

성견 치주인대세포의  
냉장 및 냉동 보관시 활성화도

연세대학교 대학원

치 의 학 과

이 동 은

성견 치주인대세포의  
냉장 및 냉동 보관시 활성화도

지도 최 성 호 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2010년 6월 일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

이 동 은

# 이동은의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ ①인

심사위원 \_\_\_\_\_ ①인

심사위원 \_\_\_\_\_ ①인

연세대학교 대학원

2010년 6월 일

## 감사의 글

이 논문이 완성되기까지 기틀을 잡아주시고 귀중한 조언과 지도를 아끼지 않아주신 최성호 지도교수님께 마음속 깊이 감사드립니다. 그리고 많은 관심과 격려를 해주신 김종관 교수님, 채중규 교수님, 조규성 교수님, 김창성 교수님, 정의원 교수님께도 감사드립니다.

연구와 실험 과정 내내 많은 도움을 준 정임희 연구원과 모든 치주과 의국원 여러분께도 감사의 인사를 전합니다.

항상 든든한 지원군이 되어 주시고 사랑으로 감싸주시는 아버지, 어머니, 시부모님, 우리가족 모두 감사하고 사랑합니다.

마지막으로 뜻을 펼칠 수 있게 격려와 지원을 아끼지 않는 평생의 친구이자 남편 김태희에게도 감사의 마음을 전합니다.

2010년 6월

저자 씀

# 차 례

|                                    |     |
|------------------------------------|-----|
| 그림차례 .....                         | ii  |
| 표차례 .....                          | iii |
| 국문 요약 .....                        | iv  |
| <br>                               |     |
| I. 서 론 .....                       | 1   |
| II. 재료 및 방법 .....                  | 6   |
| 1. 실험동물 .....                      | 6   |
| 2. 실험재료 .....                      | 6   |
| 3. 실험군 선정 .....                    | 7   |
| 4. 실험방법 .....                      | 8   |
| 5. 평가 .....                        | 9   |
| 5.1. WST-1 assay .....             | 9   |
| 5.2. 치아 치근면에 붙어있는 치주조직의 양 측정 ..... | 10  |
| 6. 통계분석 .....                      | 10  |
| III. 결 과 .....                     | 11  |
| 1. 대조군/냉장군/냉동군의 비교 .....           | 11  |
| 2. 냉장군/냉동군 보관기간별 비교 .....          | 11  |
| IV. 고 찰 .....                      | 13  |
| V. 결 론 .....                       | 18  |
| 참고문헌 .....                         | 19  |
| 영문요약 .....                         | 26  |

## 그림차례

Figure 1 Cleavage of tetrazolium salts (WST-1) to formazan ..... 23

Figure 2 WST-1/Eosin value of control group & all experimental groups ..... 23

## 표 차례

|  |    |
|--|----|
| Table 1. WST-1/Eosin value of control group, Hypothermic preservation groups and Cryopreservation groups ..... | 24 |
|--|----|

|   |    |
|---|----|
| Table 2. WST-1/Eosin value of hypothermic preservation group and cryopreservation group according to preservation time..... | 25 |
|---|----|

## 국문요약

# 성견 치주인대세포의 냉장 및 냉동 보관시 활성화도

<지도교수 최 성 호>

연세대학교 대학원 치의학과

이 동 은

본 연구의 목적은 치주인대세포를 냉장, 냉동 보관시 보관기간에 따른 세포 활성화도를 비교하여 평가하는 것이다.

생후 12개월 이상의 수컷 성견 7마리의 하악 좌우 소구치를 발거한 후 각군당 11개의 소구치 치근을 WST-1 검색에 이용하였다. 실험군은 7개 군으로 대조군은 즉시 발치군이며, 4℃ 냉장고에 3일간 보관한 냉장군, 4℃ 냉장고에 일주일간 보관한 냉장군, 4℃ 냉장고에 이주일간 보관한 냉장군, 발치 후 동해방지제 처리과정을 거쳐 -196℃에서 3일간 보관한 냉동군, 발치 후 동해방지제 처리과정을 거쳐 -196℃에서 일주일간 보관한 냉동군, 발치 후 동해방지제 처리과정을 거쳐 -196℃에서 이주일간 보관한 냉동군으로 나누었다.

보존액은 F medium을 사용했으며 동해방지제로 10% dimethylsulfoxide (DMSO) 를 사용했다.

각 실험군에 해당되는 보관기간이 지난 후 WST-1검색을 시행한 뒤 치근면을 단위면적으로 표준화하기 위해 WST-1측정값을 Eosin 염색 후 530nm에서 측정한 흡광도 값으로 나누었다. 통계 분석을 위해 ANOVA를 시행하였으며 사후 검정으로는 Tukey 방법을 사용하였고 결과는 다음과 같다.

1. WST-1 검사 결과, 냉장군의 치주인대세포 활성도는 대조군보다는 낮았으나 냉동군보다 유의성있게 높은 수치를 보였다 ( $p < 0.05$ ).

2. 냉장군에서 보관기간별 치주인대세포 활성도는 3일 보관의 WST-1 값이 7일, 14일군과 비교하여 유의성있게 높은 결과를 보인 반면 ( $p < 0.05$ ), 냉장 7일군과 14일군은 상호간의 유의성있는 차이를 볼 수 없었다.

3. 냉동군에서 치주인대세포 활성도는 보관기간에 따라 유의할 만한 차이를 볼 수 없었다 ( $p < 0.05$ ).

이상의 결과로 본 연구의 범위 안에서, 치아를 2주 이하 단기 보관시에는 4℃ 냉장보관이 냉동보관보다 유리한 것으로 판단되며, 특히 3일 이내로 냉장보관을 하는 것이 치아 이식 성공률을 현저히 높힐 수 있을 것으로 사료된다.

---

**핵심되는 말:** 치주인대세포, 보존, WST-1, 활성도

# 성견 치주인대세포의 냉장 및 냉동 보관시 활성화도

(지도교수 최 성 호)

연세대학교 대학원 치의학과

이 동 은

## I. 서 론

치아결손의 심미와 기능을 회복하는 방법으로는 고정성 bridge, 가철성 denture, 교정에 의한 치아이동, 임플란트 및 자가치아이식술이 있다 (Kim 2001). 이 중 자가치아이식술은 다른 치료방법에 비해 자기 치아를 이용하여 치주인대세포를 보존할 수 있으며, 인접치의 삭제가 없고 임플란트 식립에 비해 비용이 저렴하다는 장점을 가지고 있다.

그러나 골 유착이나 치근흡수등의 여러 단점 때문에 그 활용이 제한되어왔었다 (Shimmono, et al.1995). 하지만 자신의 치아 그대로를 사용하고

싶어하는 환자들이 늘고 임플란트의 여러 제한적 요소들로 인해 근래 다시 주목 받게 되었으며 그 배경으로는 치아 재식에서 치근막 치유에 관한 생물학적 원칙 연구의 발전이 있었다 (Kim 2001). 자가치아 이식은 통상적으로 제3대구치를 이용하여 보존이 불가능한 대구치를 발치 한 부위에 이식하는 경우가 많으며, 외과적 정직 (surgical up-righting), 외과적 정출 (surgical extrusion), 의도적 재식술 (intentional replantation) 등도 거의 같은 치유기전을 보이므로 자가치아이식의 범주에 속할 수 있다 (Tsukiboshi M 1993).

일반적으로 치아 이식이나 재식 후의 치주 치유는 치근표면에 남아있는 치주인대세포 생활력에 의존하는 것으로 알려져 있으며 Kratchman 등은 구강외에서 10분 이상 경과하지 않아야 의도적 재식 (intentional replantation)에 성공할 수 있다고 보고하였다 (O.Schwartz, Andreasen & Greve 1983, Kratchman 1997).

그러나, 교정 치료 중 발거 된 치아를 미래 자신의 치아 결손부위에 이식하고자 예비로 보관하거나 교정적으로 발거 되어 버려지는 치아나 지치등을 보관하여 타가치아 이식을 계획한 경우 등에서 치아 장, 단기 보존의 필요성이 대두되었다 (O.Schwartz 1992).

이런 경우 치아의 저온 보관과 더불어 치아은행은 새로운 가능성을 제시한다. 치아이식의 성공을 좌우하는 중요한 열쇠는 이식치의 치근면의

건전하고 생활력있는 치주인대세포의 존재이며 그 활성화 유지를 위한 다양한 시도가 이루어져 왔다 (O.Schwartz, Andreasen & Greve 1983). 따라서 치아의 치주인대세포 활성도를 유지하면서 체외에서 보존하는 과정은 치아이식에서 매우 핵심적인 단계가 되었다. 세포를 저온에서 보관하게 되면 화학반응을 지연하고 대사를 중단시켜 장기간 보존할 수 있으며, 보관방법은 일반적으로 4℃ 냉장 보존법과 -80℃~-196℃ 냉동 보존법으로 나뉜다 (Rubinsky 2003). 냉장 보존법은 용액의 어는점 직전까지 온도를 낮춰 보관하는 방법으로 주로 심장이나 간과 같은 기관의 보존에 사용된다. 냉동 보존법은 용액의 어는점 이하에서 장기간 세포를 보존할 때 사용되는 방법이다 (Rubinsky 2003). 그러나 냉동과 해동 과정에서 생성된 얼음 결정과 증가된 용질의 축적은 삼투압을 증가시켜 세포 손상을 초래할 수 있다는 단점이 있다 (O.Schwartz 1992, Rubinsky 2003). 따라서 냉동 보존의 궁극적 목적은 극히 낮은 온도에서 “중단된 모든 생리적 기능의 가역성을 조절하는 것”이며 이때 세포내 얼음 결정을 최소화하는 것이 필수적이다 (Rubinsky 2003). Kim 등은 원숭이의 치아를 발치하여 -70℃와 -20℃에서 2주간 냉동보관한 후 재이식한 부위의 조직 소견에서 염증조직이 존재하며 골흡수와 더불어 치근단 흡수 소견까지 관찰 할 수 있었다고 보고하였다 (Kim, et al. 2000). 이처럼 세포를 냉동할 때 생기는 손상을 줄이기 위해 동해방지제를 사용하며

대표적인 동해방지 제인 dimethylsulfoxide (DMSO)는 세포내 얼음 결정체의 형성을 저해하고 세포막으로 가해지는 삼투압을 감소시킴으로서 세포의 손상을 줄인다 (Mazur 1984).

치의학 분야연구에서 쥐 치아의 치주인대세포는 1주일 이상의 장기보관 시에 4℃냉장보관군보다 10% dimethylsulfoxide (DMSO)를 사용한 -196℃ 급속냉동군에서 그 활성도가 우수한 결과가 나왔다 (Kim, et al. 2006).

발거된 치아를 즉시 이식하기에 수혜부의 공간적 문제를 해결하는 것이 필요한 경우나 악골 수술을 위해 발치된 치아의 재식을 계획한 경우에는 치아 보관기간을 고려한 적절한 프로토콜이 필요하다. 즉, 미래를 대비한 장기적 치아의 보관이 아닌 치아의 발치후 이식 및 재식시기까지의 기간이 정해진 경우 각 치아의 보관기간에 따른 효과적인 단기 보관법의 선택이 치주인대세포 생활력에 영향을 미칠것이다 (O.Schwartz & Rank 1986, O.Schwartz, et al. 2002).

안과학분야에서 중요한 생리적 기능을 수행하는 망막색소상피세포이식의 성공을 결정짓는 요인은 이식 당시 세포 생존률이다. 망막색소상피세포의 저온보관시 24시간, 48시간 세포생존율은 냉동보관보다 냉장보관에서 높았고 특히 24시간 냉장보관시 95%의 세포 생존률을 보였다 (Seo, et al. 1999).

이에 본 연구의 목적은 성견의 치아를 발거한 후 냉동, 냉장 보관하고 3일, 7일 (1주), 14일 (2주)이 경과하였을 때 WST-1(4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) 검색법을 이용하여 치주 인대세포의 활성도를 비교 평가하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험동물

생후 12개월 이상이며, 체중 15kg 내외의 수컷 성견 7마리의 치아를 사용하였다. Pentobarbital 30mg/kg으로 정맥주사 하여 전신마취를 시키고, 2% Lidocaine HCl로 하악 양측 소구치 부위의 협점막에 침윤마취를 시행하였다. 견치 원심부에서 제1대구치 근심부까지 열구형 절개를 시행하고 박리한다. 단근치인 제 1소구치는 발치 감자로 발치하고 다근치인 제 2,3,4소구치는 Bur를 이용하여 근원심으로 분리 후 발치 감자를 이용하여 발치를 시행 하였다. 실험동물의 선정과 관리, 수술 방법과 준비는 연세대학교 의과대학 실험동물위원회의 방침 및 법규를 준수하여 시행하였다.

### 2. 실험 재료

보관 용액인 F medium은 Dulbeco'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/ $\mu$ l), streptomycin (100 $\mu$ l/ml), fungizone (0.3 $\mu$ g/ml)을 첨가하여 제조하였다.

냉동군에서 사용된 세포질내 동해방지제로는 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)를 사용하였다.

### 3. 실험군 선정

#### 1군: 대조군 - 즉시 발치군

치아를 발거하자마자 PBS에 세척한 후 실험에 이용하였다.

#### 2군: 냉장군

치아를 발거하고 PBS에 세척한 후 2ml 냉동튜브에 F medium 1ml 와 함께 담아 4℃냉장고에 보관한 후 실험에 이용하였다.

2-1군(냉장3일): 치아 발거 후 4℃냉장고에 3일 보관한 후 실험에 이용하였다.

2-2군(냉장7일): 치아 발거 후 4℃냉장고에 1주 보관한 후 실험에 이용하였다.

2-3군(냉장14일): 치아 발거 후 4℃냉장고에 2주 보관한 후 실험에

이용하였다.

### 3군: 냉동군

발거된 치아를 PBS에 세척하고 4℃에서 보관한 F-medium에 2.5%, 5%, 7.5% DMSO를 첨가한 용액에 5분간씩 단계적으로 담근다. 최종적으로 2ml 냉동튜브에 F medium과 10% DMSO 혼합액 1 ml를 치아와 함께 넣고 5분 후 -196℃액화질소 냉동고에 넣어 급속 냉동시켜 보관하였다.

3-1군(냉동3일): 치아 발거 후 급속 냉동시켜 3일 보관한 후 실험에 이용하였다.

3-2군(냉동7일): 치아 발거 후 급속 냉동시켜 1주 보관한 후 실험에 이용하였다.

3-3군(냉동14일): 치아 발거 후 급속 냉동시켜 2주 보관한 후 실험에 이용하였다.

## 4. 실험방법

### 냉동군의 해빙 방법

급속 냉동한 치아를 냉동튜브 채로 -196℃ 액화질소 냉동고에서

꺼내어 37°C 수욕조에 넣어 해빙하였다. 2ml 냉동튜브 속의 보관용액이 완전히 액체 상태로 된 것을 확인하고 치아를 꺼낸다. 꺼낸 치아를 7.5%, 5%, 2.5%, 0% DMSO가 첨가된 용액에 5분간씩 순차적으로 담귀 DMSO를 제거한 후 WST-1검색에 사용하였다.

## 5. 평가

### 5.1. WST-1 assay

Wst-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) 검색시약은 세포 증식 분석 및 세포 독성 측정시 사용된다 (Carlson 2006). 이 방법은 약한 붉은 색의 tetrazolium salts (WST-1)을 세포내 미토콘드리아 탈수소 효소가 분해하여 진한 붉은 색의 formazan 결정으로 환원시키는 원리를 이용하여 450nm의 파장에서 Dynatech MRX ELISA microplate reader (Dynatech laboratories, Chantilly, VA, USA)로 흡광도를 측정한다 (Figure 1). 이 흡광도는 살아있는 세포에 의해 WST-1이 환원된 양을 나타내며 생존세포 수와 비례한다.

각 실험군의 처리가 끝난 뒤에 48-well plate에 WST-1 용액 (20 $\mu$ l, Cell Proliferation Reagent WST-1; Roche Applied Science, Mannheim,

Germany) 130ml 넣고 각 군별 치아를 WST-1 용액이 있는 well에 담는다. 알루미늄 호일로 48-well plate를 싸서 4시간 동안 37°C 에 세포배양기에서 배양하였다. 치아를 제거하고 반응한 WST-1 용액을 96-well plate로 옮긴 뒤 Dynatech MRX ELISA microplate reader (Dynatech laboratories, Chantilly, VA, USA)에 넣고 450nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

## 5.2. 치아 치근면에 붙어있는 치주조직의 양 측정

실험에 사용된 치아의 치근면에 붙어있는 치주조직의 양을 정량적으로 측정하기 위해 WST-1 검색 실험 후 각 군의 well에서 제거된 치아를 각 군별로 48-well plate에 넣고 Eosin (Accustain, sigma-aldrich chemie, GmbH, Germany) 130ml $\mu$ l 첨가한다. 12시간 정도 염색을 한 후 치아를 제거하고 다른 well에 넣어 1% acid alcohol (70% ethyl alcohol, 1% HCL) 130ml에 30분간 담가두어 치근면에 염색된 치주조직을 탈색시킨다. 48-well plate에서 치아를 꺼낸 뒤 반응한 시약을 96-well plate로 옮긴다. 마지막으로 96-well plate를 Dynatech MRX ELISA microplate reader (Dynatech laboratories, Chantilly, VA, USA)에 넣고 530nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

## 6. 통계분석 (Statistical analysis)

WST-1 검색과 Eosin 염색에서 얻은 흡광도는 대조군과 각 실험군 차이를 SPSS 15.0을 이용한 ANOVA를 사용하여 분석하였으며 사후 검정으로는 Tukey 방법을 썼다. 유의수준은  $p < 0.05$ 로 하였다.

### III. 결 과

#### 1. 대조군/냉장군/냉동군의 비교

치주조직 단위 면적당의 WST-1값인 WST-1/Eosin 비율은 대조군이 통계 학적으로 유의성 있게 가장 높은 세포활성도를 보였으며 ( $p < 0.05$ ) 냉장군은 냉동군보다 통계학적으로 유의성있게 높은 세포활성도를 보였다 ( $p < 0.05$ ) (Table 1).

#### 2. 냉장군/냉동군 보관기간별 비교

냉장군을 보면 냉장 3일군은 다른 냉장 7일, 14일군과 비교하여 통계학 적으로 유의성 있게 높은 활성도를 보인 반면 ( $p < 0.05$ ), 냉장 7일군과 14일 군은 상호간에 통계학적으로 유의성 있는 차이를 볼 수 없었다.

그러나, 냉동군의 경우, 냉동 3, 7, 14일군 모두 통계학적으로 유의성있는 차이가 없었다 (Table 2).

## IV. 고 찰

세포보존의 궁극적인 목적은 생체시계를 일정시간 정지시키고 원하는 때에 세포 생존율, 구조와 기능을 재현하는 것이다. 보존 후의 생존율을 비롯한 세포의 기능 유지를 목적으로 하는 과학자들은 새로운 보존액의 개발에 주력하고 있는데, 이러한 노력은 개선된 저온 및 동결보존 방법의 개발로 이어져 효과적인 세포보존에 기여하고 있다. 치주 치유는 자가 치아 이식의 성공률을 결정짓는 가장 중요한 요소 중 하나이며 치주 치유를 위해 치주인대세포 생존율와 기능을 유지하는 것은 필수적 단계이다 (Kristern, et al. 1985, Line, et al. 1974). 따라서 발거된 치아의 치주인대세포 활성도를 오래 유지하고자 하는 여러 보존 프로토콜이 개발되어 왔다. Schwartz등은 원숭이의 치아를 1주간 냉동 보존한 후 재식하는 방법을 보고하였고 처음으로 인간의 상악 소구치를 18개월 냉동보관하고 4년 추적관찰결과 임상적 방사선학적으로 정상 치주인대로 치유되었음을 보고하였다 (O.Schwartz, Andreasen & Greve 1983, O.Schwartz & Rank 1986, O.Schwartz, Andreasen & Greve 1985).

그러나, 세포를 냉동 보존하는 과정에서 세포가 손상 받을 수 있다.  $-5^{\circ}\text{C}$ 까지는 보존액에 포함된 동해방지제로 인해 어는점이 낮아져서 세포와 주위 보존액은 얼지 않고,  $-5^{\circ}\text{C}$ 와  $-15^{\circ}\text{C}$  사이에서는 세포 외부

보존액에서 얼음이 형성되거나 세포막이 얼음이 세포질 내로 성장하는 것을 막기 때문에 세포는 얼지 않고 과냉각된다. 세포내 과냉각된 수분은 부분적으로 동결된 세포 외부 보존액보다 높은 화학적 전위를 가져서 세포 외부로 흘러나와 얼게 된다 (Mazur 1984, Gao & Critaet 2000). 또한 냉동 보관시에는 냉동 속도가 중요한데 저속냉동시에는 세포내 수분이 빠져나감으로써 세포의 수축이 생기며 급속 냉동시에는 얼음 결정체가 세포내에서 형성되어 해동 시에 세포가 사멸할 수 있다. 따라서 적절한 냉동속도와 동해방지제의 사용이 필요하다 (Mazur 1984, Mazur, Leibo & Chu 1972). DMSO는 세포질 내로 침투해서 냉동 과정 중에 전해질의 농도를 감소시키고 삼투압에 의한 세포 수축을 감소시키며 세포 내 얼음결정체가 생겨 세포막이 파괴되는 것을 막는다 (Mazur 1984). DMSO의 임상적 안정성은 정자, 세균, 혈액 줄기 세포등을 냉동한 연구에서 이미 확인되었다 (Makino, et al. 1991, Katayama, et al. 1997).

그러나, DMSO는 농도, 노출시간, 온도에 따라 세포 자체에 대한 독성을 보일 수 있다는 부작용도 고려되어야 한다 (Neulieb 1990). 2000년 Dong등은 저농도 DMSO에 세포를 노출시켜 적응시킨 후 이어 고농도 DMSO를 첨가 하는 2단계법으로 세포 생존율을 10% 가까이 향상 시킬 수 있다고 보고하였다 (Dong SH, et al. 2000). 따라서 본 연구에서 역시 냉동보존군의 DMSO 처리를 저농도에서 고농도로 단계적으로 시행하였다.

단기간의 냉장 보존 시에는 이온펌프 ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase,  $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$  ATPase) 의 효율성이 떨어짐 에 따라 세포내 구성과 삼투압에 변화가 오며 부종과 단백질 변성을 초래 한다. 이러한 손상은 시간의 경과에 따라 결과를 예측할 수 있으며 상온으로 돌아오면 부분적으로 회복되기도 한다 (Rubinsky 2003). Rubinsky 등은 냉장보존으로는 수일에서 수주간 세포보존이 용이하고 냉동보존은 몇 달 정도의 장기간 보존에 유리하다고 하였다. 특히 단기간 냉장 보존시에 나타난 변화는 종종 가역적으로 나타나며 그 반응의 범위는 보관기간과 온도에 따라 달라진다 (Rubinsky 2003). 반면에 장기간 냉장보관을 하게 되면 냉성 허혈 (cold ischemia)에 의해 세포가 괴사되거나 사멸된다고 알려져 있다. 이는 ATP의 부족과 반응 산소계 (reactive oxygen species;  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{OH}^-$ )의 증가와 arachidonic acid 등으로 인해 lipid peroxidation으로 세포막이 변질되기 때문이다 (Meng 2003). 쥐치아를 이용한 연구에서도 1주일 이상 장기보관시에는  $4^\circ\text{C}$  냉장보관보다는 냉동 보관 하였을때 치주인대 활성도가 더 우수한 것으로 결과가 나왔다(Kim, et al. 2006).

본 실험에서는 냉장보관의 경우 냉장 3일군이 다른 냉장군에 비해 유의성 있게 높은 세포활성도 수치가 나왔으며 이는 냉장군은 단기 보관하는 것이 더 유리하다고 판단할 수 있는 근거가 된다. 냉동보관의 경우에는 냉장보관군보다 생존률이 낮았다. 치아를 직접  $-196^\circ\text{C}$  질소

탱크에 넣는 고속 냉동법은 세포내에서 형성된 얼음 결정체로 인해 치주인대세포 활성도에 영향을 미쳤을 것이다. 따라서 적절한 냉동속도의 선택이나 고압을 이용하는 등의 냉동환경의 개선은 더 높은 생존률을 예상해볼 수 있다. 프로그램 냉동 속도 조절기를 이용한 저속 냉동은 냉동으로 인한 손상을 줄일 수 있다 (Kawasaki, et al. 2004). 1992년 O.Schwartz는  $-35^{\circ}\text{C}$  까지  $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  속도로 저속 냉동,  $-100^{\circ}\text{C}$  까지  $-6^{\circ}\text{C}/\text{min}$  속도로 냉동한 뒤  $-196^{\circ}\text{C}$ 까지 급속 냉동할 것을 권하였다 (O.Schwartz 1992). 210MPa 고압 하에서는 물의 상변이 온도가  $0^{\circ}\text{C}$ 에서  $-21^{\circ}\text{C}$ 로 내려가므로 낮은 온도에서 도 얼지 않은 상태로 보관할 수 있어 여러 분야에서 이를 이용한 연구가 진행되어 왔다 (Schluter, et al. 2004). 2007년 Kazunori 가 쥐의 장을 5atm (hyperbaric oxygen pressure) 하에서 2일간 저온 보존 후 이식했을 때 1atm 에서 저온 보존한 것보다 더 좋은 이식 결과를 보였다고 하였고, 2000년, 2001년 Takahashi 는 냉동에 따른 손상을 피하기 위해 30MPa 까지의 고압 (high hydrostatic pressure) 하에서  $0^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 쥐의 간을 저온 보존하는 것이 가능하고 5MPa 고압 (high hydrostatic pressure) 하에서  $-2^{\circ}\text{C}$  에서 5시간 동안 냉동시키지 않고 저온 보존할 수 있다고 하였다 (Kazunori, et al. 2007, Takahasi, et al. 2000, Takahasi, et al. 2001). 치과학 분야에서 쥐 치아를 이용한 실험에서도 30MPa 압력을 이용하여 저속

냉동을 하게되면 4℃냉장균이나 압력을 가하지 않은 저속냉동균보다 높은 치주인대 활성도를 보인다는 보고가 있었다 (Lee, et al. 2009). 우수한 항암작용으로 근래 각광받고 있는 녹차 추출물인 Polyphenol은 강력한 항산화제로서 in vitro에서 유해산소균에 대한 산소 유리기의 탐식기능을 가지며 이는 지질의 과산화를 막는 역할을 한다. 의학분야에서 Polyphenol 은 세포 보관시에 나타나는 세포 손상을 예방하여 장기 이식 시에 시간의 격차를 감소시키는 보존제로서 활용이 시도되고 있으며, 유해산소균 으로부터 인체 혈관내피세포를 보존하는 효과가 우수하다는 보고도 있었다 (Kim 2004). 최근 Kawata는 미소자장을 이용한 프로그램 냉동고 (cell alive system)을 이용하여 세포를 냉동시키는 방법을 개발하였으며 앞으로 치아 저온 보존은 건전한 치주인대세포를 유지하여 자연치와 유사한 저작기능을 회복하는 더욱 큰 기여를 할 것으로 기대되어진다 (Kawata 2005).

## V. 결 론

본 연구는 성견 하악 좌우 소구치를 발거 후 4℃ 냉장 보관, -196℃ 냉동 보관하에서 각각 3일, 1주, 2주 보관한 후의 치주인대세포 활성도를 WST-1 검색법으로 측정하였을 때 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. WST-1 검사 결과, 냉장군의 치주인대세포 활성도는 대조군보다는 낮았으나 냉동군보다 유의성있게 높은 수치를 보였다 ( $p < 0.05$ ).
2. 냉장군에서 보관기간별 치주인대세포 활성도는 3일 보관의 WST-1 값이 7일, 14일군과 비교하여 유의성있게 높은 결과를 보인 반면 ( $p < 0.05$ ), 냉장 7일군과 14일군은 상호간의 유의성있는 차이를 볼 수 없었다.
3. 냉동군에서 치주인대세포 활성도는 보관기간에 따라 유의할 만한 차이를 볼 수 없었다 ( $p < 0.05$ ).

이상의 결과로 본 연구의 범위안에서, 치아를 2주 이하 단기 보관시에는 4℃ 냉장보관이 냉동보관보다 유리한 것으로 판단되며, 특히 3일 이내로 냉장보관을 하는 것이 우수한 치아 이식 성공률을 보일 수 있을 것으로 사료된다.

## 참고문헌

- Kim, D.W., (2001) Translation of 自家齒牙利殖, Narea Publishing, Inc.
- Shimono, M., Lijima, K., (1995) Pathology of Wound Healing <Clinical Aspect> Transplantation and Replantation of teeth-Practical Use of Periodontal Ligament. Korean Edition ed: Ishiyaku Publishers, Inc.
- Tsukiboshi, M., (1993) Autogenous tooth transplantation: a reevaluation. *Int J Periodontics Restorative Dent* **13**: 120-149.
- Schwartz, O., Andreasen, J.O. and Greve, T., (1983) Cryopreservation before replantation of mature teeth in monkeys (I) Effect of different cryoprotective agents and freezing devices. *Int J Oral Surg* **12**: 425-436.
- Kratchman, S., (1997) Intentional replantation, *Dental clinics of North America* **41**: 603-617.
- Schwartz, O., (1992) Cryopreservation of teeth before replantation or transplantation, Atlas of replantation and transplantation of teeth. *Medglobe*, P241-256.
- Rubinsky, B., (2003) Principles of low temperature cell preservation. *Heart Fail Rev* **8**(3): 277-284.
- Kim, S.G., Yoon, Y.J., Choi, E.H., (2000) An experimental study on Freezing Tooth Transplantation in monkeys. *Oral biology Research* **24**(1): 267-273.
- Mazur, P., (1984) Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* **247**: 125-142,

Kim, J.W., Kim, E.S., Kim, J., Lee, S.J., (2006) Evaluation of periodontal ligament cell viability in rat teeth after frozen preservation using in-vivo MTT assay. *J Kor Acad of Cons Dent* **31**(3): 192-202.

Schwartz, O., Rank, C.P., (1986) Autotransplantation of cryopreserved tooth in connection with orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* **90**(1): 67-72.

Schwartz, O., Andreasen, J.O. Andreasen, F.M., (2002) Effects of temperature, storage time and media on periodontal and pulpal healing after replantation of incisors in monkeys. *Dent Traumatol* **18**: 190-195.

Seo, K.Y., Kim, S.H., Kim, O.W., (1999) In Vitro Viability of Retinal Pigment Epithelial Cells from Human Donor Eyeballs According to the Environmental Conditions and Periods. *J Korean Ophthalmol Soc* **40**(2): 481-489.

Carlson, M.A., (2006) Technical note: assay of cell quantity in the fibroblast populated collagen matrix with a tetrazolium reagent. *Eur Cell Mater* **12**: 44-48.

Kristerson, L., (1985) Autotransplantation of human premolars. A clinical & Radiographic study of 100 teeth. *Int J Oral surg* **14**: 200-213.

Line, S.E., Polson, A.M., (1974) Relation between periodontal injury, selective cell repopulation and ankylosis. *J Periodontol* **45**: 725-730.

Schwartz, O., Andreasen, J.O. and Greve, T., (1985) 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* **14**: 350-361 .

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

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

Makino, S., Harada, M., Akashi, K., Shibuya, T., Inaba, S., Niho, Y. (1991) A simplified method cryopreservation of peripheral blood stem cells at -80 centigrade without rate controlled freezing. *Bone Marrow Transplant* **8**: 239-234.

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

Neulieb, R.L., Neulieb, M.K., (1990) The diverse actions of dimethyl sulphoxide; an indication of membrane transport activity. *Cytobios* **63**: 139-165.

Dong, S.H., Kim, B.H., Sung, S.R., (2000) Cryopreservation of primary hepatosite for repeated investigational uses. *Koreal J Gastroenterol* **35**: 591-599.

Meng, Q., (2003) Hypothermic preservation of hepatocytes, *Biotechnol Prog* **19**(4): 1118-1127.

Kawasaki, N., Hamamot, Y., Nakajima, T., Irie, K., Ozawa, H., (2004) Periodontal regeneration of transplanted rat molars after cryopreservation. *Arch Oral Biol* **49**(1): 59-69

Schluter O, Urrutia Benet G, Heinz V, Knorr D, Metastable states of water and ice during pressuresupported freezing of potato tissue, *Biotechnol Prog* **20**(3), 799-810 (2004).

Kazunori Inuzuka MDa, Naoki Unno MD, FACS, a, Naoto Yamamoto MDa, Daisuke Sagara MDa, Minoru Suzuki MDa, Motohiro Nishiyama MDa and Hiroyuki Konno, (2007) Effect of hyperbarically oxygenated-perfluorochemical with University of

Wisconsin solution on preservation of rat small intestine using an original pressure-resistant portable apparatus. *Surgery* **142**(1): 57-66.

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

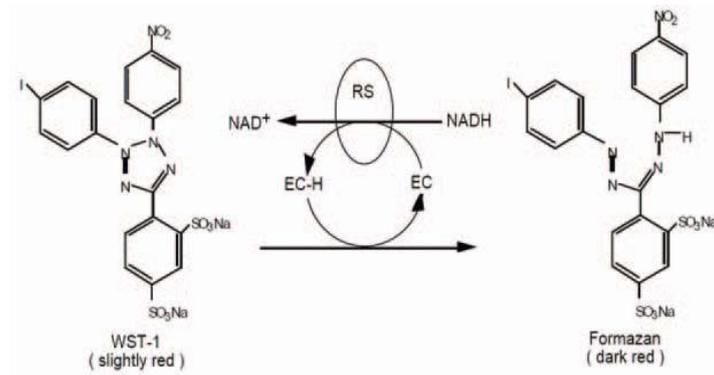
Takahashi, T., Kakita, A., Takahashi, Y., Yokoyama, T., Yamashina, (2001) Preservation of rat livers by supercooling under high pressure. *Transplantation Proceedings* **33**: 916-919.

Lee, Y.E., Kim, E.S., Kim, J., Han, S.H., Lee, S.J., (2009) The Efficacy of programmed cryo preservation under pressure in rat periodontal ligament cells. *J Kor Acad of Cons Dent* **34**(4): 356-363.

Kim, J.B., (2004) Protective effect of polyphenol against reactive oxygen species on cultured human endothelial cells, Ph D. Thesis. Yonsei University

Kawata, T., (2005) Transplantation tooth from bank. Hiroshima. Department of Orthodontics, Hiroshima University School of Dentistry

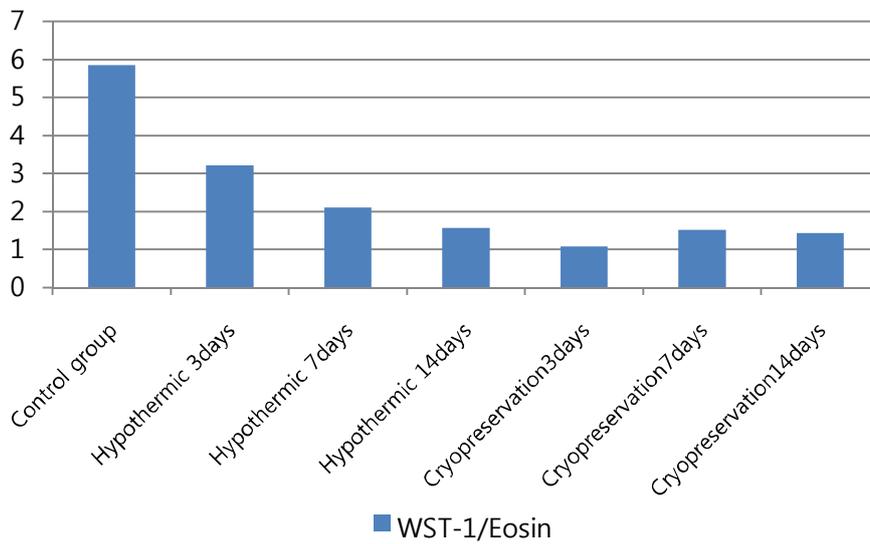
## FIGURES



**Figure 1. cleavage of tetrazolium salts(WST-1) to formazan.**

(EC = electron coupling reagent,

RS= mitochondrial succinate-tetrazolium reductase system)



**Figure 2. WST-1/Eosin value of control group & all experimental groups.**

## TABLES

**Table 1. WST-1/Eosin value of control group, Hypothermic preservation groups and Cryopreservation groups (p < 0.05)**

| Groups                                | WST-1 <sup>1</sup> /Eosin <sup>2</sup> |
|---------------------------------------|--|
| Control groups                        | 5.84±0.96                              |
| Hypothermic<br>Preservation<br>Groups | 2.30±1.01                              |
| Cryopreservation<br>Groups            | 1.34±0.56                              |

There were significant differences between groups with different subscripts (p < 0.05).

The values of WST-1<sup>1</sup> are proportional to the vitality of the cells. The values of Eosin<sup>2</sup> are proportional to the area of the periodontal ligament cells. So the values of WST-1/Eosin mean the vitality of the periodontal ligament cells per unit area.

**Table 2. WST-1/Eosin value of hypothermic preservation group and cryopreservation group according to preservation time (3,7,14 days) (p < 0.05)**

| Groups                          | WST-1/Eosin |
|---------------------------------|-------------|
| Hypothermic<br>for 3 days       | 3.21±1.01   |
| Hypothermic<br>for 7 days       | 2.10±0.73   |
| Hypothermic<br>for 14 days      | 1.56±0.33   |
| Cryopreservation<br>for 3 days  | 1.07±0.47   |
| Cryopreservation<br>for 7 days  | 1.51±0.35   |
| Cryopreservation<br>for 14 days | 1.43±0.71   |

There were significant differences between groups with different subscripts (p < 0.05).

## **ABSTRACT**

### **Viability of the periodontal ligament cells according to preservation method and time**

**Dong-Eun Lee, D.D.S.**

*Department of Dental Science*

*Graduate School, Yonsei University*

*(Directed by Prof. Seong-Ho Choi, D.D.S., M.S.D., Ph.D.)*

The purpose of this study was to evaluate the viability of periodontal ligament cells in dog teeth using cold preservation (4°C) method & cryo-preservation (-196°C) method by means of WST-1(4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) assay.

A total of 7 beagle dogs were used. Eight teeth of each group were divided into 8 experimental group depending upon the preservation condition. The experimental groups were group 1 (immediate control), group 2-1 (cold preservation at 4°C for 3 days), group 2-2 (cold preservation at 4°C for 1 week), group 2-3 (cold preservation at 4°C for 2 week), group 3-1 (cryo-preservation for 3 days), group 3-2 (cryo-

preservation for 1 week), group 3-3 (cryo-preservation for 2 weeks). F-medium and 10% dimethylsulfoxide (DMSO) were used as preservation medium and cryo-protectant. For cryo-preservation groups, thawing was performed in 37°C water bath, then WST-1 assay was processed. The values of optical density obtained by WST-1 was divided by the values of eosin staining for tissue volume standardization.

In WST-1 assay, all cold preservation (4°C) groups (group 2, 3, 4) showed significantly higher viability of periodontal ligament cells than cryo-preservation group (group 5, 6, 7) ( $p < 0.05$ ), but showed lower viability than immediate control group ( $p < 0.05$ ). In cold preservation (4°C) groups, group 2 showed significantly higher viability than group 3 and 4. There was no significant difference between all cryo-preservation groups (-196°C).

From the results of this study, cold-preservation method suggests the better efficacy for short term preservation of the teeth than cryo-preservation.

---

**Key Words :** periodontal ligament cell, preservation, WST-1,