



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학박사 학위논문

암세포 생존에 대한
호흡연동방사선치료의 영향

Effects of linear accelerator based
respiratory gating radiation therapy on cancer cell survival

울 산 대 학 교 대 학 원

의 학 과

정 유 리

암세포 생존에 대한
호흡연동방사선치료의 영향

지도교수 송시열

이 논문을 의학박사 학위 논문으로 제출함

2018년 12월

울산대학교 대학원
의학과
정유리

정유리의 의학박사학위 논문을 인준함

심사위원	조 병 철	인
심사위원	송 시 열	인
심사위원	정 성 윤	인
심사위원	곽 정 원	인
심사위원	노 오 규	인

울 산 대 학 교 대 학 원

2018 년 12 월

국문 요약(Korean Abstract)

연구목적: 호흡연동방사선치료를 빈번하게 시행하는 간암 및 폐암 세포를 배양하고, 호흡연동방사선조사를 시행해서, 암세포 생존에 대한 호흡연동방사선치료의 영향을 탐색하고자 하였다.

연구대상 및 방법: 간암 세포(Huh7, Human hepatocellular carcinoma cells) 및 폐암 세포(A549, Human lung cancer cells)를 체외에서 배양하고, 0, 2, 5, 10 Gy의 방사선을 조사하였다. 각 조사선량에서 세 가지 조건(no-gating, gating (gating window 40%), gating (gating window 20%))의 호흡연동방사선을 조사하였고, cell viability assay와 clonogenic assay를 시행하였다. 각 조사선량에서 호흡연동방사선조사 여부에 따른 cell viability assay 및 clonogenic assay 결과를 비교하기 위해 윌콕슨 부호 순위 검증을 시행하였다. 실험 결과의 검증을 위해 두 차례 반복 실험을 시행하였다.

연구결과: Huh7 세포의 방사선 조사 후 5일째 cell viability는 no-gating 기법의 0, 2, 5, 10 Gy에서 $100\% \pm 5.9\%$, $95.0\% \pm 10.0\%$, $88.2\% \pm 4.1\%$, $69.3\% \pm 5.3\%$ 로 측정되었으며, 모든 선량에서 no-gating 기법에 비해 gating 기법의 cell viability가 유의하게 높았다. 반복 실험 결과 2, 5 Gy에서는 여전히 no-gating 기법에 비해 gating 기법의 cell viability가 유의하게 높았지만, 10 Gy에서는 결과가 일관되지 않았다. Huh7 세포의 clonogenic assay에서 plating efficiency (PE)는 0.419로 산출되었고, no-gating 기법의 0, 2, 5, 10 Gy 방사선 조사 후 survival fraction (SF) 값은 0.998 ± 0.146 , 0.751 ± 0.040 , 0.215 ± 0.031 , 0.010 ± 0.005 로 산출되었다. SF는 모든 선량에서 no-gating 기법과 gating 기법 간에 유의한 차이가 없었다. A549 세포의 방사선 조사 후 3일째 cell viability는 no-gating 기법의 0, 2, 5, 10 Gy에서 $100\% \pm 6.7\%$, $90.0\% \pm 7.9\%$, $89.6\% \pm 5.4\%$, $88.4\% \pm 3.0\%$ 로 측정되었고, 모든 선량에서 no-gating 기법과 gating 기법 간에 유의한 차이는 없었다. A549 세포의 clonogenic assay에서 PE는 0.471로 산출되었고, 0, 2, 5, 10 Gy 방사선 조사 후 SF 값은 1.001 ± 0.058 , 0.825 ± 0.066 , 0.378 ± 0.057 , 0.026 ± 0.008 로 산출되었다. 모든 선량에서 no-gating 기법과 gating 기법 간의 SF 결과의 유의한 차이가 없었다.

결론: Huh7, A549 세포에서 호흡연동방사선조사 여부에 따른 암세포 생존/사멸의 차이는 없었다. 이러한 결과를 뒷받침하기 위해서는, 좀 더 다양한 조건(다양한

세포, 세기조절방사선치료 기법 적용, 체내 실험 (in vivo) 등)에서 추가적인 검증이 필요하다.

중심단어: 방사선치료(Radiation therapy); 호흡연동(Respiration gating); 생물학적 영향(Biologic effect); 세포 생존(Cell survival)

목차(Contents)

국문요약	i
표 및 그림 목차	iii
서론	1
연구대상 및 방법	2
1. 암세포 배양(Culture of cancer cells)	2
2. Cell viability assay	2
3. Clonogenic assay	3
4. Cell cycle analysis	3
5. 방사선조사(Irradiation)	3
6. 통계학적 분석(Statistics)	9
결과	10
1. Huh7	10
가. Cell viability assay	10
나. Clonogenic assay	16
다. Cell cycle analysis	18
2. A549	20
가. Cell viability assay	20
나. Clonogenic assay	22
다. Cell cycle analysis	24
고찰	26
결론	31
참고문헌	32
영문요약	35

표 및 그림 목차(Lists of figures and tables)

Table 1. Protocol of respiratory gating radiation therapy in present study	5
Table 2. Plan parameters.....	7
Table 3. Comparison of cell viability of Huh7 at 5 days after irradiation between no-gating and gating technique in the first experiment	15
Figure 1. Setup of cell culture plates and dose distribution.....	8
Figure 2. Results of cell viability assay for Huh7.....	13
Figure 3. Results of clonogenic assay for Huh7.	17
Figure 4. Results of cell cycle analysis for Huh7.....	19
Figure 5. Results of cell viability assay for A549.....	21
Figure 6. Results of clonogenic assay for A549.....	23
Figure 7. Results of cell cycle analysis for A549.....	25

서론

흉복부 종양의 경우 호흡에 따른 움직임(respiratory motion)이 있다. 움직임 정도는 환자 및 종양의 위치 등에 따라 다양하다. 기술의 발전으로 4차원 CT (4-dimensional CT)를 촬영하여 호흡에 따른 종양의 움직임 정도를 분석하는 것이 가능해졌고, 분석된 종양의 움직임 정도에 따라 방사선치료의 범위(planning target volume (PTV))를 설정할 수 있게 되었다. 비슷한 크기의 종양이라도 호흡에 따른 움직임 정도가 클 경우에는 방사선치료의 범위가 더 넓게 설정되어야 하며, 이로 인해 정상조직에 조사되는 방사선 선량 또한 높아질 수 있어서, 종양에 처방할 수 있는 방사선 선량이 제한적일 수 있다. 하지만, 최근에는 방사선치료기술의 발전으로, 호흡에 따라 움직이는 종양이 특정 위치에 있을 때만 방사선을 조사하는 기법인 ‘호흡연동방사선치료(Respiratory gating radiation therapy)’가 가능해졌고, 이는 임상에서 활발히 시행되고 있다. 호흡연동방사선치료를 통해 방사선치료의 범위를 줄임으로써, 치료 부작용의 확률을 낮추고, 종양에 좀 더 높은 선량을 처방하는 것이 가능해졌다.

호흡연동방사선치료를 시행할 경우, 치료의 범위를 줄일 수 있다는 장점이 있지만, 종양이 특정 위치에 있을 때만 방사선이 조사(beam on)되고, 특정 위치를 벗어날 경우에는 방사선조사가 중단(beam off)되는 것을 반복해서, 선량률(Dose rate)의 저하 및 변화가 빈번하게 발생하고, 전체치료시간(treatment delivery time) 또한 증가한다. 임상적으로 흉복부 종양을 치료하는 데 있어 호흡연동방사선치료가 활발히 시행되고 있고, 이에 따른 선량률의 저하/변화 및 전체치료시간의 증가로 인한 종양 제어(tumor control) 등의 생물학적 영향에 대한 탐색이 필요하지만, 이에 대한 연구가 드문 실정이다.

본 연구에서는 호흡연동방사선치료를 빈번하게 시행하는 간암 및 폐암 세포를 배양하고, 다양한 조건의 호흡연동방사선조사를 시행해서, 암세포의 생존에 대한 호흡연동방사선치료의 영향을 탐색하고자 하였다.

연구대상 및 방법

암세포 생존에 대한 호흡연동방사선치료의 영향을 탐색하고자, 체외에서 배양한 암세포에 다양한 조건의 방사선을 조사하고, cell viability assay, clonogenic assay 및 cell cycle analysis를 시행하였다. 첫 번째 실험 결과를 재확인하기 위해 반복 실험을 시행하였고, 반복 실험의 조건(세포 밀도, 방사선 선량 등)은 첫 번째 실험의 결과를 토대로 조절하였다.

1. 암세포 배양 (Culture of cancer cells)

간암 세포(Huh7, Human hepatocellular carcinoma cells; RCB1366)와 폐암 세포(A549, Human lung cancer cells; ATCC no. HB-8064)를 다음의 조건에서 배양하였다

- * Huh7 배양액(Culture medium): Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco-Invitrogen), 10 % fetal bovine serum (FBS, Gibco-Invitrogen), 1% penicillin/streptomycin (Gibco-Invitrogen)
- * A549 배양액: F-12K nutrient mixture (Kaighn's modification, Gibco-Invitrogen), 10 % fetal bovine serum (FBS, Gibco-Invitrogen), 1% penicillin/streptomycin (Gibco-Invitrogen)
- * 배양 조건: 37 °C in a humidified incubator with 5 % CO₂

2. Cell viability assay

Huh7 세포(1×10^4 cells/100ul/well)와 A549 세포(5×10^3 cells/100ul/well)를 96-well cell culture plate에 파종(seeding)하고, 24시간 동안 배양한 이후에 방사선을 조사하였다. Cell viability는 방사선조사 후 3일, 5일째에 Cell Counting Kit-8 (Dojindo Molecular Technologies)를 이용해 측정하였다. 2300 EnSpire™ Multilabel Reader (PerkinElmer)를 통해 WST-8 (Nacalai Tesque, Inc.) 시약 처리 후 생성된 Formazan의 흡광도(Optical density (OD) at 450 nm)를 측정하였다. 측정된 OD 값을 바탕으로, 아래의 식을 통해 cell viability를 계산하였다.

$$* \text{Cell viability (\%)} = (\text{OD of irradiated cells} / \text{mean OD in 0 Gy cells}) \times 100$$

3. Clonogenic assay

Huh7 세포와 A549 세포를 6-well cell culture plate에 파종(seeding)하고, 24시간 동안 배양한 이후에 방사선을 조사하였다. 파종(seeding)한 세포의 밀도는 선량에 따라 아래와 같았다.

* Huh7: 0 Gy (100 cells/3ml/well, 200 cells/3ml/well); 2 Gy (200 cells/3ml/well, 400 cells/3ml/well); 5 Gy (400 cells/3ml/well, 800 cells/3ml/well); 10 Gy (800 cells/3ml/well, 1,600 cells/3ml/well)

* A549: 0 Gy (300 cells/3ml/well); 2 Gy (300 cells/3ml/well); 5 Gy (500 cells/3ml/well); 10 Gy (1,500 cells/3ml/well)

방사선조사 후, colony가 형성될 때까지 약 2주 동안 배양하였다. 배양된 세포를 고정(20% methanol)하고 염색(0.5% crystal violet)하여, 50개 이상의 세포들로 이루어진 colony 수를 세고, 아래의 식을 통해 plating efficiency와 survival fraction을 구하였다.

* Plating efficiency (PE) = mean colonies counted in 0 Gy plate / cells plated in 0 Gy plate

* Survival fraction (SF) = colonies counted / (cells plated x PE)

4. Cell cycle analysis

Huh7 세포(2×10^5 cells/3ml/well)와 A549 세포(5×10^5 cells/3ml/well)를 60x15 mm cell culture dish에 파종(seeding)하고, 24시간 동안 배양한 이후에 15 Gy의 방사선을 조사하였다. 방사선조사 후 24, 48, 72시간에 세포를 고정(100% cold-ethanol) 및 염색(propidium iodide)하여, flow cytometry (BD FACSCanto II)를 통해 세포 주기의 분포를 분석했다.

5. 방사선조사(Irradiation)

0, 2, 5, 10, 15 Gy의 방사선을 세 가지 조건(no-gating, gating (gating window 40%),

gating (gating window 20%))에서 조사하였다(Table 1). 환자의 호흡을 대신하여, 움직이는 팬텀(moving phantom)을 설치하였다. Moving phantom의 주기를 5.6초로 설정하고, 0%에서 90%까지 10% 간격으로 구분하였다. 30-70% 구간에서만 방사선이 조사되는 조건을 gating (gating window 40%)로 정의하고, 40-60% 구간에서만 방사선이 조사되는 조건을 gating (gating window 20%)로 정의하였다. Moving phantom의 움직임을 Real-time Position Management respiratory gating system (Varian Medical Systems)을 통해 모니터링하면서 방사선을 조사하였다.

Table 1. Protocol of respiratory gating radiation therapy in present study

	Expected treatment delivery time (minutes)
0 Gy	0
2 Gy, no-gating	0.3
2 Gy, gating (gating window 40%)	0.8
2 Gy, gating (gating window 20%)	1.6
5 Gy, no-gating	0.8
5 Gy, gating (gating window 40%)	2.0
5 Gy, gating (gating window 20%)	4.0
10 Gy, no-gating	1.6
10 Gy, gating (gating window 40%)	4.0
10 Gy, gating (gating window 20%)	8.0
15 Gy, no-gating	2.4
15 Gy, gating (gating window 40%)	6.0
15 Gy, gating (gating window 20%)	12.0

물리적 오차를 최소한으로 줄이기 위해, 본 실험을 위한 방사선조사틀을 제작하였다. 방사선조사틀은 cell culture plate (dish)의 아래(inferior)와 외측(lateral)의 둘레에 각각 2 cm, 1 cm 두께의 bolus가 위치하도록 하였다. 배양액이 채워진 cell culture plate (dish)를 방사선조사틀에 setup 하고 CT simulation (GE LightSpeed RT 16)을 시행하였다. Eclipse treatment planning system (Varian)을 이용해 방사선조사를 위한 계획(planning)을 하였다. Table 2과 같은 plan parameter를 적용했을 때, cell culture plate (dish)의 선량 분포는 Figure 1과 같았다.

Table 2. Plan parameters

Parameter	
Irradiation machine	Clinac iX (Varian)
Source to couch distance	100 cm
Field	
Number	1
Size	40 cm x 40 cm
Gantry angle	180 degree
Energy	6 MV
Dose rate	600 MU/minute
Output	104 cGy/100 MU

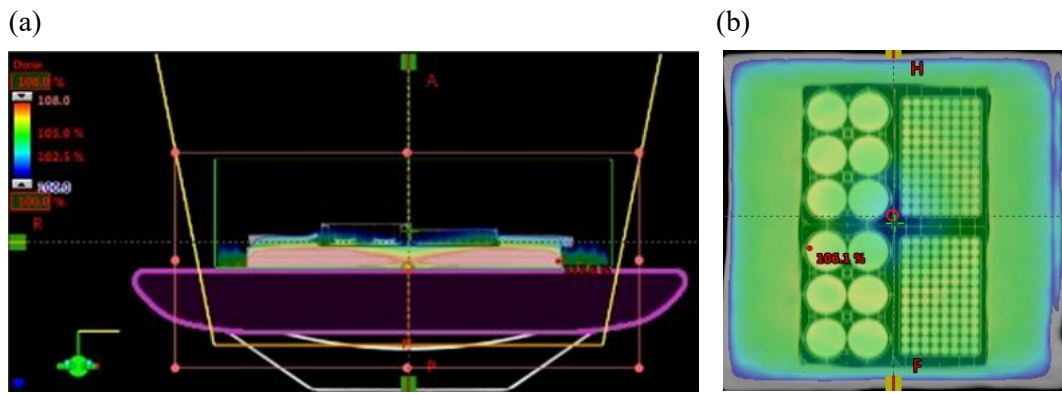


Figure 1. Setup of cell culture plates and dose distribution at (a) coronal and (b) axial plane.

6) 통계학적 분석(Statistics)

모든 데이터는 평균±표준편차로 표현하였다. Gating 여부에 따른 cell viability assay 및 clonogenic assay 결과를 비교하기 위해 윌콕슨 부호 순위 검증을 시행하였다(two-sided at the 5% level of significance by SPSS version 21 (IBM SPSS Statistics)).

결과

1. Huh7

가. Cell viability assay

Huh7 세포(1×10^4 cells/100ul/well)에서 no-gating 기법의 방사선 조사 후 3일째 cell viability (평균±표준편차)는 0, 2, 5, 10 Gy에서 $100\% \pm 14.2\%$, $107.8\% \pm 5.4\%$, $95.7\% \pm 7.2\%$, $103.2\% \pm 9.7\%$ 로 측정되었으며, 방사선조사에 따른 cell viability의 감소를 확인할 수 없었다(Figure 2(a)). 방사선 조사 후 5일째 cell viability는 no-gating 기법의 0, 2, 5, 10 Gy에서 $100\% \pm 5.9\%$, $95.0\% \pm 10.0\%$, $88.2\% \pm 4.1\%$, $69.3\% \pm 5.3\%$ 로 측정되었으며, 방사선조사 선량에 따른 viability의 감소를 확인할 수 있었다. 모든 선량에서 no-gating 기법에 비해 gating 기법의 cell viability가 유의하게 높았다(Figure 2(b), Table 3). Gating window 40%의 gating 기법과 no-gating 기법의 viability 평균값의 차이는 2, 5, 10 Gy에서 8.0%, 11.0%, 12.2%로 산출되었고, no-gating 기법의 viability 평균값을 100%로 보정하였을 때에는, 8.4%, 12.5%, 17.6%로 산출되었다. Gating window 20%의 gating 기법과 no-gating 기법의 viability 평균값의 차이는 2, 5, 10 Gy에서 6.3%, 15.8%, 12.3%로 산출되었고, no-gating 기법의 viability 평균값을 100%로 보정하였을 때에는, 6.6%, 17.9%, 17.7%로 산출되었다.

첫 번째 실험 결과를 재확인하기 위해서, 반복 실험을 시행하였다. 두 번째 실험에서는 세포 밀도를 1×10^3 cells/100ul/well로 하였고, 조사 선량은 0, 2, 5, 10, 15 Gy로 하였다. 방사선 조사 후 3일째 cell viability는 no-gating 기법의 0, 2, 5, 10, 15 Gy에서 $100\% \pm 6.5\%$, $82.5\% \pm 8.1\%$, $80.7\% \pm 7.2\%$, $66.5\% \pm 5.6\%$, $58.0\% \pm 6.7\%$ 로 측정되었으며, 2, 5 Gy에서는 no-gating 기법에 비해 gating 기법의 cell viability가 유의하게 높았다(Figure 2(c)). 10 Gy에서는 no-gating 기법에 비해 gating 기법의 cell viability가 유의하게 낮았고, 15 Gy에서는 no-gating 기법과 gating 기법 간의 cell viability에 유의한 차이가 없었다. 방사선 조사 후 5일째 cell viability는 no-gating 기법의 0, 2, 5, 10, 15 Gy에서 $100\% \pm 8.4\%$, $89.5\% \pm 7.9\%$, $60.0\% \pm 6.3\%$, $29.5\% \pm 3.6\%$, $22.1\% \pm 1.8\%$ 로 측정되었으며, 2, 5 Gy에서는 no-gating 기법에 비해 gating 기법의 cell viability가 유의

하게 높았다(Figure 2(d)). Gating window 40%의 gating 기법과 no-gating 기법의 viability 평균값의 차이는 2, 5 Gy에서 7.1%, 16.3%로 산출되었고, no-gating 기법의 viability 평균값을 100%로 보정하였을 때에는, 7.9%, 27.2%로 산출되었다. Gating window 20%의 gating 기법과 no-gating 기법의 viability 평균값의 차이는 2, 5 Gy에서 16.3%, 15.6%로 산출되었고, no-gating 기법의 viability 평균값을 100%로 보정하였을 때에는, 27.2%, 26.0%로 산출되었다. 10 Gy에서는 gating window 20%의 gating 기법의 viability가 no-gating 기법에 비해 유의하게 낮았지만, 평균값의 차이는 1.3%로 작았다. 15 Gy에서는 no-gating 기법과 gating 기법 간의 cell viability에 유의한 차이가 없었다.

두 번째 실험 결과를 재확인하기 위해서, 세 번째 실험을 시행하였다. 세포 밀도를 두 가지(1×10^4 cells/100ul/well, 1×10^3 cells/100ul/well)로 하였고, 조사 선량은 0, 10, 15 Gy 세 가지로 하였다. 첫 번째 실험과 동일한 세포 밀도(1×10^4 cells/100ul/well)에서는 방사선 조사 후 3일째 cell viability가 no-gating 기법의 0, 10, 15 Gy에서 $100\% \pm 4.7\%$, $82.2\% \pm 12.0\%$, $68.8\% \pm 5.5\%$ 로 측정되었으며, 모든 선량에서 no-gating 기법에 비해 gating 기법의 cell viability가 유의하게 높았다(Figure 2(e)). Gating window 40%의 gating 기법과 no-gating 기법의 viability 평균값의 차이는 10, 15 Gy에서 5.5%, 8.2%로 산출되었고, no-gating 기법의 viability 평균값을 100%로 보정하였을 때에는, 6.7%, 11.9%로 산출되었다. Gating window 20%의 gating 기법과 no-gating 기법의 viability 평균값의 차이는 10, 15 Gy에서 5.5%, 12.0%로 산출되었고, no-gating 기법의 viability 평균값을 100%로 보정하였을 때에는, 6.7%, 17.4%로 산출되었다. 방사선 조사 후 5일째 cell viability는 no-gating 기법의 0, 10, 15 Gy에서 $100\% \pm 2.0\%$, $86.6\% \pm 2.9\%$, $74.1\% \pm 3.0\%$ 로 측정되었다. 10 Gy 선량에서는 no-gating 기법에 비해 모든 gating 기법(gating window 40%, gating window 20%)의 cell viability가 유의하게 높았지만, 15 Gy 선량에서는 gating window 20%의 gating 기법만 no-gating 기법에 비해 유의하게 높은 cell viability를 보였다(Figure 2(f)). Gating window 40%의 gating 기법과 no-gating 기법의 viability 평균값의 차이는 10 Gy에서 5.0%로 산출되었고, no-gating 기법의 viability 평균값을 100%로 보정하였을 때에는, 5.8%로 산출되었다. Gating window 20%의 gating 기법과 no-gating 기법의 viability 평균값의 차이는 10, 15 Gy에서 3.1%, 9.5%로 산출되었고, no-gating 기법의 viability 평

균값을 100%로 보정하였을 때에는, 3.6%, 12.8%로 산출되었다.

두 번째 실험과 동일한 세포 밀도(1×10^3 cells/100ul/well)에서는 방사선 조사 후 3일째 cell viability가 no-gating 기법의 0, 10, 15 Gy에서 $100\% \pm 8.2\%$, $82.4\% \pm 6.7\%$, $62.4\% \pm 8.8\%$ 로 측정되었다. 15 Gy 선량에서는 no-gating 기법에 비해 모든 gating 기법(gating window 40%, gating window 20%)의 cell viability가 유의하게 높았지만, 10 Gy 선량에서는 no-gating 기법에 비해 모든 gating 기법의 cell viability가 유의하게 낮았다(Figure 2(g)). 방사선 조사 후 5일째 cell viability는 no-gating 기법의 0, 10, 15 Gy에서 $100\% \pm 5.1\%$, $36.1\% \pm 2.8\%$, $26.7\% \pm 2.4\%$ 로 측정되었다. 10 Gy 선량에서는 no-gating 기법과 gating 기법 간의 cell viability 결과의 유의한 차이가 없었다. 15 Gy 선량에서는 gating window 20% 의 gating 기법만 no-gating 기법에 비해 유의하게 높은 cell viability를 보였다(Figure 2(h)). Gating window 20% 의 gating 기법과 no-gating 기법의 viability 평균값의 차이는 15 Gy에서 7.3%로 산출되었고, no-gating 기법의 viability 평균값을 100%로 보정하였을 때에는, 27.3%로 산출되었다.

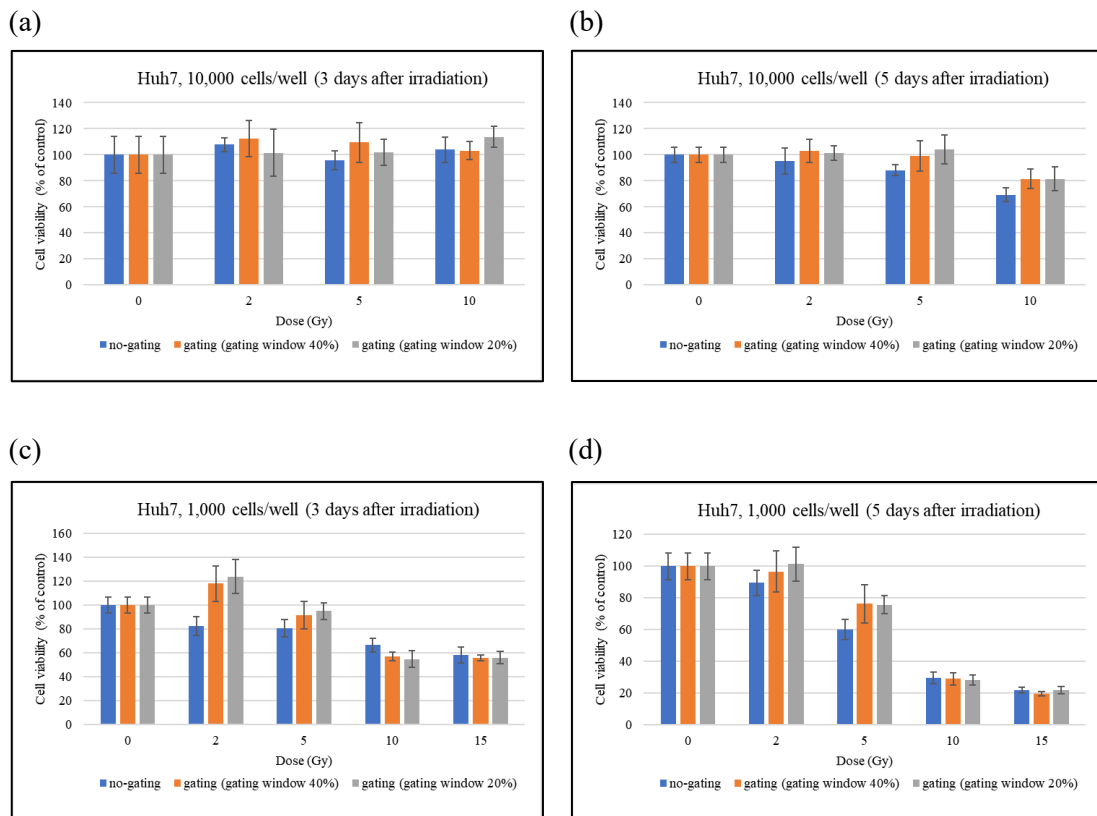


Figure 2. Results of cell viability assay for Huh7.

(a, b) Cell viability at 3 days (a) and 5 days (b) after irradiation for Huh7 with cell density (10,000 cells/well) in the first experiment.

(c, d) Cell viability at 3 days (c) and 5 days (d) after irradiation for Huh7 with cell density (1,000 cells/well) in the second experiment.

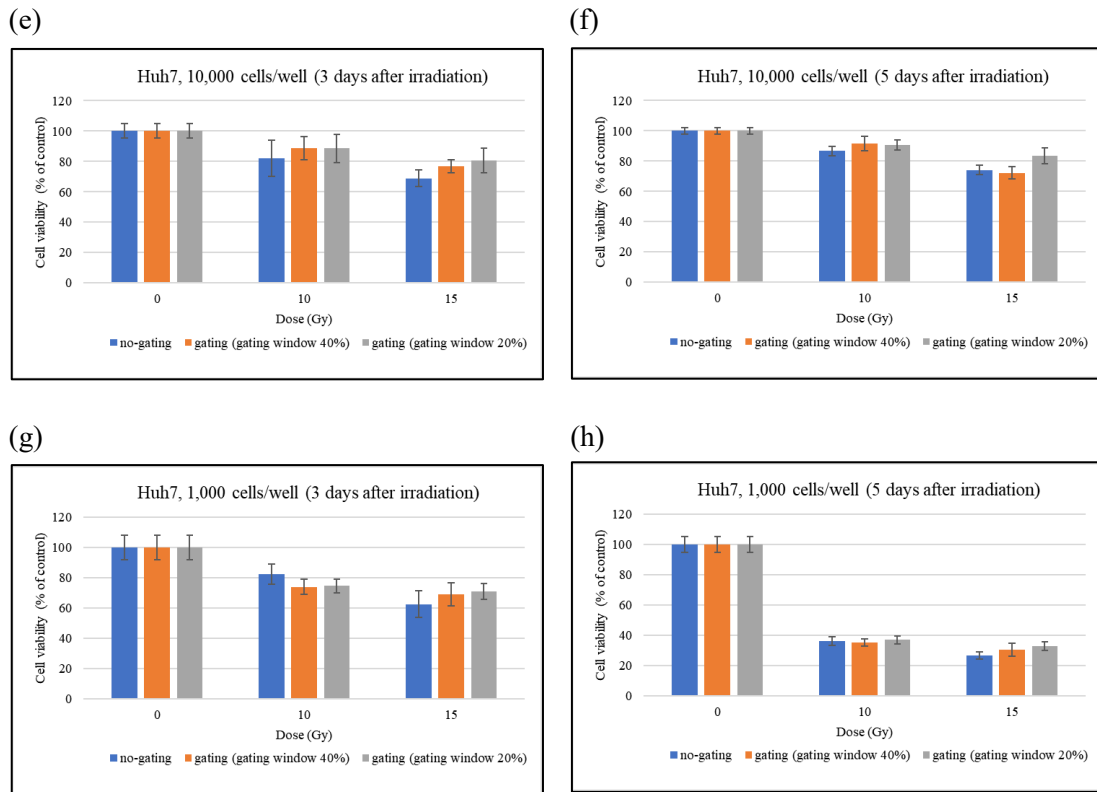


Figure 2. Results of cell viability assay for Huh7 (continued).

(e, f) Cell viability at 3 days (e) and 5 days (f) after irradiation for Huh7 with cell density (10,000 cells/well) in the third experiment.

(g, h) Cell viability at 3 days (g) and 5 days (h) after irradiation for Huh7 with cell density (1,000 cells/well) in the third experiment.

Table 3. Comparison of cell viability of Huh7 at 5 days after irradiation between no-gating technique and gating technique in the first experiment

	No-gating (mean±SD)	Gating window 40% (vs. no-gating)	Gating window 20% (vs. no-gating)
2 Gy	95.0%±10.0%	103.0%±8.7% (p=0.021)	101.3%±5.7% (p=0.028)
5 Gy	88.2%±4.1%	99.2%±11.6% (p=0.021)	104.0%±11.1% (p=0.008)
10 Gy	69.3%±5.3%	81.5%±7.7% (p=0.008)	81.6%±9.0% (p=0.008)

나. Clonogenic assay

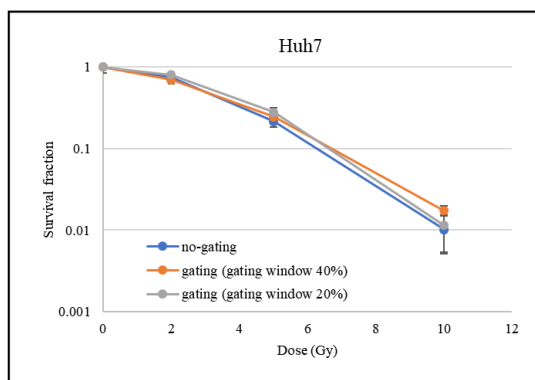
Huh7 세포의 plating efficiency (PE)는 0.419로 산출되었고, no-gating 기법의 방사선 조사 후 survival fraction (SF, 평균±표준편차)은 0, 2, 5, 10 Gy 에서 0.998 ± 0.146 , 0.751 ± 0.040 , 0.215 ± 0.031 , 0.010 ± 0.005 로 산출되었다(Figure 3(a)). 10 Gy 선량에서는 gating window 40% 의 gating 기법의 SF 값이 no-gating 기법에 비해 유의하게 높았지만 평균값의 차이는 0.01 미만이었다(0.017 ± 0.002 vs. 0.010 ± 0.005 , $p=0.028$). 10 Gy 선량에서 gating window 20% 의 gating 기법과 no-gating 기법 간에는 SF 값의 유의한 차이가 없었다(0.011 ± 0.006 vs. 0.010 ± 0.005 , $p=0.131$). 2, 5 Gy 선량에서는 gating 기법과 no-gating 기법 간의 SF 결과의 유의한 차이가 없었다.

첫 번째 실험 결과를 재확인하기 위해서, 반복 실험을 시행하였다. 두 번째 실험에서는 조사 선량을 0, 10, 15 Gy 세 가지로 하였고, 조사 선량에 따라 세포 밀도를 다음과 같이 조절하였다.

* 0 Gy (200 cells/3ml/well); 10 Gy (4,000 cells/3ml/well); 15 Gy (10,000 cells/3ml/well);

두 번째 실험에서 PE 값은 0.283으로 산출되었고, no-gating 기법의 0, 10, 15 Gy 방사선 조사 후 SF 값은 1.009 ± 0.129 , 0.013 ± 0.002 , 0.001 ± 0.000 으로 산출되었다(Figure 3(b)). 15 Gy 선량에서는 gating window 40% 의 gating 기법의 SF 값이 no-gating 기법에 비해 유의하게 높았지만 평균값의 차이는 0.001 미만이었다(0.001 ± 0.000 vs. 0.002 ± 0.000 , $p=0.045$). 15 Gy 선량에서 gating window 20% 의 gating 기법과 no-gating 기법 간에는 SF 값의 유의한 차이가 없었다(0.001 ± 0.000 vs. 0.001 ± 0.001 , $p=0.175$). 10 Gy 선량에서는 gating 기법과 no-gating 기법 간의 SF 결과의 유의한 차이가 없었다.

(a)



(b)

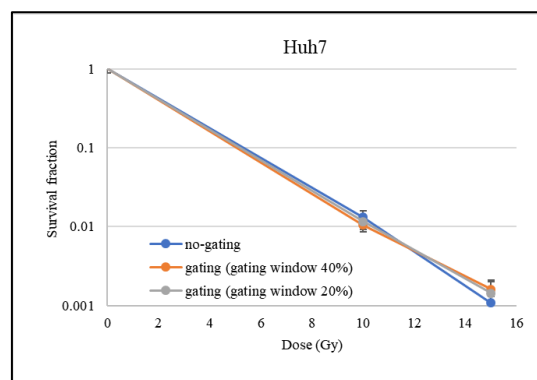


Figure 3. Results of clonogenic assay for Huh7.

(a) Survival fractions after 0, 2, 5, 10 Gy irradiation in the first experiment.

(b) Survival fractions after 0, 10, 15 Gy irradiation in the second experiment.

다. Cell cycle analysis

방사선조사를 하지 않은 세포에서는 방사선조사 후 24시간, 48시간, 72시간째 G2/M phase가 17.8%, 18.4%, 12.1%로 측정되었다(Figure 4 (a-c)). 방사선을 조사한 세포에서는 24시간째 G2/M phase가 no-gating, gating window 40%, gating window 20%에서 54.2%, 52.1%, 53.0%로 측정되었고(Figure 4(a)), 48시간째에는 24.3%, 29.4%, 27.9%로 감소하였다(Figure 4(b)). 방사선조사 후 72시간째 subG1은 방사선조사를 하지 않은 세포에서는 4.9%, 방사선을 조사한 세포에서는 no-gating, gating window 40%, gating window 20%에서 22.5%, 20.4%, 17.9%로 측정되었다(Figure 4(c)).

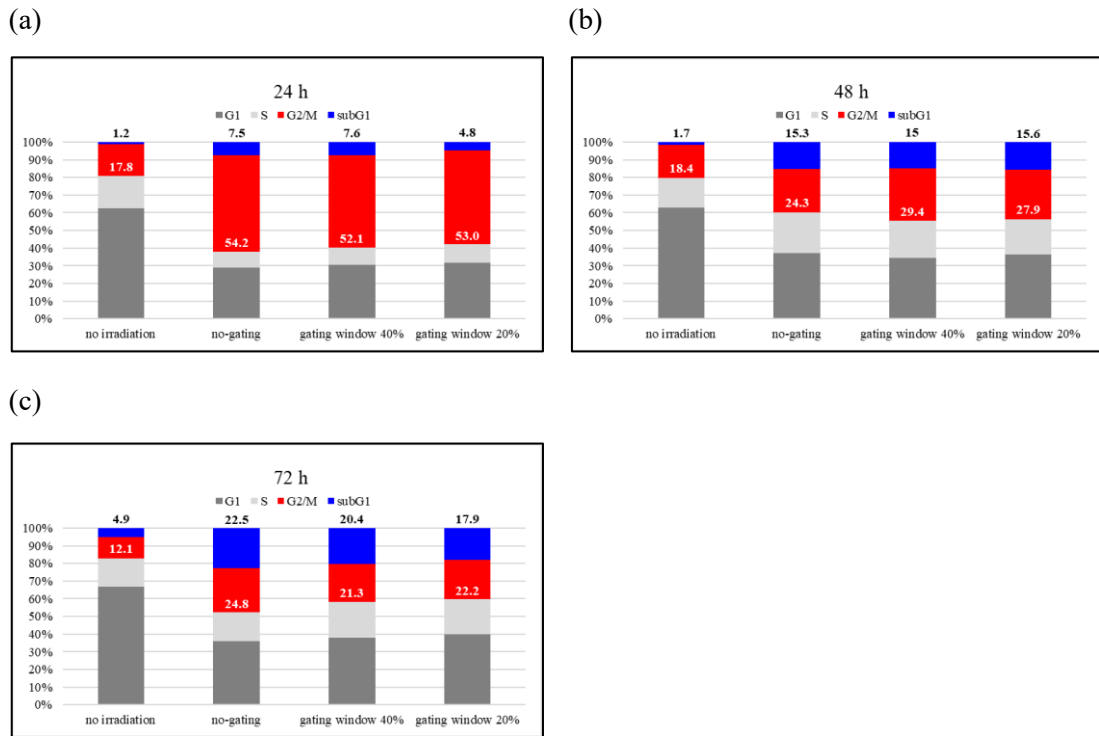


Figure 4. Results of cell cycle analysis for Huh7.

(a-c) Cell cycle distribution at (a) 24 hours, (b) 48 hours, and (c) 72 hours after irradiation.

2. A549

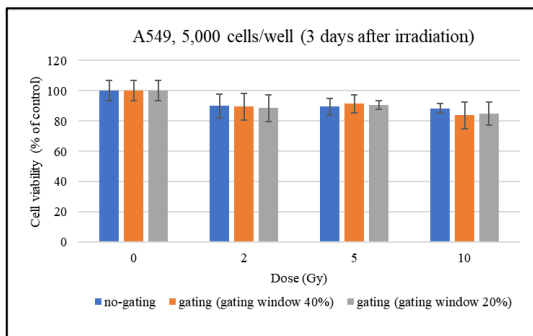
가. Cell viability assay

A549 세포(5×10^3 cells/100ul/well)에서 no-gating 기법의 방사선 조사 후 3일째 cell viability (평균±표준편차)는 0, 2, 5, 10 Gy에서 $100\% \pm 6.7\%$, $90.0\% \pm 7.9\%$, $89.6\% \pm 5.4\%$, $88.4\% \pm 3.0\%$ 로 측정되었다(Figure 5(a)). 모든 선량에서 no-gating 기법과 gating 기법 간의 cell viability 결과의 유의한 차이가 없었다.

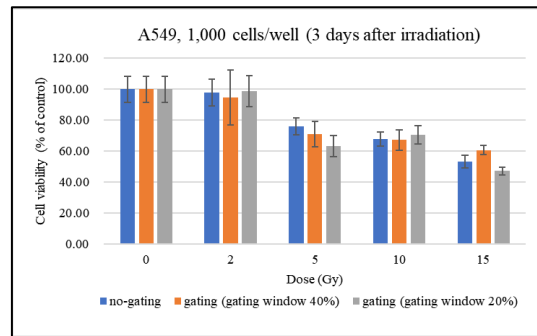
첫 번째 실험 결과를 재확인하기 위해서, 두 번의 반복 실험을 시행하였다. 두 번째 실험에서는 세포 밀도를 1×10^3 cells/100ul/well로 하였고, 조사 선량은 0, 2, 5, 10, 15 Gy로 하였다. 방사선 조사 후 3일째 cell viability는 no-gating 기법의 0, 2, 5, 10, 15 Gy에서 $100\% \pm 8.4\%$, $98.0\% \pm 8.7\%$, $76.0\% \pm 5.4\%$, $67.9\% \pm 4.6\%$, $53.3\% \pm 4.0\%$ 로 측정되었다(Figure 5(b)). 2, 10, 15 Gy에서는 no-gating 기법과 gating 기법 간의 cell viability 결과의 유의한 차이가 없었고, 5 Gy에서는 no-gating 기법에 비해 gating 기법의 cell viability가 유의하게 낮았다. 5 Gy에서 gating window 20%의 gating 기법과 no-gating 기법의 viability 평균값의 차이는 -12.6%로 산출되었고, no-gating 기법의 viability 평균값을 100%로 보정하였을 때에는, -16.6%로 산출되었다.

세 번째 실험에서는 두 번째 실험과 동일한 세포 밀도에서 동일한 선량을 조사하였다. 방사선 조사 후 3일째 cell viability는 no-gating 기법의 0, 2, 5, 10, 15 Gy에서 $100\% \pm 9.2\%$, $96.3\% \pm 9.1\%$, $77.5\% \pm 8.0\%$, $52.5\% \pm 3.4\%$, $48.5\% \pm 4.1\%$ 로 측정되었다(Figure 5(c)). 5, 10, 15 Gy에서는 no-gating 기법과 gating 기법 간의 cell viability 결과의 유의한 차이가 없었고, 2 Gy에서는 no-gating 기법에 비해 gating window 20%의 gating 기법의 cell viability가 유의하게 낮았다. 2 Gy에서 Gating window 20%의 gating 기법과 no-gating 기법의 viability 평균값의 차이는 -7.1%로 산출되었고, no-gating 기법의 viability 평균값을 100%로 보정하였을 때에는, -7.4%로 산출되었다.

(a)



(b)



(c)

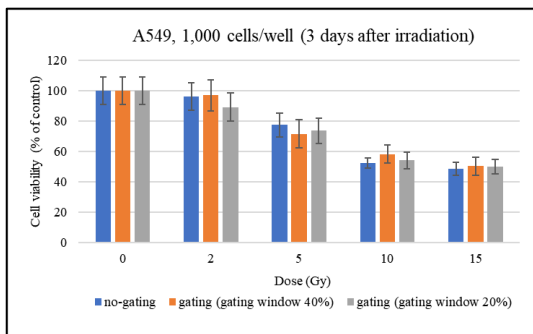


Figure 5. Results of cell viability assay for A549.

(a) Cell viability at 3 days after irradiation for A549 with cell density (5,000 cells/well) in the first experiment.

(b) Cell viability at 3 days after irradiation for A549 with cell density (1,000 cells/well) in the second experiment.

(c) Cell viability at 3 days after irradiation for A549 with cell density (1,000 cells/well) in the third experiment.

나. Clonogenic assay

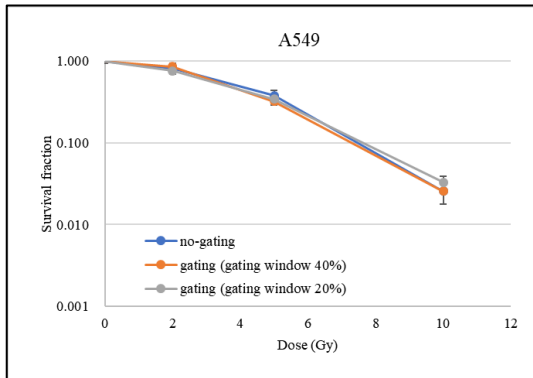
A549 세포의 plating efficiency (PE)는 0.471로 산출되었고, no-gating 기법의 방사선 조사 후 survival fraction (SF, 평균±표준편차)은 0, 2, 5, 10 Gy에서 1.001 ± 0.058 , 0.825 ± 0.066 , 0.378 ± 0.057 , 0.026 ± 0.008 로 산출되었다(Figure 6(a)). 모든 선량에서 gating 기법과 no-gating 기법 간에는 SF 값의 유의한 차이가 없었다.

첫 번째 실험 결과를 재확인하기 위해서, 반복 실험을 시행하였다. 두 번째 실험에서는 조사 선량을 0, 2, 5, 10, 15 Gy로 하였고, 조사 선량에 따라 세포 밀도를 다음과 같이 조절하였다.

* 0 Gy (300 cells/3ml/well); 2 Gy (300 cells/3ml/well); 5 Gy (500 cells/3ml/well); 10 Gy (1,500 cells/3ml/well); 15 Gy (20,000 cells/3ml/well)

두 번째 실험에서 PE 값은 0.377로 산출되었고, no-gating 기법의 0, 2, 5, 10, 15 Gy 방사선 조사 후 SF 값은 0.993 ± 0.096 , 0.595 ± 0.078 , 0.164 ± 0.033 , 0.011 ± 0.006 , 0.0003 ± 0.000 으로 산출되었다(Figure 6(b)). 모든 선량에서 gating 기법과 no-gating 기법 간에는 SF 값의 유의한 차이가 없었다.

(a)



(b)

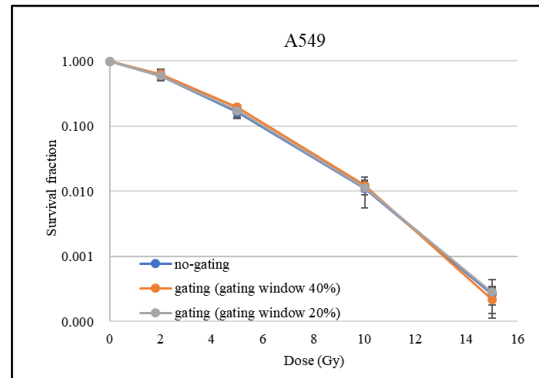


Figure 6. Results of clonogenic assay for A549.

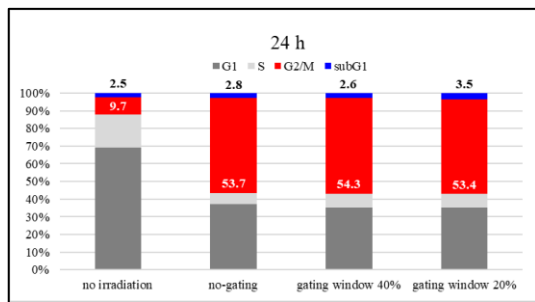
(a) Survival fractions after 0, 2, 5, 10 Gy irradiation in the first experiment.

(b) Survival fractions after 0, 2, 5, 10, 15 Gy irradiation in the second experiment.

다. Cell cycle analysis

방사선조사를 하지 않은 세포에서는 방사선조사 후 24시간, 48시간째 G2/M phase가 9.7%, 16.5%로 측정되었다(Figure 7(a-b)). 방사선을 조사한 세포에서는 24시간째 G2/M phase가 no-gating, gating window 40%, gating window 20%에서 53.7%, 54.3%, 53.4%로 측정되었고(Figure 7(a)), 48시간째에는 50.7%, 48.0%, 50.8%로 측정되었다(Figure 7(b)). 방사선조사 후 48시간째 subG1은 방사선조사를 하지 않은 세포에서는 4.6%, 방사선을 조사한 세포에서는 no-gating, gating window 40%, gating window 20%에서 3.9%, 3.1%, 4.1%로 측정되었다.

(a)



(b)

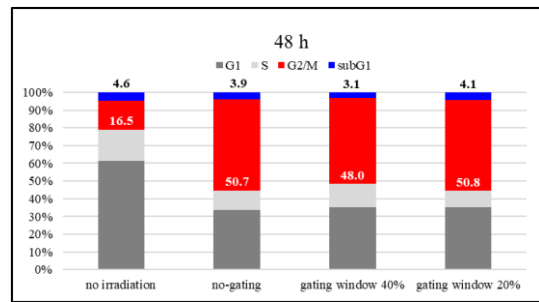


Figure 7. Results of cell cycle analysis for A549.

(a, b) Cell cycle distribution at (a) 24 hours and (b) 48 hours after irradiation.

고찰

본 연구에서는 호흡연동방사선조사 여부에 따른 Huh7, A549 암세포 생존의 차이를 확인할 수 없었다. Clonogenic assay에서 2, 5, 10, 15 Gy의 방사선을 조사할 때, no-gating 기법과 gating 기법 간의 SF의 차이가 없었고, 이는 Huh7, A549 두 세포에서 일관된 결과를 보였다.

호흡연동방사선치료를 시행할 경우, 방사선조사와 중단이 반복되고, 이로 인해 선량률의 저하 및 변화가 빈번하게 발생하며, 전체치료시간이 증가한다. 임상적으로 호흡연동방사선치료를 도입하면서 방사선조사와 중단의 반복에 따른 선량학적 영향에 대한 여러 연구들이 발표되었지만,¹⁻⁵⁾ 이에 따른 생물학적 영향에 대한 연구는 드문 실정이다. 전체치료시간의 증가에 따른 생물학적 영향에 대한 연구들 중에서, 방사선의 조사 및 중단을 반복하는 실험을 시행한 경우도 있었지만, 이러한 연구들에서 설정된 방사선조사가 중단되는 기간(interval)은 대부분 1-20분이상이었다.⁶⁻⁹⁾ 건강한 성인의 호흡률이 분당 12-18회인 점을 고려하면,¹⁰⁾ 호흡의 주기는 약 3-5초이고, 호흡연동방사선치료시 방사선조사가 중단되는 기간은 5초 미만으로 매우 짧기 때문에, 앞선 연구들의 결과를 호흡연동방사선치료의 경우에 대입하는 것은 적절하지 못하다. 비록 앞선 연구들에서 방사선조사가 중단되는 기간이 증가할수록 암세포 생존이 증가한다는 결과를 보여주었지만, 이러한 결과는 방사선조사의 중단 여부보다는 전체치료시간의 증가와 관련 있었을 것으로 생각된다. 2008년 Keall 등¹¹⁾이 2 Gy 선량을 gating window 33%로 조사하였을 때, no-gating 기법과 gating 기법 간에 clonogenic assay 결과에 차이가 없다는 결과를 발표한 바 있다. 하지만, 이 연구에서는 moving phantom의 주기에 대한 언급이 없어서 방사선조사가 중단되는 기간을 명확히 알 수 없다는 점, 2 Gy 선량만 조사했다는 점, 대상 세포가 사람의 종양 세포가 아닌 V79 Chinese hamster lung fibroblast였다는 점 등의 한계가 있다. 반면, 본 연구는 0, 2, 5, 10, 15 Gy의 방사선을 세 가지 조건(no-gating, gating (gating window 40%), gating (gating window 20%))으로 조사하였으며, 현재까지 발표된 연구들 가운데 실제 호흡연동방사선치료와 가장 유사한 조건을 적용하였다는 데 의미가 있다. 또한, 임상에서 호흡연동방사선치료를 가장 빈번하게 시행하는 간암 및 폐암 세포를 대상으로 했다는 데 의미가 있다. 본 연

구에서 사용된 Moving phantom의 주기는 5.6초로 설정되어, gating window 40%에서는 2.2초 동안 조사되고 3.4초 동안 중단되는 것이 반복되고, gating window 20%에서는 1.1초 동안 조사되고 4.5초 동안 중단되는 것이 반복되었다. 결과적으로, Gating 기법을 통해 2, 5, 10, 15 Gy를 조사하기 위해서 방사선 조사와 중단이 17, 43, 86, 129회 반복되었지만, gating 기법과 no-gating 기법 간의 암세포 생존의 차이는 없었다. 이러한 결과와 관련하여, 저자는 두 가지 해석이 가능하다고 생각한다. 첫째, 방사선조사 후 발생하는 물리화학적인(physicochemical) 과정은 밀리초(millisecond) 이내에 일어나기 때문에,¹²⁾ 수 초 동안의 방사선조사와 중단이 반복되는지 여부는 물리화학적인 과정에 영향을 미치기에는 너무 길 가능성이 있다. 둘째, 방사선조사 후 발생하는 생물학적 과정인 준치사손상회복(sublethal damage repair)은 방사선조사 직후부터 수 시간 이내에 일어나는 것으로 알려져 있지만,¹²⁾ 수 초 미만의 방사선조사 중단 여부는 준치사손상회복의 정도에 의미 있는 차이를 만들기에는 너무 짧을 가능성이 있다.

선량률에 따른 생물학적 영향에 대한 연구들에서는 선량률이라는 용어를 크게 두 가지 의미(평균선량률(average dose rate), 순간선량률(instantaneous dose rate))로 사용한다. 평균선량률이 전체치료시간 동안 전달된 선량을 분당 모니터단위(monitor unit (MU)-per-minute)로 환산한 개념인데 반해, 순간선량률은 각 순간에 전달되는 선량의 비율을 의미하는 개념이다.^{11, 13)} 평균선량률은 전체치료시간의 길이에 반비례하기 때문에, 이로 인한 생물학적 영향은 전체치료시간에 따른 생물학적 영향과 같은 개념이다. 방사선치료를 시행하는 동안 선형가속기 안의 전리함(ion chamber)를 통해 모니터링되는 선량률은 순간선량률의 개념에 더 가깝다. 본 연구에서는 호흡연동방사선치료를 시행하는 동안 방사선조사 및 중단의 반복으로 인하여, 선형가속기 안의 전리함을 통해 모니터링되는 순간선량률이 분당 0 MU에서 600 MU로 지속적으로 변화했지만, 이로 인한 암세포 생존의 차이는 확인할 수 없었다. 지속적으로 변화하는 순간선량률의 생물학적 영향에 대해서는 보고된 바가 없지만, 순간선량률의 높고 낮음에 따른 생물학적 영향에 대해서는 여러 연구들에서 본 연구와 동일한 결과를 발표한 바 있다. 대부분의 연구들에서는 순간선량률에 따른 암세포 생존의 정도에 차이가 없었고, 순간선량률보다는 평균선량률(전체치료시간)이 중요하다는 결과를 보고하였다.¹³⁻¹⁸⁾ 순간선량률은 두 가지 인

자(펄스당 선량(dose per pulse), 펄스 반복 빈도(pulse repetition frequency))에 의해 결정된다. Flattening filter 빔에 비해 4배 이상 높은 순간선량률을 구현할 수 있는 Flattening filter-free (FFF) 빔의 사용이 가능해지면서, FFF 빔의 생물학적인 영향에 대해 여러 연구들이 발표되었지만, 대부분의 연구들에서 FFF 빔을 통한 방사선 조사 효과의 향상을 확인할 수 없었다.¹³⁻¹⁸⁾ 비록 Lohse 등¹⁹⁾의 연구에서는 순간선량률이 높은 FFF 빔이 방사선조사의 효과를 향상시킨다는 결과를 보여주었지만, 이는 펄스 반복 빈도나 평균선량률이 아닌 펄스당 선량의 상승과 관련이 있었다. 이러한 과거 연구들의 결과를 종합해서 보면, 본 연구에서는 호흡연동방사선조사를 시행하는 동안 선형가속기 안의 전리함을 통해 모니터링되는 순간선량률은 지속적으로 변화했지만, 펄스 반복 빈도와 펄스당 선량은 변화하지 않았기 때문에, 순간선량률의 변화에도 불구하고 암세포 생존의 차이가 없었던 것으로 생각된다.

호흡연동방사선치료에서 gating window 40% 및 20% 기법으로 no-gating 기법과 동일한 선량을 전달하기 위해서는, 전체치료시간이 각각 2.5배 및 5배 증가한다. 본 연구에서는 gating window 20% 기법으로 2, 5, 10, 15 Gy를 조사하기 위해 전체조사시간이 0.3, 0.8, 1.6, 2.4분에서 1.6, 4, 8, 12분으로 증가하였지만, no-gating 기법과 gating 기법 간의 암세포 생존의 차이는 없었다. 전체치료시간 증가에 따른 생물학적 영향에 대해서는 많은 연구들이 발표되었다.^{6-9, 13, 20-26)} 전체치료시간이 증가할 경우 준치사손상회복을 통해 방사선치료의 효과가 감소할 수 있다는 가설 하에 여러 in vitro 실험들이 시행되었고, 대부분의 연구에서는 전체치료시간의 증가에 따라 암세포 생존이 증가하는 결과를 보여주었다. 하지만, 이러한 연구들에서 전체치료시간의 증가는 대부분 15-20분 이상이었다.^{6-9, 20-25)} 전체치료시간의 증가가 15분 미만이었을 때에도 암세포 생존이 증가한다는 결과를 보여준 연구들도 있었지만, 이 연구들에서의 조사선량은 5 Gy 미만이었다.^{13, 25, 26)} 이러한 연구들에서도 동일한 선량률로 5 Gy 이상을 조사한다면, 전체치료시간이 15분 이상 증가할 것으로 생각된다. 본 연구에서는 방사선조사 계획을 후향일문조사(posterior one port)로 하였기 때문에, 15 Gy를 gating window 20% 기법으로 조사하더라도, 필요한 전체치료시간이 12분으로 이전의 연구들에 비해 짧았고, 이로 인해 전체치료시간 증가에 따른 암세포 생존의 차이를 확인할 수 없었던 것으로 생각된다. 세기조절

방사선치료 기법(intensity modulated radiation therapy)을 적용하여 전체치료시간이 증가할 경우 생물학적 영향이 달라질 수 있겠다. 하지만, 최근에는 체적조절호형 방사선치료(volumetric modulated arc therapy) 및 FFF 빔의 도입으로, 세기조절방사선치료 기법을 적용하더라도 전체치료시간 단축이 가능해졌다.

본 연구에는 다음과 같은 제한점들이 있다. 첫째, 실험의 대상이 두 가지 세포로 제한적이었다. 세포의 종류에 따라 방사선민감성 및 준치사손상회복 속도 등이 다를 수 있다. 드물지만, 전체치료시간 증가에 따라 방사선조사의 효과가 증가하는 역선량률효과를 보고한 연구도 있어서,²⁷⁾ 정상세포를 포함한 다양한 세포에서의 추가적인 검증이 필요하다. 본 연구에서는 Huh7, A549 두 가지 세포 모두 no-gating 기법과 gating 기법 간의 clonogenic assay로 평가한 암세포 생존에는 차이가 없는 일관된 결과를 보였지만, 방사선조사 후 5일 이내의 단기간의 암세포 생존을 평가하는 viability assay 결과는 두 세포 간 차이가 있었다. A549 세포의 경우에는 모든 선량에서 no-gating 기법과 gating 기법 간의 viability assay 결과의 차이가 없었지만, Huh7 세포의 경우에는 2, 5 Gy를 조사한 경우 no-gating 기법에 비해 gating 기법의 cell viability가 일관되게 높은 결과를 보였다. Cell cycle analysis 결과 두 세포 모두 방사선조사 후 24시간째 G2/M arrest 소견을 보였지만, Huh7 세포는 48시간째 G2/M phase가 감소한 것에 비해, A549 세포에서는 48시간째에도 G2/M arrest가 지속된 점 등을 고려하면, 두 세포에서 호흡연동방사선조사에 따른 단기간의 생물학적 영향에 차이가 있을 가능성을 배제할 수 없으며, 단기간의 생물학적 영향이 갖는 의미에 대한 추가적인 연구가 필요하다. 둘째, 방사선조사 계획을 후향일문조사(posterior one port)만으로 하였다. 실제 임상에서는 호흡연동 방사선치료를 시행하는 환자에서 세기조절방사선치료 기법을 적용하는 경우가 많다. 이러한 경우에는 동일 필드 내에서도 다엽조준기(multileaf collimator)의 개폐에 따라 순간선량률이 더 많이 변화하고, 더 많은 모니터단위의 필요에 의해 전체치료시간 또한 증가할 수 있기 때문에, 이러한 치료기법에서 추가적인 검증이 필요하다. 셋째, 본 연구는 in vitro 실험에서 세포 생존을 평가하였기 때문에, 재산소화(reoxygenation) 등이 고려되지 않았다는 한계가 있으며, in vivo 실험에서 추가적인 검증이 필요하다. 방사선조사 후 단기간에는 재산소화가 일어나지 않는 것으로 알려져 있지만, Shibamoto 등²⁸⁾의 in vivo 실험에서는 5분 이내에도 재산소

화가 일어날 수 있음을 보고한 바가 있다. 이러한 제한점들에도 불구하고 본 연구는 호흡연동방사선치료를 가장 빈번하게 시행하는 간암 및 폐암 세포를 대상으로 하였고, 현재까지 발표된 연구들 가운데 실제 호흡연동방사선치료와 가장 유사한 조건을 적용하여 다양한 선량을 조사한 연구라는 데 의미가 있다.

결론

Huh7, A549 세포에서 호흡연동방사선조사 여부에 따른 암세포 생존/사멸의 차이는 없었다. 이러한 결과를 뒷받침하기 위해서는, 좀 더 다양한 조건(다양한 세포, 세기조절방사선치료 기법 적용, 체내 실험 (in vivo) 등)에서 추가적인 검증이 필요하다.

참고문헌

1. Ramsey CR, Cordrey IL, Oliver AL. A comparison of beam characteristics for gated and nongated clinical x-ray beams. *Med Phys* 1999;26(10):2086-91.
2. King RB, Agnew CE, O'Connell BF, Prise KM, Hounsell AR, McGarry CK. Time-resolved dosimetric verification of respiratory-gated radiotherapy exposures using a high-resolution 2D ionisation chamber array. *Phys Med Biol* 2016;61(15):5529-46.
3. Evans PM, Symonds-Taylor JR, Colgan R, Hugo GD, Letts N, Sandin C. Gating characteristics of an Elekta radiotherapy treatment unit measured with three types of detector. *Phys Med Biol* 2010;55(8):N201-10.
4. Kriminski S, Li AN, Solberg TD. Dosimetric characteristics of a new linear accelerator under gated operation. *J Appl Clin Med Phys* 2006;7(1):65-76.
5. Khamfongkhrua C, Tannanonta C, Thongsawad S. Dosimetric evaluation of radiation dose rate effect in respiratory gated intensity modulated radiation therapy. *Biomed Imaging Interv J* 2012;8(1):e5.
6. Sterzing F, Munter MW, Schafer M, Haering P, Rhein B, Thilmann C, et al. Radiobiological investigation of dose-rate effects in intensity-modulated radiation therapy. *Strahlenther Onkol* 2005;181(1):42-8.
7. Shibamoto Y, Otsuka S, Iwata H, Sugie C, Ogino H, Tomita N. Radiobiological evaluation of the radiation dose as used in high-precision radiotherapy: effect of prolonged delivery time and applicability of the linear-quadratic model. *J Radiat Res* 2012;53(1):1-9.
8. Jiang L, Xiong XP, Hu CS, Ou ZL, Zhu GP, Ying HM. In vitro and in vivo studies on radiobiological effects of prolonged fraction delivery time in A549 cells. *J Radiat Res* 2013;54(2):230-4.
9. Ogino H, Shibamoto Y, Sugie C, Ito M. Biological effects of intermittent radiation in cultured tumor cells: influence of fraction number and dose per fraction. *J Radiat Res* 2005;46(4):401-6.
10. Ganong's review of medical physiology. In. New York: McGraw-Hill Medical; 2010.

11. Keall PJ, Chang M, Benedict S, Thames H, Vedam SS, Lin PS. Investigating the temporal effects of respiratory-gated and intensity-modulated radiotherapy treatment delivery on in vitro survival: an experimental and theoretical study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008;71(5):1547-52.
12. Halperin EC, Wazer DE, Perez CA, Brady LW. *Perez & Brady's principles and practice of radiation oncology*; (2019).
13. Bewes JM, Suchowerska N, Jackson M, Zhang M, McKenzie DR. The radiobiological effect of intra-fraction dose-rate modulation in intensity modulated radiation therapy (IMRT). *Phys Med Biol* 2008;53(13):3567-78.
14. Nakano H, Minami K, Yagi M, Imaizumi H, Otani Y, Inoue S, et al. Radiobiological effects of flattening filter-free photon beams on A549 non-small-cell lung cancer cells. *J Radiat Res* 2018;59(4):442-5.
15. Sorensen BS, Vestergaard A, Overgaard J, Praestegaard LH. Dependence of cell survival on instantaneous dose rate of a linear accelerator. *Radiother Oncol* 2011;101(1):223-5.
16. Verbakel WF, van den Berg J, Slotman BJ, Sminia P. Comparable cell survival between high dose rate flattening filter free and conventional dose rate irradiation. *Acta Oncol* 2013;52(3):652-7.
17. King RB, Hyland WB, Cole AJ, Butterworth KT, McMahon SJ, Redmond KM, et al. An in vitro study of the radiobiological effects of flattening filter free radiotherapy treatments. *Phys Med Biol* 2013;58(5):N83-94.
18. Ling CC, Gerweck LE, Zaider M, Yorke E. Dose-rate effects in external beam radiotherapy redux. *Radiother Oncol* 2010;95(3):261-8.
19. Lohse I, Lang S, Hrbacek J, Scheidegger S, Bodis S, Macedo NS, et al. Effect of high dose per pulse flattening filter-free beams on cancer cell survival. *Radiother Oncol* 2011;101(1):226-32.
20. Elkind MM, Sutton H. Radiation response of mammalian cells grown in culture. 1. Repair of X-ray damage in surviving Chinese hamster cells. *Radiat Res* 1960;13:556-93.

21. Elkind MM, Sutton-Gilbert H, Moses WB, Alescio T, Swain RW. Radiation Response of Mammalian Cells Grown in Culture. V. Temperature Dependence of the Repair of X-Ray Damage in Surviving Cells (Aerobic and Hypoxic). *Radiat Res* 1965;25:359-76.
22. Benedict SH, Lin PS, Zwicker RD, Huang DT, Schmidt-Ullrich RK. The biological effectiveness of intermittent irradiation as a function of overall treatment time: development of correction factors for linac-based stereotactic radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997;37(4):765-9.
23. Zheng XK, Chen LH, Wang WJ, Ye F, Liu JB, Li QS, et al. Impact of prolonged fraction delivery times simulating IMRT on cultured nasopharyngeal carcinoma cell killing. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010;78(5):1541-7.
24. Paganetti H. Changes in tumor cell response due to prolonged dose delivery times in fractionated radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;63(3):892-900.
25. Mu X, Lofroth PO, Karlsson M, Zackrisson B. The effect of fraction time in intensity modulated radiotherapy: theoretical and experimental evaluation of an optimisation problem. *Radiother Oncol* 2003;68(2):181-7.
26. Moiseenko V, Duzenli C, Durand RE. In vitro study of cell survival following dynamic MLC intensity-modulated radiation therapy dose delivery. *Med Phys* 2007;34(4):1514-20.
27. Oktaria S, Lerch MLF, Rosenfeld AB, Tehei M, Corde S. In vitro investigation of the dose-rate effect on the biological effectiveness of megavoltage X-ray radiation doses. *Appl Radiat Isot* 2017;128:114-9.

Abstract

The Graduate School of the University of Ulsan

Jeong, Yuri

Purpose: To investigate biologic effects of linear accelerator based respiratory gating radiation therapy on in vitro cancer cell survival.

Materials and Methods: Huh7 and A549 cells were irradiated to 0, 2, 5, 10 Gy with three delivery methods (no-gating, gating (gating window 40%), gating (gating window 20%)). Cell viability assay and clonogenic assay were performed, and Wilcoxon signed-rank tests were done to compare results between no-gating and gating delivery.

Results: For Huh7, cell viability at 5 days after no-gating delivery of 0, 2, 5, 10 Gy was $100\% \pm 5.9\%$, $95.0\% \pm 10.0\%$, $88.2\% \pm 4.1\%$, $69.3\% \pm 5.3\%$, respectively, and cell viability after gating delivery was higher than that after no-gating delivery in all doses. However, the results of 10 Gy were not consistent in the repeated experiments. In clonogenic assay, survival fraction (SF) after no-gating delivery of 0, 2, 5, 10 Gy was 0.998 ± 0.146 , 0.751 ± 0.040 , 0.215 ± 0.031 , 0.010 ± 0.005 , respectively, and there was no difference between the results of no-gating and that of gating delivery. For A549, cell viability at 3 days after no-gating delivery of 0, 2, 5, 10 Gy was $100\% \pm 6.7\%$, $90.0\% \pm 7.9\%$, $89.6\% \pm 5.4\%$, $88.4\% \pm 3.0\%$, and cell viability was not different between no-gating and gating delivery in all doses. In clonogenic assay, SF after no-gating delivery of 0, 2, 5, 10 Gy was 1.001 ± 0.058 , 0.825 ± 0.066 , 0.378 ± 0.057 , 0.026 ± 0.008 , respectively, and there was no difference between the results of no-gating and that of gating delivery.

Conclusion: For both Huh7 and A549 cells, in vitro cancer cell survivals were not affected by linear accelerator based respiratory gating radiation therapy. Further investigations with different cell lines are needed to confirm the findings of present study.

Keywords: radiation therapy; respiration gating; biologic effect; cell survival