

압력 저속 냉동이 쥐치아
치주인대세포에 미치는 영향

연세대학교대학원

치의학과

이 영 은

압력 저속 냉동이 쥐치아
치주인대세포에 미치는 영향

지도교수 이 승 종

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2008년 12월 일

연세대학교 대학원

치의학과

이 영 은

이영은의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2008년 12월 일

감사의 글

이 논문이 있기까지 조언과 지도를 해주신 이승중 교수님께 진심어린 감사를 드립니다. 또 실험을 시작할 수 있게 도와주신 김의성 교수님께 감사드립니다.

병리 실험을 지도 해주신 김진 교수님, 바쁘신 중에도 기꺼이 심사를 맡아 주신 최성호 교수님, 정일영 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 아울러 이찬영 교수님, 노병덕 교수님, 박성호 교수님, 박정원 교수님께도 감사를 드립니다.

아낌없는 조언으로 실험을 도와준 친구 방사선과 교실 은상아와 구강병리학 교실 김현실에게도 감사를 전합니다.

바쁜 수련생활에서도 실험을 도와준 윤범희 선생, 고은진 선생, 백도영 선생에게 고마운 마음을 표하고 싶습니다.

박사를 시작하게 해주시고 바쁠 때마다 애들을 돌봐주신 부모님께 감사드립니다. 조언을 해 준 영미 언니에게도 고마운 마음을 전합니다.

박사 과정에서 큰 힘이 되었던 저의 사랑하는 남편 한승훈과 사랑하는 아이들 한예린, 한재준, 한재영과 기쁨을 함께 하고 싶습니다.

실험 과정마다 걱정해주고 조언해준 친구들, 선배님들, 후배들 감사합니다. 저를 아껴주신 모든 분들께 감사드립니다.

저자 씬

차 례

그림 차례	ii
표 차례	iii
국문 요약	iv
I. 서론	1
II. 실험 재료 및 방법	6
1. 실험 대상 및 전 처치	6
2. 실험 방법	6
2-1. MTT 검색	9
2-2. WST-1 검색	9
2-3. 치아 치근면에 붙어있는 치주조직의 양 측정	9
2-4. TUNEL 검사	9
3. 통계 처리	10
III. 결과	11
1. MTT 검색	11
2. WST-1 검색	11
3. TUNEL 검사	12
IV. 고찰	16
V. 결론	21
VI. 참고문헌	22
영문요약	30
VII. 부록	31

List of Figures

Figure 1. Schematic diagram of program freezer with pressure vessel	8
Figure 2. The averages and standard deviations of percentage of positive cells by TUNEL test	13
Figure 3. The micrograph of immediately extraction group by TUNEL test	13
Figure 4. The micrograph of cold preservation group by TUNEL test	14
Figure 5. The micrograph of rapid freezing group by TUNEL test	14
Figure 6. The micrograph of slow freezing group by TUNEL test	15
Figure 7. The micrograph of slow freezing under pressure group by TUNEL test	15

List of Tables

Table 1. The averages and standard deviations of optical density of MTT	11
Table 2. The averages and standard deviations of optical density of WST-1	12

국문 요약

압력 저속 냉동이 쥐 치아 치주인대세포에 미치는 영향

본 연구의 목적은 흰 쥐의 상악 대구치를 발거한 후 압력 저속 냉동 보관법으로 냉동 보관한 후 MTT, WST-1 검색법과 TUNEL 검사법을 이용하여 치주인대세포의 활성도와 세포 사멸도를 다른 냉동 보관법과 비교, 측정하고자 하였다.

생후 4주된 암컷 Sprague-Dawley계 흰쥐의 상악 좌우 제 1,2 대구치를 발거하여 각 군 당 18개의 쥐 치아를 MTT, WST-1 검색에 이용하였고 6개의 치아를 TUNEL 검사에 이용하였다. 실험군은 5 개군으로 대조군은 즉시 발치군이며, 4℃ 냉장고에 일주일간 보관한 냉장군, 발치 후 동해방지제 처리과정을 거쳐 -196℃의 액화질소에 넣어 냉동한 급속 냉동군, 4℃에서 -35℃까지 -0.5℃/min 속도로 서서히 냉동시킨 뒤 -196℃에 냉동한 저속 냉동군, 3MPa의 압력을 가하고 -0.5℃/min 속도로 4℃에서 -35℃까지 서서히 냉동시킨 뒤 -196℃에 냉동한 압력 저속 냉동군으로 나누었다. 보존액은 F medium을 사용했으며 동해방지제로 10% dimethylsulfoxide(DMSO)를 사용하였다. 치근면을 단위면적으로 표준화하기 위해 MTT, WST-1 측정값을 Eosin 염색 후 530nm에서 측정된 흡광도 값으로 나누었다. TUNEL 검사 시 각 조직슬라이드에서 400배 크기의 현미경 시야에서 임의로 세 부분을 지정하여 정상 세포수와 양성 세포수를 세어 그 비율을 계산하여 각 실험군 당 평균치를 구하였다. 통계 분석을 위해 one way ANOVA를 시행하였으며 사후 검정으로는 Tukey 방법을 사용하였고 결과는 다음과 같다.

1. MTT 검색에 의한 흡광도를 Eosin 염색 후 측정된 흡광도로 나눈 값에서는 압력 저속 냉동군은 즉시 발치군보다 유의성 있게 세포 활성도가 낮았으나($p < 0.05$), 저속 냉동군이나 냉장군과 비교할 때는 높은 세포 활성도를 보이며 통계적 유의성이 있었다($p < 0.05$). 급속 냉동군과 비교할 때는 높은 세포 활성도를 보였지만, 통계적 유의성은 없었다.

2. WST-1 검색에 의한 흡광도를 Eosin 염색 후 측정된 흡광도로 나눈 값에서도 MTT 검색과 마찬가지로 압력 저속 냉동군에서는 즉시 발치군보다 유의성 있게 세포 활성도가 낮았으나($p < 0.05$), 저속 냉동군이나 냉장군과 비교할 때는 높은 세포 활성도를 보이며 통계적 유의성이 있었다($p < 0.05$). 급속 냉동군과 비교할 때는 높은 세포 활성도를 보였지만, 통계적 유의성은 없었다.

3. TUNEL 검사 결과는 모든 군들이 세포 사멸도에 있어서 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

핵심되는 말: 치주인대세포, MTT, WST-1, TUNEL, 활성화도, 저속 냉동, 급속 냉동, 압력 저속 냉동

압력 저속 냉동이 쥐 치아 치주인대세포에 미치는 영향

지도교수 <이 승 종>

연세대학교 대학원 치의학과

이 영 은

I. 서론

우식이나 치주질환, 외상으로 인해 상실된 치아를 수복하는 방법으로 보철치료, 임플란트, 치아이식이 있다. 최근 임플란트가 널리 보급되어 사용되고 있으나 골의 양이 부족한 결손 부위에서는 골 이식이 추가적으로 필요하고 성장기 환자에서는 사용할 수 없으며 자연치와 같은 치근막의 감각 기능을 가질 수 없고 고가의 비용과 시간이 필요한 단점이 있다. 그러나, 치아이식은 생리적인 치주 인대가 재생되어 자연치와 유사한 기능을 유지할 수 있고 성장기 환자에서도 자연치와 같은 수준으로 기능이 회복될 수 있으며 비용과 시간의 감소 등의 장점이 있다.

치아 이식은 환자의 나이, 치근 발육 정도, 이식치의 형태, 이식와의 감염여부, 수술 중 외상, 고정의 형태 등에 의해 예후에 영향을 받게 되며 이중 이식치의 치근면에 있는 건전하고 생활력 있는 치주인대세포의 존재가 치아 이식 성공률을 결정짓는 가장 중요한 요소로

(Schwartz 1983,1985, Kristerson 1985, Lindskog 1983, Melcher 1970, Andreasen, J Periodont Res 1981) 이식치아의 치주인대세포의 활성도를 유지하기 위해 많은 시도가 있어 왔다.

일반적으로 세포의 활성도를 장기간 유지하는 방법으로 저온보존법과 냉동보존법이 있다. 저온보존법은 얼음이 어는 온도 전까지 온도를 낮춰 세포 대사를 감소시켜 보관하는 방법으로 심장, 간, 췌장, 신장 등 전체 기관의 단기간 보존에 사용된다(Rubinsky, 2003). 냉동보존법은 세포를 장기간 보관할 때 많이 사용되고 냉동과 해동 과정에서 얼음 결정과 증가된 용질의 축적으로 인한 삼투압의 증가로 인한 세포 손상이 올 수 있다(Rubinsky, 2003, Schwartz, 1992). 이러한 세포 손상을 줄이기 위해 많은 방법들을 시험해 왔으며 대표적으로 동해방지제의 사용과 다양한 냉동 방법의 개발을 들 수 있다.

대표적인 동해방지제인 DMSO는 세포질 내로 침투해서 냉동 과정 중에 전해질의 농도를 감소시키고 삼투압에 의한 세포 수축을 감소시키고 세포 내 얼음결정체가 생겨 세포막이 파괴되는 것을 막는다(Mazur, 1984, Schwartz, 1992). 그러나, DMSO는 농도, 노출시간, 온도에 따라 세포 자체에 대한 독성을 보일 수 있다.(Neulieb RL, 1990) 정자, 세균, 혈액 줄기세포를 냉동한 연구에서도 DMSO의 임상적 안정성이 이미 확인되었으며(Makino, 1991, Katayam Y, 1997) 치주인대세포도 속도 조절 냉동기로 DMSO와 같이 냉동했을 때 대부분이 생존한다는 것이 입증되었다(Schwartz, 2002).

냉동보존을 위한 다른 접근법으로 최근 일본에서는 미소자장을 이용한 프로그램 냉동고(Cell Alive System)를 이용하여 세포 핵내, 세포내, 세포외 물분자를 자기장에 의해 진동시켜 결정화를 억제해 과냉각 상태를 유지하다가 세포, 냉동 보존액 전체를 동시에 냉동하게 하는 시도가 있었다.(Kawata, 2005, Kaku, 2007) 이 특수한 자장 냉동고를 사용하여 Kawata는 쥐 치아를 15mA 자기장으로 $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 속도로 -30°C 까지 3일간 냉동 보관했을 때 급속 냉동을 하는 것보다 좋은 결과를 얻었다고 보고하였으며 Kaku는 사람의 치주인대세포를 75mA 자기장으로 $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 속도로 -30°C 까지 3일간 냉동 보관했을 때 세포활성도가 제일 높았다고 보고하였다. Ahn(2008)도 쥐 치아를 $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 속도로 -20°C 까지 21.7mA, 60Hz, 1G의 자기장을 이용하여 프로그램 냉동을 시도하였으나 급속, 저속 냉동한 군 사이에 유의한 차이는 없다고 보고하였다.

또 다른 접근법으로 고압 하에서 냉동시킴으로서 세포의 손상을 줄이고자 하는 방법을 생각할 수 있다. 210MPa 고압 하에서는 물의 상변이 온도가 0°C 에서 -21°C 로 내려가므로

낮은 온도에서도 얼지 않은 상태로 보관할 수 있어(Schluter, 2004) 식품공학 분야에서 이를 이용한 연구가 진행되어 왔다. 대기압 상태에서 냉동했을 때는 크기가 크고 불규칙한 다양한 직경의 결정들이 형성되는데 비해 식품 고압 냉동 방법(Pressure Shift Freezing, Pressure Assist Freezing)은 압력을 주어 0°C 아래에서 과냉각 상태로 존재하다가 압력이 해소되면서 조직에 최소한의 손상을 주면서 결정이 작고 균일하게 형성(Zhu 2005, Schluter 2004) 되어 식품의 맛과 질을 향상시킬 수 있다.

의학 분야에서도 세포의 생존률을 증가시키기 위해 압력을 이용한 시도가 있었다. Kazunori(2007)가 쥐의 장을 5atm의 고압(Hyperbaric Oxygen Pressure) 하에서 2일간 저온 보존 후 이식했을 때 1 atm에서 저온 보존한 것보다 더 좋은 이식 결과를 보였다고 하였고, Takahashi(2000,2001)는 냉동에 따른 손상을 피하기 위해 30MPa까지의 고압(High Hydrostatic Pressure) 하에서 0°C에서는 1시간 동안 쥐의 간을 저온 보존하는 것이 가능하고 5MPa 고압(High Hydrostatic Pressure) 하에서는 -2°C에서 5시간 동안 쥐의 간을 냉동시키지 않고 저온 보존할 수 있다고 하였다. 이에 더 나아가 Pribenszky(2005)는 쥐의 embryo를 30분간 실온에서 60MPa 고압(High Hydrostatic Pressure)처리한 후 냉동 보관했을 때 생존률이 증가하였고 Pribenszky(2008)와 Du(2008)도 돼지 난자를 20, 40MPa 압력을 가한 후 냉동 보관했을 때 생존률이 증가하였다고 하였다. 이런 고압(High Hydrostatic Pressure)은 치사량에 가까운 스트레스로 작용해 heat shock proteins(HSPs) 70과 (Kaarniranta, 1998) heat shock proteins(HSPs) 90 β 의 생산을 유도한다고 한다(Elo, 2003). 이 HSPs은 세포의 환경에 대한 스트레스 저항성을 증가시켜 냉동과 같은 환경에서도 세포를 보호해 생존률을 증가시켰다고 보고하고 있다(Du, Pribenszky, 2008).

세포의 활성도를 측정하기 위한 검사로서 Tetrazolium-based colormetric assay(MTT) 검색법은 배양된 세포와 조직의 생존 능력을 보는 가장 널리 알려진 방법이다(Martin, 2000). 이 방법은 대사과정이 온전한 세포의 미토콘드리아 탈수소효소가 노란색 수용성 tetrazolium salt인 MTT(3,4[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 자주색을 띠는 비수용성의 formazan 결정으로 환원시키는 원리를 이용하여 formazan 결정을 DMSO에 용해시켜 570nm의 파장에서 흡광도를 측정한다. 이 흡광도는 살아있는 세포에 의해 MTT가 환원된 양을 나타내며 생존세포 수와 비례한다.

Kim(2007) 등은 쥐 치아를 즉시 발치군, 1시간 건조군, 1시간 viaspan 보관군에서 채식 후 치주인대 세포의 활성도를 MTT로 평가하였을 때 조직학적 소견과 일치함을 보고하여 MTT 검색법이 치주인대세포 활성도를 평가하는데 유용한 방법이라고 하였다. 또

Jeon(2006) 등도 쥐 치아를 발치 후 실온 상태에서 시간 변화에 따른 치근면의 치주인대세포의 활성도를 MTT 검색법과 냉동 절단법을 이용한 조직학적 소견과 일치함을 보고하여 MTT 검색법이 치주인대세포 활성도를 평가하는데 유용한 방법임을 보고하였다.

WST-1(4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) 검색법 역시 세포 증식 및 생존 능력, 약제에 대한 세포 독성을 평가할 때 사용된다(Berridge, 1996). 이 방법은 MTT와는 다른 약한 붉은 색의 tetrazolium salts(WST-1)을 세포내 미토콘드리아 탈수소효소가 분해하여 진한 붉은 색의 formazan 결정으로 환원시키는 원리를 이용하며 450nm의 파장에서 흡광도를 측정한다. 이 흡광도는 살아있는 세포에 의해 WST-1이 환원된 양을 나타내며 생존세포 수와 비례한다. WST-1 검색법은 동위원소를 사용하지 않으며 시약을 녹이기 위한 유기용매를 사용하지 않아 안전하며 동일 계통의 기질인 MTT가 비수용성의 formazan 결정으로 환원시키는 데 반해 WST-1은 수용성 formazan 결정으로 환원시켜 추가적인 단계 없이 측정할 수 있으므로 고감도의 결과를 보장하여 MTT보다 민감도가 뛰어나다(Alotto, Ariotti, 2002).

냉동과 해동 과정은 DNA 분절과 세포사멸과 관련된 유전자 전사 증가와 같은 손상을 일으킬 수 있다(Park, 2006, Honda, 2001). 냉동 과정 중에 세포막 단백질은 분리되고 세포막 지질이 분리되기도 하는 세포막 구조에 변화가 오면서 세포막의 누출이 일어나 필요 없는 이온이 들어가고 세포막에 있는 이온 펌프 효율이 감소하면서 세포내 구성과 농도의 변화가 오며 단백질이 변성되고 세포 골격이 손상되면서 세포사멸(apoptosis)이 일어난다(Rubinsky, 2003). 이런 세포사멸을 검사하는 방법으로 TUNEL 검사(Terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)-mediated dUPT-biotin nick end labeling)가 있다. 이 검사의 원리는 세포 사멸체(apoptotic body)가 생화학적으로 세포 핵 안의 DNA가 분해되는 과정을 거친다는 점에 착안하여 이때 노출되는 3'-OH 가에 TdT(Terminal deoxynucleotidyl transferase)의 매개로 표지된 nucleotide를 붙이는 것이다. 먼저 조직에 단백질 분해 효소 처리를 해서 핵 안으로 시약들이 침투할 수 있는 조건을 만들고 DNA에 결합한 표지된 nucleotide는 peroxidase를 매개로 한 통상적인 면역 화학적 기법에 의해 신호를 증폭한 후 관찰할 수 있게 된다. 이 검사는 방법이 비교적 쉬우며 파라핀 조직에서의 검출이 가능하여 후향적 검사가 가능하고 정량 분석이 가능하다는 장점이 있어 임상에서의 적용이 용이하다(Wijsman JH, 1993).

냉동 보존된 토끼의 대동맥을 해동방법에 따른 세포 손상 정도를 TUNEL 검색법으로 보고자 한 시도(Oh YM, 2004)가 있었으며 Oh(2005) 등은 인간의 치아를 급속 냉동 보관한 후 치주인대 세포의 활성도를 MTT 검색법과 TUNEL 검색법으로 검사시 결과가 일치함을

보고하였고 Ahn(2008)도 쥐 치아를 냉동 보관한 후 치주인대 세포의 활성도를 평가시 MTT 검색법과 TUNEL 검색법의 결과가 일치함을 보고하였다.

이에 본 연구의 목적은 흰 쥐의 상악 대구치를 발거한 후 치주인대세포를 압력을 이용한 저속 냉동 보관법으로 냉동 보관시 MTT 검색법, WST-1 검색법, TUNEL 검사를 이용하여 측정된 치주인대세포의 활성도와 사멸도를 저속 냉동법, 급속 냉동법, 냉장 보관법과 비교하여 평가하는 것이다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험 대상 및 전 처치

생후 4주된 암컷 Sprague-Dawley계 흰쥐 25마리를 사용하였다. 발치를 용이하게 하기 위해 0.4% β -aminopropionitrile(β -APN, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 함유한 Purina 분말과 물을 발치 전 3일간 공급하였다.

마취는 Tiletamine(Zoletil50, Virbac, Carros, France) 1cc를 이용하여 피하 주사하였다. 마취가 유도된 후 날카로운 탐침으로 peritomy를 시행한 후 조직 검자를 이용하여 치관을 잡고 최소한의 외상을 가하면서 접근이 가장 용이한 좌우측 상악 제 1, 2 대구치를 모두 발거하였다. 이때 발치와 주변의 출혈은 면봉으로 조절하고 발치 후에는 치근의 파절 여부를 현미경을 사용하여 확인하였다.

2. 실험 방법

실험에 사용한 보관 용액인 F medium은 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, Gibco-BRL, NY, USA)과 Ham's nutrient mixtures F12(Gibco-BRL, NY, USA)를 3:1의 비로 섞고 10% fetal bovine serum(FBS)와 항생제 penicillin (100units/ μ l), streptomycin(100 μ l/ml), fungizone(0.3 μ g/ml)을 첨가하여 제조하였다.

냉동시 세포질내 동해방지제로는 10% dimethylsulfoxide(DMSO, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였다.

가. 실험군 분류

대조군으로는 즉시 발치군을 사용하였다. 각 군 당 5마리의 쥐에서 18개의 치아를 발거하여 MTT 검색법과 WST-1검색법에 사용하였다.

1군: 즉시 발치군

치아를 발거하자마자 PBS에 세척한 후 실험에 이용하였다.

2군: 냉장군

치아를 발거하고 PBS 세척한 후 2ml 냉동튜브에 F medium 1ml 와 함께 담아 4℃ 냉장

고에 일주일간 보관한 후 실험에 이용하였다.

3군: 급속 냉동군

발거된 치아를 PBS에 세척하고 4°C에서 보관한 F-medium에 2.5%, 5%, 7.5% DMSO를 첨가한 용액에 5분간씩 단계적으로 담근 뒤 2ml 냉동튜브에 F medium과 10% DMSO 혼합 용액 1ml와 함께 넣고 5분 후 -196°C 액화질소 냉동고에 넣어 냉동시켜 일주일간 보관하였다.

4군: 저속 냉동군

발거된 치아를 PBS에 세척하고 4°C에서 보관한 F-medium에 2.5%, 5%, 7.5% DMSO를 첨가한 용액에 5분간씩 단계적으로 담근 뒤 2ml 냉동튜브에 F medium과 10% DMSO 혼합 용액 1ml와 함께 넣고 5분 후 속도조절 냉동기에 넣어 4°C 냉장온도에서 -35°C까지 -0.5°C/min로 서서히 냉동시킨 뒤 -196°C 액화질소 냉동고에 넣어 일주일간 보관하였다.

5군: 압력 저속 냉동군

발거된 치아를 PBS에 세척하고 4°C에서 보관한 F-medium에 2.5%, 5%, 7.5% DMSO를 첨가한 용액에 5분간씩 단계적으로 담근 뒤 2ml 냉동튜브에 F medium과 10% DMSO 혼합 용액 2ml를 넣고 뚜껑 부위를 테이프(NASASEAL®, Han Yang Chemical, P.T.F.E. Thread seal Tape, Seoul, Korea)로 밀봉하였다. 5분 기다리는 동안 압력통(Geumsung Science, Seoul, Korea) 안에 냉동튜브를 4개 넣고 스페너로 잠근 뒤 속도조절 냉동기(Low Temp Freezer Drying Chamber KS5045, Geumsung Science, Seoul, Korea)에 넣고 압력통에 압력을 3MPa로 가하고 4°C에서 -35°C까지 -0.5°C/min로 서서히 냉동시킨 뒤 -196°C 액화질소 냉동고에 넣어 일주일간 보관하였다.

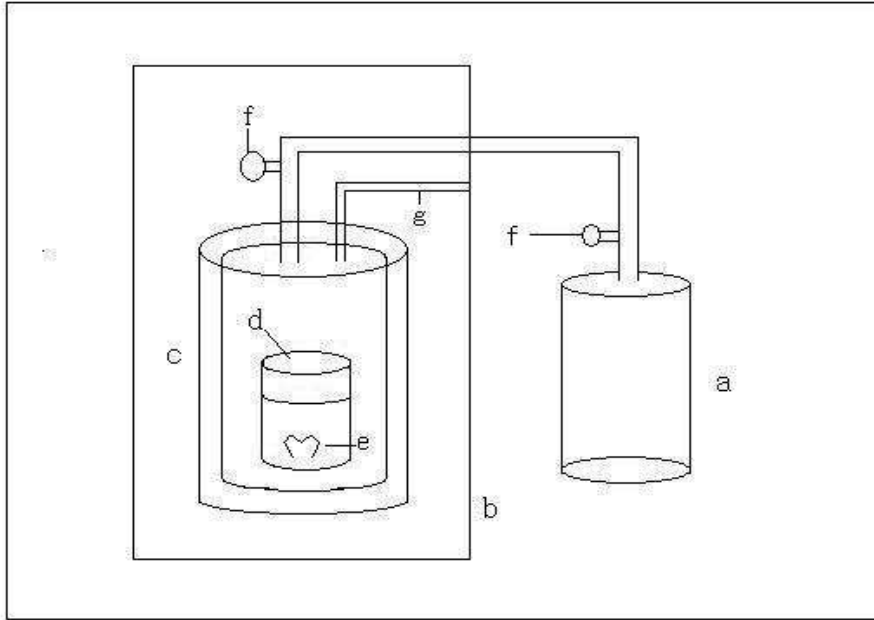


Figure 1. Schematic diagram of program freezer with pressure vessel.

- a. Oxygen container : 3MPa of pressure
- b. Program freezer
- c. Pressure bottle
- d. 2ml Cryotube: 1ml F medium + 10% DMSO
- e. Tooth treated 10% DMSO
- f. Pressure valve
- g. Thermometer

나. 냉동군의 해빙 방법

급속 냉동군과 저속 냉동군의 냉동한 치아를 냉동튜브 채로 -196°C 액화질소 냉동고에서 꺼내어 37°C 수욕조에 넣어 해빙하였다. 압력 냉동군은 압력통을 액화질소 냉동고에서 꺼내어 압력을 해소하고 안에 든 냉동튜브를 꺼내 37°C 수욕조에 넣어 해빙하였다.

2ml 냉동튜브 속의 보관용액이 완전히 액체 상태로 되었을 때 수욕조에서 꺼내 치아를 7.5%, 5%, 2.5%, 0% DMSO가 첨가된 용액에 5분씩 순차적으로 담귀 DMSO를 제거한 후 MTT 검색, WST-1 검색과 TUNEL 검사에 사용하였다.

2-1. MTT 검색 (3,4[4,5-dimethylthiazol-2-y1]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

각 실험군의 처리가 끝난 뒤에 96-well plate에 MTT 용액(0.05mg/ml, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 200 μ l를 넣고 각 군별 치아를 MTT 용액이 있는 well에 담았다. 알루미늄 호일로 96-well plate를 싸서 3시간 동안 37 $^{\circ}$ C 회전진탕기에 배양하였다. 3시간 후 DMSO 150 μ l를 넣은 well에 치아를 옮기고 15분간 회전진탕하여 형성된 MTT formazan 결정을 녹여 내었다. 15분 후 치아를 제거하고 Dynatech MRX ELISA microplate reader (Dynatech laboratories, Chantilly, VA, USA)에 넣고 570nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

2-2. WST-1 검색 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate)

각 실험군의 처리가 끝난 뒤에 96-well plate에 WST-1 용액(20 μ l, Cell Proliferation Reagent WST-1;Roche Applied Science, Mannheim, Germany) 200 μ l를 넣고 각 군별 치아를 WST-1 용액이 있는 well에 담았다. 알루미늄 호일로 96-well plate를 싸서 4시간 동안 37 $^{\circ}$ C 회전진탕기에 배양하였다. 치아를 제거하고 Dynatech MRX ELISA microplate reader (Dynatech laboratories, Chantilly, VA, USA)에 넣고 450nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

2-3. 치아 치근면에 붙어있는 치주조직의 양 측정

실험에 사용된 치아의 치근면에 붙어있는 치주조직의 양을 정량적으로 측정하기 위해 MTT 검색과 WST-1 검색 실험 후 각 군의 well에서 제거된 치아를 각 군별로 96-well plate에 넣고 Eosin(Accustain, sigma-aldrich chemie, Gmbh, Germany) 350 μ l를 첨가하여 12시간 정도 염색을 한 후 치아를 제거하고 다른 well에 넣어 1% acid alcohol (70% ethyl alcohol, 1% HCL) 350 μ l에 30분간 담가두어 치근면에 염색된 치주조직을 탈색시켰다.

치아를 꺼낸 뒤 Dynatech MRX ELISA microplate reader (Dynatech laboratories, Chantilly, VA, USA)에 넣고 530nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

2-4. Terminal deoxynucleotidyl transferase(TDT)-mediated dUPT-biotin nick end labeling(TUNEL) 검사

각 실험군에 의해 준비된 치아 6개를 4% paraformaldehyde가 든 2ml 튜브에 담근 후 조직을 고정하여 보관하였다가 탈석회화한 후 파라핀에 포매하였다.

4 μ m 두께로 조직을 절편한 후 silane coating slide(Muto pure chemical co. Ltd, Tokyo, Japan)에 고정하였다. 각 조직 슬라이드를 Tris-HCL 용액(pH 8.0)에서 10분 동안 전처리하고 20분간 proteinase K(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)로 처리하여 조직을 digestion하였다. PBS 용액으로 수세한 뒤 3% hydrogen peroxide(H₂O₂)로 조직에 있는 peroxidase를 불활성 시킨 후 PBS로 다시 수세하였다. 면역조직화학적 관찰을 위한 양성대조군에 대해 DNA buffer로 10분간 전 처리하고 DNase I(F.Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland)로 20분간 반응시켜 인위적으로 DNA를 단편화시켰다. Transferase-mediated deoxyuridin triphosphated(TdT, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) buffer에서 15분간 전 처리한 후 Terminal deoxytransferase와 Biotin-16-2'-deoxy-uridine-5'-triphosphate(dUTP, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland)로 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 30분 동안 반응시켜 dUTP를 표지하였다. 음성 대조군에서는 TdT 효소를 처리하지 않았다. TB buffer에서 10분간 담귀서 반응을 중지시킨 후에 2% Bovine serum albumin(BSA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)로 15분간 blocking하였고, PBS로 수세 후 streptavidin-peroxidase(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)로 30분간 반응시켜 3,3'-diaminobenzidine(DAB, Vector laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA)로 발색시켰다. 대조염색은 nuclear fast red를 이용하였으며 다시 70%, 90%, 100% 에틸알코올로 탈수하여 봉입하였다. TUNEL 검사에 양성인 치주인대세포의 각 조직슬라이드에서 400배 크기의 현미경(Vanox-S, Olympus, Japan) 시야에서 임의로 세 부분을 지정하여 양성 세포수와 전체 세포수를 계산하여 백분율을 구하였다.

3. 통계처리

대조군과 각 실험군에서 MTT 검색, WST-1 검색에서 얻은 흡광도를 Eosin 염색에서 얻은 흡광도로 나눈 수치의 차이를 SPSS 12.0(SPSS, Chicago, Illinois, USA)을 이용한 ANOVA를 사용하여 분석하였으며 사후 검정으로는 Tukey의 방법을 썼다. TUNEL 검사를 시행한 결과도 SPSS 12.0(SPSS, Chicago, Illinois, USA)을 이용한 ANOVA를 사용하여 분석하였으며 사후 검정으로는 Tukey HSD 방법을 사용하였다.

III. 결과

1. MTT 검색

치근면의 면적으로 나누어진 값인 MTT/Eosin 비율은 냉장군, 급속 냉동군, 저속 냉동군, 압력 저속 냉동군은 즉시 발치군보다 통계적으로 유의하게 낮은 세포 활성을 보였으며 ($p<0.05$) 압력 저속 냉동군은 급속 냉동군보다 높은 수치였으나 유의한 차이가 없었고 냉장군과 저속 냉동군보다 유의성 있게 높은 세포활성도를 보였다($p<0.05$). 그러나, 냉장군은 압력 저속 냉동군, 급속 냉동군, 저속 냉동군, 즉시 발치군과 통계학적으로 유의한 차이를 보이며 가장 낮은 세포 활성을 보였다($p<0.05$).

Table 1. The averages and standard deviations of optical density of MTT.

Groups	MTT ¹	Eosin ²	MTT/Eosin ³
Immediately extraction	3.01±0.25	0.49±0.11	6.45±1.46 ^a
Cold preservation	0.81±0.26	0.42±0.11	2.08±0.94 ^b
Rapid freezing	1.60±0.37	0.45±0.12	3.69±1.03 ^{c,d}
Slow freezing	1.62±0.24	0.47±0.13	3.62±0.88 ^c
Slow freezing under pressure	1.94±0.44	0.44±0.14	4.71±1.24 ^d

Same letters are not significant($p>0.05$).

The values of MTT¹ are proportional to the vitality of the cells. The values of Eosin² are proportional to the area of the periodontal ligament cells. So, The values of MTT/Eosin³ means the vitality of the periodontal ligament cells per unit area.

2. WST-1 검색

치근면의 면적으로 나누어진 값인 WST-1/Eosin 비율은 냉장군, 급속 냉동군, 저속 냉동군, 압력 저속 냉동군은 즉시 발치군보다 통계적으로 유의하게 낮은 세포활성도를 보였으며 ($p<0.05$) 압력 저속 냉동군은 급속 냉동군보다 높은 수치였으나 유의한 차이가 없었고, 냉장군과 저속 냉동군보다 유의성 있게 높은 세포활성도를 보였다($p<0.05$). 냉장군은 압력 저속 냉동군, 저속 냉동군, 급속 냉동군, 즉시 발치군과 통계학적으로 유의있게 가장 낮은 세

포 활성을 보였다($p < 0.05$).

Table 2. The averages and standard deviations of optical density of WST-1.

Groups	WST-1 ¹	Eosin ²	WST-1/Eosin ³
Immediately extraction	2.31±0.33	0.49±0.13	4.96±1.23 ^a
Cold preservation	0.58±0.19	0.39±0.12	1.50±0.32 ^b
Rapid freezing	1.08±0.22	0.42±0.15	2.83±0.95 ^{c,d}
Slow freezing	1.11±0.32	0.5±0.20	2.46±1.00 ^c
Slow freezing under pressure	1.34±0.21	0.41±0.10	3.41±0.81 ^d

Same letters are not significant($p > 0.05$).

The values of WST-1¹ are proportional to the vitality of the cells. The values of Eosin² are proportional to the area of the periodontal ligament cells. So, The values of WST-1/Eosin³ means the vitality of the periodontal ligament cells per unit area.

3. TUNEL test

각 실험군 당 6개의 치아를 이용하여 전체 세포수에 대한 양성 세포수의 비율을 구해 각 군별로 평균 및 표준 편차를 구해 one way ANOVA를 시행한 결과 압력 저속 냉동군은 세포 사멸에 있어서 즉시 발치군, 급속 냉동군, 냉장군에 통계적으로 유의한 차이가 없었다 ($p > 0.05$). 각 실험군 별로 400배 크기의 현미경 시야에서 양성 세포를 관찰했을 때 저속 냉동군에서는 모두 양성세포가 관찰되지 않았으며 즉시 발치군, 급속 냉동군, 압력 저속 냉동군에서는 4개의 치아에서, 냉장군에서는 5개의 치아에서 양성 세포가 국소적으로 분포함을 관찰할 수 있었다.

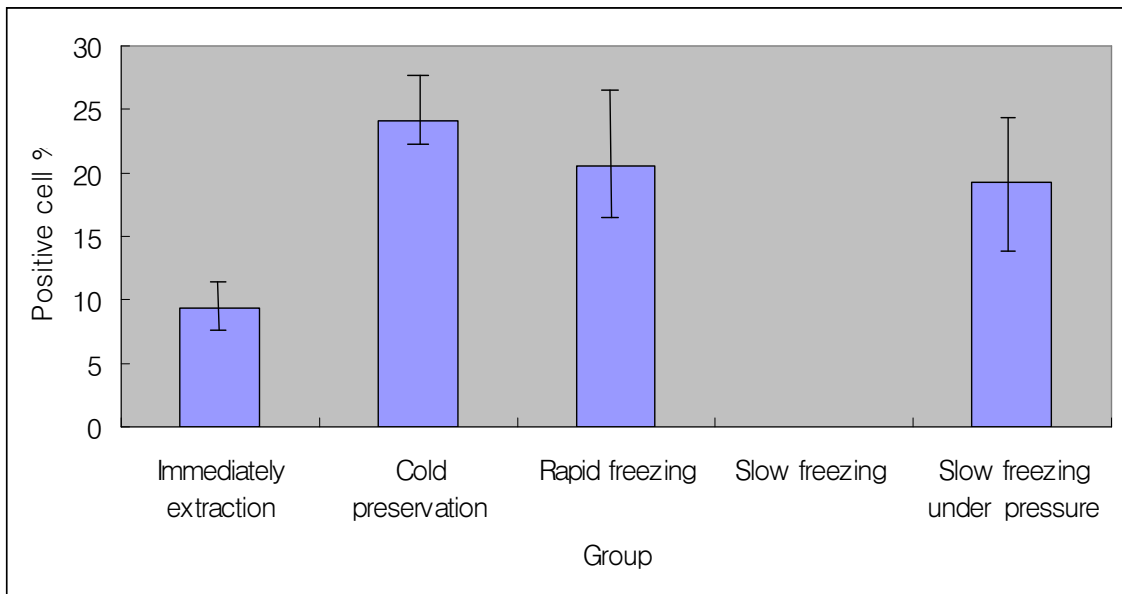


Figure 2. The averages and standard deviations of percentage of positive cells by TUNEL test.

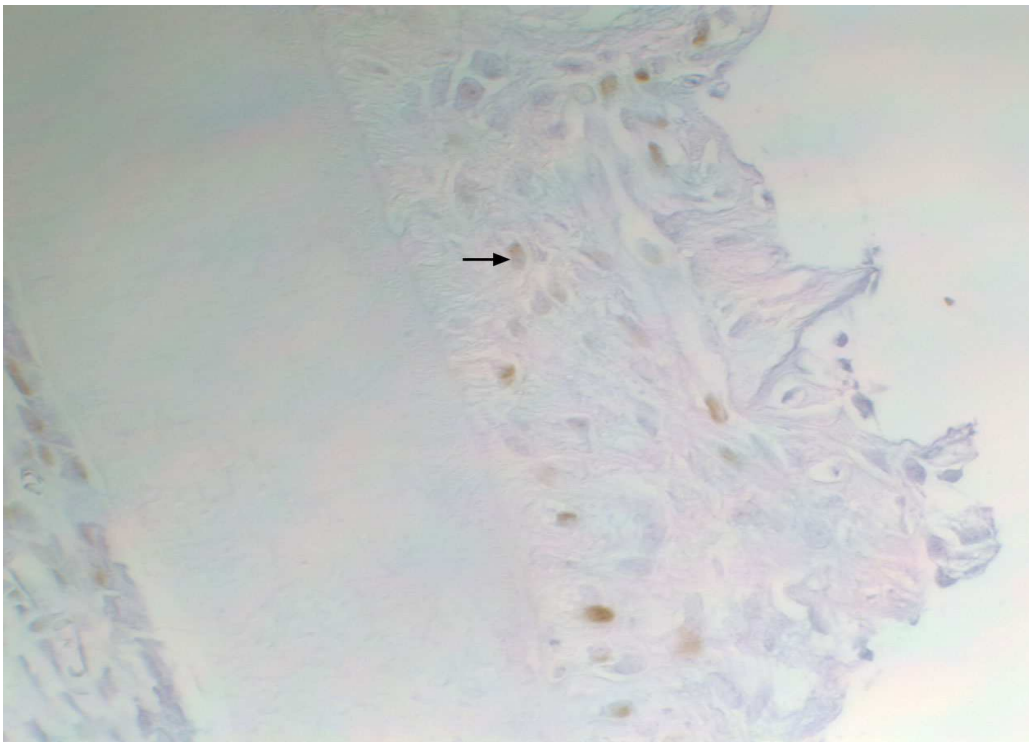


Figure 3. The micrograph of immediately extraction group by TUNEL test(x 400). Brown stained cells are positive cells(by arrow).

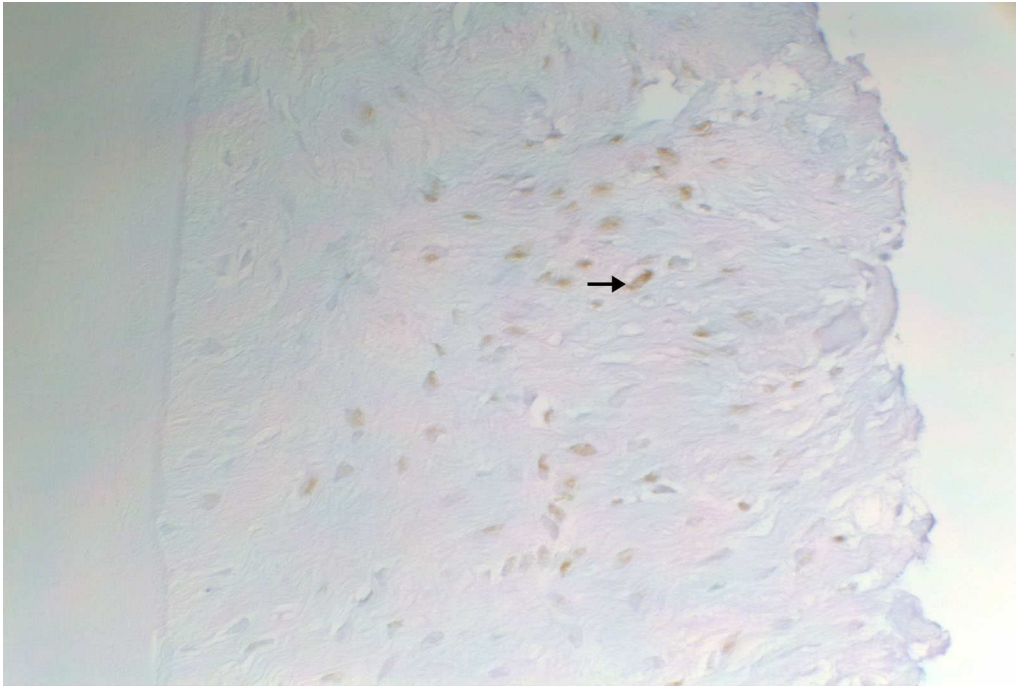


Figure 4. The micrograph of cold preservation group by TUNEL test(x 400).
Brown stained cells are positive cells(by arrow).

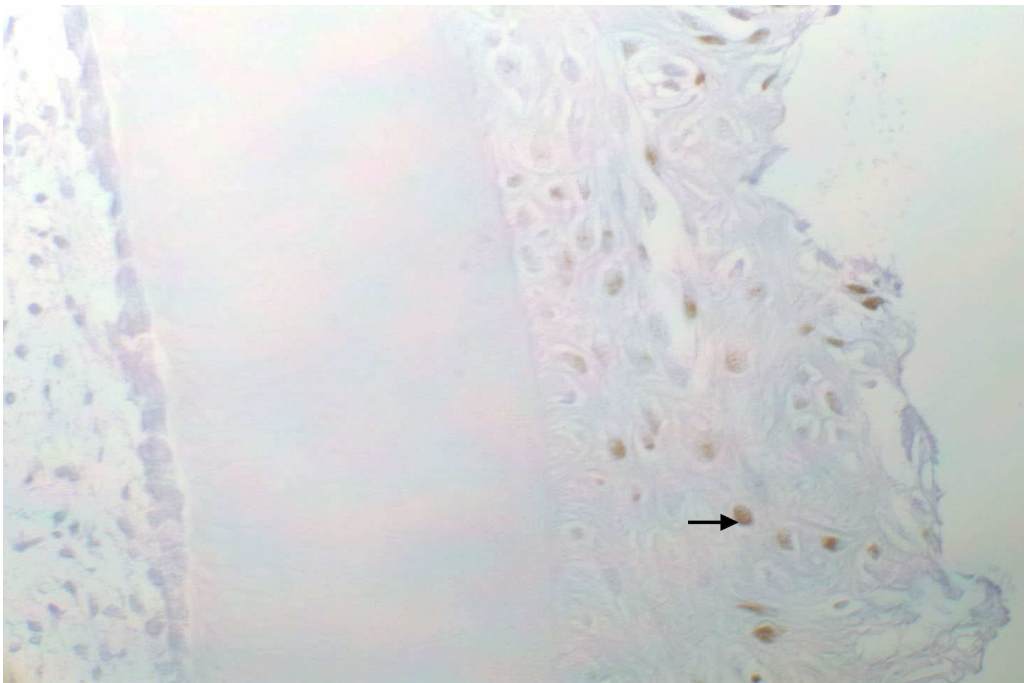


Figure 5. The micrograph of rapid freezing group by TUNEL test(x 400).
Brown stained cells are positive cells(by arrow).

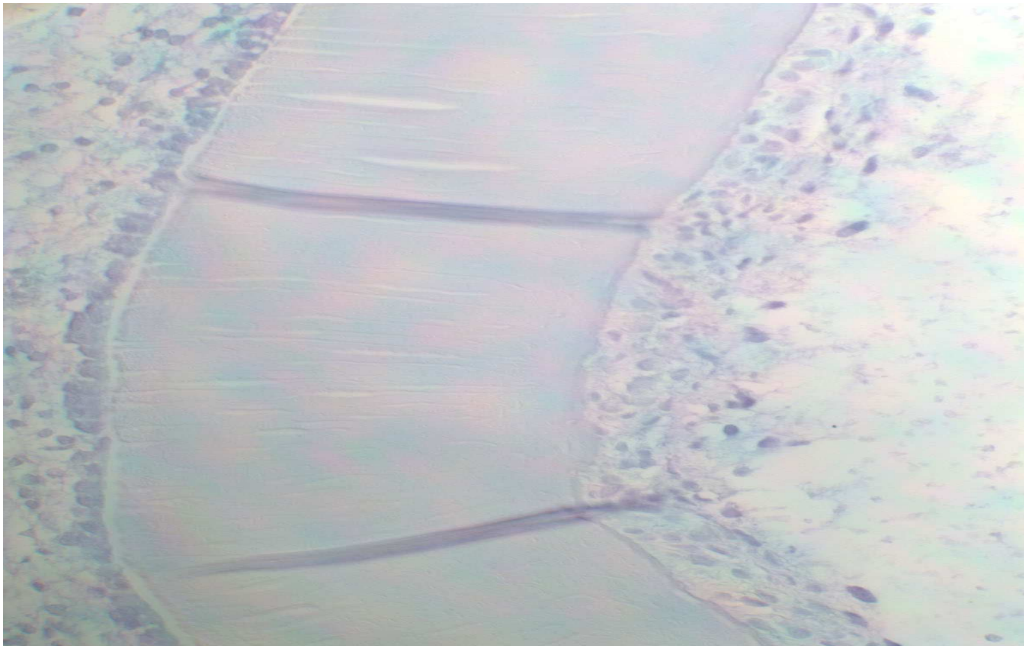


Figure 6. The micrograph of slow freezing group by TUNEL test(x 400).

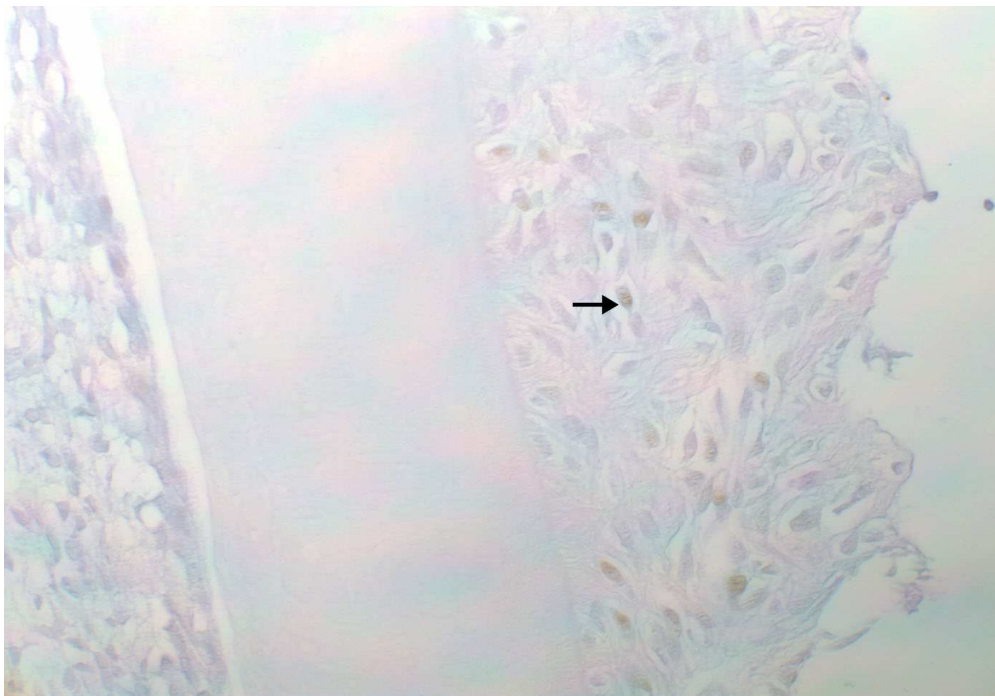


Figure 7. The micrograph of slow freezing under pressure group by TUNEL test(x 400).
Brown stained cells are positive cells(by arrow).

IV. 고찰

냉동보존은 치아가 상실된 부위에 자가치아이식으로 수복을 계획했으나 수여부위가 너무 작아 교정치료를 해야 하는 경우나 교정 치료 중에 발치된 치아를 보관하여 미래에 자가치아이식이나 타가치아이식을 위해 치아은행을 만드는데 있어서 새로운 가능성을 열어주었다 (Schwartz, 1985, 1992).

여러 연구에서 냉동이 치주인대세포의 재생에 영향을 미치지 않는 것을 보여주었고 Kawasaki(2004)는 속도조절냉동기를 이용하여 냉동된 치아의 치주조직의 재생이 비록 느리지만 즉시 발치하여 재식된 치아의 치주조직 재생과 유사하다는 것을 관찰하였다.

그러나, 세포를 냉동 보존하는 과정에서 세포가 손상 받을 수 있다.

-5℃까지는 보존액 내에 포함된 동해방지제로 인해 어는점이 낮아져서 세포와 주위 보존액은 얼지 않고, -5℃와 -15℃ 사이에서는 세포 외부 보존액에서 얼음이 형성되나 세포막이 얼음이 세포질 내로 성장하는 것을 막기 때문에 세포는 얼지 않고 과냉각된다(Mazur, 1984, Gaeo, 2000). 세포내 과냉각된 수분은 부분적으로 동결된 세포 외부 보존액보다 높은 화학적 전위를 가져서 세포 외부로 흘러나와 얼게 된다(Mazur, 1984, Gaeo, 2000). 이후 일어나는 세포 내 변화는 냉동속도에 따라 달라진다. 냉동속도가 너무 빠르면 세포 내 수분이 삼투압으로 빠져나가기 전에 과냉각되면서 생긴 세포 내 얼음 결정체에 의해 세포가 손상 받게 된다. 그러나, 냉동 속도가 너무 느리면 세포 외부에 얼음이 형성됨에 따라 용액의 농도가 증가하여 세포 내 수분이 세포 외로 이동하여 세포 내 용질의 농도가 증가하고 세포는 수축하게 된다(Mazur, 1984, Pegg 2002, Gaeo, 2000). 따라서, 세포를 냉동할 때 손상을 줄일 수 있는 적절한 냉동 속도와 방법을 결정하고 동해방지제 사용을 하는 것이 필요하다.

프로그램 냉동 속도 조절기를 이용한 저속 냉동은 냉동으로 인한 손상을 줄일 수 있다 (Kawasaki, 2004). Andreasen(1992)은 -35℃ 까지 -0.5℃/min 속도로 저속 냉동, -100℃ 까지 -6℃/min 속도로 냉동한 뒤 -196℃까지 급속 냉동할 것을 권하였고, Kawata(2005)와 Kaku(2007)는 쥐 치아를 자기장으로 -0.5℃/min 속도로 -30℃까지 3일간 냉동 보관했을 때 좋은 결과를 얻었다고 하였으므로 본 실험에서도 프로그램 냉동속도 조절기를 사용하여 -35℃까지는 -0.5℃/min 속도로 저속 냉동하였다. -35℃ 이하 온도에서는 세포 내부에 얼음 결정이 생기지 않고(Ashwood-smith, 1980) 세포 외부의 냉동환경에 반응해서 세포가 수축하기 때문에 -196℃까지 빠르게 냉동할 수 있다고(Ashwood-smith, 1980, Farrant, 1977) 보고되고 있으므로 -35℃ 이하부터 -196℃까지는 액체 질소통을 사용하여 급속 냉동을 시행하였다.

세포를 해동하는 과정에서도 세포가 손상을 받을 수 있는데 냉동속도가 빠르면 세포 내 크기가 매우 작은 얼음 결정체가 형성되고(Nei, 1978, Shimada, 1977) 이때 느린 속도로 해동하면 세포 내 작은 결정이 응집하여 큰 결정을 형성하는 재결정화 현상이 일어나 세포가 손상을 받게 된다(Mazur, 1984, 1972). 반면 Gao(2000)는 급속 해동을 하면 재결정화 현상을 막을 수 있으므로 많은 세포를 살릴 수 있다고 보고하여 본 실험에서는 급속 해동을 시행하였다.

대표적인 동해방지제로서 DMSO가 널리 사용되며 Schwartz와 Andreasen(1983, 1985)은 속도조절기로 저속 냉동을 했을 때 10% DMSO를 사용한 경우 정상 치근단막 생성이 제일 좋았다고 하였고 Kim(2006)도 급속 냉동시 10% DMSO를 사용했을 때 치주인대 활성화가 제일 높았다고 보고하였으므로 본 실험에서는 동해방지제로 10% DMSO를 선택하여 실험하였다.

냉동 보존 기술의 방법들이 식품 공학 쪽에서 식품의 신선함을 유지하기 위해 발전되어 왔다. 식품을 냉동하면 미생물의 번식을 방지하고 효소의 작용을 억제하며 산화반응을 낮게 하여 장기 저장에 효과적인 방법이 되나 냉동, 저장, 해동할 때 원하지 않는 품질의 변화가 발생하게 된다(최신식품가공학). 식품을 냉동할 때 기존의 냉동 과정에서는 세포 표면에서 동결이 시작되어 표면의 얼음이 장벽이 되어 내부 동결을 방해하게 되어 세포 전체가 동결 되는데 시간이 걸리고 동결 속도는 느려져 내부로 갈수록 빙결정이 대형화하는 경향이 있고 표면 얼음이 성장함에 따라 내부의 얼지 않은 물 분자가 이동해 세포의 탈수가 일어난다. 얼음 결정의 크기는 크고 다양한 직경을 갖게 된다. 반면 210MPa 고압 하에서는 물의 상변이 온도가 0℃에서 -21℃로 낮아지므로(Schluter, 2004) 고압을 준 상태에서 0℃ 이하의 온도로 떨어뜨리면 과냉각 상태로 존재하다가 빠른 속도로 압력이 해소되면서 결정이 작고 균일하게 동시에 형성된다(Zhu 2004, 2005, Schluter 2004). 또한 역으로 얼음을 가압하면 용해된다(Cheftel, 2002). 이렇게 저온 고압 냉동을 하면 맛과 향기, 색이 천연에 가깝고 가열에 의해 붕괴되기 쉬운 영양소의 파괴가 적다(최신식품가공학). Zhu(2005)는 젤라틴 젤과 같은 식품을 고압을 이용하여 냉동하면 세포의 손상을 줄여 식품의 맛과 질이 향상된다고 보고하였다.

그러나, 이런 고압 장치는 보통 장치와 비교하여 크기가 크고 무거우며 제작비가 다른 실험용 기기에 비해 고가라는 단점이 있다. 이에 본 연구에서는 3MPa의 압력을 주면서 냉동시킬 수 있는 기기를 제작하여 실험에 사용하였다.

고압(High Hydrostatic Pressure)은 세포막의 수동 수송과 능동 수송을 포함한 세포 내

생화학적 반응과 세포의 단백질 운곽을 변화시키는 것이 증명되었다(Abe et al 1999, Aldridge and Bruner 1985, Huang 2007). Kaarniranta(1998)는 고압이 후전사 활성화를 유도해 HSPs 70의 생산을 유도한다고 하였고, Elo(2003)는 고압이 HSPs 90 β 의 생산을 유도한다고 하였다. HSPs은 스트레스 단백질이라고도 불리는 일종의 molecular chaperone으로서 세포가 고온으로 자극되었을 때 다량으로 생성되는 세포질 내 단백질 군으로 추운 온도, 삼투압, 산도, 세포의 대사 장애, 독성물질, 물리적 자극 등에 의해서도 생성이 증가된다(Alahiotis, 1983, Due, 2008). 이 HSPs은 세포질 내 단백질의 형태와 구조를 완전하게 유지하는데 중요한 기능을 담당하며(Parsell, 1993) 세포질 내 단백질을 세포 표면으로 이동시켜 면역반응을 유발하는 항원 전달체 기능도 가지고 있다고 한다(Pelham, 1988). 또, 암세포 내의 특정한 항원과 결합하여 암세포에 대한 세포성 면역 반응을 유발하기도 하고(Udono, 1999), 사람의 혈액 종양세포를 이용한 연구에서 HSPs 70은 세포의 분화를 촉진시키며 세포사멸을 억제할 뿐만 아니라 유발하는 약제에 대해서도 세포가 내성을 갖도록 한다는 보고도 있다(Kwak, 1988).

본 실험에서도 압력 저속 냉동군에서 다른 군에 비해 높은 생존률을 보인 것은 압력 처리로 인해 생성된 HSPs이 관여하지 않았나 추측된다.

MTT 검색법은 세포의 활성도를 보는데 방사능 물질을 사용하지 않고 96 well plate를 사용하므로 많은 시료를 검사할 수 있고 과정이 반자동으로 이루어지므로 상당히 정확하다. Kim(2007, 2006), Jeon(2006), Ahn(2008)은 쥐 치아가 96 well plate에 잠길 정도로 충분히 작기 때문에 in vivo MTT 검색법을 이용하여 치주인대세포의 활성도를 배양이라는 과정 없이 직접 측정할 수 있다고 하였다.

WST-1 검색법 역시 세포 증식 및 생존 능력, 약제에 대한 세포 독성을 측정하며 세포의 활성도를 보는데 방사능 물질을 사용하지 않고 96 well plate를 사용하므로 많은 시료를 검사할 수 있고 과정이 반자동으로 이루어지므로 상당히 정확하다. 그러나, 이 방법들은 DNA나 단백질을 측정하지 않고 살아있는 세포 수에 비례하는 양적인 측정만 가능하다(Carlson, 2006).

동일 계통의 기질인 MTT는 비수용성의 formazan 결정으로 환원되어 결정을 녹이는 단계를 한 번 더 거치게 되나 WST-1는 수용성 formazan 결정으로 환원되어 추가적인 단계 없이 측정할 수 있어 MTT보다 민감도가 뛰어나다(Alotto, Ariotti, 2002). 그러나, 비용 면에서 WST-1보다 MTT가 상대적으로 저렴하여 쉽게 이용할 수 있다.

본 실험에서는 쥐의 구강 내에서 발수하는 것이 불가능하고 발거 후에 발수를 하는 경우 치근의 손상이 우려되고 시간을 일정하게 조절할 수 없어 변수로 작용할 수 있으므로 발수하지 않고 그대로 MTT 검색과 WST-1 검색에 사용하였다.

이렇게 발거된 상악 제 1 대구치와 제 2대구치를 직접 MTT 검색법과 WST-1 검색법에 이용할 경우 치아의 치근면에 붙어있는 치주조직의 양이 일정치 않고 같은 치아 부위라 할 지라도 치근의 길이와 지름에 있어 제각기 다 다르므로 치주인대세포 활성도를 비교하기 위해 Kim(2006)이 시도한 Eosin 검색법을 이용하였다. 이는 MTT 검색법을 응용하여 세포질의 염기성 물질과 반응한 Eosin을 1% acid alcohol로 탈색시킨 용액의 흡광도를 530nm에서 측정해서 그 농도를 구해 간접적으로 치주인대세포의 양을 알아보는 것이다. 이렇게 구한 MTT 환원 흡광도를 Eosin 흡광도로 나누어 표준화하면 치주조직의 양이 다른 제1,2 대구치를 치주인대 단위면적으로 환산해 서로간 상호 비교가 가능하다고 하였다(Kim, 2006). 그래서, 본 실험에서도 MTT 환원 흡광도와 WST-1 환원 흡광도를 단위면적당으로 환산해 비교하여 압력 저속 냉동법이 저속 냉동법에 비해 치주인대세포 활성도가 유의성 있게 높게 나타났다고 할 수 있었고 급속 냉동법과 비교 시에 유의성 있는 차이는 아니었지만 비교적 높은 값을 보였다.

냉동 보존된 치아의 물리적 측면도 고려되어야 하는데 Oh(2004) 연구에서 발거된 사람 소구치를 급속 냉동하였을 때 16개 중 4개 치아에서 수직적인 파절이 관찰된 것을 보고한 바, 급속 냉동 시에 치아 외부와 내부의 급격한 온도차이로 인한 수축이 일어나 파절이 생길 수 있으므로 급속 냉동법보다는 저속 냉동법이 더 고려될 수 있고 압력 저속 냉동법이 저속 냉동법보다는 높은 활성도를 보였으므로 더 추천할 수 있다.

실험 결과 냉장균은 다른 균에 비해 유의성 있게 세포활성도가 낮았는데 냉장 상태에서는 보관 기간이 길어질수록 저온허혈에 의해 세포가 괴사되거나 사멸되기 때문에(Fisher, Maclean 2000) 장기 보관하는 데는 적합하지 못하다.

의료계에서는 암세포를 억제하는 약물의 효과를 보기위해 MTT 검색이나 WST-1 검색으로 약물에 의한 암세포의 생활력을 평가하고 세포 사멸 정도를 TUNEL 검사로 평가하는 방법을 많이 사용하고 있다. 세포사멸(apoptosis)은 1972년 Kerr등이 세포사(cell death)의 형태학적 연구에서 처음 도입한 개념으로 괴사(necrosis)와는 다른 세포 사멸의 한 형태이며 괴사는 DNA 파괴 전에 세포막의 소실이 일어나는 것이 특징이지만, 세포 사멸은 DNA 파괴 후 세포막이 소실되며 세포핵의 분열, 염색체의 응결 및 세포질의 응축, 세포 사멸체의 형성 등의 특징적인 양상을 동반한다(Searle 1982, Kerr 1994). 능동적이고 계획된 세포사(programmed cell death)인 세포사멸은 생체의 항상성을 유지하기 위해서 정상세포에서도 일어나며 건강한 조직이 방사선 조사, 항암제, 호르몬, 세포 독성물 등 DNA 파괴성 요인에 노출되는 경우에도 발생된다고 보고되었다(Kerr, 2002). 치아를 냉동 보관하게 되어도 DNA 분절과 세포사멸과 관련된 유전자 전사 증가와 같은 손상을 받게 된다(Park, 2006, Honda, 2001).

세포사멸을 측정하는 방법은 전자현미경을 통하여 핵 및 염색체의 변화를 관찰하거나 세

포 사멸체를 찾아내는 형태학적인 방법이 가장 기본적인 방법이지만 정량분석이 어렵고 신선한 조직 절편이 필요하여 임상적으로도 적용하기 곤란하다는 단점이 있고 세포의 DNA를 추출하여 전기영동을 통해 분해된 DNA를 측정하는 방법 역시 이종성(heterogeneous cell population)에서는 적용하기 어렵다는 결점이 있다. TUNEL 검사가 전체 세포 중에서 세포 사멸이 일어난 분획을 빠르게 정량화하는 최선의 방법이므로(Negoescu 1996, Shinohara 1997) 본 연구에서는 세포 사멸도를 검사하는 방법으로 TUNEL 검사를 시행하였다. 그러나, 실험 결과 저속 냉동군은 모두 세포 사멸이 관찰되지 않았고 즉시 발치군, 급속 냉동군, 압력 저속 냉장군은 4개의 치아에서 양성 세포가 관찰되었고 냉장군은 5개의 치아에서 양성 세포가 관찰되었으나 서로 유의한 차이를 보이지 않았다. Oh(2005) 등도 사람의 치아를 급속 냉동한 후 치주인대세포의 DNA 손상을 TUNEL 검색법으로 평가하였을 때 즉시 발치군과 급속 냉동군의 사멸도의 유의한 차이가 없음을 보고하였고 냉동 환경이 치주인대세포의 세포사멸을 일으킬 정도가 아니어서 냉동보관 후 재식했을 때 치주인대세포가 재생될 수 있다고 하였다.

본 연구에서 치아를 냉동 후 치주인대세포의 활성도를 검사했을 때 MTT 검색과 WST-1 검색 모두에서 압력 저속 냉동군이 급속 냉동군보다 높은 활성도를 나타냈으나 유의성 있지는 않았고 냉장군, 저속 냉동군보다 유의성 있게 높은 세포 활성도를 보여 동일한 결과를 얻을 수 있었다. 그러나, TUNEL 검사를 이용한 세포 사멸도 검사에서는 세포 활성도검사와 동일한 결과를 보이지 않았는데, 이것은 TUNEL 검사에 사용한 표본수가 적고 TUNEL 검사는 세포 사멸의 특징인 DNA 분절화를 면역화화적인 방법으로 검출하는 방법으로 DNA가 분해되는 상황인 세포 손상 후 DNA가 수리되는 DNA 복원 과정과 세포 괴사가 되는 경우에도 양성으로 측정하는 문제점이 있기 때문으로 생각된다.

본 연구에서 시행한 압력 저속 냉동보관법은 쥐 치아 치주인대세포의 높은 활성도를 보였으므로 치아를 냉동 보관하는 방법으로 이용될 수 있으며 차후 압력을 주는 시간이나 강도 등에 있어서 세밀한 프로토콜의 개발이 필요하다.

V. 결론

본 연구는 흰쥐 상악 대구치를 발거 후 3MPa 압력 하에 저속 냉동법을 이용하여 치아냉동 시 치주인대세포의 활성도를 MTT 검색법, WST-1 검색법, TUNEL 검사를 이용하여 측정하고자 한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. MTT 검사 결과 압력 저속 냉동군은 즉시 발치군보다 유의성 있게 세포 활성도가 낮았으나($p < 0.05$), 압력을 주지 않은 저속 냉동군이나 냉장군과 비교할 때는 높은 세포 활성도를 보이며 통계적 유의성이 있었다($p < 0.05$). 급속 냉동군과 비교할 때는 높은 세포 활성도를 보였지만, 통계적 유의성은 없었다.
2. WST-1 검사 결과도 MTT 검사와 마찬가지로 압력 저속 냉동군에서는 즉시 발치군보다 유의성 있게 세포 활성도가 낮았으나($p < 0.05$), 압력을 주지 않은 저속 냉동군이나 냉장군과 비교할 때는 높은 세포 활성도를 보이며 통계적 유의성이 있었다($p < 0.05$). 급속 냉동군과 비교할 때는 높은 세포 활성도를 보였지만, 통계적 유의성은 없었다.
3. 4℃ 냉장군에서는 MTT 검사, WST-1 검사 결과 모든 군에 비해 세포 활성도가 현저하게 낮았다($p < 0.05$).
4. TUNEL 검사 결과 세포 사멸도에서는 유의성 있는 차이를 보이지 않았다.

위의 결과를 통해, 3MPa(30기압) 압력을 이용한 저속냉동보관법은 4℃ 냉장법이나 압력을 사용하지 않은 다른 냉동 보관법에 비해 우수한 쥐 치아의 치주인대세포의 활성도를 보여 차후 치아의 재-이식을 위한 중-장기 치아보관을 위한 방법으로서의 가능성을 제시하였다.

VI. 참고 문헌

Abe F, Kato C, Horikoshi K. Pressure regulated metabolism in microorganisms. Trends Microbiol 1999;7:447-453.

Ahn HJ, Kim ES, Kim J, Kim DW, Kim KY, Lee CY, Lee SJ. Evaluation of viability of periodontal ligament cell in rat teeth using slow cryopreservation method with magnetic field. J of Korean Academy of Conservative Dentistry 2008;33(4):332-340.

Alahiotis SN. Heat shock proteins. A new view on the temperature compensation. Comp Biochem Physiol 1983;B75:379-387.

Aldridge BE, Bruner LJ. Pressure effects on mechanisms of charge transport across bilayer membranes. Biochem Biophys Acta 1985;817:343-354.

Alotto D, Ariotti S, Graziano S, Verrua R, Stella M, Magliacani G, Castagnoli C. The role of quality control in a skin bank: tissue viability determination. Cell and Tissue banking 2002;3:3-10.

Andreasen JO. Interrelation between alveolar bone and periodontal ligament repair after replantation of mature permanent incisors in monkeys. J Periodont Res 1981;16:228-235.

Andreasen JO, Schwartz O. Atlas of replantation and transplantation of teeth. Mediglobe SA, Fribourg, Switzerland. 1992.

Ashwood-smith MJ. Low temperature preservation of cells, tissues and organs. Pitman Medicals 1980;19-45.

Berridge MV, Tan AS, McCoy KD, Wang R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. Biochemica 1996;4:15-20.

Carlson MA. Technical note: assay of cell quantity in the fibroblast populated collagen matrix with a tetrazolium reagent. Eur Cell Materials. 2006;12:44-48.

Cheftel JC, Thiebaud M, Dumay E. Pressure-assisted freezing and thawing of foods: a review of recent studies. *High Pressure Research* 2002;22:601-611.

Due Y, Lin L, Schmidt M, Bogh IB, Kragh PM, Sorensen CB, Li J, Purup S, Pribenszky C, Molnar M, Kuwayama M, Zhang X, Yang H, Bolund L, Vajta G.

High hydrostatic pressure treatment of porcine oocytes before handmade cloning improves developmental competence and cryosurvival. *Cloning and stem cells* 2008;10(3):325-330.

Due Y, Pribenszky C, Molnar M, Zhang X, Yang H, Kuwayama M, Pedersen AM, Villemoes K, Bolund L, Vajta G. High hydrostatic pressure: a new way to improve in vitro developmental competence of porcine matured oocytes after vitrification. *Reproduction* 2008;135(1):13-17.

Elo MA, Sironen RK, Karjalainen HM, Kaarniranta KK, Helminen HJ, Lammi MJ. Specific induction of heat shock protein 90 beta by high hydrostatic pressure. *Biorheology* 2003;40:141-146.

Farrant J. Water transport and cell survival in cryobiological procedures. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1977;B278(959):191-205.

Fisher S, Maclean AA, Liu M, Cardella JA, Slutsky AS, Suga M, Moreira JF, Keshavjee S. Dynamic changes in apoptotic and necrotic cell death correlate with severity of ischemia-reperfusion injury in lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(5):1932-9.

Gao D, Critser JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR J* 2000;41(4):187-196.

Honda S, Weigel A, Hjelmeland LM, Handa JT. Induction of telomere shortening and replicative senescence by cryopreservation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;282:493-498.

Huang SY, Pribenszky C, Kuo YH., et al. The effect of hydrostatic pressure treatment on the protein profile of boar spermatozoa before and after freezing. Proceedings of the 6th International Conference on Boar Semen Preservation, Alliston, Ontario, Canada, 2007 p. I.-34.

Inuzuka K, Unno N, Yamamoto N, Sagara D, Suzuki M, Nishiyama M, Konno H. Effect of hyperbarically oxygenated-perfluorochemical with university of Wisconsin solution on preservation of rat small intestine using an original pressure-resistant portable apparatus. *Surgery* 2007;142(1):57-66.

Jeon IS, Kim ES, Kim J, Lee SJ. Evaluation of periodontal ligament cell viability in rat teeth according to various extra-oral dry storage times using MTT assay. *J of Korean Academy of Conservative Dentistry* 2006;31(5):398-408.

Kaarniranta K, Elo M, Sironen R, Lammi MJ, Goldring MB, Eriksson JE, Sistonen L, Helminen HJ. Hsp 70 accumulation in chondrocytic cells exposed to high continuous hydrostatic pressure coincides with mRNA stabilization rather than transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:2319-2324.

Kaku M, Kamata H, Kawata T. Cryopreservation of PDL cells by use of program freezer with magnetic field for tooth banking. *Dentistry in Japan*. 2007;43:82-86.

Katayam Y, Yano T, Bessho A, Deguchi S, Sunami N, Shinagawa K, Omoto E, Makino T, Mizuno S, Fukuda, Eto T, Fujisaki T, Ohno Y, Inaba S, Niho Y, Lindskog S, Harada M. The effect of simplified method for cryopreservation and thawing procedures on peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplant* 1997;19(3):283-287.

Kawasaki N, Hamamoto Y, Nakajima T, Irie K, Ozawa H. Periodontal regeneration of transplanted rat molars after cryopreservation. *Archives of Oral Biology* 2004;49:59-69.

Kawata T. Tooth transplantation by teeth bank-approach to human-Hiroshima. Department of Orthodontics, Hiroshima University School of Dentistry. 2005.

Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994;73(8):2013-2026.

Kerr JF. History of the events leading to the formation of the apoptosis concept. *Toxicology* 2002;27:181-182, 471-474.

Kim ES, Jeon IS, Kim JW, Kim J, Juhn HS, Lee SJ. An MTT-based method for quantification of periodontal ligament cell viability. *Oral Diseases* 2007; 13(5):495-499.

Kim JW, Kim ES, Kim J, Lee SJ. Evaluation of periodontal ligament cell viability in rat teeth after frozen preservation using in-vivo MTT assay. *J of Korean Academy of Conservative Dentistry* 2006;3(3):192-202.

Kristerson L. Autotransplantation of human premolars. A clinical and radiographic study of 100 teeth. *Int J Oral Surg* 1985;14:200-213.

Kwak HJ, Jun CD, Pae HO, Yoo JC, Park YC, Choi BM, Na YG, Park RK, Chung HT, Park WJ, Seo JS. The role of inducible 70-kDa heat shock protein in cell cycle control, differentiation and apoptotic cell death of the human myeloid leukemic HL-60 cells. *Cell Immunol* 1988;187:1-12.

Lindskog S, Blomlof L, Hammarstrom L. Repair of periodontal tissues in vivo and in vitro. *J Clin Periodontol* 1983;10:188-205.

Makino S, Harada M, Akashi K, Taniguchi S, Shibuya T, Inaba S, Niho Y. A simplified method cryopreservation of peripheral blood stem cells at -80 centigrade without rate-controlled freezing. *Bone Marrow Transplant* 1991;8:239-244.

Martin H, Bournique B, Sarsat JP, Albaladejo V, Lerche-Langrand C. Cryopreserved rat liver slices: a critical evaluation of cell viability, histological integrity and drug metabolizing enzymes. *Cryobiology* 2000;41:135-144.

Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 1984;247:125-142.

Mazur P, Leibo SP, Chu EH. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Exp Cell Res* 1972;71(2):345-355.

Melcher AH. Repair of wounds in the periodontium of the rat. Influence of periodontal ligament on osteogenesis. *Arch Oral Biol* 1970;15:1183-1204.

Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C, Brambilla C, Brambilla E. In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *J Histochem Cytochem* 1996;44:959-968.

Nei T. Structure and function of frozen cells freezing patterns and post-thaw survival. *J Microsc* 1978;112-197-204.

Neulieb RL, Neulieb MK. The diverse actions of dimethyl sulphoxide: an indication of membrane transport activity. *Cytobios* 1990;63:139-165.

Oh YH, Che ZM, Hong JC, Lee SJ, Kim J. Cryopreservation of human teeth for future organization of a tooth bank-A preliminary study. *Cryobiology* 2005; 51(3):322-329.

Oh YM, Sim SB, Sa YJ, Park JK, Kwack MS, Lee SH. Comparison of different thawing methods on cryopreserved aorta. *Korean J Thorac Surg* 2004;37:113-118.

Park SY, Kim EY, Cui XS, Tae JC, Lee WD, Kim NH, Park SP, Lim JH. Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts. *Zygote* 2006;14:125-131.

Parsell DA, Lindquist S. The function of heat shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Ann Rev Genet* 1993;27:437-496.

Pegg DE. The history and principles of cryopreservation. *Seminars in reproductive*

medicine 2002;20(1):5-13.

Pelham HR. Heat shock proteins: coming in from cold. *Nature* 1988;332:776-777.

Pribenszky C, Du Y, Molnar M, Harnos A, Vajta G. Increased stress tolerance of matured pig oocytes after high hydrostatic pressure treatment. *Anim Reprod Sci* 2008;106(1-2):200-207.

Pribenszky C, Molnar M, Cseh S, Solti L. Improving post-thaw survival of cryopreserved mouse blastocysts by hydrostatic pressure challenge. *Anim Reprod Sci* 2005;87(1-2):143-150.

Rubinsky B. Principles of low temperature cell preservation. *Heart Fail Rev* 2003;8(3):277-284.

Schluter O, Urrutia Benet G, Heinz V, Knorr D. Metastable states of water and ice during pressure-supported freezing of potato tissue. *Biotechnol Prog* 2004;20:799-810.

Schwartz O, Andreasen JO. Cryopreservation of mature teeth before replantation in monkeys(I). Effect of different cryopreservation agents and freezing devices. *Int J Oral Surg* 1983;12:425-436.

Schwartz O, Andreasen JO, Greve T. Cryopreservation before replantation of mature teeth in monkeys(II). Effect of preincubation, different freezing and equilibration rates and endodontic treatment upon periodontal healing. *Int J Oral Surg* 1985;14:350-361.

Schwartz O, Andreasen FM, Andreasen JO. Effects of temperature, storage time and media on periodontal and pulpal healing after replantation of incisors in monkeys. *Dent Traumtol* 2002;18:190-195.

Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis : distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu* 1982;17:229-59.

Shimada K. Effects of cryoprotective additives on intracellular ice formation and survival in very rapidly cooled HeLa cells. *Contrib Inst Low Temp Sci Ser B* 1977;19:49-69.

Shinohara S, Gobbel GT, Lamborn KR, Tada E, Fike JR. Apoptosis is in the subependyma of young adult rats after single and fractionated doses of x-rays. *Cancer Res* 1997;57:2694-2702.

Takahashi T, Kakita A, Takahashi Y, I. Sakamoto, K. Yokoyama, T. Fujiu, S. Yamashina, T. Tamaki, Y. Takazawa, R. Muratsubaki. Functional integrity of the rat liver after subzero preservation under high pressure. *Transplantation Proceedings* 2000;32:1634-1636.

Takahashi T, Kakita A, Takahashi Y, Yokoyama K, Sakamoto I, Yamashina S. Preservation of rat livers by supercooling under high pressure. *Transplantation Proceedings* 2001;33:916-919.

Udono H, Srivastava PK. Comparison of tumor specific immunogenicities of stress-induced protein gp96, hsp 90, hsp 70. *J Immunol* 1999;152:5398-5403.

Welch TJ, Farewell A, Neidhardt FC, Bartlett DH. Stress response of *Escherichia coli* to elevated hydrostatic pressure. *J Bacteriol* 1993;175:7170-7177.

Wemekamp-Kamphuis HH, Karatzas AK, Wouters JA, Abee T. Enhanced levels of cold-shock proteins in *Listeria monocytogenes* LO28 upon exposure to low temperature and high hydrostatic pressure. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:456-463.

Wijsman JH, Jonker PR, Keijzer R, van de Velde CJ, Cornelisse CJ, van Dierendonck JH. A new method to detect apoptosis in paraffin sections : In situ end-labeling of fragmented DNA. *J Histo Cyto* 1993;41(1):7-12.

Zhu SM, Le Bail A, Ramaswamy HS, Chapleau N. Characterization of ice crystals in pork muscle formed by pressure shift freezing as compared with classical freezing

methods. Journal of Food Science 2004;69(4):E190-197.

Zhu SM, Ramaswamy HS, Le Bail A. Ice crystal formation in gelatin gel during pressure shift versus conventional freezing. Journal of Food Engineering 2005;66(1):69-76.

성종환, 문광덕, 김종국, 여생규. 최신 식품가공학. 한국. 형설출판사. 2007.

장규섭, 이종욱, 임상빈. 최신 식품공학. 한국. 시그마프레스. 2003.

한명규. 최신 식품가공학. 한국. 형설출판사. 2004.

ABSTRACT

The efficacy of programmed cryopreservation under pressure in rat teeth

(Directed by Professor Seung-Jong Lee)

Lee, Young Eun
Dept. of Dentistry
The Graduate School
Yonsei University

The purpose of this study was to evaluate the viability of periodontal ligament cell in rat teeth using slow cryopreservation method under pressure by means of MTT assay, WST-1 assay and TUNEL test. 18 teeth per group of Sprague-Dawley white female rats of 4 week-old were used for each group.

The maxillary left and right, first and second molars were extracted as atraumatically as possible under tiletamine anesthesia. The experimental groups were group 1 (Immediately extraction), group 2 (Cold preservation at 4°C for 1 week), group 3(Rapid freezing in liquid nitrogen), group 4(Slow freezing), group 5(Slow freezing under pressure of 3MPa). F-medium was used as preservation medium and 10% DMSO as cryoprotectant. After cryopreservation and thawing, MTT assay, WST-1 assay, TUNEL test were processed. One way ANOVA and Tukey method were performed at the 95% level of confidence. The values of optical density obtained after MTT assay and WST-1 were divided by the values of eosin staining for tissue volume standardization.

In both MTT and WST-1 assay, group 5 showed higher viability of periodontal ligament cell than group 2 and 4. but showed lower viability of periodontal ligament cell than group 1. In TUNEL test, there were no positive cells in group 4. And it showed no significant difference among group 1, 2, 3, 5.

By the results of this study, slow cryopreservation method under pressure is recommended as one of the methods for long term cryopreservation.

2)

Key words: periodontal ligament cell, MTT, WST-1, TUNEL, viability, pressure, cryopreservation

부 록

1. MTT 검색 및 Eosin 염색 후 측정된 흡광도의 실험 원자료

<MTT 570nm>

	즉시 발치군	냉장군	급속 냉동군	저속 냉동군	압력 저속 냉동군
1	2.625	1.437	1.826	2.247	1.678
2	2.714	0.963	1.614	1.338	2.652
3	3.123	0.493	1.545	1.533	1.636
4	3.051	1.121	1.525	1.861	1.370
5	3.086	0.568	2.081	1.532	2.684
6	3.447	0.714	2.355	1.503	1.644
7	2.607	0.843	2.171	1.604	1.809
8	3.315	0.901	1.197	1.700	2.150
9	2.958	0.925	1.573	1.58	2.162
10	3.111	0.816	1.195	1.422	2.187
11	2.912	0.989	1.442	1.862	1.596
12	3.088	0.982	1.369	1.267	2.715
13	3.031	0.429	1.429	1.632	2.462
14	2.612	0.724	1.356	1.729	1.711
15	2.974	0.329	1.462	1.609	1.369
16	2.947	0.642	1.211	1.893	1.567
17	3.254	0.894	1.231	1.410	1.785
18	3.278	0.770	2.142	1.458	1.792

<Eosin 530nm>

	즉시 발치군	냉장군	급속 냉동군	저속 냉동군	압력 저속 냉동군
1	0.507	0.456	0.451	0.741	0.322
2	0.351	0.431	0.316	0.331	0.711

3	0.639	0.222	0.530	0.588	0.357
4	0.488	0.333	0.475	0.402	0.366
5	0.461	0.477	0.520	0.438	0.763
6	0.476	0.452	0.494	0.445	0.459
7	0.318	0.431	0.752	0.31	0.270
8	0.587	0.249	0.543	0.644	0.405
9	0.542	0.349	0.470	0.579	0.439
10	0.642	0.294	0.236	0.412	0.522
11	0.647	0.456	0.290	0.558	0.470
12	0.610	0.276	0.465	0.349	0.583
13	0.432	0.533	0.429	0.489	0.342
14	0.398	0.493	0.609	0.595	0.447
15	0.563	0.470	0.310	0.547	0.251
16	0.309	0.567	0.400	0.384	0.441
17	0.379	0.579	0.470	0.409	0.432
18	0.441	0.579	0.428	0.268	0.252

<MTT/Eosin>

	즉시 발치군	냉장군	급속 냉동군	저속 냉동군	압력 저속 냉동군
1	5.178	3.151	4.049	3.032	5.211
2	7.732	2.234	5.108	4.042	3.730
3	4.887	2.221	2.915	2.607	4.583
4	6.252	3.366	3.211	4.629	3.743
5	6.694	1.191	4.002	3.498	3.518
6	7.242	1.580	4.767	3.378	3.582
7	8.198	1.956	2.887	5.174	6.700
8	5.647	3.618	2.204	2.640	5.309
9	5.458	2.650	3.347	2.729	4.925

10	4.846	2.776	5.064	3.451	4.190
11	4.501	2.169	4.972	3.337	3.396
12	5.062	3.558	2.944	3.630	4.657
13	7.016	0.805	3.331	3.337	7.199
14	6.563	1.469	2.227	2.906	3.828
15	5.282	0.700	4.716	2.941	5.454
16	9.537	1.132	3.028	4.930	3.553
17	8.586	1.544	2.619	3.447	4.132
18	7.433	1.330	5.005	5.440	7.111

2. WST-1 검색 및 Eosin 염색 후 측정된 흡광도의 실험원자료

<WST-1 450nm>

	즉시 발치군	냉장군	급속 냉동군	저속 냉동군	압력 저속 냉동군
1	2.334	0.442	1.130	1.192	1.216
2	2.058	0.439	1.028	0.920	0.933
3	2.061	0.352	1.064	0.670	1.259
4	1.719	0.675	0.983	0.836	1.007
5	2.028	0.295	1.244	1.434	1.334
6	2.112	0.372	0.826	1.014	1.354
7	2.031	0.485	0.845	1.155	1.408
8	2.618	0.648	1.582	0.648	1.608
9	2.564	0.589	0.975	1.518	1.723
10	2.026	0.621	1.272	1.417	1.467
11	2.285	0.508	0.871	0.957	1.453
12	2.343	0.867	1.158	1.188	1.129
13	2.878	0.583	1.260	0.649	1.327
14	2.649	0.657	1.092	1.504	1.111
15	2.726	1.017	0.851	1.231	1.635

16	2.618	0.573	1.496	1.213	1.420
17	2.564	0.817	0.914	0.796	1.303
18	1.917	0.514	0.847	1.649	1.405

<Eosin 530nm>

	즉시 발치군	냉장군	급속 냉동군	저속 냉동군	압력 저속 냉동군
1	0.321	0.252	0.597	0.515	0.350
2	0.678	0.272	0.335	0.367	0.335
3	0.342	0.294	0.276	0.428	0.379
4	0.314	0.404	0.271	0.378	0.412
5	0.596	0.324	0.524	0.438	0.374
6	0.505	0.332	0.393	0.253	0.503
7	0.491	0.221	0.204	0.460	0.317
8	0.433	0.564	0.456	0.270	0.404
9	0.669	0.333	0.352	0.518	0.488
10	0.309	0.378	0.362	0.576	0.446
11	0.551	0.348	0.438	0.316	0.264
12	0.553	0.482	0.464	0.225	0.277
13	0.701	0.414	0.244	0.536	0.524
14	0.544	0.532	0.495	0.799	0.312
15	0.483	0.679	0.379	0.599	0.648
16	0.371	0.441	0.862	0.712	0.527
17	0.491	0.535	0.536	0.578	0.310
18	0.475	0.286	0.323	1.032	0.503

<WST-1/Eosin>

	즉시 발치군	냉장군	급속 냉동군	저속 냉동군	압력 저속 냉동군
1	7.271	1.754	1.893	2.315	3.474
2	3.035	1.614	3.069	2.507	2.785
3	6.026	1.197	3.855	1.565	3.322

4	5.475	1.671	3.627	2.212	2.444
5	3.403	0.910	2.374	3.274	3.567
6	4.182	1.120	2.102	4.008	2.692
7	4.136	2.195	4.142	2.511	4.442
8	6.046	1.149	3.469	2.400	3.980
9	3.833	1.769	2.770	2.931	3.531
10	6.557	1.643	3.514	2.460	3.289
11	4.147	1.460	1.989	3.028	5.504
12	4.237	1.799	2.496	5.280	4.076
13	4.106	1.408	5.164	1.211	2.532
14	4.869	1.235	2.206	1.882	3.561
15	5.644	1.498	2.245	2.055	2.523
16	7.057	1.299	1.735	1.704	2.694
17	5.222	1.527	1.705	1.377	4.203
18	4.036	1.797	2.622	1.598	2.793

3. TUNEL 검사 후 양성세포율의 평균과 표준편차

Groups	N	Mean	Standard deviation
Immediately extraction	4	9.33	6.13
Cold preservation	5	24.12	12.43
Rapid freezing	4	20.49	19.99
Slow freezing under pressure	4	19.28	20.83

단위: %

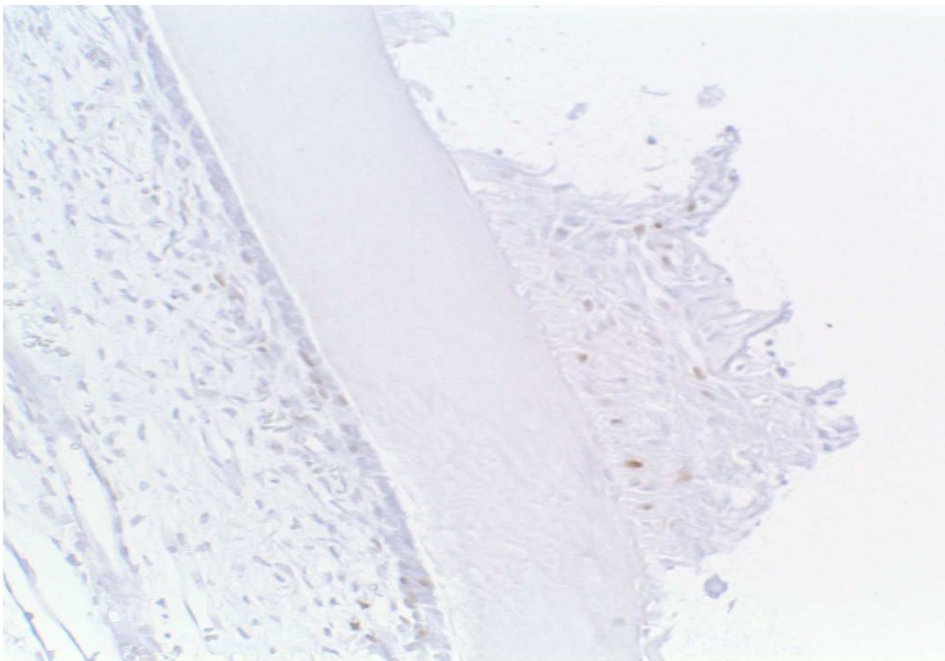
4. TUNEL 검사 후 양성세포율 원자료

	즉시 발치군	냉장군	급속군	압력 지속 냉동군
1	10.68	17.81	49.74	1.75

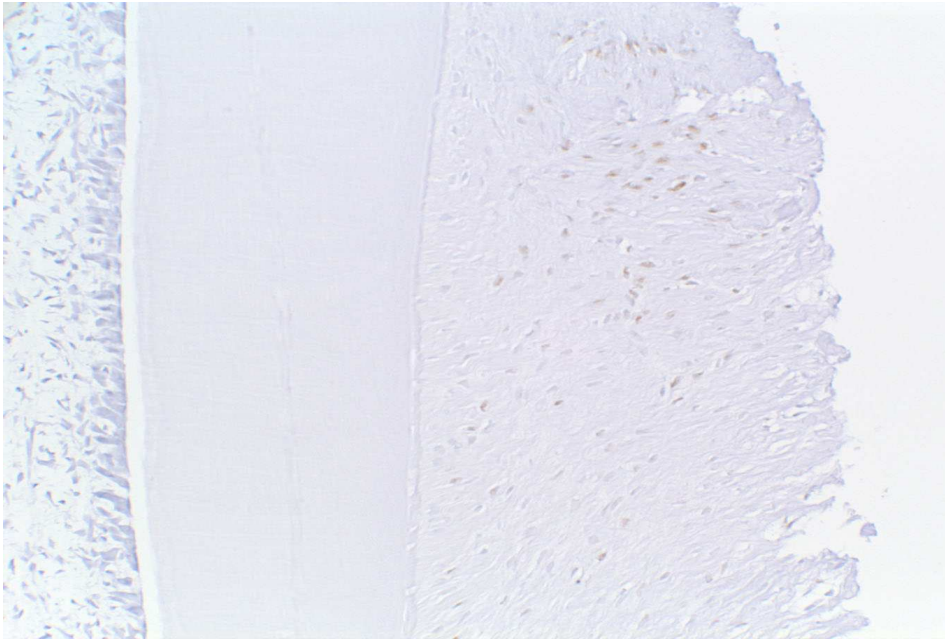
2	15.95	12.75	9.30	46.89
3	9.55	15.00	16.67	4.70
4	1.14	39.39	6.25	23.79
5		35.62		

단위: %

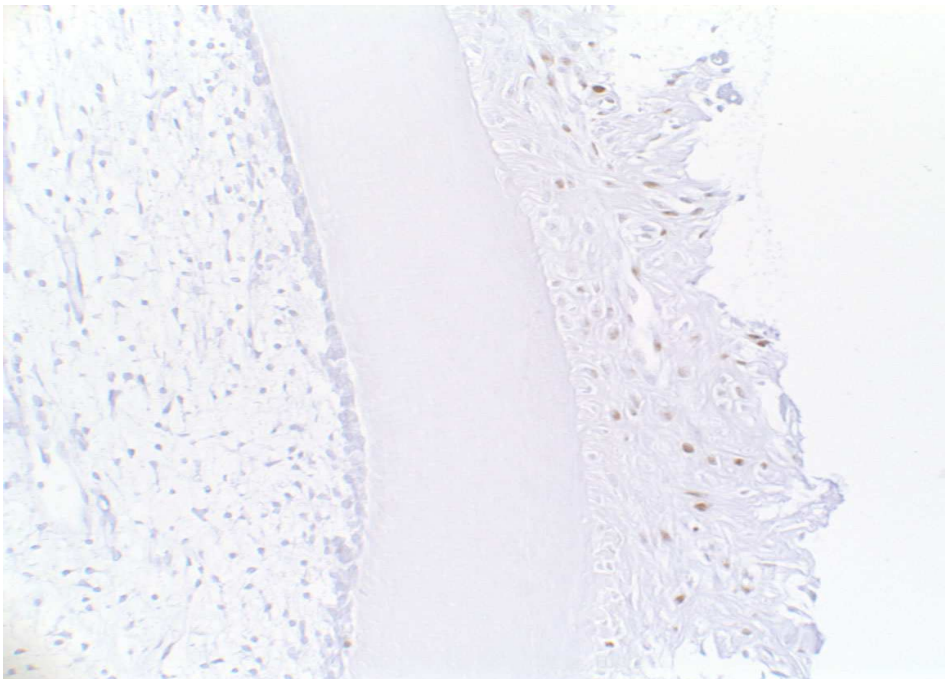
5. TUNEL 검사의 저배율 현미경 사진(x200)



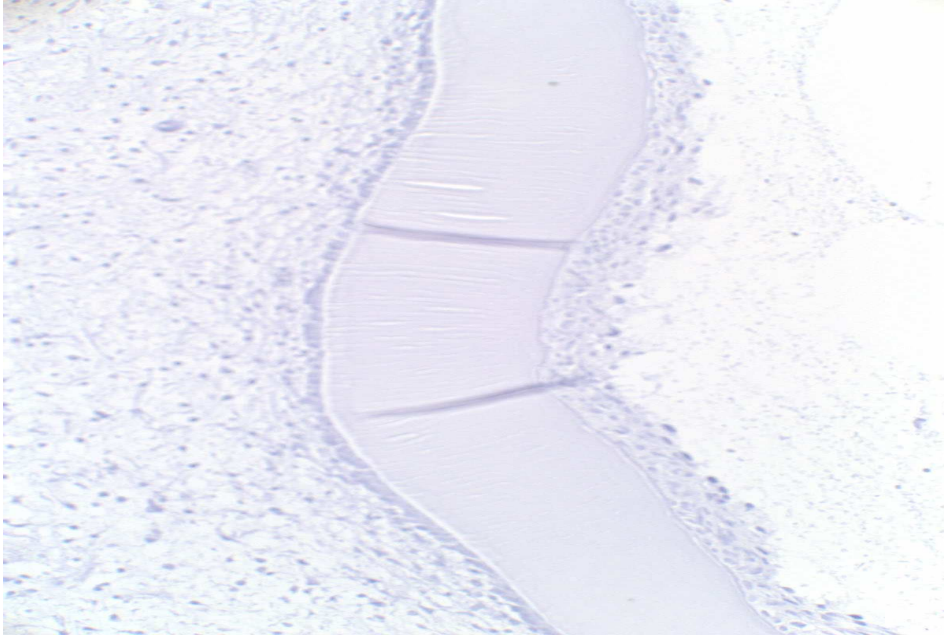
가. 즉시 발치군



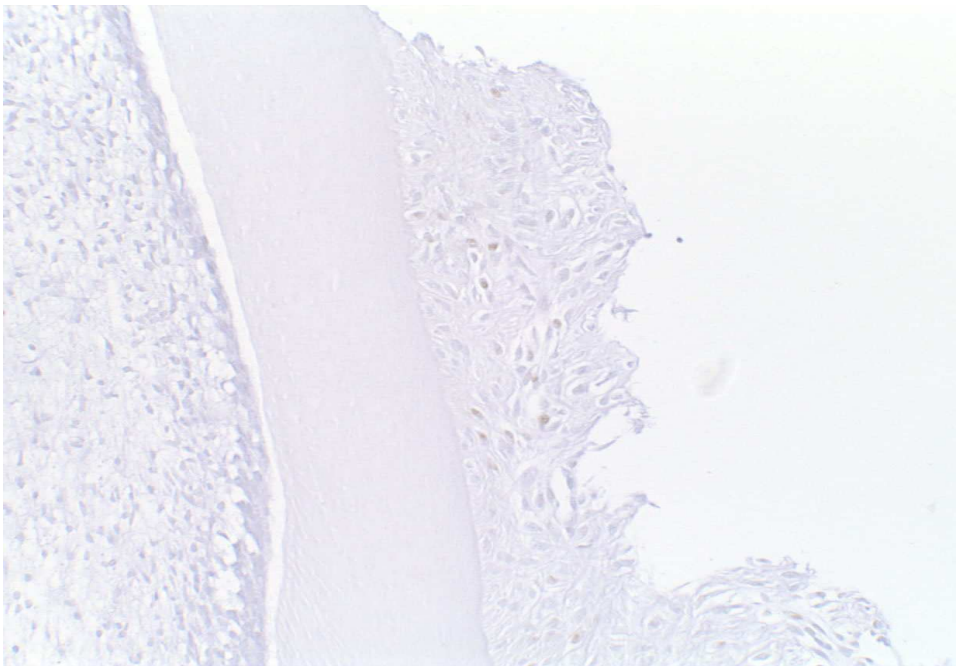
나. 냉장근



다. 급속 냉동근



라. 저속 냉동군



마. 압력 냉동군