creative commons

COMMONS DEED

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

dCollection

공학석사 학위논문

전해 환원수의 방사선 방호 효과 연구

Study on the Radioprotection Effect of Electrolyzed Reduced Water

2019 년 2 월

서울대학교 대학원

에너지시스템공학부

홍 지 원

전해 환원수의 방사선 방호 효과 연구

지도 교수 김 은 희

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함

2019 년 2월

서울대학교 대학원

에너지시스템공학부

홍 지 원

홍지원의 공학석사 학위논문을 인준함

2019 년 2월

위 원 장 _____ 정 경 재 _____ (인)

부위원장 _____ 김 은 희 _____ (인)

위 원 _____ 김 소 라 _____ (인)

초 록

방사선 방호제(Radioprotector)란 정상 조직과 세포를 방사선의 영향으로부터 보호하는 물질로, 방사선에 의한 세포 내 DNA 손상의 억제, 생존율 증가 등의 효과를 가진다. 방호 효과가 좋은 화학적 방호제는 독성이 강하여 사용에 제약이 따르기 때문에, 최근에는 식물화학추출물, 비타민 등 독성이 적은 천연 방호제에 대한 연구들이 활발히 진행되고 있다. 물의 전기 분해 중 음극으로부터 생성되는 전해 환원수(Electrolyzed reduced water)는 강한 환원력을 지닌 물질로, 수소 분자, 수소 원자 및 백금 나노 입자를 포함한 것으로 알려져 있다. 선행 연구들을 통해 전해 환원수의 화학 약품, UV 방사선, 열 스트레스 등의 외부 인자에 대한 방호 효과가 확인되었으나, 현재까지 전리 방사선에 대한 방호 효과는 확인된 바 없다. 그러나 UV 방사선에 대한 전해 환원수의 방호 효과와 주요 방호 인자인 수소 분자의 방사선 방호 효과를 고려할 때 전해 환원수 역시 전리 방사선에 대한 방호 효과를 지닐 것이라 기대해볼 수 있다.

본 연구에서는 전해 환원수의 방사선 방호제로서의 활용 가능성을 확인하기 위하여 세포에 대한 독성 평가와 엑스선에 대한 방호 효과 확인을 위한 실험들을 수행하였다. 우선, 엑스선의 경우 직접적인 작용보다 활성산소종에 의한 DNA 손상 비율이 크다는 점에서 전해 환원수 처리 유무에 따른 활성산소종의 정량적 양을 평가하였다. 또한 전해 환원수 처리에 따른 DNA 손상에 의해 유발되는 세포 자살 비율을 확인하고 세포군집형성능 실험을 통한 세포 생존율을 대조군과 비교하였다. 이 때 엑스선 선량과 선량률 및 에너지를 달리함으로써 전해 환원수의 방호 효과 정도 차이를 확인하고자 하였다. 그 결과 전해 환원수의 처리는 정상

세포에 대한 유의미한 독성이 없는 반면 암세포에서 독성 효과를 나타내었으며, 엑스선 조사 조건에서 활성산소종 감소, 세포 자살 억제, 그리고 세포 생존율의 증가가 나타나 전해 환원수가 방호 효과를 지님을 확인하였다. 엑스선의 선량 및 선량률에 따른 효과 차이는 없었으나 에너지가 낮을수록 그 효과가 크게 나타났는데, 이는 전해 환원수 내 포함된 금속 나노 입자의 영향을 일부 받은 것으로 추측된다.

본 연구에서는 전해 환원수의 전리 방사선에 대한 방호 효과를 확인하기 위해 in vitro 실험을 수행하였으며, 이에 관한 in vivo 상의 추가적인 실험이 요구된다. 비록 다른 방호제와 비교 시 방호 효과가 낮게 나타났지만, 전기 분해 조건 변화를 통해 더 높은 농도의 전해 환원수를 얻고 추가적인 처리를 통해 전해 환원수 내 금속 입자들을 제거한다면 더 좋은 방호 효과를 나타낼 것으로 기대된다. 또한 암세포보다 정상세포에서 그 효과가 크게 나타났다는 점을 통해 방사선 진단 및 치료 측면에서 전해 환원수의 방사선 방호제로서의 활용성을 기대해 볼 수 있다.

주요어 : 방사선 방호제, 전해 환원수, 세포 독성, 방사선 방호, 방사선의 생물학적 영향

학 번 : 2017-23750

목 차

초 록 i
목 차 iii
표 목 차 v
그림목차 vi

제 1 장 서 론 1

제 2 장 배경 이론 4
제 1 절 전리 방사선의 생물학적 영향..... 4
제 2 절 방사선 방호제 (Radioprotector)..... 5
제 3 절 전해 환원수(Electrolyzed reduced water)의 방호 효과.....
8

제 3 장 대상 및 방법 11
제 1 절 세포 및 세포 배양.....
1 1
제 2 절 전해 환원수의 생성..... 12
제 3 절 방사선 조사..... 14
제 4 절 세포 내 활성산소종의 정량적 평가 (DFCDA assay)..... 16
제 5 절 세포 자살 분석 (Apoptosis assay)..... 17

제 6 절 세포군집형성능 실험 (Clonogenic cell survival assay)..... 18
제 7 절 통계적 분석..... 20
제 4 장 결과 및 분석 21
제 1 절 전해 환원수의 세포에 대한 독성 확인..... 21
제 2 절 세포 내 활성산소종의 정량적 평가 결과..... 25
제 3 절 세포 자살 분석 결과..... 31
제 4 절 세포군집형성능 실험 결과..... 36
제 5 장 논 의 45
제 1 절 전해 환원수의 전리 방사선에 대한 방호 메커니즘 분석..... 45
제 2 절 세포의 방사선 민감도 및 특성 차이..... 49
제 3 절 금속 나노 입자의 방사선 선량 증가 영향..... 52
제 6 장 결 론 56
참고문헌 58
Abstract 68

표 목차

[Table 3.2.] 증류수와 여러 조건에서의 전해 환원수의 pH 및 ORP..... 13

[Table 5.1.] In vitro 실험으로 진행된 다양한 방사선 방호제들의 선량 감소 인자 비교(이 때 선량 감소 인자는 모두 세포 생존율 10%를 보이는 선량 값에 대한 계산)..... 48

[Table 5.3.] ICP-Mass Spectrometer를 이용하여 확인한 전해 환원수에 포함된 금속 입자 농도 및 150 keV에서 광전 효과 반응 단면적..... 54

그림 목차

[Fig. 2.2.] 전리 방사선 피폭 후 시간에 따른 생물학적 영향과 방사선 방호제의 개입 7

[Fig. 3.3.] YXLON model 450-D08 모델의 60 kVp와 150 kVp에서의 에너지 스펙트럼 15

[Fig. 4.1.1.] 세포 배양액에 전해 환원수의 처리 유무를 달리하였을 때 (a) Rat diencephalon cell, (b) Rat gliosarcoma cell에서의 Annexin V와 7-AAD에 반응하지 않는 viable cell 비율, (c) Rat diencephalon cell, (d) Rat gliosarcoma cell에서의 세포 군집 형성능 비율 23

[Fig. 4.1.2.] 세포 배양액에 높은 농도의 전해 환원수(ERW_{LV2})의 처리 유무를 달리하였을 때 (a) Rat diencephalon cell, (b) Rat gliosarcoma cell에서의 Annexin V와 7-AAD에 반응하지 않는 viable cell 비율, (c) Rat diencephalon cell, (d) Rat gliosarcoma cell에서의 세포 군집 형성능 비율 24

[Fig. 4.2.1.] (a) Rat diencephalon cell, (b) Rat gliosarcoma cell에 동일 선량률 0.16 Gy/min 및 선량 1 Gy에서 서로 다른 최대 에너지를 가진 전압 60, 80, 90, 그리고 150 kVp 조건의 엑스선 조사 시 전해 환원수 처리 유무에 따른 DCF 평균 세기의 비교 28

[Fig. 4.2.2.] (a) Rat diencephalon cell, (b) Rat gliosarcoma cell에 동일 전압 150 kVp 및 선량률 1.01 Gy/min에서 서로 다른 선량 1 Gy와 4 Gy 조건의 엑스선 조사 시 전해 환원수 처리 유무에 따른 DCF 평균 세기의

비교..... 29

[Fig. 4.2.3.] (a) Rat diencephalon cell, (b) Rat gliosarcoma cell에 동일 전압 150 kVp 및 선량 1 Gy에서 서로 다른 선량률 0.16 Gy/min와 1.01 Gy/min 조건의 엑스선 조사 시 전해 환원수 처리 유무에 따른 DCF 평균 세기의 비교..... 30

[Fig. 4.3.1.] Rat diencephalon cell에 동일 선량률 0.16 Gy/min 및 선량 (a) 1 Gy, (b) 4 Gy 엑스선 조사 조건에서 전해 환원수 처리를 달리하였을 때 서로 다른 최대 에너지의 전압 60 kVp와 150 kVp 조건에 따른 세포 자살 비율의 비교..... 33

[Fig. 4.3.2.] Rat gliosarcoma cell에 동일 선량률 0.16 Gy/min 및 선량 (a) 1 Gy, (b) 4 Gy 엑스선 조사 조건에서 전해 환원수 처리를 달리하였을 때 서로 다른 최대 에너지의 전압 60 kVp와 150 kVp 조건에 따른 세포 자살 비율의 비교..... 34

[Fig. 4.3.3.] Rat diencephalon cell(a, b)와 Rat gliosarcoma cell(c, d)에 대하여 동일 전압 150 kVp에서 선량률을 0.16 Gy/min(a, c)과 1.01 Gy/min(b, d)으로 달리하여 전해 환원수를 처리하였을 때 세포 자살 비율의 비교..... 35

[Fig. 4.4.1.] Rat diencephalon cell에 동일 선량률 0.16 Gy/min에서 서로 다른 최대 에너지를 가진 전압 (a) 60 kVp, (b) 150 kVp 조건의 엑스선 조사 시 전해 환원수 처리 유무에 따른 세포 생존율 곡선..... 38

[Fig. 4.4.2.] Rat gliosarcoma cell에 동일 선량률 0.16 Gy/min에서 서로 다른 최대 에너지를 가진 전압 (a) 60 kVp, (b) 150 kVp 조건의 엑스선 조사 시 전해 환원수 처리 유무에 따른 세포 생존율 곡선..... 39

[Fig. 4.4.3.] Rat diencephalon cell에 동일 전압 150 kVp에서 서로 다른 선량률 (a) 0.16 Gy/min, (b) 1.01 Gy/min 조건의 엑스선 조사 시 전해 환원수 처리 유무에 따른 세포 생존율 곡선..... 40

[Fig. 4.4.4.] Rat gliosarcoma cell에 동일 전압 150 kVp에서 서로 다른 선량률 (a) 0.16 Gy/min, (b) 1.01 Gy/min 조건의 엑스선 조사 시 전해 환원수 처리 유무에 따른 세포 생존율 곡선..... 41

[Fig. 4.4.5.] (a) Rat diencephalon cell, (b) Rat gliosarcoma cell에 60 kVp, 0.16 Gy/min 엑스선 조사 시 전해 환원수 처리 유무 및 농도에 따른 세포 생존율 곡선..... 42

[Fig. 4.4.6.] Rat diencephalon cell와 Rat gliosarcoma cell에 대한 각 엑스선 조사 조건에서의 선량 감소 인자(Dose reduction factor) 비교..... 43

[Fig. 4.4.7.] Rat diencephalon cell와 Rat gliosarcoma cell에 대한 60 kVp, 0.16 Gy/min 엑스선 조사 조건에서의 전해 환원수 농도에 따른 선량 감소 인자(Dose reduction factor) 비교..... 44

[Fig. 5.2.] 150 kVp, 1.01 Gy/min에서 Rat diencephalon cell와 Rat gliosarcoma cell의 조사 선량에 따른 세포 생존율..... 51

[Fig. 5. 3.] 광자 에너지 1 ~ 1000 keV에서 (a) 철(Fe), (b) 백금(Pt), (c) 티타늄(Ti)의 물질과의 총 반응 단면적(반응 확률) 및 광전 효과 반응 단

면적 55

제 1 장 서 론

전리 방사선은 DNA와 직접적으로 반응하는 직접 작용과 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS) 생성을 통한 간접 작용으로 인체에 위해를 가한다. 이러한 방사선의 생물학적 영향으로부터 정상 조직 및 세포를 보호하기 위하여 방사선 피폭 시점 혹은 그 전에 처리하는 물질을 '방사선 방호제'라 한다. 주로 계획 피폭 상황, 방사선 사고 상황 및 방사선 치료에 대비하여 사용되며, 전리 방사선의 경우 간접 작용의 영향이 크기 때문에 활성산소종의 제거 능력은 방사선 방호제의 필수 요건이다[1]. 방사선 방호제는 활성산소종 제거 능력 외에 체내 항산화제의 유도, 지질 과산화의 감소, 세포 자살 감소 등을 통한 세포 생존율 향상 및 항염증 효과를 수행할 수 있어야 한다[2]. 현재까지 유일하게 FDA 승인을 받은 Amifostine과 같이 대부분의 화학적 방호제는 방호 효과가 좋은 반면 독성과 부작용때문에 인체에 대한 사용에 제약이 따른다[3]. 따라서 최근에는 인체에 대한 독성이 적으면서 활성산소종을 효율적으로 제거할 수 있는 식물 내 함유된 화학물질, 비타민 등 천연 방호제에 대한 연구들이 활발하게 진행되고 있다[4].

전해 환원수(Electrolyzed reduced water, ERW)는 물의 전기 분해 중 음극에서 생성되는 강한 환원력을 띈 물질로, 활성산소종 제거를 통한 화학약품과 열 스트레스 등의 외부 인자에 대한 방호 효과를 지닌다. 인체에 대한 독성이 없으며, in vitro 및 in vivo 실험들로부터 DNA 손상의 완화, 세포 자살의 억제, 염증 완화 및 암세포의 성장 억제 효과들이 확인되었다[5]. 화학약품 H_2O_2 처리에 대해 다른 항산화제와 그 효과를 비교할 때 L-NAC와 효과가 비슷하고, ASA 효과보다는 낮아 어느 정도의 방호 효과 경쟁력

을 가짐을 알 수 있다[6]. 정확한 메커니즘이 밝혀지지는 않았으나 전해 환원수 내 용존되어 있는 수소 분자와 수소 원자 및 백금 나노 입자가 항산화 효과의 주요 인자로 제시되고 있으며[7], 각 인자들에 대한 방사선 방호 효과가 확인된 바 있다. 특히 전해 환원수 방호 메커니즘의 주요 인자인 수소 분자는 강한 산화력을 지닌 활성산소종을 선택적으로 제거함으로써[8] 항산화 과정 및 다양한 신호 전달 조절을 통해 항염증, 세포 자살의 억제 등 방사선 방호 효과들을 지니는 것으로 확인되었다[9].

현재까지 전해 환원수를 이용하여 엑스선 혹은 감마선에 대한 방호 효과를 확인한 선행 연구 사례는 없으나, 낮은 에너지의 방사선인 자외선에 대해 방호 효과가 확인된 점[10, 11]과 주요 방호 인자인 수소 분자가 방사선 방호 효과를 지닌다는 점[12, 13]에서 전해 환원수 역시 방사선 유도의 활성산소종을 제거함으로써 방호 효과를 지닐 것이라 예상하였다. 따라서 본 연구는 엑스선을 이용한 in vitro 실험을 통하여 전해 환원수의 방사선 방호 효과를 확인하고자 하였다.

본 연구에서는 전해 환원수가 Rat diencephalon cell과 Rat gliosarcoma cell에 대하여 독성을 띄는지를 확인한 다음 세 가지 end point를 통한 방사선 방호 효과를 확인하였다. 우선 DCFDA assay를 이용하여 전해 환원수 처리에 따른 세포 내 활성산소종의 정량적 평가를 실시하였으며, 방사선 유도의 활성산소종 생성에 의해 나타나는 세포 자살(Apoptosis) 비율을 Annexin V/7-AAD를 이용하여 확인하였다. 세포군집 형성능 실험 수행을 통해 전해 환원수 처리에 따른 세포 생존율과 선량 감소 인자를 확인함으로써 전해 환원수의 방사선 방호제로서의 사용 가능성을 탐색하고자 하였다. 이 때 다양한 엑스선 선량과 선량률, 그리고 에너지 조건에서 실험을 수행하여 조사 조건에 따른 방호 효과 차이를 확인하고자 하였다. 실험 결과를 통해 전해 환원수의 방사선 방호 효과와 엑스선 에너지

에 따른 효과 차이를 확인하였으며, 전해 환원수의 엑스선 방호 효과 유무를 확인한 연구로서 의미를 지닌다.

제 2 장 배경 이론

제 1 절 전리 방사선의 생물학적 영향

방사선 피폭은 방사선 에너지가 유기 분자, DNA 등에 직접 반응하는 직접 작용이나 물 분자의 이온화 및 여기로 생성된 활성산소종을 통한 간접 작용으로 인체에 위해를 가할 수 있다. 엑스선과 같은 낮은 LET(Linear Energy Transfer) 특성의 방사선은 활성산소종 매개의 간접 작용에 의한 손상 비율이 크다. 활성산소종의 경우 적정 농도에서는 신호 전달과 같은 긍정적인 역할을 수행하지만, 피폭에 의해 그 양이 과도해져 균형이 무너지면 산화 스트레스를 유발하고 이중나선절단(Double Strand Break, DSB)과 같은 손상을 일으킨다. 그로 인해 나타날 수 있는 결과는 주로 세포 증식능(Cellular reproductive integrity)의 상실로, 손상 정도가 커서 세포가 스스로 회복할 수 있는 능력을 넘어서면 세포 자살(Apoptosis)이나 세포 괴사(Necrosis)의 과정에 따라 세포 죽음(Cell death)으로 나타난다. DNA 손상이 일어나면 세포 내에서는 스스로를 보호하기 위하여 동시에 회복 과정이 일어나며, DNA 손상 회복이 성공적으로 일어나면 세포가 손상없이 생존할 수 있다. 하지만, 회복 과정이 실패하여 DNA 손상을 그대로 가진 채 생존하면 암 유발(Carcinogenesis), 돌연변이 유발(Mutagenesis), 혹은 2차적인 세포 자살 및 세포 괴사를 통한 세포 죽음이 나타날 수 있다. DNA 외에도 방사선은 지질(Lipid)이나 단백질 신호 체계와도 반응하여 전사인자(Transcription factor)의 활성화 등 다양한 메커니즘을 통하여 유전자 표현에 변형을 일으킬 수 있다[14]. 전리 방사선에 의한 신호 체계의 활성화는 세포 주기 조절, DNA 회복, 세포 자살 등 중요한 과정에 영향을 준다.

제 2 절 방사선 방호제 (Radioprotector)

방사선 방호제(Radioprotector)는 정상 조직과 세포에 대한 방사선의 영향을 감소시키는 물질로, 방사선 치료, 핵 시설 내 응용, 군사적 목적, 계획 피폭 상황 및 방사선 사고 상황 등 방사선의 원치 않는 영향 방호를 위해 연구 및 사용된다. Fig. 2.2와 같이 방사선의 생물학적 영향이 피폭 후 굉장히 빠른 시간 내에 이루어지기 때문에 방사선 방호제는 방사선 피폭 전 혹은 적어도 피폭 시점에 존재하여야 그 효과를 나타낼 수 있다. 전리 방사선의 경우 방사선의 간접적 영향이 큰 부분을 차지하기에 활성산소종과 같은 반응성이 큰 라디컬을 제거하는 것이 방호 측면에 있어 중요한 목적이자, 방사선 방호제의 필수 요건이다. 이 외에도 체내 자연적으로 생성되는 항산화제인 SOD(Superoxide dismutase), GSH(Glutathione)의 항산화 능력이나 Ascorbic acid, Thiols처럼 수소 원자 공여를 통한 자유 라디컬 제거 능력을 지녀야 방호제로서 역할을 수행할 수 있다[1]. 특히 방사선 피폭에 의해 생성되는 자유 라디컬들은 일반적인 산화 스트레스에서 발생하는 활성종에 비해 비교적 활성도가 높기 때문에 일반적인 항산화제보다 더 강한 방호 능력을 지녀야 한다.

합성 티올류 및 천연 항산화제 혼합물 등 다양한 종류의 방사선 방호제들이 탐색 및 개발되었으나, 현재까지 화학적 방호제인 Amifostine(WR-2721)만이 유일하게 FDA 승인을 받았다. Amifostine은 체내에서 WR-1065로 변환되어 작용하며, in vitro 및 in vivo 실험을 통해 다양한 종류의 방사선에 대한 방호 효과를 지님이 확인되었다[15]. 하지만 American Society of Clinical Oncology Guideline의 권고에 따라 200mg/m^2/d 정량을 방사선 조사 15~30분 전 정맥 내 주사(Intravenous injection)되어야 한다[3]는 한계와 비교적 강한 독성으로 인한 부작용(설사, 구토, 저혈압

등) 때문에 사용이 엄격하게 제한되고 있다. 따라서 독성을 최소화하면서 인체에 용인 가능한 투여 방식, 그리고 좋은 방호 효과를 지닌 방호제들을 탐색하여야 하며, 최근에는 다양한 천연 화합물의 방호 효과들이 연구되고 있다[4]. 방사선 방호제로 사용되기 위해서는 in vitro 및 in vivo 실험을 통해 다음과 같은 방호 메커니즘 및 효과를 보여야 한다[2].

1. 자유 라디컬(Free radical) 제거 능력
2. 체내 항산화제(SOD, GSH 등) 유도
3. DNA 손상 감소
4. 지질 과산화(Lipid peroxidation) 감소
5. 세포 생존율 향상
6. 세포 자살(Apoptosis) 비율 감소
7. 세포 주기(Cell cycle)에의 직접적 영향
8. 방사선 피폭 후 염증 반응의 감소

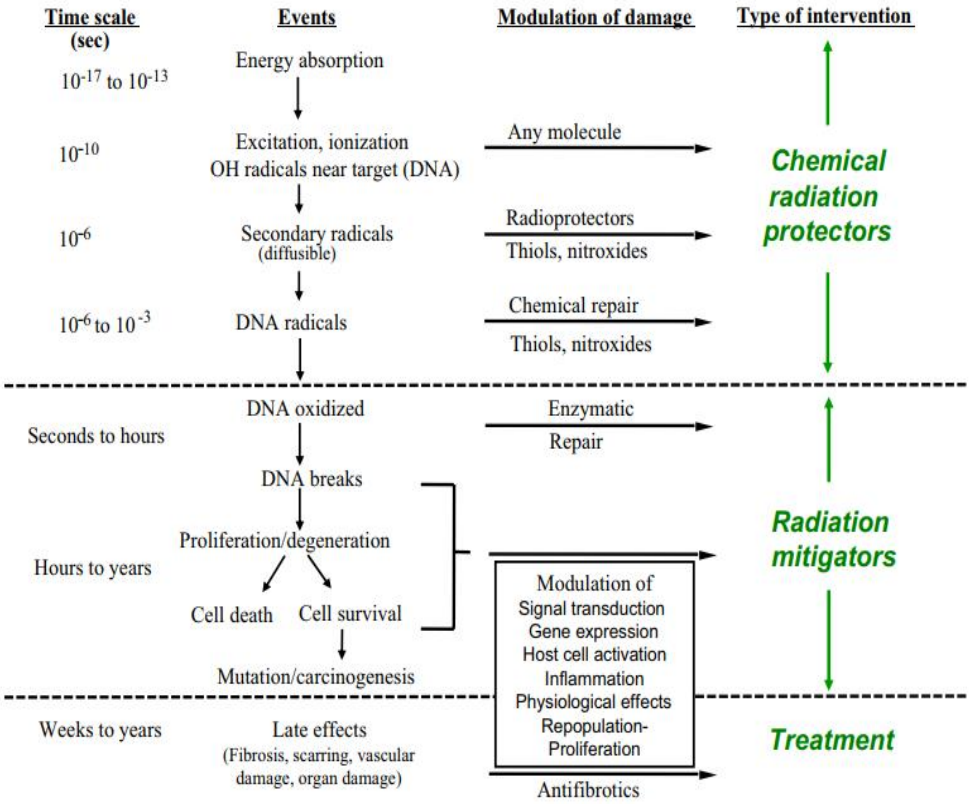

Fig. 2.2. 전리 방사선 피폭 후 시간에 따른 생물학적 영향과 방사선 방호제의 개입[1].

제 3 절 전해 환원수(Electrolyzed reduced water)의 방호 효과

전해 환원수(Electrolyzed reduced water, ERW)는 물의 전기 분해 중 음극에서 생성되는 물질로, 높은 pH 와 낮은 산화환원 퍼텐셜(Oxidation Reduction Potential, ORP) 값을 나타내는 강한 환원력을 지닌 물질이다. In vitro 및 in vivo 실험을 통해 전해 환원수가 다양한 외부 인자에 대한 방호 효과를 가짐이 확인되었다. 세포와 사람 혈액 샘플에 전해 환원수 처리 시 화학약품 H_2O_2 혹은 당뇨병 유발 물질인 Alloxan 유도의 활성산소종 생성이 억제되어 DNA 손상이 완화되고 세포 자살 비율이 감소하였다[7, 16, 17, 18]. 또한 암세포의 성장을 억제하는 항암효과가 확인되었고[19], 아토피 피부염 유도의 염증전 시토킨을 감소시키는 항염증 반응을 보였다[20]. 전리 방사선에 대한 효과는 확인된 바 없으나 자외선에 의해 생성되는 활성산소종을 감소시킴으로써 세포 자살의 억제, 생존 능력의 증가 등 방사선 방호 효과에 대한 가능성을 보였다[10, 11]. 아직까지 방호 효과에 대한 정확한 메커니즘이 밝혀진 바는 없지만, 전기 분해 세기에 따라 방호 효과가 증가했으며 그에 용존량이 비례하여 증가하는 수소 분자와 수소 원자, 그리고 소량의 백금 나노 입자에 기인한 것으로 추측하고 있다[7]. 위 세 가지 인자에 대한 방호 효과들은 다음과 같이 다양한 선행 연구들로부터 확인된 바 있다.

수소 분자(Hydrogen molecule, H_2)는 잠재적 방사선 방호 물질로, 인체에 독성이 없고 세포막을 쉽게 통과하여 미토콘드리아, 핵에 확산되기 쉽다는 장점을 지닌다. Ohsawa et al. (2007)의 연구를 통해 수소 분자가 활성산소종 중 산화력이 큰 Hydroxyl radical(·OH)과 Peroxynitrite(ONOO−)를 선택적으로 제거함이 밝혀진 후 이에 관한

연구들이 활발히 진행되었다[8]. 정확한 방호 메커니즘이 밝혀지지는 않았으나 선택적 항산화 과정과 신호 전달 조절 작용을 통한 항염증 작용, 세포 자살의 억제 등 방호 효과를 나타내는 것으로 추정된다[9]. 수소 분자가 실온에서 물에 최대한 용해될 수 있는 농도는 1.6 ppm으로, 0.8 ~ 1.2 ppm의 수소 분자가 용존된 용액(Hydrogen rich water)을 세포에 전처리한 후 방사선 조사 시 대조군 대비 활성산소종의 양이 감소하였다. 또한 체내 항산화방어기작을 수행하는 SOD, GSH의 활성도가 증가하였고, 산화 스트레스 손상 시 생성되는 독성 물질인 MDA와 DNA 손상의 부산물인 8-OHdG가 감소하여 수소 분자가 급성 산화 스트레스 영향을 감소시킬 수 있음이 확인되었다[12, 21, 22]. 그에 따라 세포 자살 관련 인자인 Caspase-3 등의 감소, bcl-2 등의 증가를 통해 세포 자살을 억제하였으며[23], 세포 생존율이 증가하였다[12, 13]. 쥐에 대한 Whole body irradiation (WBI)을 수행한 in vivo 실험에서도 수소 분자 용존 용액 처리 시 활성산소종의 감소 및 백혈구와 혈소판의 감소 그리고 생존율 증가가 나타났으며[21], 염증 조직의 손상이 억제되었다[24]. 실제 악성 간암으로 방사선 치료를 받는 환자들을 대상으로 수소 분자가 용존된 물을 6주간 음용하도록 한 결과 방사선 치료에 대한 암의 반응에 차이를 주지 않으면서 혈액 내 활성산소 대사 산물들이 감소하고 환자 삶의 질이 향상됨 또한 확인한 바 있다[25].

수소 원자(Atomic hydrogen, H)는 활성산소종에 의한 세포 죽음을 억제할 수 있다는 선행 연구가 보고된 바 있으며[26], 세포에 물 분자로 둘러싸인 수소 원자인 $H(H_2O)_m$의 전처리 후 자외선 조사 시 MMP-1, COX-2, IL-6, IL-1β 등 형질 발현과 활성산소종이 감소됨이 확인되었다[27]. In vivo 상에서도 자외선 피폭에 의해 나타나는 홍반과 Thymidine dimer을 감소시키는 항염증 효과를 가져 피부 광노화에 대한

방호 효과를 나타내었다.

전해 환원수의 고압 살균(Autoclaving)을 통해 기체 요소를 제거하였을 때에도 여전히 활성산소종 제거 효과가 나타났고 동일 농도의 수소 용존 용액과 비교했을 때 전해 환원수가 더 우수한 효과를 지닌다는 점에서 수소 분자 외의 방호 요소가 있을 것이라 추측되었다[7]. 이에 대하여 전해 환원수 내 포함된 다양한 원소들을 ICP-MS를 통해 분석하였고, 전기 분해 세기에 비례하여 그 양이 증가하는 백금 나노 입자를 그 요인으로써 추측하였다. 백금 나노 입자는 전기 분해 중 백금으로 코팅된 티타늄 전극에서 떨어져 나와 소량 함유된 것으로 확인되었다. 질량 대비 표면적이 넓은 백금류 입자는 환원제로서 사용되는데, 백금 나노 입자는 생물체 내 촉매 반응을 일으켜 활성산소종을 제거하는 항산화제로서의 역할을 수행할 수 있다고 알려져 있다[28]. 백금 나노 입자가 SOD나 Catalase를 모방하는 효과를 보임이 확인된 바 있으며[29], 자외선 유도 활성산소종의 감소를 통해 세포 죽음을 예방한 결과가 보고되기도 하였다[30]. 특히 암 세포의 성장을 억제하는 항암제로도 사용되는데, 저농도인 10^{-2} mg/l에서도 그 효과를 지니는 것이 확인되었다[31]. 그러나 전해 환원수 내 포함된 백금 나노 입자의 양이 0.1-2.5 ppb 정도의 매우 소량인 관계로 방호 효과에 직접적으로 관여하기보다는 ligand로써 간접적인 역할을 수행하는 것으로 추측하고 있다[7, 32]. 실제로 전해 환원수에 백금 나노 입자를 추가적으로 주입하였을 때 더 강한 환원 효과를 보임이 선행 연구로부터 확인되었다[32, 33].

제 3 장 대상 및 방법

제 1 절 세포 및 세포 배양

본 연구에서는 쥐의 정상 간뇌 세포인 Rat normal diencephalon cell [CRL-2005, ATCC, Manassas, VA, USA]과 신경 교종 세포인 Rat gliosarcoma cell [CRL-2200, ATCC, Manassas, VA, USA]을 사용하였다. 두 세포 모두 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) (GIBCO)을 보충한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (GIBCO, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 37 ℃, 10% CO_2 환경의 인큐베이터에서 배양되었다.

제 2 절 전해 환원수의 생성

30 V 전원 장치와 백금으로 코팅된 티타늄 전극을 이용하여 NaCl 0.5 M이 첨가된 증류수(MilliQ, Merck Millipore, Darmstadt, Germany)의 전기 분해를 통해 선행 연구와 동일한 방식으로 음극으로부터 전해 환원수를 얻었다. 전해 환원수는 초기 pH가 강한 염기성을 나타내어 세포에 직접 처리하기 적합치 않아 1시간동안 인큐베이터에서 보관하였고, 그에 따른 pH와 ORP의 변화는 Table 3.2와 같다. 산화환원력을 나타내는 값인 산화환원퍼텐셜(ORP)은 음의 값을 가질 때 환원력을 가지며 전해 환원수의 경우 강한 환원력을 지님을 알 수 있다. ORP가 pH에 의존하는 성질에 따라 인큐베이터 보관 후 값이 처음보다는 증가하였지만, 그럼에도 증류수 대비 큰 환원력을 지님을 확인할 수 있다. 모든 실험에서 ERW_{LV1} 조건의 전해 환원수를 세포 배양액과 1:1의 비율로 혼합하여 방사선 조사 전 30분간 전처리하였으며, 세포 군집 형성능 실험에서 전해 환원수 농도에 따른 방호 효과 차이를 확인할 때에만 전기 분해 시간을 2배로 하여 얻은 ERW_{LV2}를 추가적으로 사용하였다.

	pH	ORP
증류수	7.145 ± 0.245	214.4 ± 14.151 mV
전해 환원수	11.587 ± 0.156	− 586.75 ± 54.793 mV
1 시간동안 인큐베이터 보관한 전해 환원수 (ERW_{LV1})	7.522 ± 0.098	− 241.667 ± 13.642 mV
전기 분해 시간을 2 배로 하여 얻은 전해 환원수를 1 시간 동안 인큐베이터 보관한 경우(ERW_{LV2})	7.682 ± 0.076	− 296.667 ± 17.638 mV

Table 3.2. 증류수와 여러 조건에서 전해 환원수의 pH 및 ORP.

제 3 절 방사선 조사

방사선 조사는 서울대학교 방사선 생명공학 연구실의 엑스선 빔 튜브(Model 450-D08, YXLON, Germany)를 사용하여 수행하였다[34]. 본 실험에서는 엑스선 장치의 인가 전압 150 kVp에서의 선량률 1.01 Gy/min (전류 10 mA)과 0.16 Gy/min (전류 1.6 mA), 그리고 60 kVp에서 선량률 0.16 Gy/min (전류 10 mA) 조건에서 선량에 따른 세포 반응을 확인하였다. 다양한 에너지 영역에서 전해 환원수의 방호 효과 확인을 위해 80 kVp와 90 kVp 전압을 추가적으로 사용하였으며, 장치의 한계 상 60 kVp에서의 최대 전류 10 mA일 때 선량률 0.16 Gy/min에 맞추기 위해 각 전압에서의 전류를 조정하였다. 주로 사용된 전압 60 kVp와 150 kVp는 그림 3.3의 엑스선 스펙트럼에서 각각 최대 에너지를 60 keV와 150 keV를 가진 것으로 확인하였다.

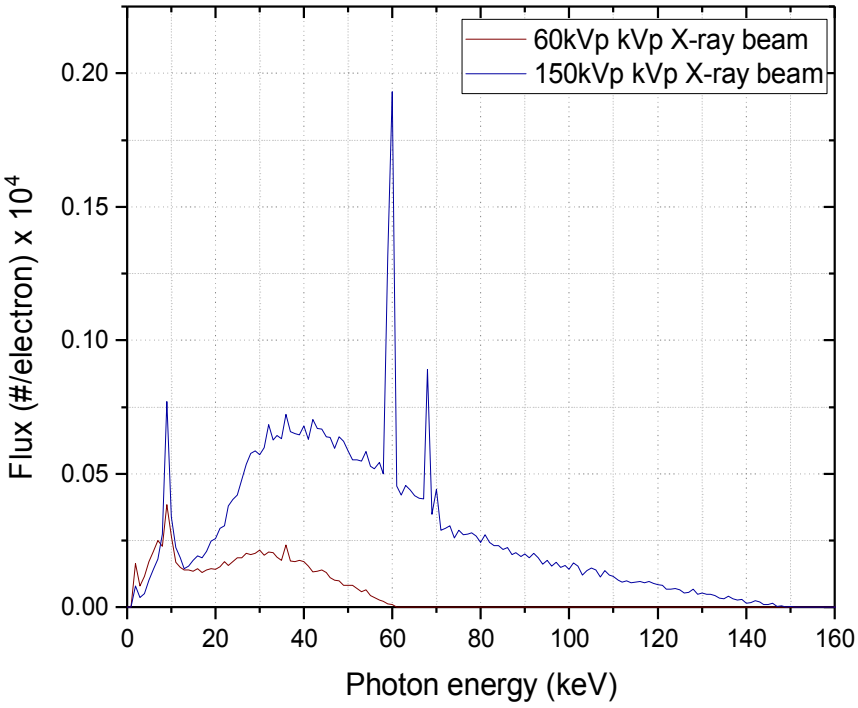

Fig. 3.3. YXLON model 450-D08 모델의 60 kVp와 150 kVp에서의 에너지 스펙트럼.

제 4 절 세포 내 활성산소종의 정량적 평가 (DCFDA assay)

화학약품 혹은 방사선 유도에 의해 생성되는 활성산소종의 경우 2’, 7’-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA)의 2’, 7’-dichlorofluorescein (DCF)로의 산화 과정을 이용하여 정량적 양을 탐색할 수 있다. 무형광의 DCFDA 혼합물은 활성산소종과 반응하여 형광성이 높은 물질인 DCF로 산화되며, 형광 분광법(Fluorescence spectroscopy)을 이용하여 구한 DCF의 형광량을 통해 활성산소종의 양을 측정할 수 있다.

본 실험은 Cellular ROS detection assay kit (ab113851, ABcam, Cambridge, UK)를 이용하여 수행하였다. Rat diencephalon cell과 Rat gliosarcoma cell에 10 μM의 DCFDA를 처리하여 15분간 인큐베이터에 보관한 후 전해 환원수를 30분간 처리하였고, 그 후 각 조건에서 방사선 조사를 수행하였다. 조사 후 20분간 인큐베이터에 보관한 뒤 서울대학교 공동기기원의 FACSAria-II (BD Bioscience, San Jose, CA, USA)를 이용하여 형광 분석을 시행하였다. DCF의 형광은 최대 여기 및 방출 스펙트럼 495 nm, 529 nm에서 확인하였으며, DCF의 형광량, 곧 활성산소종의 양은 형광량의 수치를 나타내는 RFU(Relative fluorescence unit)로 나타내었다. 방사선과 전해 환원수를 처리하지 않은 Control 값을 1000으로 정규화하였고, 각 조사 조건에 따른 DCF 평균 형광량의 비를 계산하여 나타내었다.

제 5 절 세포 자살 분석 (Apoptosis assay)

세포 자살은 Annexin V와 7-amino-actinomycin D (7-AAD) solution의 첨가를 통해 전체 세포에 대한 비율로 분석할 수 있다. 세포 자살 신호로써 세포 막 표면에 Phosphatidylserine(PS)가 외재화되면 이와 친화성이 큰 Annexin V를 부착시켜 세포 자살 진행 중인 세포 비율을 확인할 수 있다. 7-AAD의 경우 세포막이 붕괴되었을 때 세포 내 물질과 반응하기에 Dead cell marker로써 이용되며, 이와 반응할 경우 세포 자살 후기나 세포 죽음 단계인 것으로 구분해낼 수 있다. 따라서 Annexin V와 7-AAD의 원리에 따라 다음과 같이 세포 자살 단계를 구분한다.

1. Viable cells: Annexin V (-) and 7-AAD (-)

2. Early apoptotic cells: Annexin V (+) and 7-AAD (-)

3. Late apoptotic cells or dead by apoptotic mechanism: Annexin V (+) and 7-AAD (+)

4. Dead cells (not through the apoptotic pathway): Annexin V (-) and 7-AAD (+)

본 실험에서는 Muse® Annexin V and Dead Cell Assay Kit (MCH100105)를 사용하여 세포 자살 비율을 분석하였다. 전해 환원수를 30분 동안 전처리한 뒤 선량, 선량률 그리고 에너지 조건에 따라 엑스선을 조사하였다. 조사 후 세포를 인큐베이터에 24시간동안 배양하고 Annexin V/7-AAD solution을 처리하여 20분 동안 염색한 뒤 유동 계수법(Flow cytometry)을 이용한 Muse cell analyzer를 통해 세포 자살 비율을 확인하였다.

제 6 절 세포군집형성능 실험 (Clonogenic cell survival assay)

세포군집형성능은 단일 세포가 군집으로 성장해가는 능력에 근거하여 방사선 조사 후 세포의 증식 능력을 측정하는 실험 방식이다. 세포 죽음을 나타내는 가장 흔하고 중요한 특징은 '증식능(Reproductive integrity)의 상실'로, 단백질이나 DNA 합성 능력을 보유하더라도 한 두 번의 유사분열 후 더 이상 분열할 수 없는 세포는 죽은 것으로 간주한다. 반면 무기한으로 분열하고 증식하는 능력을 보유한 세포의 경우 큰 군집을 형성할 수 있는데, 이를 'Clonogenic(클론원성)'이라 부른다. 최소 50개의 세포들로 구성된 군집을 형성하는 단일 세포의 능력은 그 세포가 재생산하는 능력을 보유함을 의미하며, 군집의 수를 계수함으로써 증식능을 보유한 세포 비율을 확인할 수 있다.

방사선 조사를 하지 않은 대조군에서도 세포들이 seeding한 만큼 모두 군집을 형성하는 것은 아니기 때문에 아무 처리를 하지 않은 세포로부터 생성된 군집의 수를 측정하여 Plating efficiency(PE)로 잡고 값을 보정할 필요가 있다. Surviving fraction(SF)은 배양 접시에 seeding된 후 방사선 조사에도 증식능을 잃지 않고 군집으로 자라난 대조군에 대한 세포 비율로, PE와 SF는 다음 식 1, 2와 같이 계산할 수 있다.

$$\mathrm{PE} = \frac{\text{Number of colonies counted}}{\text{Number of cells plated}} \times 100\ (\%) \qquad (1)$$

$$\mathrm{SF} = \frac{\text{PE of treated sample}}{\text{PE of control}} \qquad (2)$$

본 연구에서는 조건 별로 계수된 세포들을 6-well plates(NUNC)에

seeding하고 6시간동안 인큐베이터에 보관하여 세포들이 plate에 완전히 부착되도록 하였다. 그 후 전해 환원수를 30분동안 전처리한 뒤 다양한 조건의 방사선을 조사하였다. 10일간 배양 후 형성된 군집을 계수하기 위해 에탄올으로 세포를 고정시키고 5 % Giemsa(Sigma-Aldrich) 용액으로 염색하였다. 전해 환원수 처리 유무에 따라 각각 방사선을 조사하지 않았을 때의 세포 생존율 비율을 1로 정규화하였고, 그에 따른 방사선 선량에 따른 세포 군집 형성능 비율을 구하여 비교하였다.

제 7 절 통계적 분석

실험 결과들은 '평균 값 ± 표준 오차'로 제시하였다. 전해 환원수의 방호 효과 확인을 위한 대조군과 전해 환원수 처리군의 결과 비교에는 통계적 분석의 Student's T-test 를 수행하였으며, 신뢰도 90%와 95%에 대하여 확인하였다. 그에 따라 확인된 유의 확률 p 값이 0.1 보다 작을 때(신뢰도 90%) 확연한 차이가 보이지만 유의미하지는 않은 것으로 판단하였으며, 0.05 보다 작을 때(신뢰도 95%) 유의미한 차이가 있다고 판단하였다.

제 4 장 결과 및 분석

제 1 절 전해 환원수의 세포에 대한 독성 확인

방사선 조사를 하지 않았을 때 전해 환원수 처리 유무를 달리하여 세포 생존력과 세포 증식능, 두 가지 측면에서 전해 환원수 자체의 독성 여부를 확인하였다.

Fig. 4.1 (a), (b)는 Rat diencephalon cell와 Rat gliosarcoma cell을 대상으로 방사선 조사를 하지 않았을 때 전해 환원수 처리에 따른 세포 생존력(Cell viability)을 비교한 결과이다. 앞서 확인한 Annexin V와 7-AAD의 원리에 따라 두 시약에 반응하지 않는 세포를 Viable cell으로 분류하여 세포 seeding 후 24시간 뒤 세포 생존력을 확인하였다. 전해 환원수 처리 시 전반적으로 세포 생존력이 감소하였으나, T-test 결과 Rat diencephalon cell에서는 유의미한 차이가 없었고 Rat gliosarcoma cell의 경우 유의미한 독성 효과를 나타내는 것으로 확인되었다. Fig. 4.1 (c), (d)는 방사선 조사를 하지 않았을 때 전해 환원수 처리에 따른 세포 생존율(Clonogenic cell survival)을 비교한 결과이다. 대조군의 생존율을 1로 정규화한 뒤 그에 따른 전해 환원수 처리군의 비율을 계산하였으며, 이 때 생존율은 세포의 증식능을 뜻한다. 앞선 결과와 마찬가지로 전해 환원수 처리에 의한 전반적인 세포 생존율 감소는 나타났지만, Rat diencephalon cell에서는 유의미한 차이가 없었고 Rat gliosarcoma cell에 유의미한 독성 효과를 지닌 것으로 확인되었다.

Fig. 4.1.2는 기존 농도의 전해 환원수에서 전기 분해 시간을 2배로 하여 얻은 더 높은 농도의 전해 환원수, ERW_{LV2}에 대하여 위와 같은 방식으

로 세포 생존력 및 증식력 측면에서 독성 평가를 실시한 결과이다. 마찬가지로 Rat diencephalon cell에서는 유의미한 독성이 없는 반면, Rat gliosarcoma cell에 유의미한 독성 효과를 나타냈다. 이 때 ERW_{LV1}에 비하여 생존력 및 증식력이 다소 감소하기는 하였으나 그 차이는 유의미하지 않았다.

전해 환원수가 Rat gliosarcoma cell에서 독성 효과를 보이는 것은 전해 환원수가 암 세포의 세포 생존율을 억제한다는 선행 연구들과 일치한다. 전해 환원수는 암 세포 내 활성산소종을 제거함으로써 암 세포의 생장을 억제한다는 사실이 in vitro 실험들을 통해 확인된 바 있다[35, 36]. 방사선 조사와 관계없이 전해 환원수가 정상 세포에서는 독성을 띄지 않으면서 암 세포에만 독성 효과를 나타내는 것은 방사선 진단 및 치료 부분에서 장점으로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

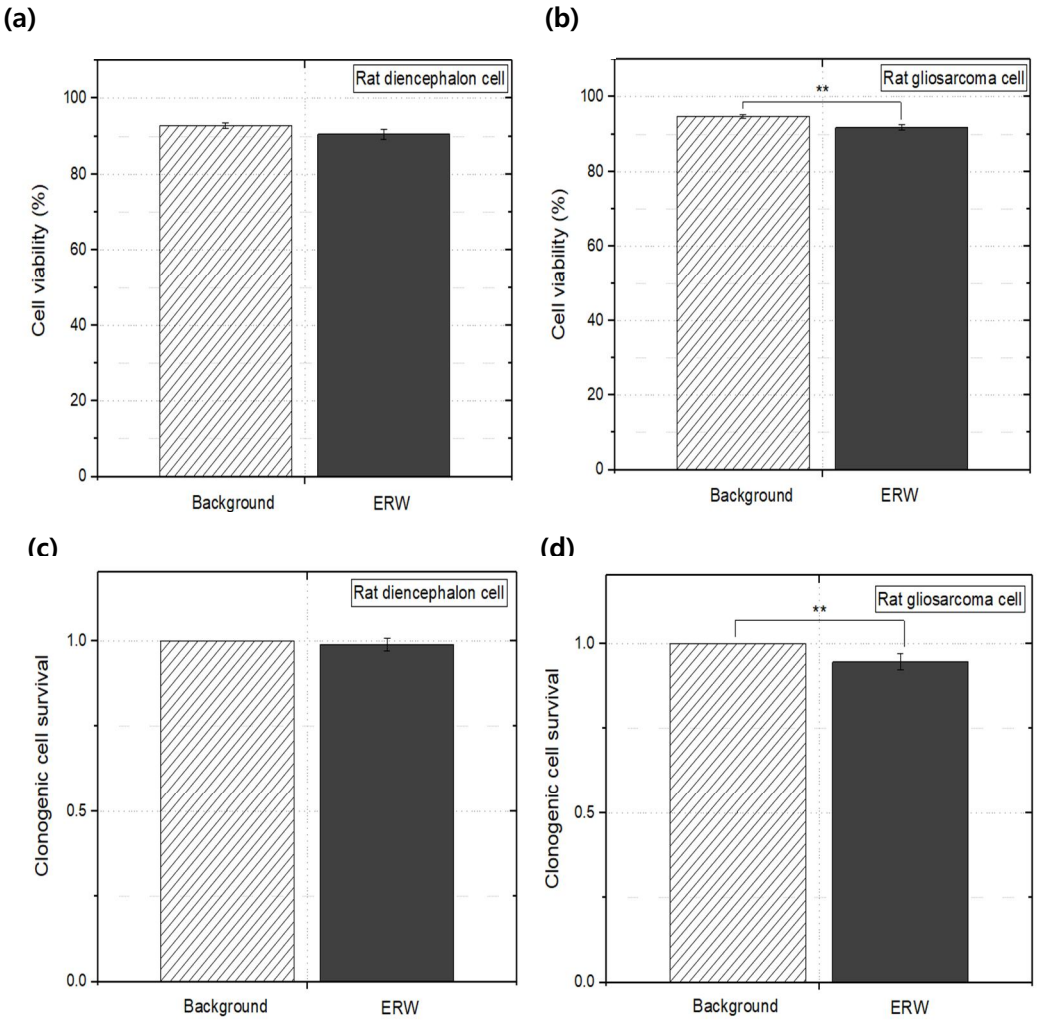

Fig. 4.1.1. 세포 배양액에 전해 환원수의 처리 유무를 달리하였을 때 (a) Rat diencephalon cell, (b) Rat gliosarcoma cell에서의 Annexin V와 7-AAD에 반응하지 않는 viable cell 비율, (c) Rat diencephalon cell, (d) Rat gliosarcoma cell에서의 세포 군집 형성능 비율. ** P value < 0.05.

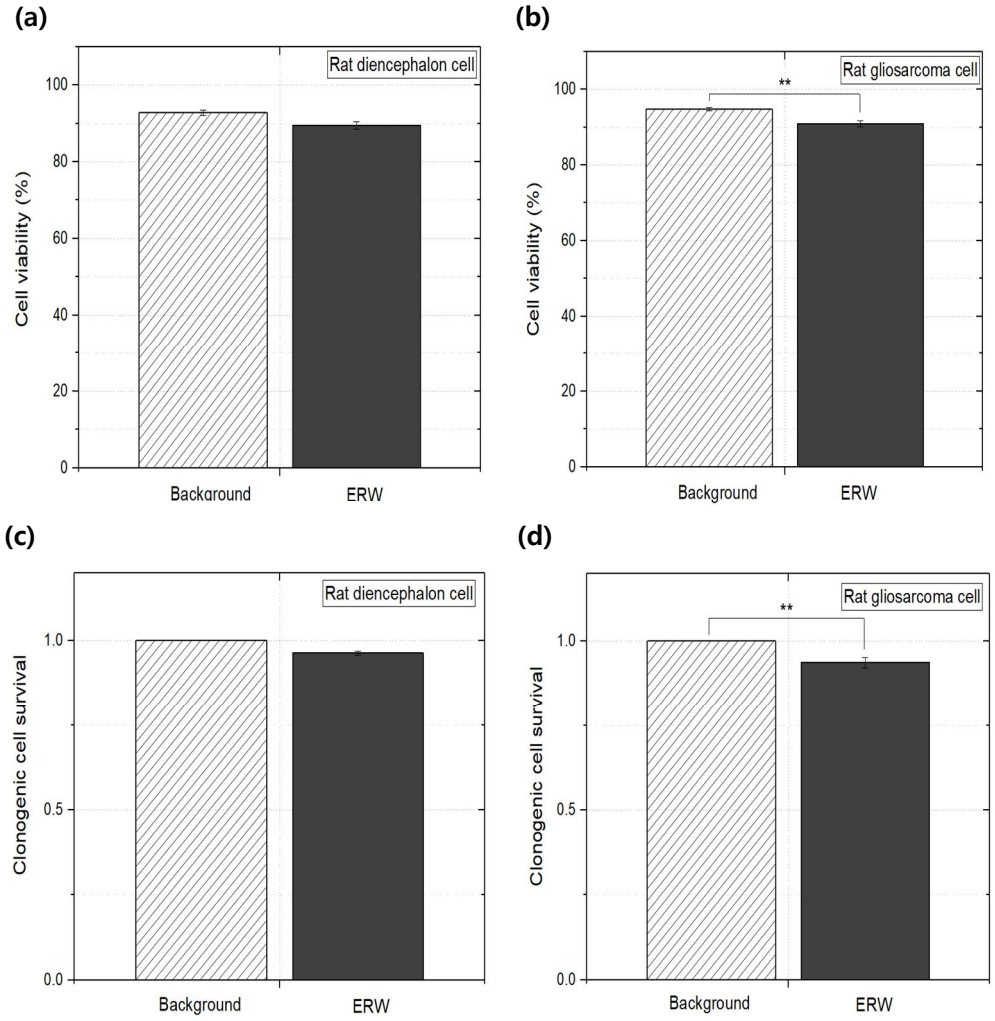

Fig. 4.1.2. 세포 배양액에 높은 농도의 전해 환원수(ERW_{LV2})의 처리 유무를 달리하였을 때 (a) Rat diencephalon cell, (b) Rat gliosarcoma cell에서의 Annexin V와 7-AAD에 반응하지 않는 viable cell 비율, (c) Rat diencephalon cell, (d) Rat gliosarcoma cell에서의 세포 군집 형성능 비율. ** P value < 0.05.

제 2 절 세포 내 활성산소종의 정량적 평가 결과

활성산소종의 제거 능력은 방사선 방호제의 필수 요건으로, 본 실험은 전해 환원수가 방사선 피폭에 의해 생성된 세포 내 활성산소종의 양을 감소시켜 방호 효과를 지닐 수 있는지를 확인해보고자 수행하였다.

Fig. 4.2.1의 전해 환원수를 처리하지 않은 대조군 결과를 통해 동일 선량 및 선량률에서 서로 다른 최대 에너지를 가진 엑스선 전압 조사 시 전압간 활성산소종 생성량에는 유의미한 차이가 없음이 확인되었다. 그러나 150 kVp보다 60 kVp 조건에서 비교적 활성산소종 생성량이 더 많았으며, 엑스선 전압이 작을수록 활성산소종 생성량이 많아지는 경향은 Rat diencephalon cell에서 더 확연하게 나타났다. 이는 저에너지 방사선에서 컴프턴 반응보다 광전 효과의 확률이 증가하여 2차 전자의 에너지 스펙트럼 변형이 일어나 방사선 유도의 생물학적 영향 차이가 나타난 것으로 추측된다. 저에너지 광자의 광전 효과에 따라 생성되는 2차 전자의 경우 낮은 에너지를 가지며, 전자는 에너지가 낮을수록 큰 LET를 가진다. 따라서 낮은 에너지의 광자가 높은 에너지의 광자보다 더 큰 생물학적 영향을 지닐 수 있음이 다양한 선행 연구의 염색체 이상이나 세포군집형성능 실험 및 몬테칼로 시뮬레이션을 통해 제시되었다[37, 38]. 따라서 본 실험 결과는 이러한 선행 연구들과 일관성이 나타난 것으로 볼 수 있다. 또한 Fig. 4.2.2를 통해 동일 전압 및 선량률에서 1 Gy와 4 Gy 비교 시 활성산소종의 생성량이 엑스선 선량에 의존한다는 선행 연구와 일치함을 확인하였고[39, 40], Fig. 4.2.3을 통해 동일 전압 및 선량에서 선량률에 따른 활성산소종 생성량은 유의미한 차이가 없음을 확인하였다.

전해 환원수의 엑스선 유도 활성산소종 생성에 대한 효과는 다음과 같다. 우선 각 세포에서 방사선 조사를 하지 않았을 때 전해 환원수를 처리할

경우 대조군 대비 활성산소종의 양이 감소됨을 확인하였다. 세포는 기본적으로 적정 농도의 활성산소종을 지니며 이를 전해 환원수가 일부 감소시키는 것으로 보인다. Rat diencephalon cell에서 그 감소율은 15.8%, Rat gliosarcoma cell에서의 감소율은 20.9%로 확인되었으며, T-test 결과 Rat gliosarcoma cell에서만 유의미한 차이를 보였다. 암세포는 세포 자체에서 활성산소종을 생성하여 그를 매개로 생장하는데, 전해 환원수가 이를 제거함으로써 암 세포 성장을 억제하여 항암 효과를 지니는 것으로 보이며 선행 연구와 그 결과가 일치함을 확인하였다. 따라서 대조군에서의 전해 환원수 처리에 따른 암 세포의 유의미한 활성산소종 감소는 이와 같은 맥락으로 이해된다. 엑스선 조사 조건에서도 전해 환원수 처리 시 대조군 대비 전반적으로 세포 내 활성산소종의 양이 감소함이 확인되었다. Fig. 4.2.1(a)에서 Rat diencephalon cell에 대한 동일 선량률 0.16 Gy/min 및 선량 1 Gy에서 서로 다른 최대 에너지를 가진 전압 조건을 비교하였을 때 60 kVp에서 49.2%, 80 kVp에서 46.0%, 90 kVp에서 39.7% 그리고 150 kVp에서 31.1%가 나타나 엑스선의 에너지가 낮을수록 전해 환원수에 의한 활성산소종의 감소율이 더 큼을 확인하였다. T-test 수행 시에도 저에너지 영역대인 60, 80, 90 kVp에서만 유의미한 차이를 보였다. Rat gliosarcoma cell을 대상으로 동일하게 수행한 Fig. 4.2.1 (b)에서는 60 kVp에서 24.0%, 80 kVp에서 15.6%, 90 kVp에서 11.0% 그리고 150 kVp에서 11.0%의 감소율을 보여 마찬가지로 저에너지의 엑스선 전압에서 전해 환원수에 의한 활성산소종의 감소율이 더 큼과 전반적으로 Rat diencephalon cell에서의 감소율보다 낮음을 확인하였다. T-test 수행 시에는 60 kVp 조건에서만 유의미한 차이를 보였다. Fig. 4.2.2에서는 동일 전압 150 kVp 및 선량률 1.01 Gy/min에서 서로 다른 선량을 조사하여 전해 환원수의 효과를 확인하였다. (a) Rat diencephalon cell에서 1 Gy 조사 시 32.6%, 4 Gy 조사 시 21.6%가 감소되어 저선량에서 비교적 감소율이 높았으며, (b) Rat

gliosarcoma cell에서는 1 Gy 조사 시 9.1%, 4 Gy 조사 시 9.9%가 감소하여 감소율 간의 차이가 없었다. Fig. 4.2.3에서는 동일 전압 150 kVp 및 선량 1 Gy에 대하여 서로 다른 선량률을 조사하였을 때 실험 결과를 확인하였다. (a) Rat diencephalon cell에 대하여 0.16 Gy/min에서 31.1%, 1.01 Gy/min에서 32.6% 감소하였고, (b) Rat gliosarcoma cell에 대하여 0.16 Gy/min에서 11.0%, 1.01 Gy/min에서 9.1% 감소하여 선량률 간의 감소율 차이는 없는 것으로 확인되었다. Fig. 4.2.2 ~ 4.2.3은 높은 최대 에너지의 전압 150 kVp에서 수행된 실험으로 Fig. 4.2.1에서 확인한 바와 같이 전해 환원수 처리에 따른 유의미한 효과는 나타나지 않았다.

따라서 전해 환원수는 방사선 유도의 세포 내 활성산소종 양을 감소시킴으로써 방사선 방호 효과를 지닐 수 있음과 동일 선량률 및 선량에서 저에너지의 엑스선일수록 활성산소종 감소 비율이 더 큼을 확인하였다.

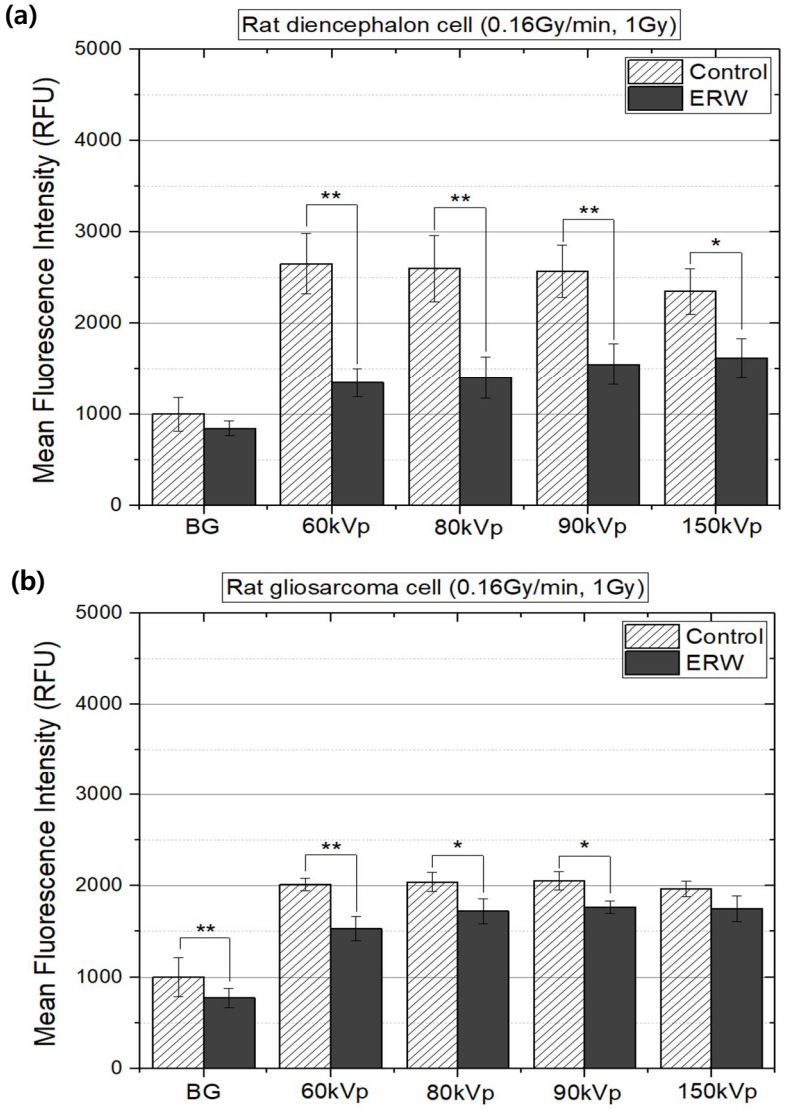

Fig. 4.2.1. (a) Rat diencephalon cell, (b) Rat gliosarcoma cell에 동일 선량률 0.16 Gy/min 및 선량 1 Gy에서 서로 다른 최대 에너지를 가진 전압 60, 80, 90, 그리고 150 kVp 조건의 엑스선 조사 시 전해 환원수 처리 유무에 따른 DCF 평균 세기의 비교. * P value < 0.1, ** P value < 0.05.

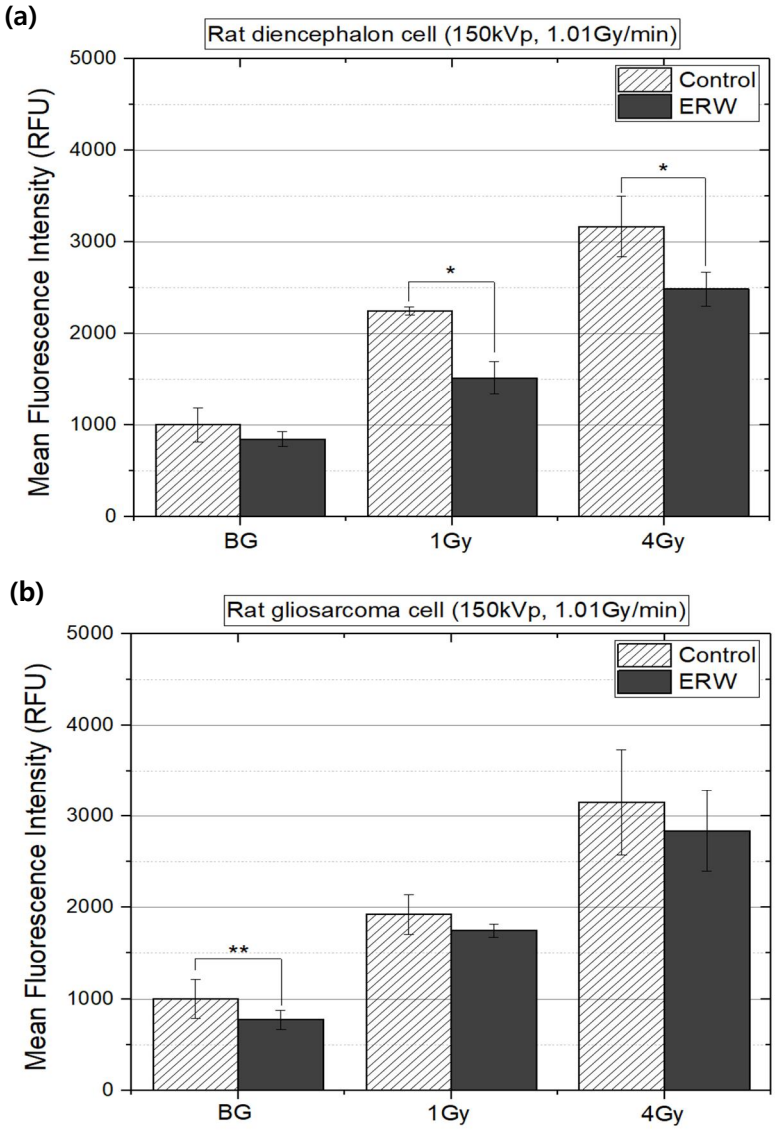

Fig. 4.2.2. (a) Rat diencephalon cell, (b) Rat gliosarcoma cell에 동일 전압 150 kVp 및 선량률 1.01 Gy/min에서 서로 다른 선량 1 Gy와 4 Gy 조건의 엑스선 조사 시 전해 환원수 처리 유무에 따른 DCF 평균 세기의 비교. * P value < 0.1, ** P value < 0.05.

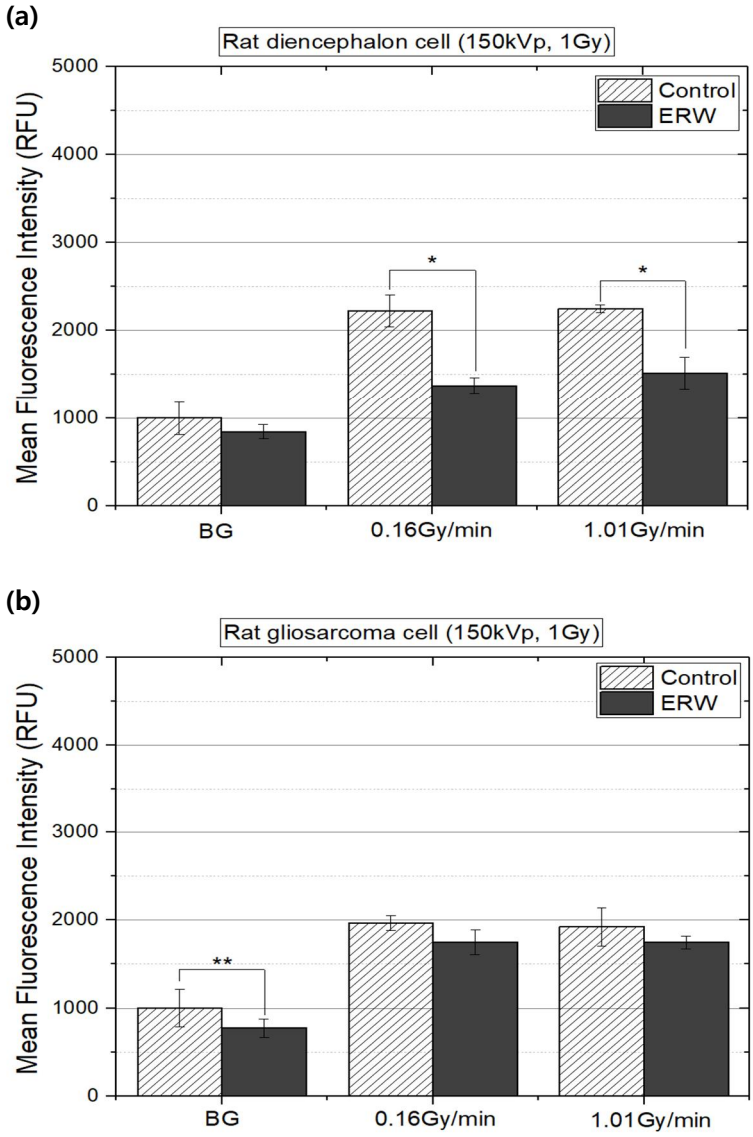

Fig. 4.2.3. (a) Rat diencephalon cell, (b) Rat gliosarcoma cell에 동일 전압 150 kVp 및 선량 1 Gy에서 서로 다른 선량률 0.16 Gy/min와 1.01 Gy/min 조건의 엑스선 조사 시 전해 환원수 처리 유무에 따른 DCF 평균 세기의 비교. * P value < 0.1, ** P value < 0.05.

제 3 절 세포 자살 분석 결과

세포 자살은 방사선 피폭과 같은 외부 자극에 의해 유전적 변형이 일어나 암이나 돌연변이가 유발되는 것을 막고자 일어나는 계획된 세포 죽음(Programmed cell death)이다[41]. Amifostine, Isofraxidin 등을 이용하여 실험을 수행한 선행 연구들로부터 방사선 방호제는 방사선 피폭에 따라 활성산소종 제거를 통해 세포 자살을 억제시키는 것으로 확인되었다[42]. 따라서 전해 환원수 처리를 통해 세포 자살 비율이 감소할 것을 예측하며 본 실험을 수행하였다.

Fig. 4.3.1의 Rat diencephalon cell 대조군에서 낮은 최대 에너지의 60 kVp에서 150 kVp보다 세포 자살 비율이 더 높게 나타난 것은 앞선 활성산소종 실험 결과와 같이 동일 선량 및 선량률에서 광자의 에너지가 낮을수록 생물학적 영향이 더 크게 나타난 것으로 그 경향성이 일치함을 확인할 수 있다. 또한 Fig. 4.3.3 (a), (b)의 대조군에서 선량과 선량률에 따라 세포 자살 비율이 증가함을 확인하였다. 이는 세포 자살 비율이 방사선 선량에 의존함[43]과 높은 선량률에서 세포 자살 비율이 큼[44]을 확인한 선행 연구들과 일치한다. 반면 Fig. 4.3.2와 4.3.3 (c), (d)를 통해 확인한 Rat gliosarcoma cell의 결과들은 Rat diencephalon cell과 달리 세포 자살 비율에서 방사선 선량이나 선량률에 대해 뚜렷한 경향성이 확인되지 않았으며, 그 비율이 7-10 % 내로 비슷한 값을 가짐을 확인하였다. 이는 낮은 방사선 민감도(Radiosensitivity)를 가지는 세포일수록 선량 및 시간과 관계없이 세포 자살 비율이 크게 변하지 않음을 확인한 선행연구로부터 그 이유를 추측할 수 있다[45]. 위 선행 연구에서 세포의 방사선 민감도에 따라 세포 자살 비율이 다른 형태로 나타날 수 있음이 확인되었으며, 따라서 낮은 방사선 민감도를 지닌 Rat gliosarcoma cell은 방사선 유도 세포 자살 비율이

대조군 대비 큰 변화가 없는 것으로 추측된다. 전반적으로 Rat diencephalon cell에서 Rat glosarcoma cell보다 세포 자살 비율이 높게 나타난 결과 또한 세포간의 방사선 민감도의 차이에 따른 것으로 확인된다.

방사선을 조사하지 않았을 때 전해 환원수 처리 시 대조군 대비 세포 자살 비율이 유의미하게 증가하였음이 확인되었다. 이는 전해 환원수가 세포에 영향을 줄 수 있는 외부 인자로 인식되어 그에 세포가 스스로를 보호하기 위한 방어 작용으로서 세포 자살이 일어난 것으로 추측된다. Fig. 4.3.1 ~ 4.3.2는 Rat diencephalon cell와 Rat glosarcoma cell에 동일 선량률 0.16 Gy/min 및 선량 (a) 1 Gy, (b) 4 Gy에서 서로 다른 최대 에너지의 전압 60 kVp와 150 kVp 조사 시 전해 환원수 처리에 따른 세포 자살 비율 결과이다. 두 세포에서 모두 전해 환원수 처리 시 대조군에 비해 전반적으로 세포 자살 비율이 감소하였으나, 더 낮은 최대 에너지를 가진 전압 60 kVp에서만 유의미한 감소가 나타났다. Fig. 4.3.3은 두 세포에 대해 동일 전압 150 kVp의 선량 1 Gy와 4 Gy에서 선량률을 0.16 Gy/min과 1.01 Gy/min로 달리하여 확인한 결과이다. 높은 최대 에너지의 전압 150 kVp에서 조사되어 (a), (b)의 Rat diencephalon cell의 경우 확연한 감소가 나타났지만 유의미한 차이는 아닌 것으로 판단되며, (c), (d)의 Rat gliosarcoma cell의 경우 대조군 대비 큰 차이가 보이지 않았다. 이 때 선량 및 선량률에 따른 감소율의 차이는 확인되지 않았다.

전해 환원수 처리에 따른 세포 자살 비율 감소 경향성은 앞선 활성산소종의 정량적 평가 실험에서 확인한 활성산소종 제거에 따른 후속 반응으로써 기대할 수 있다. 특히 낮은 에너지에서 세포 자살 비율의 감소율이 큰 특이점 또한 활성산소종 감소율 경향과 같음이 확인되었다. 따라서 본 실험의 전해 환원수 처리에 따른 세포 자살 비율 감소 효과는 전해 환원수가 활성산소종을 제거함으로써 나타나는 결과로 이해될 수 있다.

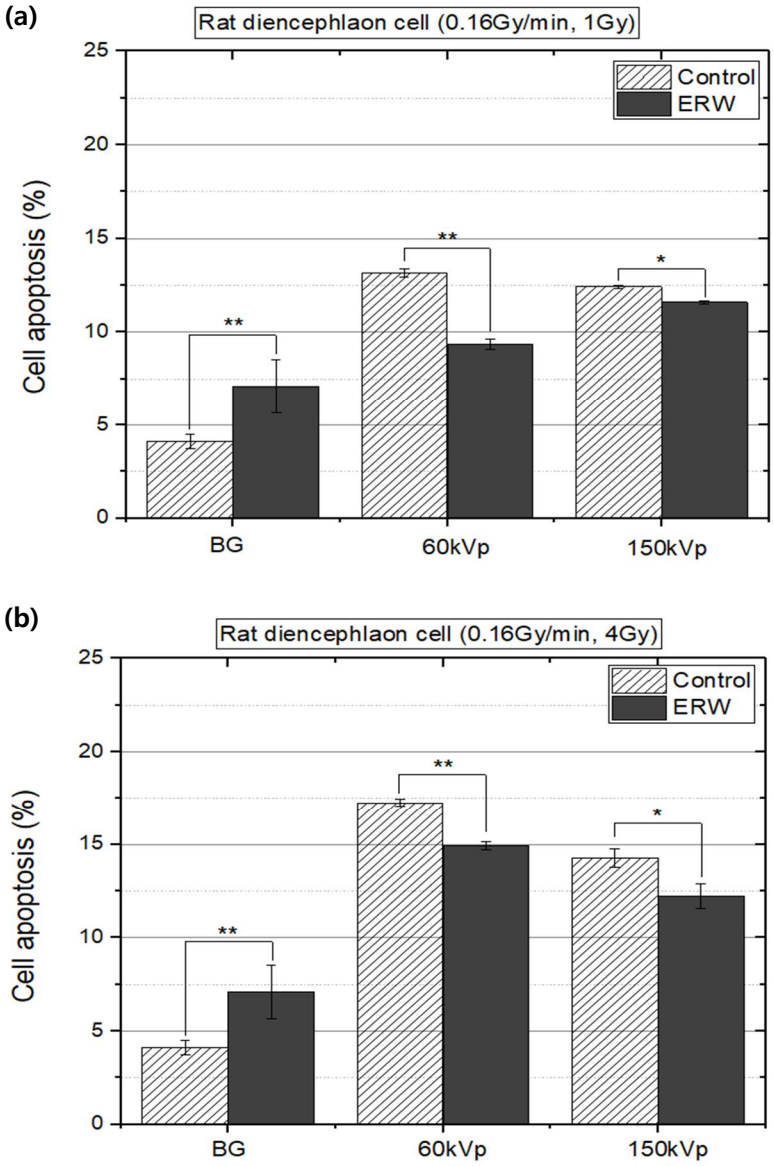

Fig. 4.3.1. Rat diencephalon cell에 동일 선량률 0.16 Gy/min 및 선량 (a) 1 Gy, (b) 4 Gy 엑스선 조사 조건에서 전해 환원수 처리를 달리하였을 때 서로 다른 최대 에너지의 전압 60 kVp와 150 kVp 조건에 따른 세포 자살 비율의 비교. * P value < 0.1, ** P value < 0.05.

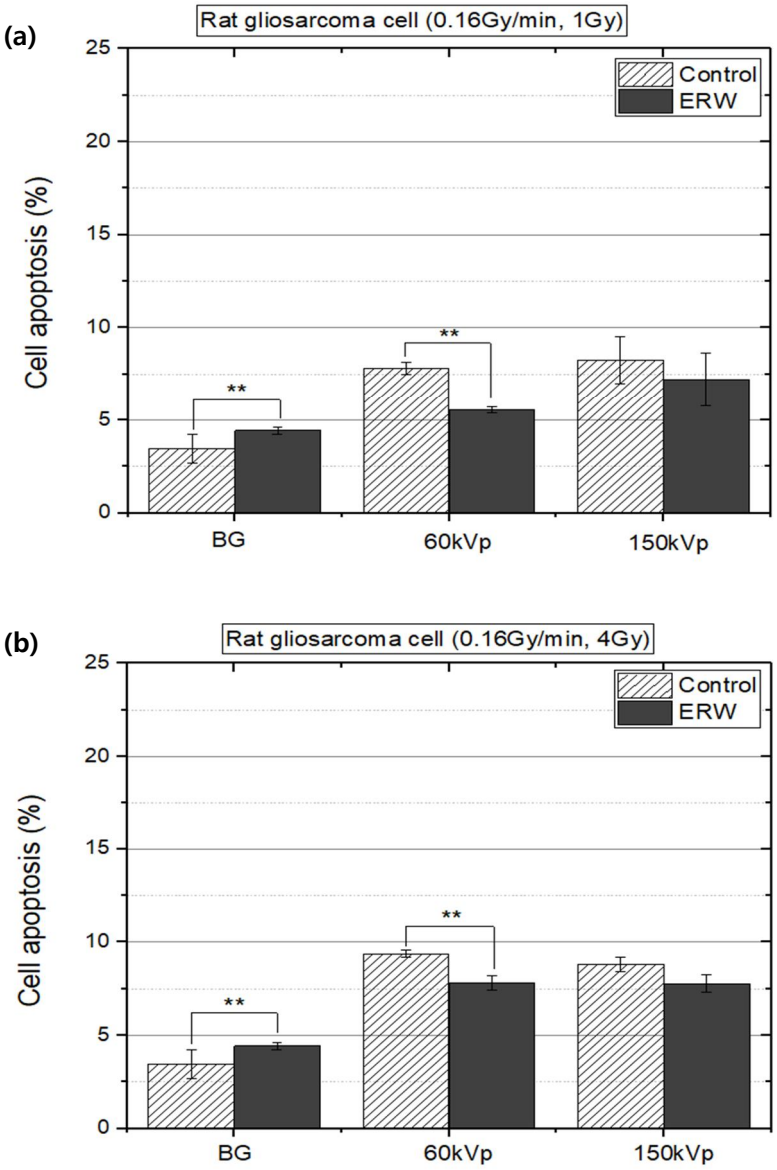

Fig. 4.3.2. Rat gliosarcoma cell에 동일 선량률 0.16 Gy/min 및 선량 (a) 1 Gy, (b) 4 Gy 엑스선 조사 조건에서 전해 환원수 처리를 달리하였을 때 서로 다른 최대 에너지의 전압 60 kVp와 150 kVp 조건에 따른 세포 자살 비율의 비교. * P value < 0.1, ** P value < 0.05.

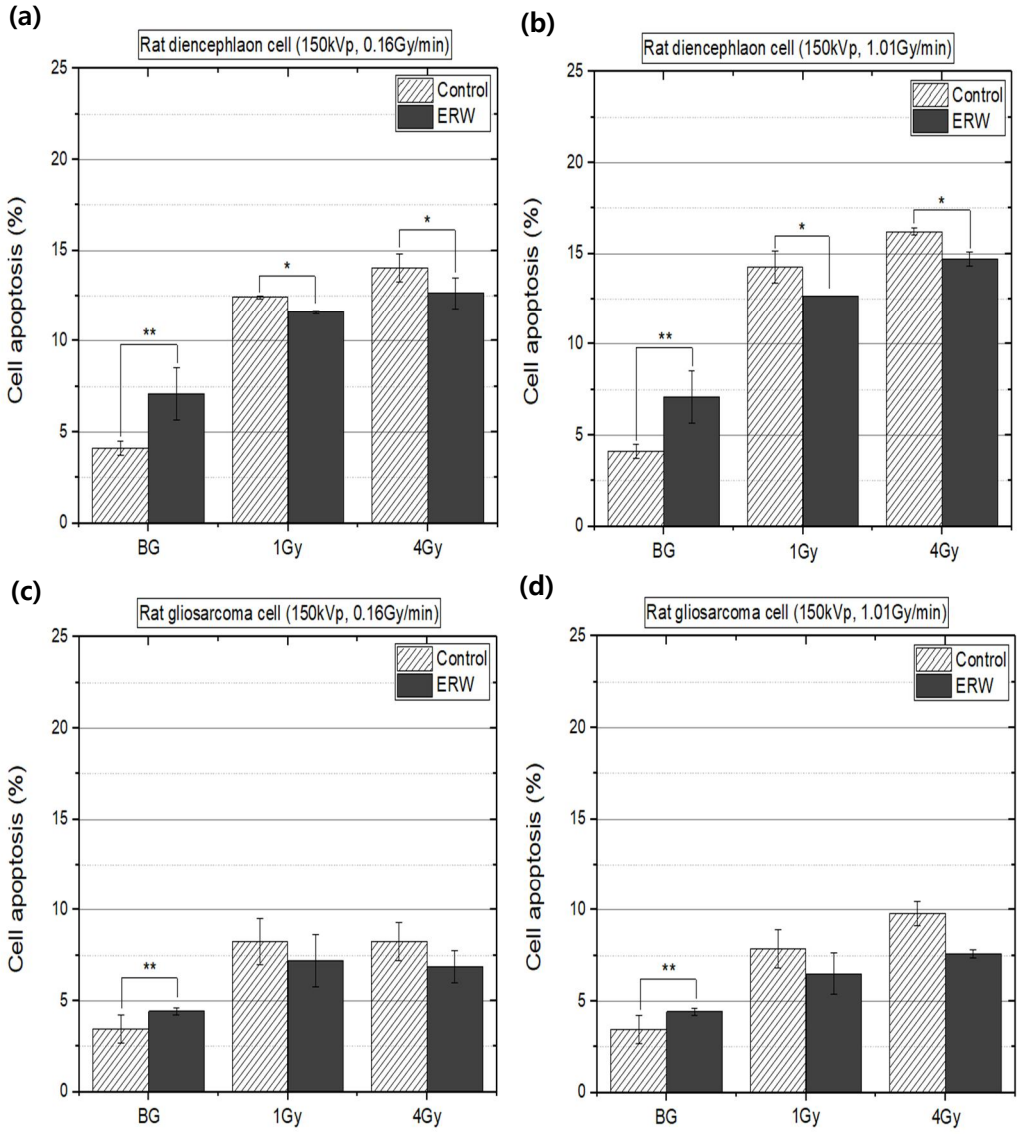

Fig. 4.3.3. Rat diencephalon cell(a, b)와 Rat gliosarcoma cell(c, d)에 대하여 동일 전압 150 kVp에서 선량률을 0.16 Gy/min(a, c)과 1.01 Gy/min(b, d)으로 달리하여 전해 환원수를 처리하였을 때 세포 자살 비율의 비교. * P value < 0.1, ** P value < 0.05.

제 4 절 세포군집형성능 실험 결과

각 조사 조건에서 방사선 선량에 따른 세포 생존율은 식 3과 같이 Linear Quadratic(LQ) 모델에 근거하여 세포 생존율 그래프로 확인할 수 있다. 이 때 D는 방사선 선량으로, α와 β는 각각 저선량, 고선량에서의 생존 곡선 기울기를 결정한다.

$$\text{Surviving Fraction (SF)} = \exp(-(\alpha D + \beta D^2)) \qquad (3)$$

Fig. 4.4.1 ~ 4.4.5는 Rat diencephalon cell과 Rat gliosarcoma cell을 대상으로 전해 환원수 처리 유무에 따른 방사선 조사 조건에서의 세포군집형성능 실험을 수행한 결과이다. 전해 환원수 처리 시 대조군에 비해 세포 생존율이 전반적으로 증가하였으나, Fig. 4.4.1 ~ 4.4.2와 같이 더 낮은 최대 에너지를 가진 60 kVp 조건에서 생존율이 유의미하게 증가하였다. Fig. 4.4.3 ~ 4.4.4와 같이 150 kVp에서 선량률을 달리하였을 경우 방호 효과는 큰 차이가 없음을 확인하였다. Fig. 4.4.5는 60 kVp, 0.16 Gy/min 조사 조건에서 전해 환원수의 농도를 ERW_{LV1}, ERW_{LV2}로 달리하였을 때의 결과로, 더 높은 농도의 ERW_{LV2} 처리 시 세포 생존율이 ERW_{LV1} 처리보다 전반적으로 증가함을 확인하였다. 그러나 Rat gliosarcoma cell의 경우 ERW_{LV1}, ERW_{LV2} 간의 효과 차이가 없는 것으로 확인된다.

Fig. 4.4.6 ~ 4.4.7은 방사선 방호제의 효과성을 나타내는 지표인 선량 감소 인자 (Dose Reduction Factor, DRF)를 식 4와 같이 계산한 결과이다. 선량 감소 인자는 방호제 유무에 따라 같은 위해를 가할 수 있는 방사선 선량의 비로, 1 이상의 값을 가질 시 방호 효과가 있는 것으로 판단한다. 본 연구에서는 위해 정도를 각 그래프에서의 10%의 생존율로 지정하여 계산하였다.

$$DRF = \frac{\text{Dose of radiation in presence of drug}}{\text{Dose of radiation in absence of drug}} \text{ for same lethality} \qquad (4)$$

Fig. 4.4.6은 Fig. 4.4.1 ~ 4.4.4를 바탕으로 각 조사 조건에서 구한 선량 감소 인자의 비교 그래프이다. 두 세포 모두 60 kVp 조건에서 150 kVp 보다 더 높은 선량 감소 인자를 가져 더 좋은 방호 효과를 나타내었으며, Rat gliosarcoma cell의 경우 Rat diencephalon cell보다 선량 감소 인자가 다소 낮음을 확인하였다. Fig. 4.4.7는 Fig. 4.4.5의 선량 감소 인자 값으로 전해 환원수의 농도를 높인 ERW_{LV2} 에서 더 높은 선량 감소 인자를 가짐을 확인하였다. 따라서 낮은 에너지의 엑스선 조건에서 전해 환원수의 농도가 높을 때 더 좋은 방호 효과를 나타낼 수 있을 것이라 추측된다.

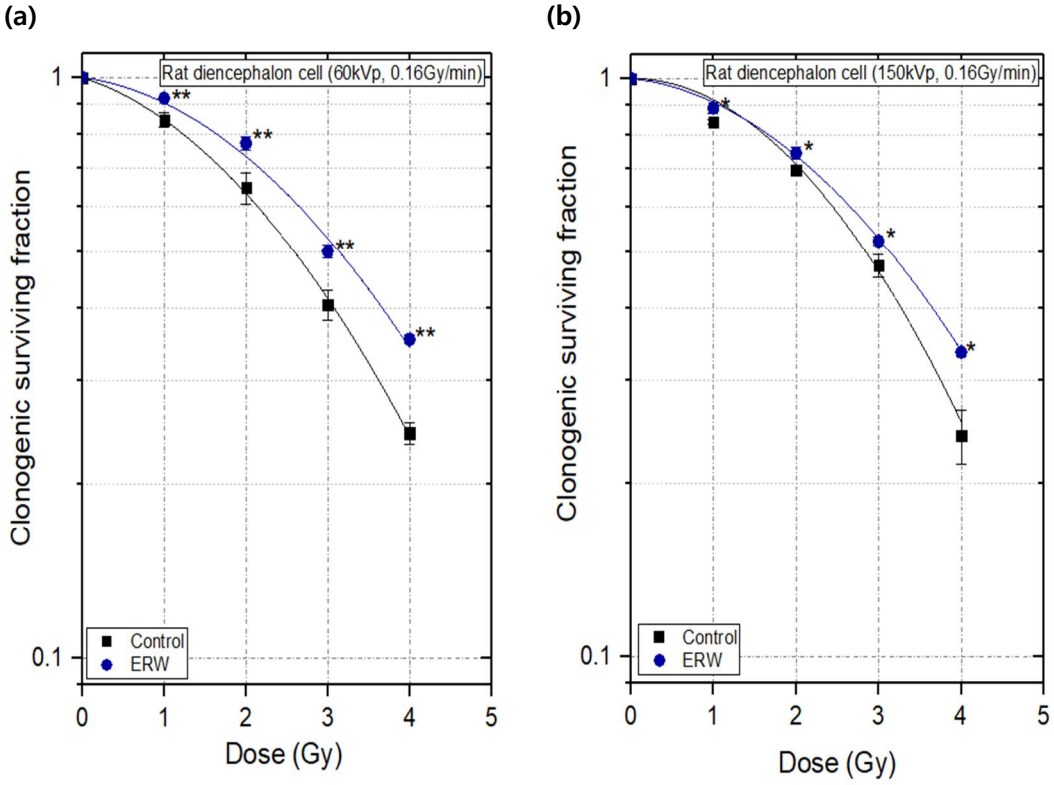

Fig. 4.4.1. Rat diencephalon cell에 동일 선량률 0.16 Gy/min에서 서로 다른 최대 에너지를 가진 전압 (a) 60 kVp, (b) 150 kVp 조건의 엑스선 조사 시 전해 환원수 처리 유무에 따른 세포 생존율 곡선. 이 때 error bar는 4~6세트 수행된 실험 결과의 표준 오차를 나타냄. * P value < 0.1, ** P value < 0.05.

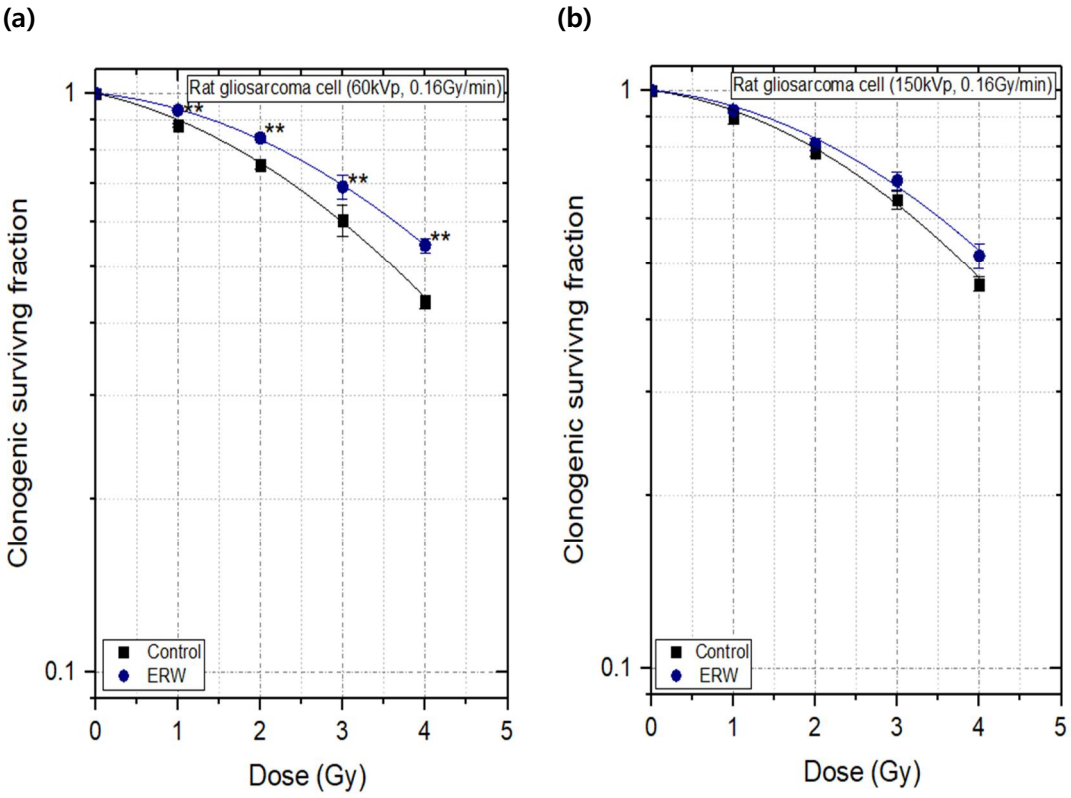

Fig. 4.4.2. Rat gliosarcoma cell에 동일 선량률 0.16 Gy/min에서 서로 다른 최대 에너지를 가진 전압 (a) 60 kVp, (b) 150 kVp 조건의 엑스선 조사 시 전해 환원수 처리 유무에 따른 세포 생존율 곡선. 이 때 error bar는 4~6세트 수행된 실험 결과의 표준 오차를 나타냄. * P value < 0.1, ** P value < 0.05.

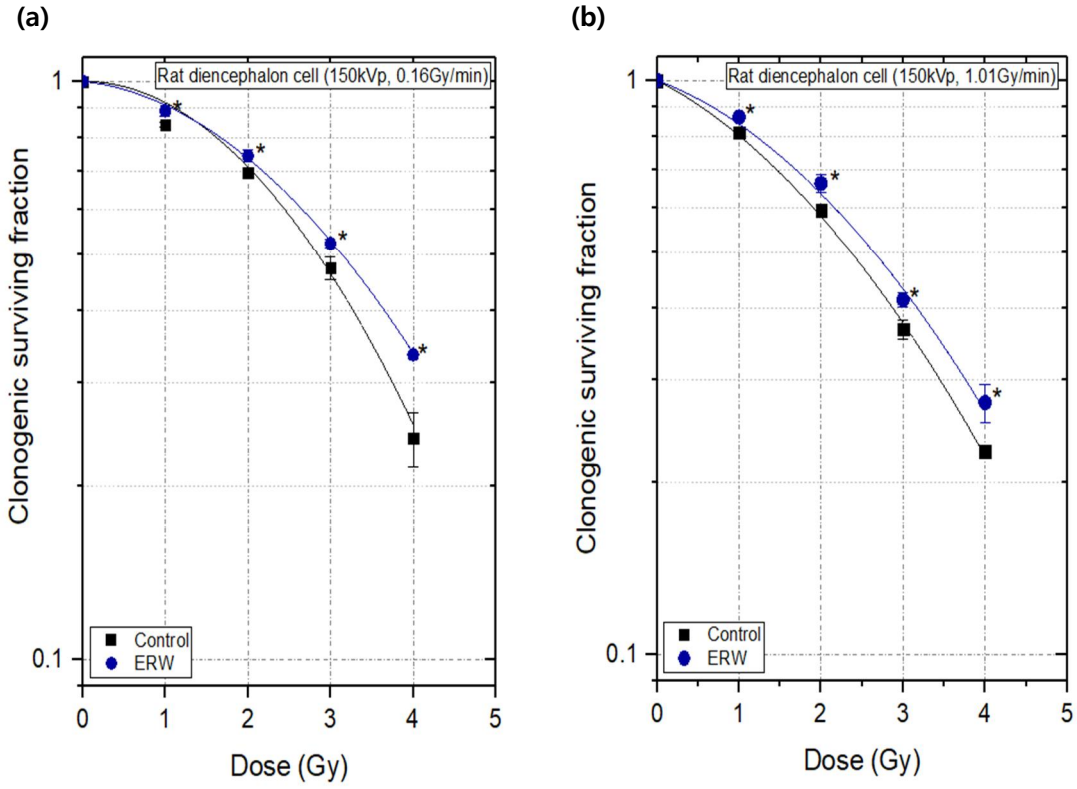

Fig. 4.4.3. Rat diencephalon cell에 동일 전압 150 kVp에서 서로 다른 선량률 (a) 0.16 Gy/min, (b) 1.01 Gy/min 조건의 엑스선 조사 시 전해 환원수 처리 유무에 따른 세포 생존율 곡선. 이 때 error bar는 4~6세트 수행된 실험 결과의 표준 오차를 나타냄. * P value < 0.1, ** P value < 0.05.

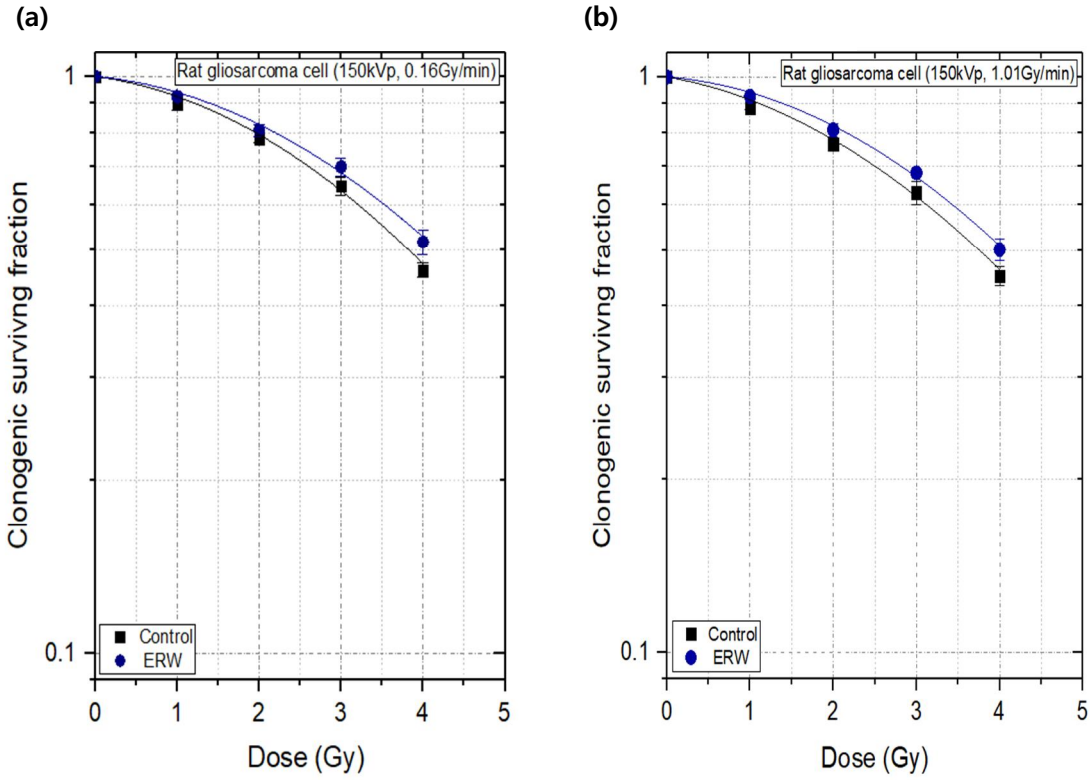

Fig. 4.4.4. Rat gliosarcoma cell에 동일 전압 150 kVp에서 서로 다른 선량률 (a) 0.16 Gy/min, (b) 1.01 Gy/min 조건의 엑스선 조사 시 전해 환원수 처리 유무에 따른 세포 생존율 곡선. 이 때 error bar는 4~6세트 수행된 실험 결과의 표준 오차를 나타냄. * P value < 0.1, ** P value < 0.05.

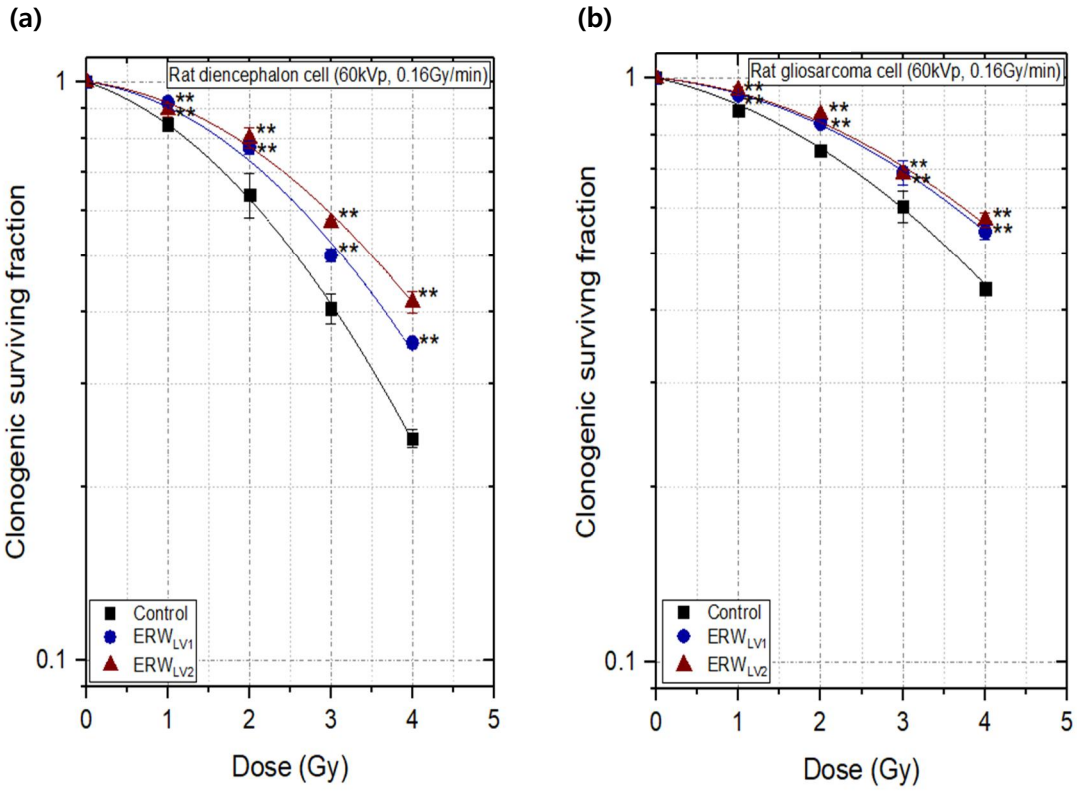

Fig. 4.4.5. (a) Rat diencephalon cell, (b) Rat gliosarcoma cell에 60 kVp, 0.16 Gy/min엑스선 조사 시 전해 환원수 처리 유무 및 농도에 따른 세포 생존율 곡선. 이 때 error bar는 4~6세트 수행된 실험 결과의 표준 오차를 나타냄. * P value < 0.1, ** P value < 0.05.

.

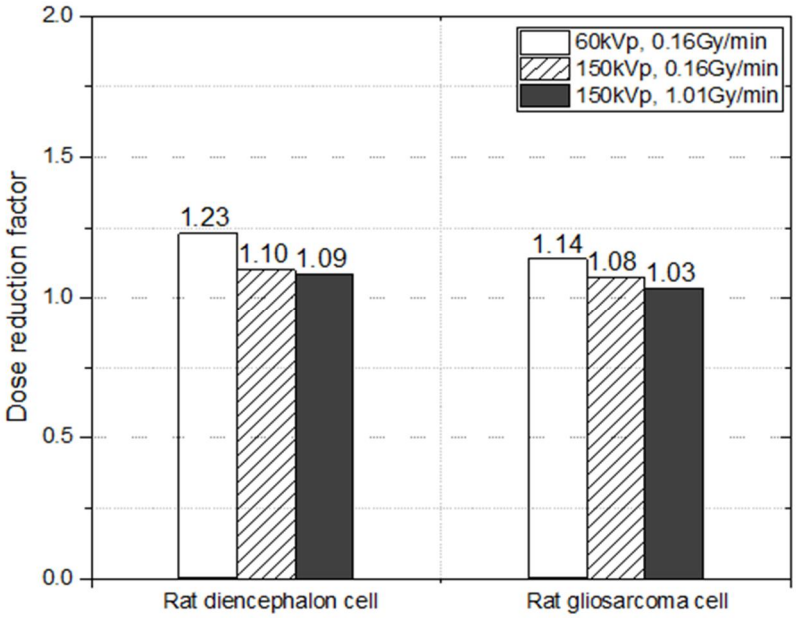

Fig. 4.4.6. Rat diencephalon cell 와 Rat gliosarcoma cell 에 대한 각 엑스선 조사 조건에서의 선량 감소 인자(Dose reduction factor) 비교.

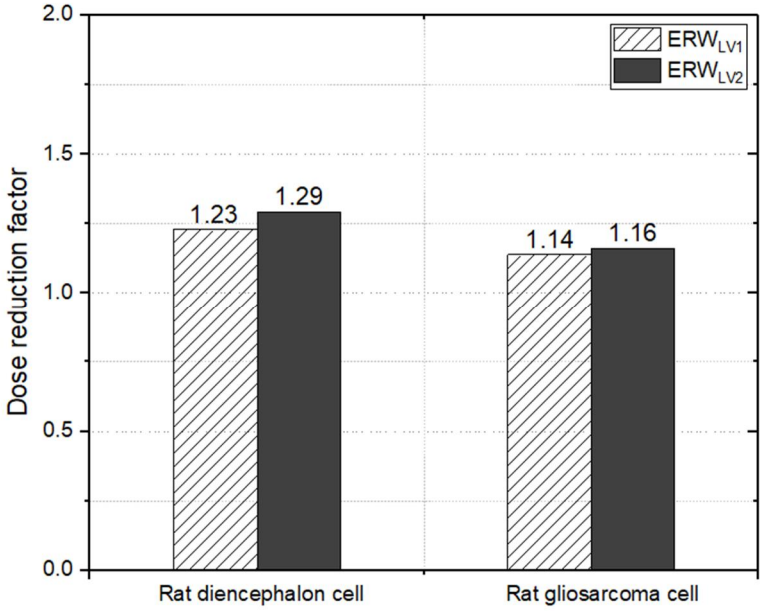

Fig. 4.4.7. Rat diencephalon cell 와 Rat gliosarcoma cell 에 대한 60 kVp, 0.16 Gy/min 엑스선 조사 조건에서의 전해 환원수 농도에 따른 선량 감소 인자(Dose reduction factor) 비교.

제 5 장 논 의

제 1 절 전해 환원수의 전리 방사선에 대한 방호 메커니즘 분석

본 연구에서는 Rat diencephalon cell(RDC)과 Rat gliosarcoma cell(RGC)에 대한 전해 환원수의 전리 방사선 방호 효과를 in vitro 실험을 통해 확인하고자 하였다. 현재까지 전해 환원수를 이용하여 전리 방사선에 대한 방호 효과를 확인한 선행 연구는 없지만, 엑스선보다 낮은 에너지의 방사선인 자외선에 대하여 실험하여 얻은 선행 결과들과 비교할 때 본 연구의 결과들은 활성산소종의 감소, 세포 자살의 억제 및 세포 생존율 증가 효과를 나타내어 선행 연구와 일치함을 확인하였다. 본 연구에서는 10%의 세포 생존율을 보이는 선량에 대해 선량 감소 인자를 계산하여 방호 효과를 비교하였으며, 다른 방호제를 사용한 in vitro 상의 선행 연구들과 비교할 때 Table. 5. 1 과 같이 전해 환원수가 방사선 방호 인자로서 활용될 수 있음을 확인하였다. 전해 환원수의 농도를 높였을 때 선량 감소 인자가 증가함에 따라 농도를 높이면 더 좋은 선량 감소 인자 값을 가질 수 있을 것이라 기대된다. 또한 구체적인 방호 메커니즘이 확인된 바는 없지만, 본 연구를 통해 확인한 방호 효과들은 전해 환원수가 활성산소종을 제거함으로써 일어난 효과로써 유추할 수 있다.

세포 자살은 미토콘드리아를 매개로 한 Intrinsic pathway와 외부 receptor을 매개로 한 Extrinsic pathway의 두 가지 방식으로 일어날 수 있다[41]. 전리 방사선 피폭에 따라 활성산소종이 생성되면 미토콘드리아에 영향을 가해 세포 자살의 Intrinsic pathway를 유발할 수 있으며, 활성산소종은 NF-kB, AP-1, p53과 같은 핵 전사 인자(Nuclear

transcription factor)의 활성화를 일으켜 death protein의 upregulation이나 survival protein의 inhibitor 생성을 유도하여 세포 자살을 유발할 수 있다. 따라서 활성산소종은 직접적인 세포 자살 유발 외에도 death receptor을 매개로 한 세포 자살을 유발할 수 있기에 전해 환원수 처리에 따른 활성산소종 생성의 감소는 세포 자살 발생에 영향을 줄 수 있다. 앞선 결과들을 통해 전해 환원수 처리 시 방사선 유도의 활성산소종 생성이 억제됨을 확인하였으며, 특히 에너지가 낮을수록 그 방호 효과가 크게 나타난 것으로 확인하였다. 이는 낮은 에너지에서 세포 자살 비율의 감소율이 큰 것과 경향이 같음을 확인할 수 있다. 따라서 본 실험의 전해 환원수 처리에 따른 세포 자살 비율 감소 효과는 전해 환원수가 활성산소종을 제거함으로써 나타나는 결과로 이해할 수 있다.

형태학적, 생화학적, 기능적 관점에서 세포 죽음의 정의와 해석에 대한 지침을 만들어내는 Nomenclature Committee on Cell Death (NCCD)에서는 세포의 필수적인 기능이 비가역적으로 사라지고 세포 구조성을 상실할 때 세포 죽음으로 판단하며[46], 세포 죽음은 형태학적으로 세포 자살(apoptosis), 자가 포식(autophagy) 및 세포 괴사(necrosis)로 분류된다고 정의하고 있다. 활성산소종은 세포의 단백질, 지질, 핵산 등의 직접적인 산화와 일반적인 손상 유발 외에 다양한 신호 체계에 영향을 가하여 위의 세포 죽음 과정을 일으킨다. 앞서 확인한 바와 같이 직간접적으로 세포 자살을 유발하고 MAPK family 의 활성화 등을 통해 간접적으로 자가 포식을 조절하며 TNF 자극 등을 통해 세포 괴사를 유발할 수 있다[47]. 따라서 전해 환원수 처리에 따라 활성산소종 생성이 억제되면 세 형태의 세포 죽음이 감소될 수 있다.

본 연구를 통해 전해 환원수 처리 시 전리 방사선 유도의 활성산소종의 제거와 세포 자살 비율의 감소 및 세포 생존율의 증가를 확인하였으며, 이

방호 효과들은 활성산소종의 제거를 근본으로 하여 나타난 결과들로 이해할 수 있다.

Radioprotector	Cell line	Concentration	Dose reduction factor
WR1065	CHO	4 uM	1.9
	V79	4 uM	1.5
Hoechst 33342	KHT	10 uM	1.8
	V79	21 uM	1.3
Proamine	V79	84 uM	1.7
Dithiotheritol	V79	10 mM	1.4
ERW	RDC	LV_2	1.29
	RGC	LV_2	1.16

Table 5.1. In vitro 실험으로 진행된 다양한 방사선 방호제들의 선량 감소 인자 비교[48]. 이 때 선량 감소 인자는 모두 세포 생존율 10%를 보이는 선량 값에 대한 계산함.

제 2 절 세포의 방사선 민감도 및 특성 차이

활성산소종, 세포 자살 및 세포 생존율을 확인한 실험 결과에서 전해 환원수 처리와 상관없이 두 세포에서 결과 경향성이 일부 다르게 나타났으며, 전해 환원수 처리에 따른 방사선 방호 효과는 Rat gliosarcoma cell 에 비해 Rat diencephalon cell 에서 더 크게 나타났다. 이는 세포 간의 방사선에 대한 민감도 차이 및 세포 특성에 따른 것으로 보인다.

Fig. 5.2 로부터 Rat diencephalon cell 가 Rat gliosarcoma cell 보다 더 높은 방사선 민감도를 나타내어 동일한 조사 조건의 엑스선 피폭에도 세포 생존율이 더 감소함을 알 수 있다. 이 방사선 민감도 차이에 따라 전해 환원수 처리와 상관없이 다양한 방사선 조사 조건에서의 실험 결과 경향성이 일부 다르게 나타난 것으로 보인다. 즉, Rat gliosarcoma cell 의 방사선 민감도가 낮기 때문에 방사선 조사 여부에 따른 영향을 덜 받아 방사선 민감도를 갖는 세포보다 전해 환원수의 효과가 적게 나타난 것으로 추측된다. 또한 암 세포의 일종인 Rat gliosarcoma cell 의 경우 정상 세포와 DNA 회복 기작, 물질 대사 체계 등이 다른 방식으로 이루어지기 때문에 전해 환원수의 효과 정도에 차이가 나타나는 것으로 추측된다. 건강한 정상 세포의 경우 세포 분열이 화학적 과정을 통해 엄격히 조절되어 성장이 이루어지지만, 암세포의 경우 그러한 신호에 응하지 않고 조절없이 분열이 지속되는 특징을 지닌다. 주요 방호 인자인 수소 분자의 메커니즘이 선택적 항산화 과정 외 신호 전달 조절 작용에 기반한 것을 감안할 때, 전해 환원수 또한 세포 내 신호 전달에 영향을 줄 수 있으며 암 세포의 경우 이러한 역할에 영향을 덜 받은 것으로 추측할 수 있다.

방사선 치료에 있어 방사선 피폭으로부터 정상 조직을 보호하면서 암 세포에의 방호 효과가 적거나 없을 때 높은 치료 이득(Therapeutic gain)을 얻을 수 있다. 정상 세포와 암 세포간의 반응 차이는 세포 종류, 방호제 종류 등에 따라 다르게 나타나기 때문에 방사선 치료 시 적절한 방호제를 사용하는 것이 중요하다. WR-2721 의 경우 방사선 피폭으로부터 암 조직에 방호 효과가 적거나 없으면서 정상 조직을 방호하여 그 가능성을 보인 바 있다. 전해 환원수 또한 Rat gliosarcoma cell 을 엑스선으로부터 방호하는 효과를 지니지만, 효과 정도가 정상 세포인 Rat diencephalon cell 에 비하여 작다는 점에서 방사선 치료 중 방호제로서의 사용 가능성을 지닌다.

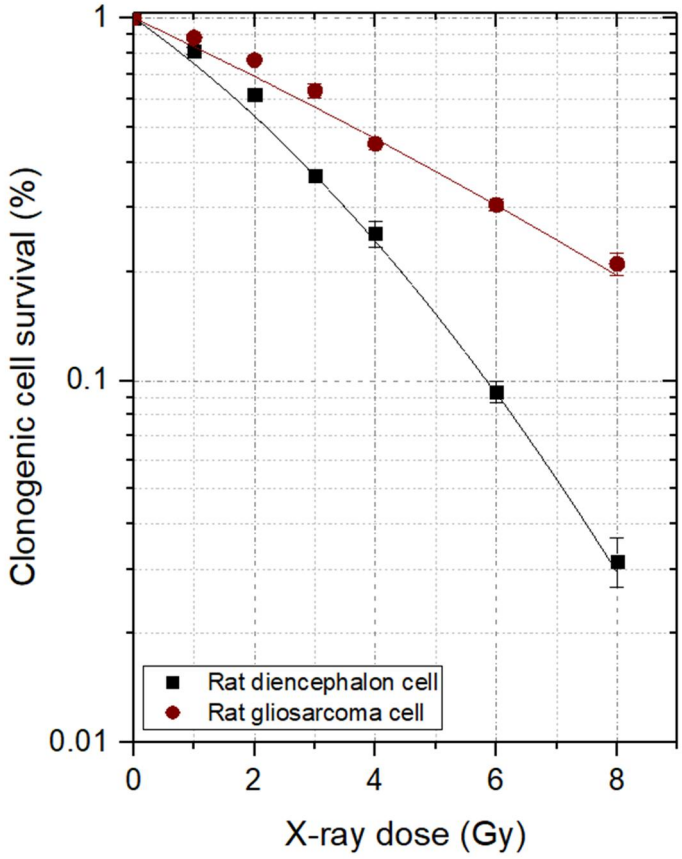

Fig. 5.2. 150 kVp, 1.01 Gy/min 에서 Rat diencephalon cell 와 Rat gliosarcoma cell 의 조사 선량에 따른 세포 생존율.

제 3 절 금속 나노 입자의 방사선 선량 증가 영향

전해 환원수는 수소 분자와 수소 원자 이외에 금속 나노 입자를 소량 함유하고 있는 것이 특징으로, 특히 전기 분해 세기에 따라 그 양이 증가하는 백금 나노 입자는 활성산소종을 제거하는 환원제로 활용되어 방호 효과에 도움이 될 것이라 평가되고 있다. 하지만 본 연구는 전리 방사선을 이용한 실험으로, 백금과 같은 높은 원자 번호의 금속 입자는 방사선 조사 시 방사선과 물질의 반응 단면적(cross section)을 증가시켜 국소 부위의 흡수 에너지를 증가시키는 선량 증가제로써 활용될 수 있음을 함께 고려하여야 한다. 광전 효과(Photoelectric effect)는 방사선 에너지가 낮을수록, 그리고 반응하는 물질의 원자 번호가 클수록 그 발생 확률이 증가한다. 광전 효과 중 생성되는 2 차 전자들은 방사선이 보통 최내각인 K 각에 속한 전자와 반응하여 생성되기에 물질의 K 각 에너지 이상의 에너지를 가져야 반응이 일어날 수 있다.

서울대학교 공동기기원의 ICP-Mass Spectrometer (NexION 350D, PerkinElmer SCIEX)를 사용하여 증류수와 전해 환원수에 포함된 다섯 가지 입자들의 농도를 측정하였다. 이 때 측정한 금속 입자는 철(Fe), 티타늄(Ti), 백금(Pt), 은(Ag) 그리고 하프늄(Hf)으로, 선행 연구를 통해 측정된 증류수와 전해 환원수에 포함된 입자들 중 차이가 있는 것으로 확인된 입자들로 선정하였다[7]. 측정 결과는 Table 5.3 과 같으며, 금속 입자들을 대략 총 0.1 ppm 을 함유한 것으로 확인되었다. 포함이 확인된 입자인 철, 티타늄, 백금에 대하여 Fig. 5.3 과 같이 keV 단위의 광자에서 물질과의 총 반응 단면적과 광전 효과의 반응 단면적을 확인하였다. 광자와 물질과의 반응 종류 중 광전 효과 발생 비율이 매우 크며, 철과 티타늄의

경우 10 keV 이하의 광자에서 K 각 에너지를 지니고 백금의 경우 78.39 keV 에서 그 에너지 값을 지님을 확인하였다.

이에 따라 전해 환원수 내 포함된 금속 나노 입자들의 선량 증가 영향으로 인해 방호 효과 일부가 상쇄되어 일반적인 방호 효과에 비해 방사선의 방호 효과가 약하게 나타날 수 있음을 추측해 볼 수 있다. 측정된 농도가 비록 저농도이기는 하나, 철과 티타늄의 경우 그의 산화물 형태인 TiO_2(Titanium dioxide nanoparticle)와 Fe_2O_4(Iron oxide nanoparticle)가 선량 증가 물질로 활용되고 있어[49, 50] 전해 환원수 내 금속 입자에 의한 선량 증가 효과는 측정된 농도보다 더 클 것이라 예상된다. 이와 같은 금속 나노 입자와 그의 산화물 형태에 의한 선량 증가 효과로 인해 화학약품이나 낮은 에너지의 UV 에서 보인 전해 환원수의 방호 효과가 온전하게 나타나지 못했을 것이라 추측된다. 또한 앞서 확인한 활성산소종, 세포 자살, 세포 생존율의 세 가지 실험 결과에서 전반적으로 에너지가 낮을수록 방호 효과가 더 좋게 나타난 것은 백금 나노 입자의 K-edge 에너지 이상에서 광전 효과가 일어나 방호 효과 일부가 상쇄된 것으로 추측할 수 있다. 특히 Table 5.3 과 같이 150 keV 에서 백금의 광전 효과 반응 단면적이 다른 두 금속보다 높아 높은 에너지의 광자에서는 백금의 영향이 큼을 알 수 있다. 세포에 백금 나노 입자를 처리한 후 방사선을 조사하였을 때 DNA 손상인 단일 나선 절단과 이중 나선 절단 발생 비율이 증가하고, 세포 생존율이 감소됨이 확인된 바 있다[51. 52]. 특히 방사선의 에너지를 다르게 하였을 때 30 keV, 40 keV 에 비해 K 각 에너지 주변의 78 keV, 78.8 keV 에너지에서 선량 증가 효과가 크게 나타났다[52]. 그러나 측정된 농도가 저농도인 관계로 백금 입자 외의 추가적인 요인으로 인한 영향도 있을 것이라 추측된다.

원소	증류수 내 입자 농도	전해 환원수 내 입자 농도	150 keV 에서 광전 효과 반응 단면적
Fe	0.85 ppb	70.72 ppb	5.215×10^3 barns/atom
Ti	< 0.1 ppb	27.54 ppb	2.797×10^3 barns/atom
Pt	< 0.1 ppb	7.87 ppb	6.170×10^4 barns/atom
Ag	< 0.1 ppb	< 0.1 ppb	
Hf	< 0.1 ppb	< 0.1 ppb	

Table 5.3. ICP-Mass Spectrometer 를 이용하여 확인한 전해 환원수에 포함된 금속 입자 농도 및 150 keV 에서 광전 효과 반응 단면적.

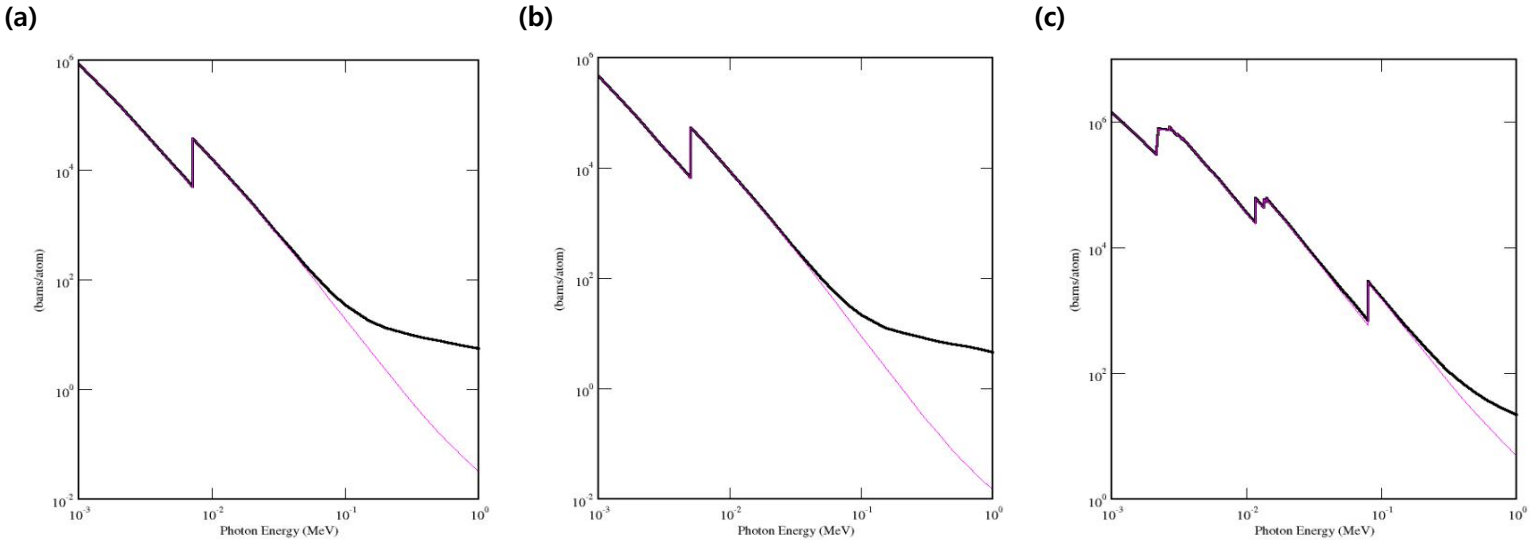

Fig. 5. 3. 광자 에너지 1 ~ 1000 keV 에서 (a) 철(Fe), (b) 티타늄(Ti), (c) 백금(Pt)의 물질과의 총 반응 단면적(반응 확률) 및 광전 효과 반응 단면적. (—— Total attenuation, —— Photoelectric absorption)

제 6 장 결 론

본 연구에서는 전해 환원수가 엑스선 조사 조건에서 방호 효과를 지닐 수 있는지를 in vitro 실험을 통하여 확인하였다. 전해 환원수는 정상 세포인 Rat diencephalon cell에 독성을 나타내지 않으면서 피폭된 세포의 활성 산소종을 감소시켜 세포 자살을 억제하고 세포 생존율을 증가시키는 방호 효과를 나타내었다. 반면 암 세포인 Rat gliosarcoma cell에 대하여 유의미한 독성을 나타내어 전해 환원수가 암 세포의 성장을 억제시킬 수 있음을 확인하였고, 방사선 조사 시 방호 효과가 나타났지만 그 효과는 정상 세포에 비해 적은 것으로 확인하였다. 정상 세포에 독성이 없으면서 방호 효과를 나타내고 암세포에서 독성을 보이면서 방호 효과가 적게 나타난다는 특징은 방사선 치료에서의 적절한 적용이 가능할 것으로 보인다.

이 때 전해 환원수의 방호 효과는 엑스선의 에너지가 낮을수록 더 크고 유의미하게 나타났다. 이는 전해 환원수 내 포함된 백금 나노 입자에 의해 고에너지 엑스선에서 광전 효과가 일어나 방호 효과 일부가 상쇄된 것으로 추측된다. 화학약품 등 다른 외부 영향에 대해 방호 인자로서 역할하였던 백금 나노 입자가 방사선과 반응 시 방호 효과를 상쇄시킬 수 있음을 파악한 것은 본 연구에서 의미를 지닌다. 이에 대해 전극의 교체 및 후속 금속 입자 제거 등 백금 나노 입자의 영향을 없앨 수 있는 방안을 모색하여 반영한다면 에너지 영역에 상관없이 좋은 방호 효과를 기대할 수 있을 것이다. 또한 전기 분해 시간을 늘림으로써 전해 환원수의 농도를 높였을 때 정상 세포에 대하여 더 좋은 방호 효과가 나타났다는 점에서 농도 조절을 통하여 더 좋은 방호 효과를 기대할 수 있을 것으로 보인다. 또한 저에너지 광자에 대한 방호 효과가 우수하다는 점을 통해 전해 환원수가 저에너지 영역의

15 keV의 엑스선을 사용한 유방암 검진 기술, 33 keV의 엑스선을 이용한 혈관 촬영법, 100-120 keV 영역대의 흉부 방사선 촬영 등 방사선의 진단적 측면에서 활용될 수 있을 것으로 보인다.

본 연구는 전해 환원수의 전리 방사선에 대한 방호 효과를 처음으로 확인하였다는 점에서 의미를 지닌다. 특히 암세포에 비해 정상세포에 대한 방호 효과가 더 좋고 농도를 높였을 때 정상 세포에서만 그 방호 효과가 좋아진다는 점에 착안하여 향후 다양한 세포, 전해 환원수의 농도 및 방사선 에너지에서 실험을 진행한다면 방사선 치료에서의 효과를 기대할 수 있을 것이다. 그러나 in vitro 실험 결과를 바로 인체에 적용하기에는 한계가 있으므로 in vivo 상의 추가적인 실험이 요구된다. 또한 고에너지 영역대에서 상대적으로 적은 방호 효과를 나타낸 것의 원인으로 추정되는 백금 나노 입자 영향에 대하여 추가적인 실험 및 시뮬레이션이 필요할 것으로 보인다.

참고 문헌

[1] D. Citrin, A. P. Cotrim, F. Hyodo, B. J. Baum, M. C. Krishna, and J. B. Mitchell, Radioprotectors and Mitigators of Radiation-Induced Normal Tissue Injury, Oncologist, Vol. 15, No. 4, pp. 360-371, 2010.

[2] T. A. Smith, D. R. Kirkpatrick, S. Smith, T. K. Smith, T. Pearson, A. Kailasam, K. Z. Herrmann, J. Schubertv, and D. K. Agrawal, Radioprotective agents to prevent cellular damage due to ionizing radiation, J Transl Med, Vol. 15, No. 232, pp. 1-18, 2017.

[3] M. L. Hensley, L. M. Schuchter, and C. Lindley, American Society of Clinical Oncology clinical practice guidelines for the use of chemotherapy and radiotherapy protectants, J Clin Oncol, Vol. 17, No. 10, pp. 3333–3355, 1999.

[4] P. Paul, M. K. Unnikrishnan, and A. N. Nagappa, Phytochemicals as radioprotective agents? A Review, Indian J Nat Prod Resour, Vol. 2, No. 2, pp. 137-150, 2011.

[5] M. Henry, and J. Chambron, Physico-chemical, biological and therapeutic characteristics of electrolyzed reduced alkaline water, Water, Vol. 5, No. 4, pp. 2094-2115, 2013.

[6] T. Kashiwagi, H. Yan, T. Hamasaki, T. Kinjo, N. Nakamichi, K. Teruya, S. Kabayama, and S. Shirahata, Electrochemically Reduced Water Protects Neural Cells from Oxidative Damage, Oxid Med Cell

Longev, Vol. 2014, pp. 1-18, 2014.

[7] T. Hamasaki, G. Harada, N. Nakamichi, S. Kabayama, K. Teruya, B. Fugetsu, W. Gong, I. Sakata, and S. Shirahata, Electrochemically reduced water exerts superior reactive oxygen species scavenging activity in HT1080 cells than the equivalent level of hydrogen-dissolved water, PLoS ONE, Vol. 12, No. 2, pp. 1-15, 2017.

[8] I. Ohsawa, M. Ishikawa, K. Takahashi, M. Watanabe, K. Nishimaki, K. Yamagata, K. Katsura, Y. Katayama, S. Asoh, and S. Ohta, Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals, Nat Med, Vol. 13, No. 6, pp. 688-694, 2007.

[9] L. Ge, M. Yang, N. N. Yang, X. X. Yin, and W. G. Song, Molecular hydrogen: a preventive and therapeutic medical gas for various diseases, Oncotarget, Vol. 8, No. 60, pp. 102653-102673, 2017.

[10] S. Kato, Y. Saitoh, K. Iwai, and N. Miwa, Hydrogen-rich electrolyzed warm water represses wrinkle formation against UVA ray together with type-I collagen production and oxidative-stress diminishment in fibroblasts and cell-injury prevention in keratinocytes, J Photochem Photobiol B, Vol. 106, No. 1, pp. 24-33, 2012.

[11] K. S. Yoon, X. Z. Huang, Y. S. Yoon, S. K. Kim, S. B. Song, B. S. Chang, D. H. Kim, and K. J. Lee, Histological Study on the Effect of Electrolyzed Reduced Water-Bathing on UVB Radiation-Induced Skin Injury in Hairless Mice, Biol Pharm Bull, Vol. 34, No. 11, pp. 1671-1677, 2011.

[12] L. Qian, B. Li, F. Cao, Y. Huang, S. Liu, J. Cai, and F. Gao, Hydrogen-rich PBS protects cultured human cells from ionizing radiation-induced cellular damage, Nuclear Technology and Radiation Protection, Vol. 25, No. 1, pp. 23-29, 2010.

[13] Y. Yang, B. Li, C. Liu, Y. Chuai, J. Lei, F. Gao, J. Cui, D. Sun, Y. Cheng, C. Zhou, and J. Cai, Hydrogen-rich saline protects immunocytes from radiation-induced apoptosis, Med Sci Monit, Vol. 18, No. 4, pp. 144-148, 2012.

[14] E. J. Hall, and A. J. Giaccia, Radiobiology for the Radiologist, 7th ed, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2012.

[15] J. Dziegielewski, J. E. Baulch, W. Goetz, M. C. Coleman, D. R. Spitz, J. S. Murley, D. J. Grdina, and W. F. Morgan, WR-1065, the active metabolite of amifostine, mitigates radiation-induced delayed genomic instability, Free Radic Biol Med, Vol. 45, No. 12, pp. 1674-1681, 2008.

[16] Y. Li, T. Hamasaki, N. Nakamichi, T. Kashiwagi, T. Komatsu, J. Ye, K Teruya, M. Abe, H. Yan, T. Kinjo, S. Kabayama, M. Kawamura, and S. Shirahata, Suppressive effects of electrolyzed reduced water on alloxan-induced apoptosis and type 1 diabetes mellitus, Cytotechnology, Vol. 63, No. 2, pp. 119-131, 2011.

[17] M. Y. Lee, Y. K. Kim, K. K. Ryoo, Y. B. Lee, and E. J. Park, Electrolyzed-Reduced Water Protects Against Oxidative Damage to DNA, RNA, and Protein, Appl Biochem Biotechnol, Vol. 135, No. 2, pp. 133-144, 2006.

[18] H. Yan, T. Kashiwaki, T. Hamasaki, T. Kinjo, K. Teruya, S. Kabayama, and S. Shirahata, The neuroprotective effects of electrolyzed reduced water and its model water containing molecular hydrogen and Pt nanoparticles, BMC Proc, Vol. 5, No. 8, pp. 69-70, 2011.

[19] C. F. Tsai, Y. W. Hsu, W. K. Chen, Y. C. Ho, and F. J. Lu, Enhanced Induction of Mitochondrial Damage and Apoptosis in Human Leukemia HL-60 Cells Due to Electrolyzed-Reduced Water and Glutathione, Biosci Biotechnol Biochem, Vol. 73, No. 2, pp. 280–287, 2009.

[20] R. M. C. Ignacio, H. S. Kwak, Y. U. Yun, M. E. J. V. Sajo, Y. S. Yoon, C. S. Kim, S. K. Kim, and K. J. Lee, The Drinking Effect of Hydrogen Water on Atopic Dermatitis Induced by Dermatophagoides farinae Allergen in NC/Nga Mice, Evid Based Complement Alternat Med, Vol. 2013, No. 1, pp. 1-5, 2013.

[21] K. Mei, S. Zhao, L. Qian, B. Li, J. Ni, and J. Cai, Hydrogen protects rats from dermatitis caused by local radiation, J Dermatolog Treat, Vol. 25, No. 2, pp. 182-188, 2014.

[22] Y. Chuai, F. Gao, B. Li, L.Zhao, L. Qian, F. Cao, L. Wang, X. Sun, J. Cui, and J. Cai, Hydrogen-rich saline attenuates radiation-induced male germ cell loss in mice through reducing hydroxyl radicals, Biochem J, Vol. 442, No. 1, pp. 49-56, 2012.

[23] S. Zhao, Y. Yang, W. Liu, Z. Xuan, S. Wu, S. Yu, K. Mei,, Y. Huang, P. Zhang, J Cai, J. Ni, and Y. Zhao, Protective effect of hydrogen-rich saline against radiation-induced immune dysfunction, J Cell Mol Med, Vol. 18, No. 5, pp. 938-946, 2014.

[24] A. Shao, H. Wu, Y. Hong, S. Tu, X. Sun, Q. Wu, Q. Zhao, J. Zhang, and J. Sheng, Hydrogen-Rich Saline Attenuated Subarachnoid Hemorrhage-Induced Early Brain Injury in Rats by Suppressing Inflammatory Response: Possible Involvement of NF-kappaB Pathway and NLRP3 Inflammasome, Mol Neurobiol, Vol. 53, No. 5, pp. 3462-3476, 2016.

[25] K. M. Kang, Y. N. Kang, I. B. Choi, T. Kawamura, Y. Toyoda, and A. Nakao, Effects of drinking hydrogen-rich water on the quality of life of patients treated with radiotherapy for liver tumors, Med Gas Res, Vol. 1, No. 11, pp. 1-8, 2011.

[26] Y. Lee, H. Kim, S. Kim, M. H. Shin, and Y. K. Kim, Myeloid differentiation factor 88 regulates basal and UV-induced expressions of IL-6 and MMP-1 in human epidermal keratinocytes, J Invest Dermatol, Vol. 129, No. 2, pp. 460-467, 2009.

[27] M. H. Shin, R. E. Park, H. Nojima, H. C. Kim, Y. K. Kim, and J. H. Chung, Atomic Hydrogen Surrounded by Water Molecules, $H(H_2O)_m$, Modulates Basal and UV-Induced Gene Expressions in Human Skin in vivo, PLoS One, Vol. 8, No. 4, pp. 1-10, 2013.

[28] P. Jawaid, M. Rehman, Y. Yoshihisa, P. Li, Q. l. Zhao, M. A.

Hassan, Y. Miyamoto, T. Shimizu, and T. Kondo, Effects of SOD/catalase mimetic platinum nanoparticles on radiation-induced apoptosis in human lymphoma U937 cells, Apoptosis, Vol. 19, No. 6, pp. 1006–1016, 2014.

[29] M. Kajita, K. Hikosaka, M. Iitsuka, A. Kanayama, N. Toshima, and Y. Miyamoto, Platinum nanoparticle is a useful scavenger of superoxide anion and hydrogen peroxide, Free Radic Res, Vol. 41, No. 6, pp. 615-626, 2007.

[30] T. Hamasaki, T. Kashiwagi, T. Imada, N. Nakamichi, S. Aramaki, K. Toh, S. Morisawa, H. Shimakoshi, Y. Hisaeda, and S. Shirahata, Kinetic analysis of superoxide anion radical scavenging and hydroxyl radical-scavenging activities of platinum nanoparticles, Langmuir, Vol. 24, No. 14, pp. 7354-7364, 2008.

[31] H. Nakanishi, T. Hamasaki, T. Kinjo, H. Yan, N. Nakamichi, S. Kabayama, K. Teruya, and S. Shirahata, Low concentration platinum nanoparticles effectively scavenge reactive oxygen species in rat skeletal L6 cells, Nano Biomed Eng, Vol. 5, No. 2, pp. 76-85, 2013.

[32] R. Nishikawa, K. Teruya, Y. Katakura, K. Osada, T. Hamasaki, T. Kashiwagi, T. Komatsu, Y. Li, J. Ye, A. Ichikawa, K. Otsubo, S. Morisawa, Q. Xu, and S. Shirahata, Electrolyzed reduced water supplemented with platinum nanoparticles suppresses promotion of two-stage cell transformation, Cytotechnology, Vol. 47, No. 1-3, pp. 97-105, 2005.

[33] R. Asada, K. Kageyama, H. Tanaka, H. Matsui, M. Kimura, Y. Saitoh, and N. Miwa, Antitumor effects of nano-bubble hydrogen-dissolved water are enhanced by coexistent platinum colloid and the combined hyperthermia with apoptosis-like cell death, Oncol Rep, Vol. 24, No. 6, pp. 1463-1470, 2010.

[34] K. M. Lee, S. R. Kim, and E. H. Kim, Characterization of dose delivery in a hard X-ray irradiation facility, J Nucl Sci Tech, Vol. 49, No. 6, pp. 655-661, 2012.

[35] G. V. Frajese, M. Benvenuto, R. Mattera, S Giampaoli, E. Ambrosin, R. Bernardini, M. G. Giganti, L. Albonici, I. Dus, V. Manzari, A. Modesti, M. Mattei, and R. Bei, Electrochemically Reduced Water Delays Mammary Tumors Growth in Mice and Inhibits Breast Cancer Cells Survival In Vitro, Evid Based Complement Alternat Med, Vol. 2018, pp. 1-14, 2018.

[36] J. Ye, Y. Li, T. Hamasaki, N. Nakamichi, T. Komatsu, T. Kashiwagi, K. Teruya, R. Nishikawa, T. Kawahara, K. Osada, K. Toh, M. Abe, H. Tian, S. Kabayama, K. Otsubo, S. Morisawa, Y. Katakura, and S. Shirahata, Inhibitory Effect of Electrolyzed Reduced Water on Tumor Angiogenesis, Biol Pharm Bull, Vol. 31, No. 1, pp. 19-26, 2008.

[37] A. Panteleeva, D. Słonina, K. Brankovic, K. Spekl, J. Pawelke, C. Hoinkis, and W. Dörr, Clonogenic survival of human keratinocytes and rodent fibroblasts after irradiation with 25 kV x-rays, Radiat Environ Biophys, Vol. 42, No. 2, pp. 95-100, 2003.

[38] E. Beyreuther, E. Lessmann, J. Pawelke, and S. Pieck, DNA double-strand break signalling: X-ray energy dependence of residual co-localised foci of γ-H2AX and 53BP1, Int J Radiat Biol, Vol. 85, No. 11, pp. 1042-1050, 2009.

[39] Y. N. Korystov, V. V. Shaposhnikova, A. F. Korystova, and M. O. Emel'yanov, Detection of Reactive Oxygen Species induced by radiation in cells using the dichlorofluorescein assay, Radiat Res, Vol. 168, No. 2, pp. 226-232, 2007.

[40] X. S. Wan, Z. Zhou, and A. R. Kennedy, Adaptation of the dichlorofluorescein assay for detection of radiation-induced oxidative stress in cultured cells, Radiat Res, Vol. 160, No. 6, pp. 622-630, 2003.

[41] T.M. Illidge, Radiation-induced apoptosis, J Clin Oncol, Vol. 10, No. 1, pp. 3-13, 1998.

[42] P. Li, Q. L. Zhao, L. H. Wu, P. Jawaid, Y. F. Jiao, M. Kadowaki, and T. Kondo, Isofraxidin, a potent reactive oxygen species (ROS) scavenger, protects human leukemia cells from radiation-induced apoptosis via ROS/mitochondria pathway in p53-independent manner, Apoptosis, Vol. 19, No. 6, pp. 1043-1053, 2014.

[43] S. F. Zerp, T. R. Stoter, F. J. Hoebers, M.W. Brekel, R. Dubbelman, G. K. Kuipers, M. V. Lafleur, B. J. Slotman, and M. Verheij, Targeting anti-apoptotic Bcl-2 by AT-101 to increase radiation efficacy: data from in vitro and clinical pharmacokinetic studies in head and neck cancer, Radiat Oncol, Vol. 10, No. 158, pp. 1-9, 2015.

[44] R. E. Langley, S. G. Quartuccio, P. T. Kennealey, C. N. Coleman, and E. A. Bump, Effect of Cell Cycle Stage, Dose Rate and Repair of Sublethal Damage on Radiation-Induced Apoptosis in F9 Teratocarcinoma Cells, Radiat Res, Vol. 144, No. 1, pp. 90-96, 1995.

[45] A. L. Dunne, M. E. Price, C. Mothersill, S. R. McKeown, T. Robson, and D. G. Hirst, Relationship between clonogenic radiosensitivity, radiation-induced apoptosis and DNA damage/repair in human colon cancer cells, Br J Cancer, Vol. 89, No. 12, pp. 2277–2283, 2003.

[46] L. Galluzzi, L. Vitale et al, Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018, Cell Death Differ, Vol. 25, No. 3, pp. 486-541, 2018.

[47] L. He, T. He, S. Farrar, L. Ji, T. Liu, and X. Ma, Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species, Cell Physiol Biochem, Vol. 44, No. 2, pp. 532-553, 2017.

[48] R. F. Martin, S. Broadhurst, M. E. Reum, C. J. Squire, G. R. Clark, P. N. Lobachevsky, J. M. White, C. Clark, D. Sy, M. Spotheim-Maurizot, and D. P. Kelly, In vitro studies with methylproamine: a potent new radioprotector, Cancer Res, Vol. 64, No. 3, pp. 1067-1070, 2004.

[49] E. Youkhana, B. Feltis, A. Blencowe, and M. Geso, Titanium Dioxide Nanoparticles as Radiosensitisers: An In vitro and Phantom-Based Study, Int J Med Sci, Vol. 14, No. 2, pp. 602-614, 2017.

[50] K. Khoshgard, P. Kiani, A. Haghparast, L. Hosseinzadeh, and M. T. Eivazi, Radiation dose rate affects the radiosensitization of MCF-7 and HeLa cell lines to X-rays induced by dextran-coated iron oxide nanoparticles, Int J Radiat Biol, Vol. 93, No. 8, pp. 757-763, 2017.

[51] M. Afiq K.A., R. A. Rashid, R. M. Lazim, N. Dollah, K. A. Razak, and W. N. Rahman, Evaluation of radiosensitization effects by platinum nanodendrites for 6 mv photon beam radiotherapy, Radiat Phys Chem, Vol. 150, pp. 40-45, 2018.

[52] M. Biston, A. Joubert, J. Adam, H. Elleaume, S. Bohic, A. Charvet, F. Este ve, N. Foray, and J. Balosso, Cure of Fisher Rats Bearing Radioresistant F98 Glioma Treated with cis-Platinum and Irradiated with Monochromatic Synchrotron X-Rays, Cancer Res, Vol. 64, No. 7, pp. 2317-2323, 2004.

Abstract

Study on the Radioprotection Effect of Electrolyzed Reduced Water

Hong Ji won

Department of Energy Systems Engineering

The Graduate School

Seoul National University

Radioprotector is a substance that protects normal tissues and cells from the harmful effects of radiation, and it inhibits DNA damage in cells and increases survival rate. Because chemical protection agents with good protection are highly toxic, their use is limited. So researches on natural protection agents such as botanical chemical extract and vitamins are being carried out actively. Electrolyzed reduced water produced from cathode during electrolysis of water is a highly reductive material known to contain hydrogen molecules, hydrogen atoms and platinum nanoparticles. Previous studies have

confirmed that it has protective effects on external factors such as chemical, UV radiation, and thermal stress, but no effects have been identified on ionizing radiation to date. However, it is expected that Electrolyzed reduced water will also have protection effect against ionizing radiation, given that its protective effects have been identified for UV radiation and that hydrogen molecules, the main protection factor, are considered as radioprotector.

In this study, experiments were conducted to assess toxicity on cells and to verify protection effects in order to confirm its availability as a radioprotector. First, the quantitative amount of reactive oxygen species was assessed given that X-rays have a greater rate of causing DNA damage by reactive oxygen species than by direct action. Experiments for checking the apoptosis rates caused by DNA damage and the cell survival rates were also conducted. At this time, the degree of protection effects of electrolyzed reduced water was determined by different levels of x-ray dose, dose rate, and energy. The results showed that the electrolyzed reduced water had no significant toxicity to normal cells, whereas toxic effects on cancer cells. X-ray irradiation confirmed that electrolyzed reduced water reduced reactive oxygen species, inhibited apoptosis and increased cell survival. There were no differences in the effects of dose and dose rate of x-rays, but the lower the energy, the greater the effect. This is thought to have been partly affected by the metallic nanoparticles contained in the electrolyzed reduced water.

This study is an in vitro experiments that confirmed the protective

effects of electrolyzed reduced water against ionizing radiation, which requires further testing in vivo. Although the protection effect was lower compared to other protection agents, it is expected to result in better effects in change in electrolysis condition and removal of metal particles in electrolyzed reduced water. It is also expected to be used as a radiation protection device in radiation therapy in that the radioprotective effects of normal cells were greater than cancer cells.

Keywords : Radioprotector, Electrolyzed reduced water, Cytotoxicity, Radiation protection, Biological effect of radiation

Student Number : 2017-23750

감사의 글

제가 석사 과정을 무사히 마칠 수 있기까지 큰 도움을 주신 분들께 이 지면을 빌려 감사의 말씀을 전합니다. 우선 대학원 진학을 결정하기부터 논문을 마무리하기까지 2년간 많은 조언과 격려로 제게 큰 도움을 주신 저의 지도 교수님, 김은희 교수님께 깊은 감사의 말씀을 드립니다. 저의 학위논문 심사를 흔쾌히 맡아 조언을 아끼지 않으셨던 정경재 교수님과 김소라 박사님, 그리고 학부부터 석사 과정까지 무한한 강의를 통해 저의 시야를 넓혀 주신 원자핵공학과의 모든 교수님께도 감사드립니다.

항상 제 결정을 존중하고 응원해주시는 부모님과 동생 광표에게도 감사한 마음을 전합니다. 곁에 든든한 지원군인 가족이 있어 저는 제 일에 온전히 집중할 수 있었고 힘들 때에도 잠시 기대어 쉬어갈 수 있었습니다.

기본적인 실험 지도부터 저의 석사 논문에 큰 도움을 주셨던 의섭 오빠, 연구실 생활 전반에 도움을 주시고 제가 즐거운 연구실 생활을 할 수 있게 해주신 지용 오빠, 완욱 오빠, 민호 오빠, 승희 언니, 광호 오빠, 유미 언니, 주희 언니, 알리, 희찬 오빠 그리고 동현이에게도 감사의 말씀을 전합니다. 연구실 생활을 함께 하지는 못하였지만 대학원 진학 전 연구실에 대해 잘 알려주시고 만날 때마다 반갑게 맞이해주시는 혜진 언니, 건민 오빠 그리고 기만 오빠께도 감사의 말씀을 전합니다. 좋은 선후배님들과 연구실 생활을 함께 할 수 있어 영광이었고, 앞으로도 좋은 인연으로 함께 하고 싶습니다.

항상 곁에서 큰 힘이 되어주었던 진용 오빠에게도 감사한 마음을 전합니다. 또한 가장 힘든 시기에 함께 고민을 나누고 극복하는데 도움을 주었던 연주, 은영, 다현이, 대학 입학부터 즐거운 시간을 함께 나누고 옆에서 큰 힘이 되어주었던 희수, 소리, 가을이 그리고 그 외 원자핵공학과 13학번 친

구들에게도 감사한 마음을 전합니다. 미처 이름을 다 적지 못한 제 주위의 많은 고마운 사람들 덕분에 즐거운 대학 생활을 보낼 수 있었습니다.

지난 2년간 힘든 시간도 있었지만 주위의 좋은 사람들 덕분에 에너지를 얻고 그 시간들을 이겨내어 여기까지 올 수 있었습니다. 이 감사한 마음을 잊지 않고 살아가도록 하겠습니다. 다시 한 번 감사드립니다.