

골다공증 유도 백서경골에 티타늄 임플란트 매식 시 저출력 초음파 적용이 골 치유에 미치는 영향

황영섭¹ · 전현준¹ · 신상훈¹ · 정인교¹ · 김규천² · 김철훈³ · 김옥규¹

¹부산대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실, ²구강해부학교실, ³동아대학교 의료원 치과 구강악안면외과

Abstract (J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2011;37:386-95)

Effect of low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on bone healing around a titanium implant in the tibia of osteoporosis-induced rats

Young-Seob Hwang¹, Hyun-Jun Jeon¹, Sang-Hun Shin¹, In-Kyo Chung¹,
Gyoo-Cheon Kim², Chul-Hoon Kim³, Uk-Kyu Kim¹

¹Department of Oral and Maxillofacial Surgery, ²Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Pusan National University, Yangsan,

³Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Dentistry, Dong-A University Medical Center, Pusan, Korea

Introduction: Osteoporosis is a major health problem in the elderly that involves changes in the properties of bone as well as impaired bone healing around a titanium implant in both humans and animals. This study examined effect of low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on the bone healing process around a titanium implant in osteoporosis-induced rats.

Materials and Methods: Sixteen rats were divided into two groups. A control group with osteoporosis induced by removing both ovaries and an experimental group of rats that were applied with LIPUS after osteoporosis had been induced. A screw type titanium implant (diameter, 2.0 mm; length, 3.5 mm, Cowell-Medi, KOREA) was placed into the tibias of 16 rats. The control and experimental group contained 8 rats each. The rats were sacrificed at 1, 2, 4, and 8 weeks after implantation to examine the histopathology and immunochemistry.

Results: The histopathology examination revealed earlier new bone formation in the experimental group than the control group. In particular, at 1 week after implantation, more new bone matrix and collagen were observed around the implant of the experimental group compared to the control group. Immunochemistry analysis showed that the level of OPG expression of the experimental group was higher in the early stages than in the control group. After 8 weeks, the levels of OPG expression were similar in both groups. The expression level of receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) was stronger in the experimental group than the control group. After 4 weeks, the level of RANKL expression was similar in both groups.

Conclusion: These results suggest that the application of LIPUS to implantation can promote bone healing around titanium in osteoporosis animals.

Key words: Osteoporosis, Dental implant, Low intensity pulsed ultrasound

[paper submitted 2011. 3. 10 / revised 2011. 10. 5 / accepted 2011. 8. 24]

I. 서 론

현대 사회가 점차 고령화되어 감에 따라 당뇨, 고혈압 및 골다공증과 같은 노인성 질환이 증대되고 있다. 노인성 질환 중 하나인 골다공증은 크게 일차성 골다공증과 이차성 골다공증으로 분류할 수 있다. 일차성 골다공증은 제1형 골다공증인 폐경 후 골다공증과 제2형 골다공증인 노인성 골다공증으로 나눌 수 있는데, 폐경 후 골다공증은 폐경기

의 시작과 동시에 급속한 골 손실이 나타나며 척추의 압박 골절과 손목뼈가 쉽게 골절될 위험이 증가하는 특징이 있다. 노인성 골다공증은 급격한 골 손실은 없으나 70세 이상의 남녀 노인에게 서서히 발생하여 골반골과 척추골에서 점진적인 골 손실을 가져온다. 이차성 골다공증은 연령에 상관없이 질병(내분비질환, 위장관 질환, 악성종양)이나 약물(부신피질호르몬, 항암화학요법, 갑상선호르몬, 항경련제, 항응고제, methotexate, cyclosporine, GnRH 등), 알코올, 흡연 등에 노출되어 초래되는 골다공증을 말한다^{1,2}.

골다공증은 부적절한 골개조의 결과로 골조직의 손실이 일어나 골이 취약해지고 골절이 일어날 위험이 큰 상태를 말하며, 골조직의 생화학적 조성에는 변화가 없으나 조직학적으로는 피질골 두께가 감소하고, 해면골 지주의 수와 크기가 감소된 상태로 정의할 수 있다³. 이는 단위체적당 골질의 감소로 나타나며, 골질의 감소는 골 형성에 대한 골

김 옥 규

626-870 경상남도 양산시 물금읍 범어리

부산대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실

Uk-Kyu Kim

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry,
Pusan National University

Beomeo-ri, Mulgeum-eup, Yangsan, 626-870, Korea

TEL: +82-55-360-5100 FAX: +82-55-360-5104

E-mail: kuksj@pusan.ac.kr

흡수의 비율이 증가하면서 발생한다⁴. 마찬가지로 치조골에서도 골 무기질 함량의 변화와 잔존 치조제의 부피의 변화가 유발된다. 실제로 여러 임상연구와 동물연구에 의해 골다공증이 치조골을 변화시키는 것이 밝혀졌는데 이러한 연구에 의하면 자궁적출술을 시행한 동물에게서 현저한 골밀도 감소와 골소주 미세구조의 변화, 하악 피질골 두께의 감소를 볼 수 있었다⁵⁻⁷.

치과 영역에서 상실된 치아의 기능을 회복시키기 위하여 널리 사용되고 있는 임플란트의 장기간의 성공률과 골유합 기간의 최소화 측면에서 볼 때 골다공증은 임플란트의 성공의 큰 걸림돌이 아닐 수 없다. 임플란트의 성공에 영향을 미치는 여러 요소(환자의 골 개조반응, 임플란트 디자인 및 표면처리, 임상술식, 기타 부수적 술식등) 중 식립 부위 골의 질은 가장 중요한 요소로서 이것이 불량할 경우 식립된 임플란트는 높은 실패율을 보인다⁸⁻¹⁰. 불량한 골질을 가진 환자에서 임플란트와 치조골과의 골 유합의 우수성을 증가시키기 위해 임플란트 디자인뿐만 아니라 골 이식재, 성장인자 및 골 형성 단백질 등에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다. 또한 골 주위에서 치유를 향상시키려는 목적으로 파동형 전자기장이나 저수위 레이저 및 저출력 파동형 초음파(low intensity pulsed ultrasound)와 같은 분야에 있어서도 활발한 연구가 이루어지고 있다^{8,11}.

특히, 신생골 형성을 촉진시키는 방법으로 저출력 초음파를 치과 치료에 응용한 연구가 활발히 진행중인데 통상적으로 골다공증을 가진 환자는 감소된 골 밀도와 부피로 인해 치료기간이 길다는 문제점을 갖고 있으므로, 신생골 형성을 촉진시켜 골 성숙 시기를 앞당길 필요성이 있다. 이에 저출력 초음파를 임플란트 치료에 응용하여 신생골 형성을 촉진시키고 안정적인 결과를 얻는 생물학적 효과를 기대하고 본 연구를 수행하였다¹².

초음파는 고주파 압력 파동(high frequency acoustical pressure waves)으로 신체로 전달되어 세포수준에서 생화학적, 분자적 반응으로 골절 치유 촉진의 효과가 있다고 보고되었다¹³. 초음파에 노출시킨 살아있는 동물 실험에서, 지속적인 초음파 적용 결과로써 조직 온도 상승 또는 진동파에 의한 기계적 응력 발생이 보고되었다. 다양한 파동 초음파가 치료에 이용되고 있는데, 고강도 초음파는 실험실 광화 과정 실험과 동물 실험에서 가골 형성 감소, 골 치유 지연, 조직 괴사 및 섬유조직 형성등 다양한 생물학적 효과를 보이지만, 저출력 초음파는 가골 형성을 촉진하고 골절부의 치유를 촉진하는 결과를 보였다¹⁴⁻¹⁹. 세포 수준에서의 초음파 연구에 의하면 배양된 조혈세포에 장기간 초음파를 노출시킨 효과로 파골세포 형성이 억제되는 것이 확인되었다²⁰. Yang 등²¹은 쥐의 대퇴골 골절(femoral fracture)에서 저출력 초음파의 노출로 aggrecan gene의 발현을 증가시켰다고 보고하였고, Parvizi 등^{22,23}은 저출력 초음파의 자극이 쥐의 격리된 연골 세포에서 칼슘의 세포 내 농도를 증가시킨다고 보고하였다. 반면에 Naruse 등^{24,25}은 phosphatidylinositol

3-kinase pathway의 활성을 포함하는 Ca-independent mechanism을 보고하였다. Wang 등²⁶은 저출력 초음파가 가골 형성을 촉진하는 성질에 따라서 연골내 골화를 촉진시켰다고 보고하였으나 정확한 기전은 아직 알려지지 않았다.

그 외 초음파 치료는 흡수된 치근의 치유를 촉진시키는 데에도 이용되었으며 조직 유도 재생술에서 성공률을 높이기 위한 방법으로 초음파 자극 환경에서 골치유 과정을 촉진시키는 시도가 있었다²⁷⁻²⁹.

이에 본 연구에서는 골다공증과 같은 특수한 상황에서 골 조직 상태가 불량한 경우 임플란트와 골이 더 잘 유착할 수 있도록 자가골이나 인조골, hydroxyapatite 같은 재료를 사용하여 골의 양을 증대시키는 방법 이외에 저출력 초음파를 적용하여 신생골 형성을 촉진시킴으로써 골다공증 상태에서의 임플란트 시술을 성공으로 이끌 수 있는 방법을 찾아보고자 골기질에 대한 병리 조직학적 검사와 골의 개조에 관계하는 osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor kB ligand (RANKL)의 발현에 대한 면역 조직화학적 검사를 시행하여 비교 분석하였다.

Ⅱ. 연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

1) 실험 동물

실험 동물은 일정 기간 동일 조건하에서 사육한 250 g 내외의 백서 16마리에 골다공증을 유도하여 임플란트를 매식한 후 저출력 초음파를 적용한 실험군 8마리와 저출력 초음파를 적용하지 않은 대조군 8마리를 사용하였다.

2) 실험 재료

실험 동물에 식립한 임플란트는 순수 티타늄(commercially pure titanium-Grade 3)으로 주문 제작한 폭경 2.0 mm, 직경 3.5 mm (pitch height 0.4 mm)의 나사형 임플란트(Cowell-Medi, Pusan, Korea)를 사용하였으며 저출력 초음파는 BR-sonic® (ITO Co. Tokyo, Japan)을 이용하였다.

2. 연구 방법

1) 골다공증 유도

250 g 내외의 10주 된 백서의 대퇴부에 전신마취를 위해 Ketamine HCl (Ketalar®, Korea united pharm. Inc, Seoul, Korea) 100 mg/kg과 Xylamine (Rumpun®, Bayer, Seoul, Korea) 10 mg/kg 을 혼합하여 근육 주사한다. 복부 소독 후 5 cm의 수평절개를 가하고 복부 노출 후 양측 신장의 하방에 존재하는 난소를 조심스럽게 완전 제거하여 골다공증을 유도하였다. 통법에 따라 봉합한 후 겐타마이신(Gentamicin hydrochloride, Choongwae, Seoul, Korea) 3 mg/kg을 근주하였다.

2) 임플란트 매식

난소 절제 후 5주가 경과되어 골다공증 유도 후 실험 동물인 백서 16마리에 Enflurane (Gerolan®, Choongwae, Seoul, Korea)과 산소압의 농도를 1:1로 혼합하여 흡입마취를 통한 전신마취를 시행하였다. 우측 경골부를 골막까지 박리하여 골 노출시킨 후 경골 근심측 5 mm 부분 경골 외측 최대 폭경부 중앙에 직경 1.6 mm twist drill을 이용하여 피질 골에 구멍을 내고 준비한 임플란트를 골수강에 도달할 때까지 조심스럽게 매식하였다. 이후 겐타마이신 항생제를 근주하였다.

3) 저출력 초음파 조사

골다공증 백서 경골 외측에 임플란트를 매식 후 실험군에 BR-sonic을 이용하여 저출력 초음파를 매일 10분씩 주파수 3 MHz, 초음파 출력 40 mW/cm²로 14일간 적용하였다. 모든 실험은 부산대학교 동물실험 윤리위원회 운영규정에 따라 적용 심의하고, 그 내용이 동물실험의 신뢰성, 안전성, 윤리성의 측면에서 적합하여 동물실험을 승인 받았으며 모든 사항을 준수하여 시행하였다.

4) 표본 제작

임플란트 매식 후 1주, 2주, 4주 및 8주 경과한 백서를 흡입을 통한 전신마취를 시행하고 심장 관류법으로 흉곽을 열어 심장을 노출시킨 후, 좌심실에 20계이지 바늘을 삽입하고 겐자로 고정하였다. 연동 관류 펌프를 작동시켜서 체순환시킨 후 우심방 벽을 절개하여 혈액을 배출시키고 PBS를 사용하여 체내 혈액을 세척하였다. 이후 4% paraformaldehyde 고정액을 다시 30분간 펌프 관류시킨 후 대퇴 관절을 포함하여 경골을 절단하고 임플란트 매식 부위를 채취하였다. 이를 동일한 고정액에 24시간 고정시킨 후 10% EDTA와 NaOH를 녹인 탈회액에 12주간 탈회시켰다. 그 후 조직을 조직캡슐에 넣어 흐르는 물에 12시간 동안 수세한 다음, 통상적인 방법에 따라 알코올과 xylene으로 탈수와 투명화를 한 후 파라핀에 포매하고 6 µm 두께의 시상연속절편을 만들었다.

5) 병리조직학적 관찰

(1) Hematoxylin-Eosin (H&E) stain

통법에 의해 H&E 염색 처리 후 표본에서 골 형성과 관련된 세포 및 세포의 기질을 관찰하기 위해 광학현미경(Zeiss Axioscop, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)을 이용하였다.

(2) Masson's trichrome stain

Masson's trichrome stain 염색표본에서 collagen 및 골 형성과 관련된 세포 및 세포의 기질을 관찰하기 위해 광학현미경을 이용하였다. 염색 처리 과정은 다음과 같다. 교원질의 생성정도에 따른 광화된 골조직과 비광화된 골조직을 관찰하기 위해 상기 제작된 6 µm 두께의 파라핀 조직 절편

을 xylene에서 파라핀을 제거하고 실온에서 Bouin 용액에 하룻밤 담가 놓은 후 조직표본의 노란색이 없어질 때까지 흐르는 물에 수세한다. 증류수로 여러 번 행구고 Weigert iron hematoxylin 용액에 10분간 핵염색을 한다. 이후 흐르는 물에 10분간 수세하여 핵을 청화시키고 Biebrich Scarlet-acid fuchsin 용액에 10분간 염색한다. 증류수로 여러 번 행군 후 phosphomolybdic-phosphotungstic acid 용액에 10분간 처리한다. 수세하지 않고 Aniline blue 용액에 5분간 염색한 후 증류수로 여러 번 행군다. 이후 1% acetic acid 용액을 1-3분간 적용시킨 다음 증류수로 여러 번 행군다. 탈수, 투명과정을 거친 후 봉입한다.

6) OPG, RANKL의 발현에 대한 면역조직화학적 검사

파라핀 포매 조직으로부터 4 µm 두께의 절편을 얻어 코팅 슬라이드에 부착시킨 다음 1시간 동안 60°C 오븐에 넣은 후 xylene으로 5분간 4회 반복 처리하여 탈 파라핀을 시행하고 여러 단계의 알코올로 함수 후 증류수로 세척하였다. 세척 완충액으로 3분씩 3회 세척하고 조직 내의 내인성 과산화효소를 제거하기 위하여 0.3% H₂O₂ 용액에 5분간 반응시켰다. 이어서 세척 완충액으로 4회 수세 후 조직 내 비특이적 결합을 억제하기 위해 blocking serum (Goat immunocruz staining system, SantaCruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)을 1시간 반응시킨 후 각각의 일차 항체(OPG:sc-8468, RANKL:sc-7692, receptor activator of nuclear factor κB (RANK):sc-7625, SantaCruz Biotechnology Inc.)를 희석하여(OPG 1:120, RANKL 1:90, RANK 1:40) 하룻밤 동안 반응시켰다. 완충액으로 수세한 다음 Biotin이 부착된 이차 항체(Goat immunocruz staining system)를 1시간 반응시킨 후 완충액으로 4회 수세하고 streptavidin이 결합된 효소 중합체(Goat immunocruz staining system)로 1시간 반응시켰다. 그 후 AEC로 발색하고 증류수로 수세한 후 H&E로 대조 염색하여 관찰하였다. 이후 광학현미경에서 Kappa ratio를 이용하여 2인 관찰자간 판정 일치도를 검정한 후 OPG와 RANKL의 발현 양상을 관찰하고 그 결과를 -: no immunoreactivity; +: weak but visible staining; ++: moderate staining; +++: strong staining intensity의 4등급 발색 반응으로 나누어 분석하였다.

III. 결 과

1. 병리조직학적 소견

1) H&E stain

(1) 대조군

매식 후 1주에서 임플란트 계면부위에 요철상을 보이는 골기질을 관찰할 수 있었다. 매식 후 2주에서는 임플란트 계면부위에 아직 무기질화가 일어나지 않은 부분이 관찰되고 내측으로 두꺼운 골기질 상태를 볼 수 있었다. 매식

후 4주에 이르러 임플란트 계면 부위에서는 매식 후 2주에 비해 두꺼워지고 성숙된 골의 양상을 관찰할 수 있었다. 매식 후 8주에서는 전반적으로 두꺼워진 골 조직 양상을 확인할 수 있었다.(Figs. 1. A-D)

(2) 실험군

매식 후 1주에서 임플란트 주위로 나사상 모양의 골기질이 관찰되었고, 이는 대조군에 비해 더 규칙적이고 증가된 양상을 보이고 있었다. 또한 대조군에 비해 더 많은 혈관을 관찰할 수 있었다. 매식 후 2주에서는 임플란트와 골이 접촉하는 계면부위에서 매식 후 1주 실험군에 비해 골기질과

재생 골의 양이 증가하였으며 이들은 대조군에 비해 더 많이 관찰되었고 또한 보다 규칙적이고 성숙된 형태를 보였다. 매식 후 4주에 이르러 임플란트 주위로 재생된 골은 높은 성숙도를 나타내고 있었으며, 성숙된 골의 두께가 두꺼워진 양상을 보였다. 매식 후 8주에서는 4주 실험군 및 8주 대조군에서와 마찬가지로 임플란트 계면 부위에서 두껍게 성숙된 골이 발견되었다. 결과적으로 매식 후 1, 2, 4주에서 실험군의 골 재생 양상이 대조군에 비해 뛰어났으며 매식 후 8주에서는 임플란트 주위 골 양상이 대조군과 비슷해짐을 확인할 수 있었다.(Figs. 2. A-D)

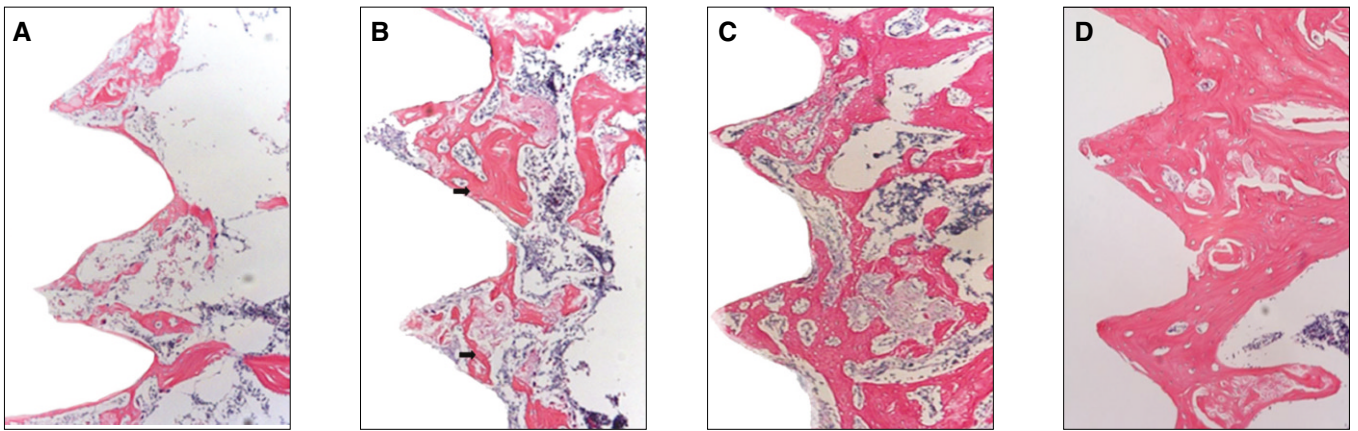


Fig. 1. A: Microphotograph at 1 week after implantation in control rat.(H&E staining. Original magnification $\times 100$) B: Microphotograph at 2 weeks after implantation in control rat.(H&E staining. Original magnification $\times 100$) arrow: collagen bone matrix.(red staining) C: Microphotograph at 4 weeks after implantation in control rat.(H&E staining. Original magnification $\times 100$) D: Microphotograph at 8 weeks after implantation in control rat.(H&E staining. Original magnification $\times 100$)

Young-Seob Hwang et al: Effect of low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on bone healing around a titanium implant in the tibia of osteoporosis-induced rats. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2011

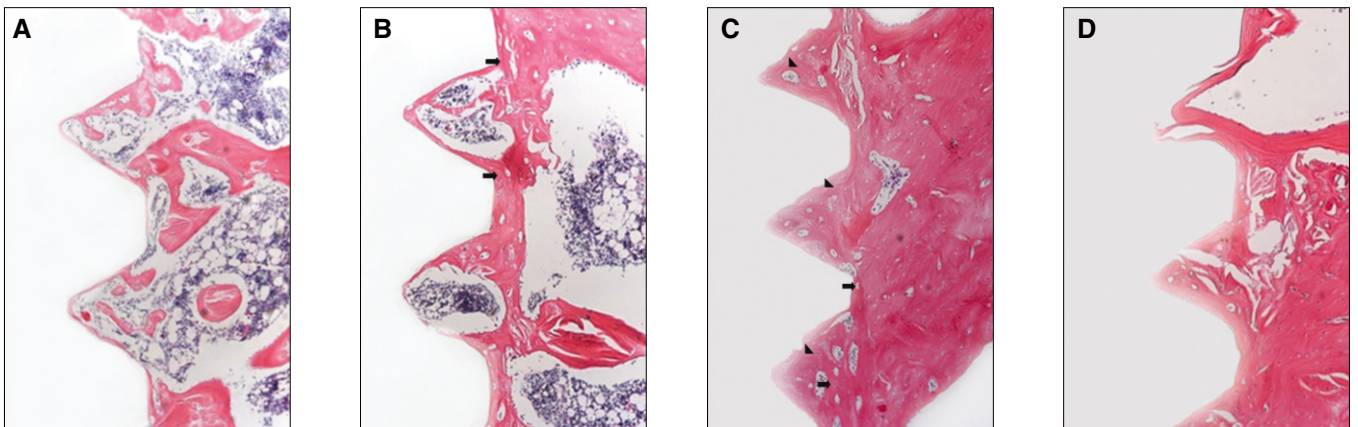


Fig. 2. A: Microphotograph at 1 week after implantation in experimental rat.(H&E staining. Original magnification $\times 100$) B: Microphotograph at 2 weeks after implantation in experimental rat.(H&E staining. Original magnification $\times 100$) Arrow: collagen bone matrix.(red staining) C: Microphotograph at 4 weeks after implantation in experimental rat.(H&E staining. Original magnification $\times 100$) Triangle indicators: osteocytes, arrows: osteoblasts. D: Microphotograph at 8 weeks after implantation in experimental rat.(H&E staining. Original magnification $\times 100$)

Young-Seob Hwang et al: Effect of low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on bone healing around a titanium implant in the tibia of osteoporosis-induced rats. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2011

2) Masson's trichrome stain

(1) 대조군

매식 후 1주에서 임플란트 계면에서 collagen 형성을 의미하는 푸른색이 나타났다. 매식 후 2주에서는 collagen 및 골 형성이 증가하였으며 골소주가 더욱 규칙적인 형태로 관찰되었다. 매식 후 4주에서 역시 골 소주 부위에서 성숙된 골의 증가와 함께 임플란트 계면주위의 골 형성이 더욱 치밀하고 규칙적인 양상을 보였다. 매식 후 8주에서는 매식 후 4주와 비슷한 정도의 골 형성 양상을 볼 수 있으며, 4주에 비해 약간 더 짙은 염색성으로 보였다.(Figs. 3, A-D)

(2) 실험군

매식 후 1주에서는 대조군에 비해 푸른색의 collagen 형성이 약간 우세함을 확인할 수 있었다. 매식 후 2주에서 collagen은 1주에 비해 더 많이 발현되고 있으며, 대조군에 비해서는 임플란트 나사선 근처에서 더 많이 발현되고 있다. 매식 후 4주에 이르러서는 매식 후 2주에 비해 collagen 및 골 형성의 증가를 관찰할 수 있었으며, 대조군에 비해 collagen 발현이 더 강하게 관찰되었다. 매식 후 8주에서는 collagen 및 골 형성과 함께 대조군과 같이 성숙된 골이 더 뚜렷하게 관찰되었다. 실험군에서 collagen의 발현은 초기

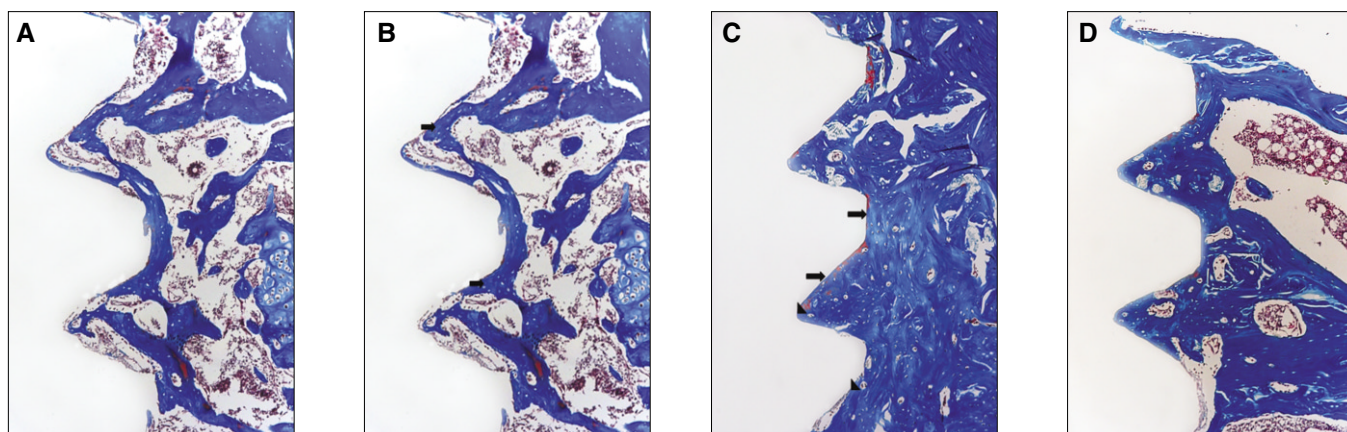


Fig. 3. A: Microphotograph at 1 week after implantation in control rat.(Masson's trichrome staining. Original magnification $\times 100$) B: Microphotograph at 2 weeks after implantation in control rat.(Masson's trichrome staining. Original magnification $\times 100$) Arrows: collagen bone matrix(blue staining) C: Microphotograph at 4 weeks after implantation in control rat.(Masson's trichrome staining. Original magnification $\times 100$) Triangle indicators: non-calcified bone; arrows: new bone matrix along implant interface D: Microphotograph at 8 weeks after implantation in control rat.(Masson's trichrome staining. Original magnification $\times 100$)

Young-Seob Hwang et al: Effect of low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on bone healing around a titanium implant in the tibia of osteoporosis-induced rats. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2011

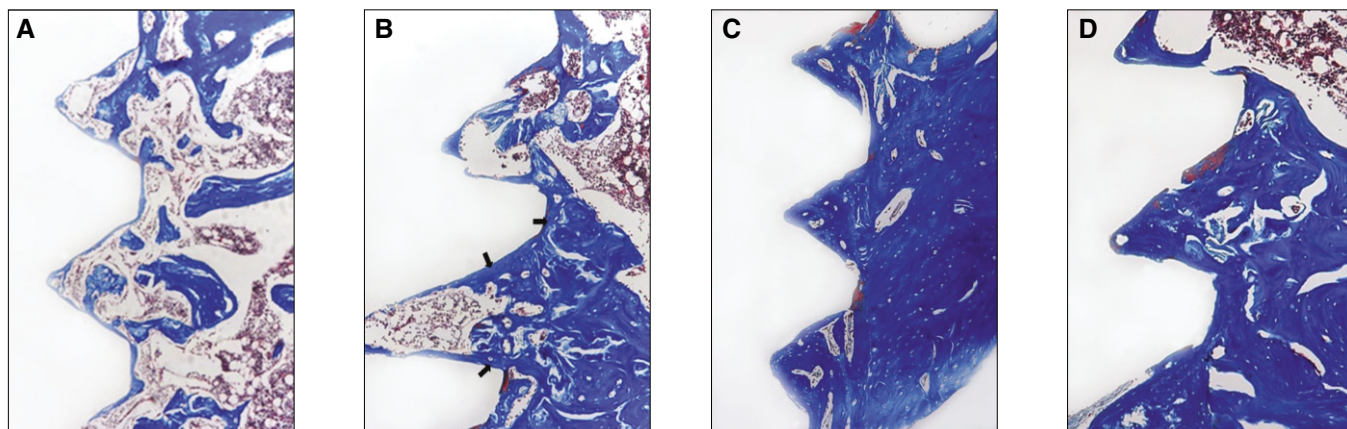


Fig. 4. A: Microphotograph at 1 week after implantation in experimental rat.(Masson's trichrome staining. Original magnification $\times 100$) B: Microphotograph at 2 weeks after implantation in experimental rat.(Masson's trichrome staining. Original magnification $\times 100$) Arrows: collagen bone matrix(blue staining) C: Microphotograph at 4 weeks after implantation in experimental rat.(Masson's trichrome staining. Original magnification $\times 100$) D: Microphotograph at 8 weeks after implantation in experimental rat.(Masson's trichrome staining. Original magnification $\times 100$)

Young-Seob Hwang et al: Effect of low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on bone healing around a titanium implant in the tibia of osteoporosis-induced rats. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2011

인 매식 후 1,2,4주에서 대조군에 비해 더 강하게 발현되었으며, 매식 후 8주에서는 실험군과 대조군 모두 collagen이 안정되게 발현되고 있었다. 실험군의 초기에서 보다 나은 골 개조 활성이 일어나고 있음을 확인하였다.(Figs. 4. A-D)

2. OPG, RANKL의 발현에 대한 면역조직화학적 검사 소견

1) OPG

OPG의 발현을 분석한 결과, 매식 후 1주에서 실험군은 대조군에 비하여 발현이 상당히 증가하였고, 매식 후 2주에서도 실험군이 대조군에 비해 OPG의 발현이 증가되었다. 또한 대조군 및 실험군 모두에서 1주군에 비해 2주군에서 발현의 증가를 보였다. 매식 후 4주에서도 실험군이 대조군에 비하여 발현이 증가되었지만, 실험군 및 대조군 모

두에서 매식 후 2주에 비해서는 감소된 양상이 확인되었다. 매식 후 8주에서는 실험군과 대조군에서 차이를 보이지 않았다.(Figs. 5. A-D, Figs. 6. A-D)

2) RANKL

실험군과 대조군 모두에서 RANKL이 임플란트 계면 및 혈관 주위 세포에서 관찰되었다. 매식 후 1주에서 실험군이 대조군에 비해 RANKL의 발현이 증가되어 나타났으며, 매식 후 2주 역시 실험군에서 대조군에 비해 RANKL의 발현 양상이 다소 높게 관찰되었다. 매식 후 4주째에서는 실험군과 대조군에서 비슷한 발현 정도를 보였으며 매식 후 2주에 비하여 발현이 감소되었다. 매식 후 8주에서는 매식 후 4주와 유사하게 발현되었다.(Figs. 7. A-D)

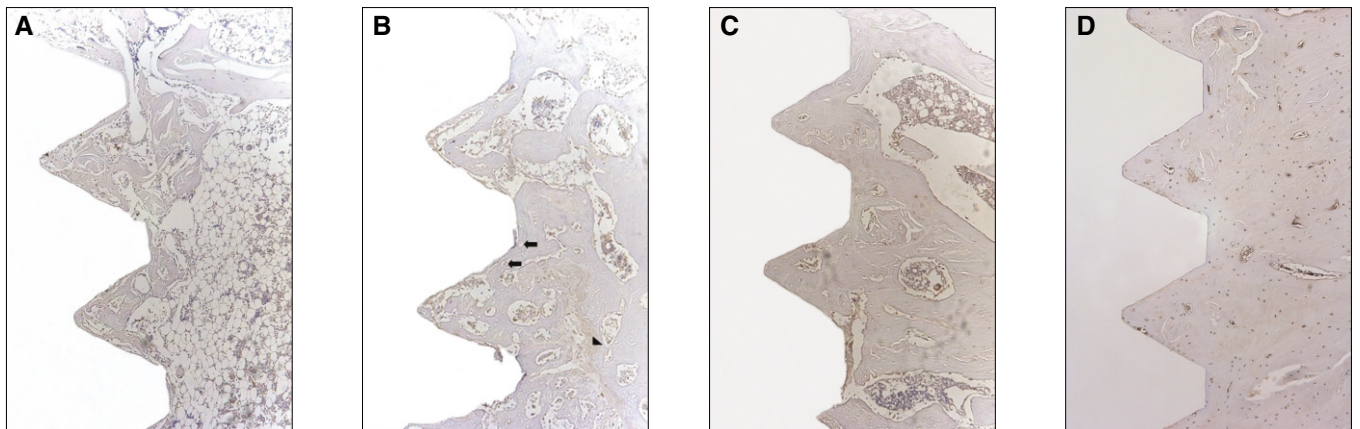


Fig. 5. A: Osteoproteogrin antibody reaction of regenerating bone at 1 week after implantation on tibia of the control rat. ($\times 100$) B: Osteoproteogrin antibody reaction of regenerating bone at 2 weeks after implantation on tibia of the control rat. ($\times 100$) Arrows:osteoclasts, triangle:osteocyte C: Osteoproteogrin antibody reaction of regenerating bone at 4 weeks after implantation on tibia of the control rat. ($\times 100$) D: Osteoproteogrin antibody reaction of regenerating bone at 8 weeks after implantation on tibia of the control rat. ($\times 100$)

Young-Seob Hwang et al: Effect of low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on bone healing around a titanium implant in the tibia of osteoporosis-induced rats. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2011

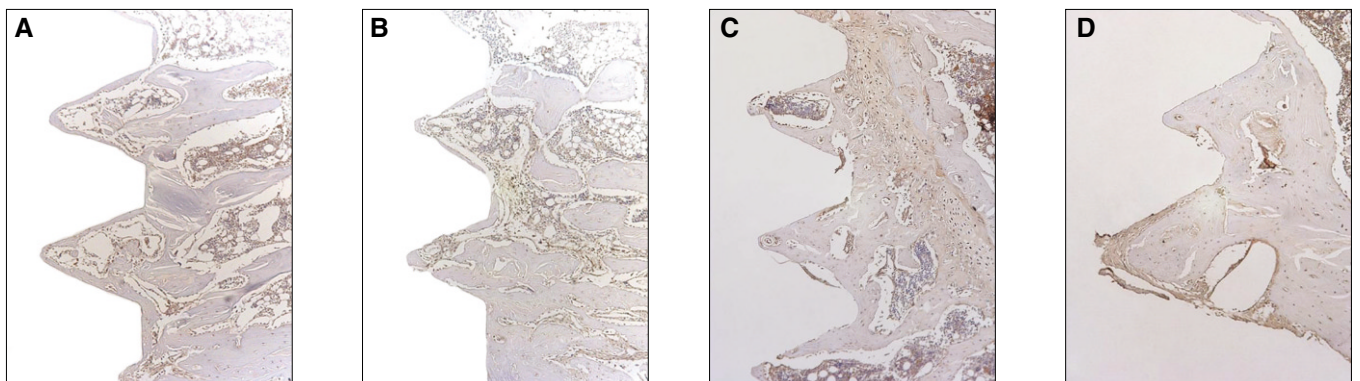


Fig. 6. A: Osteoproteogrin antibody reaction of regenerating bone at 1 week after implantation on tibia of the experimental rat. ($\times 100$) B: Osteoproteogrin antibody reaction of regenerating bone at 2 weeks after implantation on tibia of the experimental rat. ($\times 100$) C: Osteoproteogrin antibody reaction of regenerating bone at 4 weeks after implantation on tibia of the experimental rat. ($\times 100$) D: Osteoproteogrin antibody reaction of regenerating bone at 8 weeks after implantation on tibia of the experimental rat. ($\times 100$)

Young-Seob Hwang et al: Effect of low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on bone healing around a titanium implant in the tibia of osteoporosis-induced rats. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2011

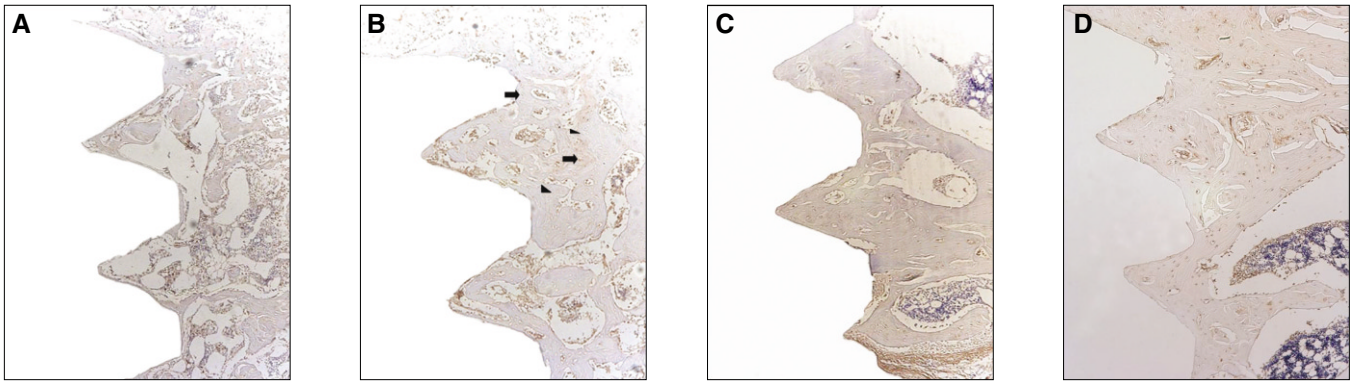


Fig. 7. A: Receptor activator of nuclear factor κ B ligand antibody reaction of regenerating bone at 1 week after implantation on tibia of the control rat. ($\times 100$) B: Receptor activator of nuclear factor κ B ligand antibody reaction of regenerating bone at 2 weeks after implantation on tibia of the control rat. ($\times 100$) Arrows: osteoclasts, triangle indicators: osteocytes. C: Receptor activator of nuclear factor κ B ligand antibody reaction of regenerating bone at 4 weeks after implantation on tibia of the control rat. ($\times 100$) D: Receptor activator of nuclear factor κ B ligand antibody reaction of regenerating bone at 8 weeks after implantation on tibia of the control rat. ($\times 100$)

Young-Seob Hwang et al: Effect of low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on bone healing around a titanium implant in the tibia of osteoporosis-induced rats. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2011

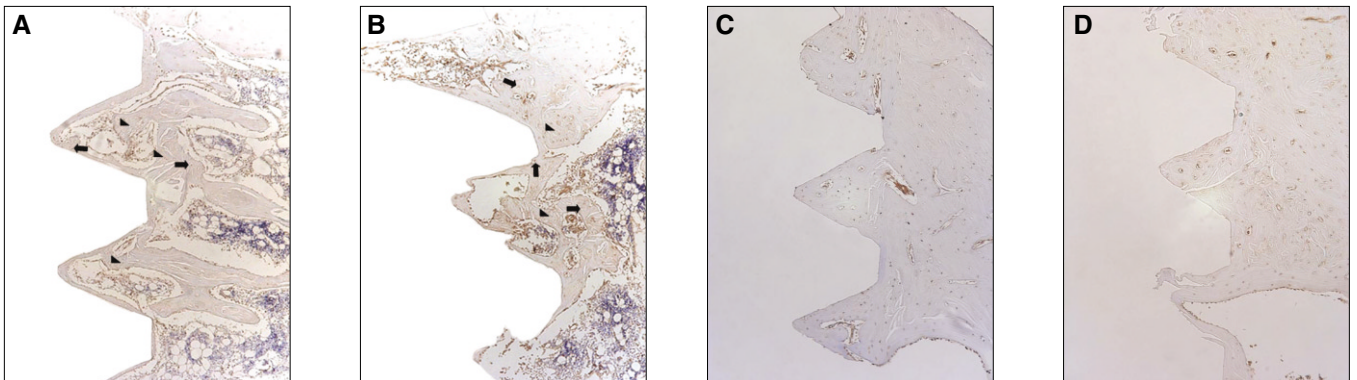


Fig. 8. A: Receptor activator of nuclear factor κ B ligand antibody reaction of regenerating bone at 1 week after implantation on tibia of the experimental rat. ($\times 100$) Arrows: osteoclasts, triangle indicators: osteocytes. B: Receptor activator of nuclear factor κ B ligand antibody reaction of regenerating bone at 2 weeks after implantation on tibia of the experimental rat. ($\times 100$) Arrows: osteoclasts, triangle indicators: osteocytes. C: Receptor activator of nuclear factor κ B ligand antibody reaction of regenerating bone at 4 weeks after implantation on tibia of the experimental rat. ($\times 100$) D: Receptor activator of nuclear factor κ B ligand antibody reaction of regenerating bone at 8 weeks after implantation on tibia of the experimental rat. ($\times 100$)

Young-Seob Hwang et al: Effect of low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on bone healing around a titanium implant in the tibia of osteoporosis-induced rats. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2011

Ⅳ. 고 찰

세계보건기구의 보고에 의하면 미국에서 폐경 후 코카시안 여성의 15%와 65세 이상 여성의 35%가 골다공증을 가지고 있으며, 코카시안 여성의 2명 중 1명은 살아가면서 1번 정도의 골다공증에 의한 골절을 겪을 수 있다고 하였다. 골다공증은 백인보다는 백인이 아닌 인종에서 더 많이 나타나고 있고, 남성보다는 여성, 젊은 인구에서 보다는 연령이 증가할수록 그 발현이 증가되어 고령 인구에서 높은 비율을 나타내고 있다^{30,31}. 국민건강보험공단이 제시한 국내 통계 자료에서도 2005년 이후 골다공증 환자수의 지속적인 증가로 2008년에는 전체 인구의 약 13%가 골다공증 환자였으며 60대 이후 고령자에서 유병률이 급증하였고, 또

한 여성이 남성보다 13배 이상 높은 발현을 보였다.

한편 고령인구의 증가와 더불어 완전 또는 부분 무치악 환자의 저작기능 회복을 위한 임플란트의 식립을 원하는 골다공증 병력을 가진 환자의 수도 증가하고 있다. 하지만 임플란트의 성공적인 결과를 위해 유약한 골질을 개선시키기 위한 노력은 필수적이라고 할 수 있다. 또한 골다공증에 의하여 무기질과 부피가 감소된 잔존 치조골조직에서의 임플란트 치료는 초기고정 및 치유기간 관점에서 많은 문제점을 가질 것으로 예견할 수 있다.

Holahan 등³²은 50대 이상 여성에게 식립된 임플란트의 생존율을 분석한 후향적 연구에서 192명 환자의 646개 임플란트 중 총 37개가 실패하여 5년간 생존율은 93.8%를 보였는데, 전체 192명 환자 중 골다공증 진단을 받지 않은 환

자가 94명(49%), 골감소증 진단을 받은 환자가 41명(21.4%), 골다공증 진단을 받은 환자가 41명(21.4%)으로, 골다공증 진단과 임플란트 실패는 유의할만한 상관관계가 없음을 보고하였다. 또한 Friberg 등³³의 임상연구에서도 다양한 디자인의 Bränemark 임플란트를 골다공증 환자에게 식립한 후 총 70개의 임플란트 중에 2개만이 실패하여 상악은 97.0%, 하악은 97.3%의 생존율을 보였다. 1년 후 검사 시 변연골 흡수의 정도는 기존 골 상태와 상관없이 다른 연구들과 일치하는 결과를 나타냈다. 1992년 Robert 등³⁴은 골다공증 환자에 있어서 칼슘 균형과 다른 대사성 질환의 중요한 요인들이 조절된다면 임플란트 식립의 적응증이 될 수 있다고 보고하였다. 상기 연구들에서 골밀도가 좋지 않은 골다공증 환자에게 있어서도 임플란트 식립 시 대체로 성공적인 골유합을 얻을 수 있었음을 알 수 있다.

하지만 Erdogan 등³⁵의 보고에 의하면 골질이 불량한 골다공증 환자에서 골증대술을 동반하는 임플란트 식립 시 이식한 골의 흡수가 일어나거나 골유합이 이루어지지 않기도 하며, 치유기간이 지연되고 심한 경우 식립한 임플란트의 실패가 초래되는 등의 합병증이 증가되었으며 특히 상악에서 더욱 그러하였다.

위와 같이, 골다공증은 임플란트 치료의 절대적인 비적응증이 아닌 상대적인 비적응증이며, 적절한 대사 조절에 치조골의 변화를 최소화하고 이른 시기에 임플란트 주위 골 유착을 증가시키면서 골 개조를 촉진할 수 있다면 임플란트 실패 혹은 치유 지연을 예방할 수 있을 것이다. 골조직 상태가 불량한 경우 더 좋은 결과를 위해서 자가골이나 합성골 등 다양한 이식 재료를 사용하여 골의 양과 질을 늘리기도 하지만 본 연구에서 사용된 저출력 초음파를 사용하여 신생골 형성을 촉진시킬 수도 있을 것으로 보인다.

Takayama 등¹²에 의하면 저출력 초음파는 초음파에 의해 발생하는 물리적 미세 진동이 기계적 자극으로 칼슘의 세포내 유입을 증가시켜 protein kinase A활성을 일으켜 골모세포의 분화를 유도하고, 골 형성을 촉진시킨다고 보고하였다. 또한 Machen 등³⁶은 저출력 초음파가 골 재생에 영향을 미치는 기계적, 열적, 전기적 기전에 대하여 설명하였다. 먼저 기계적 기전은 저출력 초음파가 미세 움직임을 일으켜, 직접적으로 또는 이차적인 화학적 매개체를 통해 골강도를 변화시킨다고 하였고, 열적 기전은 저출력 초음파가 국소적으로 조직의 온도를 1°C 이하의 범위에서 상승시켜 collagenase같은 효소의 활성을 변화시킴으로써 일어난다고 보고하였으며, 전기적 기전은 저출력 초음파가 세포막의 전위를 변화시켜 골유도성 화학 신호나 혹은 다른 기전의 생성을 통해 골 형성을 자극한다고 설명하였다.

Azuma 등³⁷은 저출력 초음파가 다양한 세포 반응 과정을 매개하는 세포에 기계적 자극을 형성함으로써 세포 반응을 촉진시키며, 섬유모세포, 연골세포, 골모세포와 같은 여러 종류의 세포가 기계적 자극에 반응하여 치유과정을 촉진시키는 역할을 한다고 보고하였고, Naruse 등^{24,25}도 저출

력 초음파가 세포 분화의 특정 단계에서 골모 세포에 작용하여 골기질 형성을 일으키는 직접 동화작용을 증진시킨다고 보고하였다. 치주인대 섬유모세포에 저출력 초음파를 조사하여 골모세포나 백악모세포로 분화시킨 Doan 등³⁸과 Harle 등¹⁴의 실험 결과도 저출력 초음파가 세포반응을 촉진시키는 것을 보여준다.

골다공증 유도 백서 경골 부위에 임플란트를 매식하고, 저출력 초음파를 적용한 본 연구에서의 병리조직학적 분석 결과 매식 후 1주에 임플란트 주위로 나사상 모양의 collagen과 골기질이 관찰되었으며, 실험군에서 더 짙은 염색상을 보여 collagen 및 골기질 형성이 더 우세함을 확인할 수 있었다. 또한 대조군에 비해 많은 혈관을 관찰할 수 있었다. 매식 후 2주에 실험군에서는 대조군에 비해 더 많은 collagen과 신생골을 관찰할 수 있었고 보다 규칙적이고 성숙된 형태를 보였다. 매식 후 4주에서도 실험군에서 대조군에 비해 collagen 및 골 형성이 많고 골 내부의 성숙된 골 또한 많음을 확인하였다. 이를 종합하여 볼 때 매식 후 1, 2, 4주 실험군의 골 재생 양상이 대조군에 비해 뛰어났으며 8주군에서는 임플란트 주위 골 양상이 대조군과 비슷해짐을 확인할 수 있었다. 즉, 저출력 초음파를 적용한 실험군이 대조군에 비해 골 형성을 위한 세포와 세포의 기질의 발현이 증가됨을 알 수 있었고 골의 치유가 빠른 시간에 이루어질 것으로 예상할 수 있었다.

골은 지속적으로 평생 동안 흡수와 생성의 반복되는 과정을 거치면서 골격을 일정하게 유지하는 골개조 과정에 있으며 이는 서로 유기적인 관계를 유지하는 골모 세포와 파골 세포에 의한 결과이다. 골의 흡수와 형성에 관여하는 중요한 사이토카인으로 밝혀진 것이 RANKL, OPG, RANK이다³⁹. 이들은 파골세포의 형성과 분화, 활성화, 세포사에 관여하여 골 흡수와 형성의 균형에 영향을 끼치게 된다. 골모세포나 기질세포에 의해 자극되는 RANKL은 골, 골수 및 림프 조직에 두드러지게 존재하며 파골세포 전구체(osteoclast precursor)에 있는 RANK와 결합하여 파골세포 전구체를 성숙한 파골세포로 분화, 활성화시킴으로써 골흡수 과정을 초래한다⁴⁰. RANK는 파골세포 전구체, B 세포, T 세포, 섬유모 세포 및 성숙 파골세포에 있는 사이토카인으로 RANKL, OPG와 결합하게 된다. 기질세포나 골모세포에서 유리되는 OPG는 파골세포 형성을 직접적으로 억제하는 사이토카인으로 RANKL과는 길항적으로 RANK에 작용하고, RANK와 결합하여 직접적으로 파골세포의 활성을 억제시킨다⁴¹. 또한 유전자 변형 쥐에서 파골세포의 형성과 활성을 감소시켜서 골화석증을 유발하는 인자로 인지되었으며, 실험적으로 일차성 골다공증인 폐경기 여성에서 유발되는 골의 흡수를 감소시키는 데 적용되었다⁴².

면역조직화학적 분석에서 OPG의 발현을 분석한 결과, 매식 후 1주와 2주, 4주에서 실험군에서 대조군에 비해 OPG의 발현이 보다 뚜렷하게 관찰되었다. 대조군에서는 매식 후 1주보다 2주에서 발현이 증가되는 결과를 보였고,

실험군에서는 매식 후 1주보다 2주에서 증가된 발현 양상을 보이면서 대조군에 비하여 1주, 2주, 4주까지 증가된 발현 양상이었다.(Table 1) 저출력 초음파를 적용한 실험군에서 초기에 OPG 발현이 증가됨은 골모세포에 의해 증가된 OPG가 파골세포 전구체에 위치한 RANK와 RANKL과의 결합을 차단함으로 인해 파골세포의 분화 및 성숙을 방해하여 결과적으로 골 흡수 활성도를 감소시키는 효과를 보인 것으로 생각된다. 임플란트 매식 후 4주 및 8주에서는 실험군과 대조군 모두에서 OPG 발현이 감소되었지만 실험군에서 감소되는 정도가 약함을 보아 실험군에서 OPG 발현이 상당기간 더 지속되어 골 흡수를 억제함을 예상할 수 있었다.

또한, 실험군, 대조군 모두에서 RANKL이 관찰되었는데 매식 후 1주 실험군에서 대조군에 비해 발현이 증가되어 나타났으며, 2주째 역시 실험군에서 대조군에 비해 RANKL이 상당히 증가된 발현 양상을 보였다. 매식 후 4주와 8주에 실험군과 대조군 모두 RANKL의 발현이 감소되었고 두 군간의 차이도 보이지 않았다.(Table 2) 매식 후 1주, 2주 실험군에서 대조군에 비해 RANKL 발현이 높은 것은 OPG 발현과 마찬가지로 골모세포의 활성도가 증가되었으며 그로 인하여 골 형성의 과정이 상대적으로 활발하게 이루어짐을 예상할 수 있었다⁴³.

저출력 초음파를 조사한 실험군과 조사하지 않은 대조군에서의 결과에서, 병리조직학적으로는 매식 후 초기에 저출력 초음파를 적용하여 증가된 골기질과 혈관 및 증가된 collagen 양상을 보였고, 면역조직화학적으로는 저출력 초

음파를 적용한 실험군에서 임플란트 매식 초기에 RANKL의 발현 증가를 보아 골모세포의 활성도가 증가됨을 알 수 있고, OPG 발현의 증가로 인한 파골세포의 분화 성숙이 억제되어 골 흡수 작용은 감소됨을 예상할 수 있었다. 이는 저출력 초음파 적용 효과에 따른 것으로 추정되지만, 신생골 형성 정도를 평가할 수 있는 추가적인 후속 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

난소를 절제한 후 5주가 경과되어 골다공증이 유도된 백서의 경골 부위에 임플란트를 매식하고 저출력 초음파가 골의 치유에 미치는 효과에 대해 알아보기 위해 실험군에 저출력 초음파를 매일 10분씩 주파수 3 MHz, 초음파 출력 40 mW/cm²를 14일간 조사하고, 매식 후 1주, 2주, 4주 및 8주에 백서를 희생 후 표본 제작을 하고 이에 대한 병리조직학적 관찰 및 OPG, RANKL의 발현에 대한 면역조직화학적 검사를 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 병리조직학적 분석을 통해 골다공증이 유도된 백서에서도 8주 이후 임플란트 주위의 골형성은 성공적으로 일어남을 확인하였다. 하지만 저출력 초음파를 적용한 경우 임플란트 계면의 골조직은 더 빠르게 성숙되었으며 광화가 우수하게 진행됨을 관찰하였다. 특히 임플란트 매식 후 1주, 2주에서 대조군에 비해 실험군에서 임플란트 주위 골기질과 collagen 형성 정도가 뛰어났으며 골내 혈관의 수 역시 대조군에 비해 실험군에서 많이 형성되었다.
2. 면역조직화학적 분석을 통해 OPG의 발현 정도를 관찰한 결과 대조군과 실험군 모두 OPG의 발현이 증가되었으며 매식 후 4주까지 OPG 발현 양상은 대조군에 비해 실험군에서 뚜렷하였다.
3. 면역조직화학적 분석을 통해 RANKL의 발현 정도를 관찰한 결과 실험군에서 임플란트 매식 후 1주와 2주에서 대조군에 비하여 유의성 있게 증가된 발현 양상을 보였다. 실험군과 대조군 모두 임플란트 매식 후 4주, 8주에는 동일하게 감소되었다.

이상의 결과를 종합하여 보면, 골다공증 유도 백서에 임플란트 식립 후 저출력 초음파를 적용하면 주위 골 반응에서 초기 골모세포 분화 형성이 촉진되고 골 개조에 관여하는 인자의 활성화가 증가되는 것이 관찰되어 저출력 초음파가 임플란트 초기 골 유착에 도움이 될 것으로 생각된다.

References

1. Lane JM, Russell L, Khan SN. Osteoporosis. Clin Orthop Relat Res 2000;372:139-150.
2. Siebzeiner MI. Consensus statement on prevention and treatment of osteoporosis. Isr Med Assoc J 2000;2:397-401.
3. Bagi CM, Mecham M, Weiss J, Miller SC. Comparative morphometric changes in rat cortical bone following ovariectomy and/or

Table 1. Osteoprotegerin expression after implantation

Periods after implantation (wk)	Control	Experimental group
1	+	+/++
2	+/++	++
4	+	+/++
8	+	+

-: no immunoreactivity, +: weak but visible staining, ++: moderate staining, +++: strong staining intensity

Young-Seob Hwang et al: Effect of low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on bone healing around a titanium implant in the tibia of osteoporosis-induced rats. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2011

Table 2. Receptor activator of nuclear factor kB ligand expression after implantation

Periods after implantation (wk)	Control	Experimental group
1	+	+/++
2	+/++	++
4	+	+
8	+	+

-: no immunoreactivity, +: weak but visible staining, ++: moderate staining, +++: strong staining intensity

Young-Seob Hwang et al: Effect of low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on bone healing around a titanium implant in the tibia of osteoporosis-induced rats. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2011

- immobilization. *Bone* 1993;14:877-883.
4. Croucher PI, Garrahan NJ, Compston JE. Structural mechanisms of trabecular bone loss in primary osteoporosis : specific disease mechanism or early aging? *Bone Miner* 1994;25:111-121.
5. Jiang G, Matsumoto H, Fujii A. Mandible bone loss in osteoporosis rats. *J Bone Miner Metab* 2003;21:388-395.
6. Cao T, Shirota T, Ohno K, Michi KI. Mineral bone loss in partially edentulous trabeculae of ovariectomized rabbit mandibles. *J Periodontal Res* 2004;39:37-41.
7. Yang J, Farnell D, Devlin H, Horner K, Graham J. The effect of ovariectomy on mandibular cortical thickness in the rat. *J Dent* 2005;33:123-129.
8. Dimitriou R, Babis GC. Biomaterial osseointegration Enhancement with biophysical stimulation. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2007;7:253-265.
9. Grassi S, Piattelli A, Ferrari DS, Figueiredo LC, Feres M, Iezzi G, *et al.* Histologic evaluation of human bone integration on machined and sandblasted acid-etched titanium surfaces in type IV bone. *J Oral Implantol* 2007;33:8-12.
10. Shibli JA, Grassi S, de Figueiredo LC, Feres M, Marcantonio E Jr, Iezzi G, *et al.* Influence of implant surface topography on early osseointegration: a histological study in human jaws. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007;80:377-385.
11. Li L, Zhu Z, Huang C, Chen W. Ultrasound: a potential technique to improve osseointegration of dental implants. *Med Hypotheses* 2008;71:568-571.
12. Takayama B, Suzuki N, Ikeda K, Shimada T, Suzuki A, Maeno M, *et al.* Low-intensity pulsed ultrasound stimulates osteogenic differentiation in ROS 17/2.8 cells. *Life Sci* 2007;80:965-971.
13. Buckley MJ, Banas AJ, Levin LG, Sumpio BE, Sato M, Jordan R, *et al.* Osteoblasts increase their rate of division and in response to cyclic, mechanical tension *in vitro*. *Bone Miner* 1988;4:225-236.
14. Harle J, Salih V, Mavia F, Knowles JC, Olsen I. Effects of ultrasound on the growth and function of bone and periodontal ligament cells *in vitro*. *Ultrasound Med Biol* 2001;27:579-586.
15. Saito M, Soshi S, Tanaka T, Fujii K. Intensity related differences in collagen post- translational modification in MC3T3-E1 osteoblasts after exposure to low- and high-intensity pulsed ultrasound. *Bone* 2004;35:644-655.
16. Lyon R, Liu XC, Meier J. The effects of therapeutic vs. high intensity ultrasound in the rabbit growth plate. *J orthop Res* 2003; 21:865-871.
17. Heckman JD, Ryaby JP, McCabe j, Frey JJ, Kilcoyne RF. Acceleration of tibial fracture-healing by non-invasive, low intensity pulsed ultrasound. *J Bone Joint Surg Am* 1994;76:26-34.
18. Kristiansen TK, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, Roe LR. Accelerated healing of distalradial fractures with the use if specific, low-intensity ultrasound. A multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Bone Joint Surg Am* 1997;79:961-973.
19. Leung KS, Lee WS, Tsui HF, Liu PP, Cheung WH. Complex tibial fracture outcomes following treatment with low intensity pulsed ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 2004;30:389-395.
20. Yang RS, Lin WL, Chen YZ, Tang CH, Huang TH, Lu BY, *et al.* Regulation by ultrasound treatment on the integrin expression and differentiation of osteoblasts. *Bone* 2005;36:276-283.
21. Yang KH, Parvizi J, Wang SJ, Lewallen DG, Kinnick RR, Greenleaf JF, *et al.* Exposure to low-intensity ultrasound increases aggrecan gene expression in a rat femur fracture model. *J Orthop Res* 1996;14:802-809.
22. Parvizi J, Parpura V, Greenleaf JF, Bolander ME. Calcium signaling is required for ultrasound-stimulated aggrecan synthesis by rat chondrocytes. *J Orthop Res* 2002;20:51-57.
23. Parvizi J, Wu CC, Lewallen DG, Greenleaf JF, Bolander. Low-intensity ultrasound stimulates proteoglycan synthesis in rat chondrocytes by increasing aggrecan gene expression. *J Orthop Res* 1999;17:488-94.
24. Naruse K, Mikuni-Takagaki Y, Azuma Y, Ito M, Oota T, Kameyama K, *et al.* Anabolic response of mouse bone marrow-derived stromal cell clone ST2 cells to low-intensity pulsed ultrasound. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;268:216-220.
25. Naruse K, Miyauchi A, Itoman M, Mikuni-Takagaki Y. Distinct anabolic response of osteoblast to low-intensity pulsed ultrasound. *J Bone Miner Res* 2003;18:360-369.
26. Wang SJ, Lewallen DG, Bolander ME, Chao EY, Ilstrup DM, Greenleaf JF. Low intensity ultrasound treatment increases strength in a rat femoral fracture model. *J Orthop Res* 1994;12: 40-47.
27. Diego Araujo DB, Eiji T, Toshihiro I, Oka H, Ohta A, Okada H, *et al.* Cementoblast response to low- and high- intensity ultrasound. *Archives of Oral Biology* 2008;53:318-323.
28. Ganne JM, Speculand B, Mayne KH, Goss AN. Inferential therapy to promote union of mandibular fractures. *Aust N Z J Surg* 199;49:81-83.
29. Kubota K, Yoshimura N, Yakota M, Fitzsimmons RJ, Wikesjö ME. Overview of effects of electrical stimulation on osteogenesis and alveolar bone. *J Periodontol* 1995;66:2-6.
30. Kanis JA. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO study group. *Osteoporosis Int* 1994;4:368-381.
31. Kanis JA, Melton LJ III, Christiansen C *et al.* The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1994;9:1137-1141.
32. Holahan CM, Koka S, Kennel KA, Weaver AL, Assad DA, Regennitter FJ, *et al.* Effect of osteoporotic status on the survival of titanium dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009;23:905-910.
33. Friberg B, Ekestubbe A, Mellstrom D, Sennerby L. Bränemark Implants and Osteoporosis. A Clinical Exploratory Study. *Clin Implant Dent Relat Res* 2001;3:50-56.
34. Robert WE, Simons KE, Garetto LP, DeCastro RA. Bone physiology and metabolism in dental implantology : Risk Factors for osteoporosis and other metabolic bone disease. *Implant Dent* 1992;1:11-21.
35. Erdogan O, Shafer DM, Taxel P, Freilich MA. A review of the association between osteoporosis and alveolar ridge augmentation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; 104:738.e1-13.
36. Machen MS, Tis JE, Inoue N, Meffert RH, Chao EY, McHale KA. The effect of low intensity pulsed ultrasound in regenerate bone in a less-than-rigid biomechanical environment. *Bio Med Mater and Eng* 2002;12:239-247.
37. Azuma Y, Ito M, Harada Y, Takagi H, Ohta T, Jingushi S. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on the various cellular reaction in the fracture callus. *J Bone Miner Res* 2001;16:671-680.
38. Doan N, Reher P, Meghji S, Harris M. *In vitro* effects of therapeutic ultrasound on cell proliferation, protein synthesis, and cytokine production by human fibroblasts, osteoblasts, and monocytes. *J Oral Maxillofac Surg* 1999;57:409-419.
39. Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyres S Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1:interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:49-60.
40. Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* 2001;79:243-253.
41. Hakeda Y, Kobayashi Y, Yamaguchi K, Yasuda H, Tsuda E, Higashio K, *et al.* Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) directly inhibits bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;251:796-801.
42. Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL:involvement in the orchestration of pathophysiologic bone remodeling. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2004;15:457-475.
43. Kim M-K, Chung I-K, Shin S-H, Kim C-H, Kim B-J, Kim J-H, Hwang Y-S, Jung E-G, Kim J-H, Kim U-K. Effect of Adipose-Derived Stem Cells on Bone Healing on Titanium Implant in Tibia of Diabetes Mellitus Induced Rats, *J Kor Assoc Oral Maxillofac Surg* 2010; 36:392-401