2 cells (Murine)를 사용하여 방사선 조사후 사전 실험을 하였다. C3H10T 1/2 cells은 세포골에형성에 관여하는 대표적인 세포로 조직공학연구자들에게 대표적으로 사용된다. 따라서 이세포를 선택하여 사전 실험하였다. fig.1

3. 돼지피부 및 통계분석

돼지피부는 1mm, 2mm 로 박편하여 측정하였다. 모든 통계적 수치의 차이는 엑셀을 통하여 T-student (t-test)를 통하여 검증되었으며 P값 value 0.05<P 의 범위에 있을 때 통계적 차이가 유의한 것으로 간주 하였다.

4. 실험방법

도시바(model:kox-15R)을 사용하여 방사선을 조사하였고 엑스레이 조사조건은 50Kvp 4mAs 거리 90cm 로 정하여 방사선조사를 시행하였다. 하부에는 방사선량을 측정할 수 있는 검출기를 위치시켰으며 순차적으로 1-6mm의 두께를 증가시켜 가면서 방사선량을 측정하여 분석하였다. 측정된 방사선량을 수식화 하여 결과를 나타내었다.

5. 통계적 분석

모든 통계적 수치의 차이는 엑셀을 통하여 T-student (t-test)를 통하여 검증되었으며 P값 value 0.05<P 의 범위에 있을 때 통계적 차이가 유의한 것으로 간주 하였다.

III. RESULT

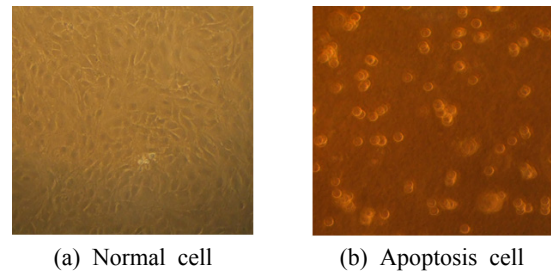


Fig. 1. The death of cells after directed radiation-exposure (a) Before radiation, (b) After radiation.

방사선을 직접적으로 세포에게 조사하게 되면 Fig.1 (A) 같은 세포사멸이 나타난다. 세포는 더 이상 증식이나 분화를 하지 못하고 사멸하여 부유하게 떠다니는 형태를 가져다주는 세포사멸(Apoptosis)이 발생한다. 쥐 계열의 세포인C3H10T 1/2을 단순 배양하여 실험조건인 방사선량으로 조사한 후 24시간이내에 단순 광학 현미경으로 관찰한 것을 스냅사진으로 찍어 데이터화 하였다. (a)는 방사선을 조사하기전 (b)는 방사선을 조사한 후 사멸현상이 발생한 것을 촬영한 사진이다.

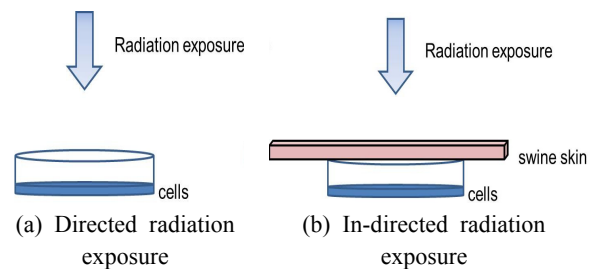


Fig. 2. Schema of experiment.

직접적인 세포에게 방사선 조사는 치명적으로 작용하여 적합한 방사선 장해 실험모델을 구현하는데 어려움을 나타나게 된다. (a) 그림은 세포에 관한 직접적인 방사선 조사 연구법을 나타내며 (b) 그림은 이번연구에서 적용하는 돼지피부를 세포에 밀접시킨 후 방사선

조사모델을 구현 할 수 있게 된다. 이러한 실험방법은 방사선 장해로 인한 세포연구를 간접적으로 구현함에 있어서 도움을 줄 수 있을 것이다.

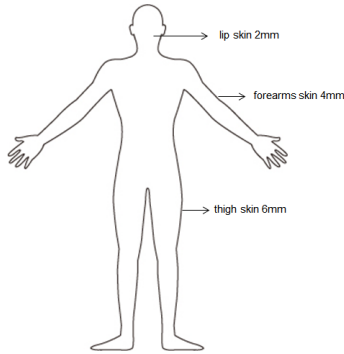
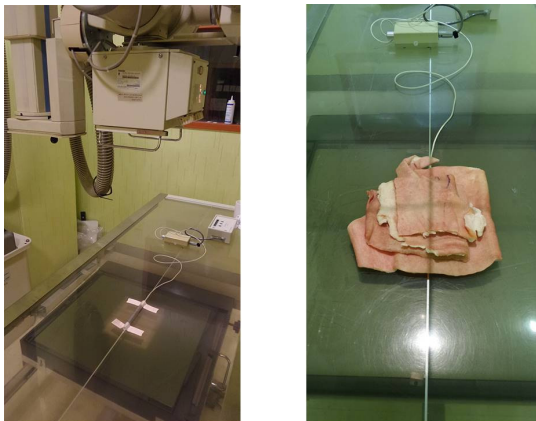


Fig. 3. The thickness of the human skin Human skin thickness is consist of 2 to 6mm.

인체의 피부의 두께는 신체부위에 따라 각각 다르게 나타난다. 입술의 경우에는 2mm의 두께를 나타내며 인체에서 가장 얇은 피부두께를 가지고 있으며 일반적인 피부의 두께는 4mm를 유지하고 있으며 가장두꺼운 허벅지는 6mm의 피부두께를 유지하고 있다. fig.3은 인체의 피부두께의 모식도를 나타내었다.



(a) X-ray detection meter (b) Swine skin
Fig. 4. Experimental method using swine skin.

Fig.4 (a)그림과 같이 측정기를 설치한 후에 순차적으로 각각 돼지피부의 두께를 올려놓고 측정하였다. (b) 1군측정당 20회 이상의 방사선량을 측정하여 데이터화하였다.

두께가 증가할수록 방사선의측정량은 급격하게 낮아

지는 결과를 얻었다. 데이터에서는 보여주지 않았지만 back ground 값은 평균 8.15mR/h의 측정치를 보여 주었다. Fig. 5와 같이 결과는 돼지피부의 두께가 1mm 인 경우에는 평균 1.42mR/h가 측정이 되었고 각각 2,4,6mm에서는 각각의 평균 0.98,0.49,0.23의 mR/h 수치를 나타내었다.

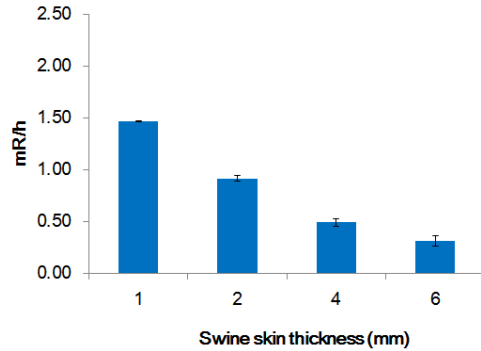


Fig. 5. Dose changes in the thickness swine skin

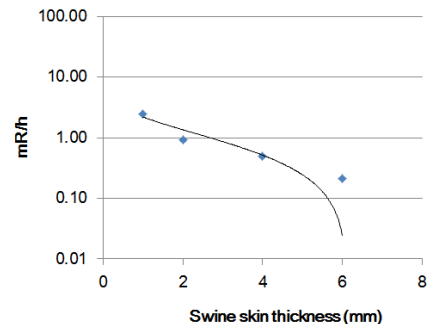


Fig. 6. Dose Formulation of change in the thickness swine skin.

$$y = -1.208 \ln(x) + 2.189 \tag{1}$$

$$x = e^{\frac{-y + 2.189}{1.208}} \tag{2}$$

$$x = e^{\frac{-y}{1.208}} \cdot e^{\frac{2.189}{1.208}} \tag{3}$$

Fig. 6과 같이 수치화로 구현된 값을 통계화하여 수식 Equ. 1,2를 유도하였다. 유도된 식을 사용하면 돼지피부의 두께를 알면 방사선량인 mR/h의 값을 구해낼 수도 있고 역으로 mR/h를 알면 피부의 두께를 유추해 낼 수 있게 된다.

IV. DISCUSSION

인체의 피부 조직의 피폭은 피부세포가 직접적으로 장해를 받게 되는 것이다. 방사선에 자주 노출이 되면 만성적인 피부장해를 유발하게 되는데 굳은살, 변색, 건조로 인한 피부의 갈라짐 등이 발생되게 된다. 이러한 방사선 피부염은 피부세포의 지속적인 방사선노출에 의한 부작용중에 하나이기도 하다.^[8,9,10] 또한 세포는 표적이론에 입각하여 유전자인 DNA에 치사를 수반하기도 한다. 세포에 관한 방사선 피폭은 단일히트 다중히트에 따른 방사선장해를 수반하는 세포의 표적모델이 존재한다. 또한 방사선의량이 증가할수록 당연히 세포 피폭확률이 높아지기 때문에 세포의 표적과 방사선량과는 서로 밀접한 관계를 나타낸다. 피부 그리고 피부하에 존재하는 다양한 세포의 손상은 정상적인 피부 조직을 재생하는데 어려움을 주기 때문에 연구가 꾸준히 증가되어야 할 것이다. 이번연구에서 사용한 돼지 피부를 선택한 이유는 현재 많은 연구자들이 사람의 대체 조직 공학피부물질로 자주 사용하는 물질이기 때문이다.^[11,12] 또한 두께를 2,4,6mm 로 측정된 것은 인체의 피부두께의 기반 하여 실험하였기 때문이다. 만약에 실험자가 4mm의 두께의 일반적인 사람피부 두께를 이용하여 방사선장해 실험을 구현하고자 한다면 4mm의 돼지 피부를 사용하여 세포가 존재하는 petridish 에 마운팅 한후 방사선 조사를 실시하면 적합한 방사선장해 실험을 실행할 수 있을 것이라는 점을 착안하였다. 한편으로는 엑스레이 조건을 50kvp, 3mAs, 90cm로 설정한 이유는 많은 생물공학자들이 실험실에서 사용하는 보편적인 장비인 Faxitron digital x-ray 장비를 기반으로 하여 설정하였다. 이번실험에서의 몇 가지 추가 실험해야하는 점과 한계점이 존재하는데 일반촬영엑스레이 장비를 이용한 점과 이는 방사선장해가 편면적을 가지고 방향성을 간과했다는 점 그리고 실질적으로 받는 사람내부의 피부선량과 비교하지 못한다는점 등의 여러 가지 보완점이 존재한다. 하지만 이번연구는 복잡한 실험이 아닌 간편한 일반촬영용 엑스레이 장비를 이용하며 바로 돼지 피부를 쉽게 구해 사람에게 받는 선량을 유추해 낼수 있다는 장점을 가지고 있어서 실험자로 하여금 보다 편리성을 제공해 줄 수 있다.

V. CONCLUSION

방사선장해 구현에 있어서 세포의 특정RNA를 획득 시에는 일반적으로 동물에게 방사선을 노출시킨 후 조직에서 세포를 획득하게 된다. 하지만 이번연구를 통한 실험은 일반촬영장비와 cell-line을 가지고도 in-vitro 상의 방사선 장해에 관한 세포연구에 적용할 수 있으며 이를 통해 얻은 RNA와 단백질을 얻을 수 있으리라 사료된다. 이번연구는 돼지피부와 세포만을 가지고도 보다 쉬운 방법으로 방사선 장해연구모델을 구현해냄으로 많은 방사선생물학 연구자에게 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

Reference

- [1] R.E. Jacob, M.K. Murphy, J.A. Creim, J.P. Carson, "Detecting radiation-induced injury using rapid 3D va riogram analysis of CT images of rat," *lungs.Acad R adiol.*20(10):1264-71, 2013.
- [2] M.F Bin Mh Busra, S.R. Chowdhury, F. Bin Ismail, A. Bin Saim, R.H Idrus. "Tissue-Engineered Skin Su bstitute Enhances Wound Healing after Radiation The rapy." *Adv Skin Wound Care.*;29(3):120-9,2016.
- [3] K. Bourtzis, R.S. Lees, J. Hendrichs, M.J Vreysen. "More than one rabbit out of the hat: Radiation, tran sgenic and symbiont-based approaches for sustainable management of mosquito and tsetse fly populations." *Acta Trop.* 13;157:115-130, 2016.
- [4] I. Papadopoulou, V. Stewart, T.D. Barwick, W.E. Park, N. Soneji, et al. "Post-Radiation Therapy Imaging Appe arances in Cervical Carcinoma. *Radiographics*", 29:150 117, 2016.
- [5] R.K. Flannigan, R.T Baverstock, "Management of po st-radiation therapy complications among prostate can cer patients: A case series." *Can Urol Assoc J.* 8(9-10):E632-6, 2014.
- [6] S.E McGuire. "DNA Damage and Repair Pathway Pr ofiles as Biomarkers in High-Risk Prostate Cancer." *JAMA Oncol.*7:1-2, 2016.
- [7] S.R Pajoum Shariati, MA Shokrgozar, M Vossoughi, "In vitro co-culture of human skin keratinocytes and fibroblasts on a biocompatible and biodegradable scaf fold." *Iran Biomed J.*13(3):169-77, 2009.

-
- [8] J. Kodiyan, K.T. Amber. "Topical antioxidants in radiation dermatitis: a clinical review." *Int J Palliat Nurs.* 21(9):446-52, 2015.
- [9] F. Haubner, E. Ohmann, F. Pohl, J Strutz, H.G Gassner, "Wound healing after radiation therapy: review of the literature", *Radiat Oncol*, 24;7:162, 2012.
- [10] H. Goldschmidt, W.K. Sherwin. "Reactions to ionizing radiation", *J Am Acad Dermatol.* 3(6):551-79. Review, 1980.
- [11] A.F. Pellegata, M.A. Asnaghi, I. Stefani, A. Maestroni, S. Maestroni, et al. "Detergent-enzymatic decellularization of swine blood vessels: insight on mechanical properties for vascular tissue engineering." *Biomed Res Int.* (2013):918753, 2013.
- [12] Z. Wu, L. Fan, B. Xu, Y. Lin, P. Zhang, X. Wei. "Use of decellularized scaffolds combined with hyaluronic acid and basic fibroblast growth factor for skin tissue engineering." *Tissue Eng Part A.* 21(1-2):390-402, 2015.

돼지피부를 사용한 방사선 체외 장애모델 구현연구

정홍문,¹ 원도연,¹ 정동경,² 정재은^{1,*}

¹대구보건대학교 방사선과

²대구파티마병원 방사선종양학과

요 약

사람 피부 조직에서의 방사선 장애를 연구하는 방법은 실험동물에게 직접적으로 방사선을 노출하여 연구를 수행하게 된다. 이러한 연구방법은 방사선을 실험동물에게 노출시킨 후에 방사선에 의해 손상된 장애조직의 세포를 획득하여 분석을 하게한다. 이것은 시간적으로나 경제적으로도 많은 손실을 수반하게 된다. 이번 연구는 돼지의 피부를 사람의 피부로 가정하여 실험하였다. 돼지피부의 두께를 정하여 돼지피부를 통과한 후 피하조직 밑에서 세포가 직접적으로 받을 수 있는 방사선량을 얻어내어 수식화 하였다. 이번연구의 결과에 따르면 피부조직의 방사선 노출 후 피하조직 밑에서 발생하는 방사선량을 유추해낼 수 있다. 더 나아가 동물실험이 아닌 세포만을 가지고도 방사선에 의한 생체장애분석을 할 수 있는 데 효과적으로 사용할 수 있을 것이다.

중심단어 : 돼지피부, 방사선피부장애, 방사선세포장애, 피하조직방사선량