

Alendronate가 백서에서 두개골 결손의 재생에 미치는 영향

정찬두 · 김옥수 · 정현주

전남대학교 치과대학 치주과학교실 및 치의학연구소

I. 서론

치주질환은 치아지지 조직의 파괴를 일으키는 질환으로써 궁극적으로 치조골의 소실을 초래해 치아를 상실되게 한다. 이러한 질환의 진행을 막고, 소실된 조직의 재생을 위한 술식이 발전되어 왔고 치주조직의 재생을 돕기 위한 물질들이 최근에 많이 연구되고 있다.

골흡수 억제제인 bisphosphonate는 1980년대 초 개발되어 골흡수가 증가되는 Paget's disease, 골다공증 등과 같은 정형외과 영역의 임상 치료제로 사용되고 있고, 최근에는 치주영역의 동물실험에서도 치주질환으로 인한 치조골 흡수를 효과적으로 억제한다고 보고되었다¹⁻⁴⁾. Bisphosphonate는 현재 etidronate, risedronate, palmidronate, alendronate 등이 사용되고 있는데, 그 중 etidronate는 ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate의 구조로 형성된 pyrophosphate의 합성유도체로서 inorganic pyrophosphate와는 달리 효소적 가수분해에 저항력이 강해 반감기가 길어 골흡수성 질환 등의 치료에 많이 쓰이고 있다. *In vitro* 실험에서 etidronate는 수산화인회석(hydroxyapatite)의 결정체의 침전과 용해를 억제시키며, 골대사과정에서 골대사율(turnover rate)과 골흡수를 저하시키는 것으로 알려

져 있다. 그러나 etidronate는 장기간 투여시 골연화증이 발생하는 부작용이 관찰되어, 최근에는 골흡수 억제효과가 1000배 더 강력하고 골연화증과 같은 부작용도 없는 alendronate sodium(sodium-4-amino-1-hydroxybutylidene -1,1-bisphosphonate trihydrate)이 개발되었다.

골흡수 억제제전으로서 bisphosphonate는 유산(lactic acid)의 형성과 양자(proton) 축적을 억제하고⁵⁻⁷⁾ lysosomal enzyme의 활성도를 감소시키며⁸⁾ prostaglandin의 합성을 막고⁹⁾ 파골세포의 형태와 활성을 변화시킨다¹⁰⁾고 알려져 있는데, alendronate는 파골세포에 의한 골흡수를 억제¹¹⁻¹²⁾하는 동시에 조골세포에 직접적인 효과를 나타낸다고 보고되고 있다¹³⁾.

Alendronate의 조골세포에 대한 영향에 관한 연구로서, Tenenbaum 등¹⁴⁾은 저농도의 alendronate가 석회화 결절 형성을 증진시킨다고 하였고, Giuliani 등¹⁵⁾은 alendronate가 조골세포의 전구세포 형성을 촉진한다고 하였다. 김¹⁶⁾은 alendronate가 세포증식, 알칼리성 인산분해효소 활성 및 석회화 결절 형성을 증가시키는 효과를 지닌 것으로 보고하였다.

본 연구는 이러한 배경 하에 백서의 두개골 결손에서 alendronate를 투여 후 골재생이 증진되는지 알아보고자 시행되었다.

교신저자: 정현주, 광주광역시 동구 학1동 5번지 전남대학교 치과대학 치주과학교실, 우편번호: 501-757

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에 사용한 실험동물은 생후 6-8주, 체중 250-350g의 웅성 Sprague-Dawley 백서 48마리였으며, 대조군, 실험 I군, 실험 II군에 각 16마리를 배정하였고 이들을 8마리씩 3주와 6주에 희생하여 조직학적 관찰을 하였다. 실험군에서는 alendronate(MK-217[®], Merck, USA)를 두개골 결손 형성 직후와 3주 후에 복강내로 투여하였다.

2. 실험방법

1) 실험군 설정

두개골정 부위에 골결손 형성 후 복강 내로 생리식염수만 투여한 군을 대조군으로, 두개골 결손 형성 후 0.25 mg/kg의 alendronate를 투여한 군을 실험 I군으로, 1.25 mg/kg의 alendronate를 투여한 군을 실험 II군으로 설정하였다.

2) 두개골 결손부 형성

백서 체중 100g 기준으로 0.1ml의 염산 케타민(Ketalar[®], 유한양행)과 0.035ml의 염산 Xylazine(Rompun[®], 한국바이엘)을 혼합하여 복강내 주사하여 전신마취시키고 두부의 털을 깎은 후 요오드로 두개정 수술부위를 소독하였다. 전두골 앞쪽에서 후두골 후방부까지 정중부를 따라 절개하고 피부와 골막을 포함한 관막을 형성하여 두개골을 노출시킨 후, 두개골 정중양을 따라 round bur로 직경 8mm의 골결손을 형성한 후 봉합하였다. 술후 감염을 막기 위하여 엠피실린(엠피실린[®], 중근당) 50 mg을 복강내 주사하고 술후 1주 후 봉합사를 제거하였다.

3) 알칼리성 인산분해효소 활성 측정

술후 3주와 6주에 희생하기 전 헤파린(헤파린[®], 녹십자)이 묻은 주사기를 이용하여 백서의 심장에서 1 ml의 혈액을 채취하고, 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 96 microwell-plate에 혈청을 40 μ 씩 5군데에

분적하고 alkaline phosphatase buffer(ALP500[®], Sigma, USA) 50 μ 를 첨가한 1분과 2분 후 405 nm에서 p-NPP(p-nitrophenyl phosphate)의 비색반응을 측정하여 알칼리성 인산분해효소 활성을 산출하였다.

4) 조직학적 관찰

술후 3주와 6주 후에 백서를 희생하여 두개골을 적출하여 포르말린에 고정하고 10% 질산용액에서 5일간 탈회한 후 파라핀에 포매하였다. 포매된 표본에서 6 μ m 두께로 시상단면을 따라 절편을 만든 후 H-E 액으로 염색하여 광학현미경으로 골결손부의 신생 골조직의 형성 및 세포 양상을 관찰하였다.

5) 조직계측학적 관찰

Scion image analysis program(Scion corporation, USA)을 이용하여 골결손 변연으로부터 정중앙부를 향해 생성된 신생골의 거리와 신생골 형성 면적을 측정하였다.

3. 통계분석

알칼리성 인산분해효소 활성과 골결손 변연부에서 중앙부를 향해 생성된 신생골의 거리 및 면적에 대한 평균값과 표준편차 및 표준오차를 구하였고, 각 군간의 차이에 대한 유의성을 평가하기 위하여 일원 분산분석법(one way-ANOVA)와 Duncan grouping을 이용하여 신뢰도 95% 수준에서 검정하였다.

III. 결과

1. 알칼리성 인산분해효소의 활성

알칼리성 인산분해효소의 활성은 술후 3주에는 대조군이 가장 높았고, 실험 I군, II군 순으로 낮았으나 군간에 유의한 차이는 보이지 않았다. 6주 후에는 모든 군에서 효소활성이 3주 후에 비해 2-3배 정도 유의하게 증가하였고, 특히 대조군이나 실험 II군과 비교하여 실험 I군에서 약 1.7배 정도 유의하게 높았다 ($p < 0.05$). (Table 1, Fig. 1)

Table 1. Blood alkaline phosphatase activity in each group

period group	3 weeks	6 weeks
Control group	0,051±0,011	0,108±0,009 [§]
Group I	0,038±0,019	0,163±0,058 ^{*§}
Group II	0,036±0,022	0,097±0,023 [§]

Values are mean ± SD of alkaline phosphatase activity (U/L).

* : significantly different from the control group by Duncan's test at $p < 0.05$

§ : significantly different from 3 weeks by Duncan's test at $p < 0.05$

Control : with normal saline injection (n=6)

Group I : with 0,25 mg/kg alendronate (n=6)

Group II : with 1,25 mg/kg alendronate (n=6)

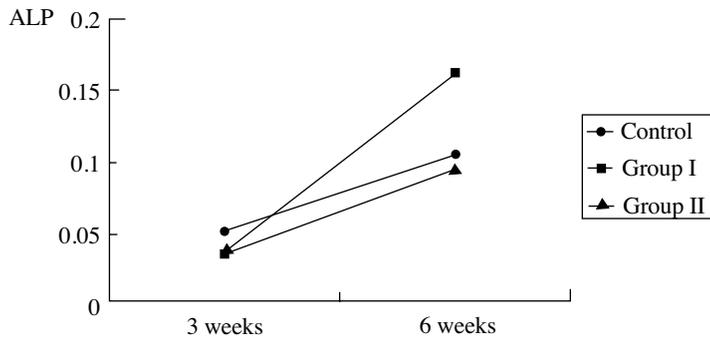


Figure 1. Blood alkaline phosphatase activity in group I, group II and control animals.(Control, with normal saline injection; Group I, with 0,25 mg/kg alendronate; Group II, with 1,25 mg/kg alendronate).

2. 조직학적 소견

1) 술후 3주

모든 군에서 골결손 변연부를 따라서 미성숙 골조직이 관찰되었고, 신생골 변연을 따라 정방형의 염색성이 현저한 조골세포가 정렬되어 있는 양상이 관찰되었다. 신생골은 실험 I군과 대조군에 비해 실험 II군에서 가장 성숙한 형태를 보였다(Fig. 2A,B, 3A,B, 4A,B). 대조군에서는 골결손의 중앙에 대부분 육아조직이 채워져 있었고, 실험 I군과 II군에서는 골결손 중앙부위에서도 미성숙 골조직이 관찰되었다(Fig. 2C, 3C, 4C).

2) 술후 6주

술후 6주에는 모든 군에서 골결손 변연부를 따라서 3주 후에 비해 더 증가된 신생골조직이 관찰되었

고, 특히 실험 I군과 II군에서는 골결손부 변연으로부터 중앙을 향하여 신생골의 형성이 활발하여 신생골소주간 연결양상을 보이고 있었다. 신생골조직 변연을 따라서 조골세포가 정렬되어 있으나 세포형태가 편평해지고 염색성이 감소하였다. 신생골조직은 좀 더 성숙되어 1차 골원모양이 자주 관찰되었고, 층판골의 형성이 실험 II군에서 많이 보였으며 실험 I군과 대조군에서도 관찰되었다(Fig. 5~7).

3. 조직계측학적 분석

조직계측학적 분석 결과 결손부 변연에서 신생골이 형성된 거리는 3주 후에 실험 I군과 II군에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 많은 골형성을 볼 수 있었다. 6주 후에는 실험 I군, 실험 II군, 대조군의 순서로 많은 골형성을 보였으나 통계학적으로 유의

Table 2. Linear and area histometrics for the amount of new bone deposition from the defect margin

group	3 weeks		6 weeks	
	linear	area	linear	area
Control group	1,698±0,316	1,603±0,276	4,295±0,976 [§]	5,345±0,773 [§]
Group I	3,414±0,223*	3,421±0,523*	4,956±0,058 [§]	5,847±0,698 [§]
Group II	2,984±0,166*	4,249±0,538*	4,337±0,897	4,586±0,732

Values are mean ± SE of bone deposition from the defect margin(mm in linear and mm² in area measurement).

* : significantly different from the control group by Duncan's test at p<(0,05

§ : significantly different from 3 weeks by Duncan's test at p<(0,05

Control : with normal saline injection (n=4)

Group I : with 0,25 mg/kg alendronate (n=4)

Group II : with 1,25 mg/kg alendronate (n=4)

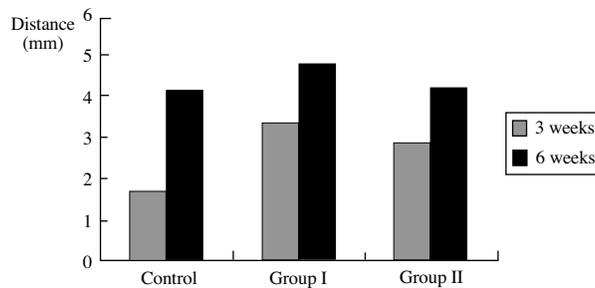


Figure 8. Comparison of the distance of new bone deposition from the defect margin(Control, with normal saline injection; group I, with 0,25 mg/kg alendronate; group II, with 1,25 mg/kg alendronate).

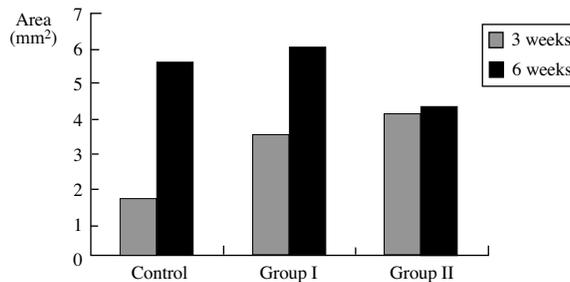


Figure 9. Area histometrics for the amount of bone deposition from the defect margin(Control, with normal saline injection; group I, with 0,25 mg/kg alendronate; group II, with 1,25 mg/kg alendronate).

한 차이를 나타내지는 않았다(Table 2, Fig. 8). 절단 면에서 관찰한 신생골 면적은 3주 후에 실험 II군, 실험 I군이 대조군에 비하여 유의하게 컸으며, 6주 후에는 실험 I군, 대조군, 실험 II군 순이었으나 그 차이

가 유의하지는 않았다(Table 2, Fig. 9). 대조군과 실험 I군에서는 술후 6주 후에 3주 후에 비하여 통계적으로 유의하게 많은 골형성을 보였으나, 실험 II군에서는 술후 3주와 6주 사이의 골형성량이 유사하였

다.(Table 2, Fig. 8, 9)

IV. 총괄 및 고찰

치주질환은 치아주위 조직의 파괴를 동반하여 결국은 치아의 상실로 이어지는 결과를 초래하게 된다. 이러한 치아의 상실을 막기 위해 치석제거술, 치근면활택술, 치주관막술 등과 같은 처치와 테트라사이클린과 같은 항생제 또는 숙주의 염증반응을 조절하기 위하여 prostaglandin, IL- β 등의 염증조직내의 화학물질 생성을 차단하는 비스테로이드성 소염제 등과 같은 약제를 이용한 처치법이 제안되고 있다. 뿐만 아니라 치주질환으로 이미 소실된 치조골과 치주인대 재생을 위하여 차폐막을 이용한 조직유도재 생술식이 개발되었으며, 그 외 여러 가지 골유도 혹은 골형성물질 등이 소개되었다. 최근에는 임프란트에 대한 관심이 증가하면서 임프란트 매식 전후 치조골의 치유에 도움을 줄 수 있는 물질에 대한 연구도 많이 이루어지고 있다.

Bisphosphonate는 초기의 골대사질환 치료제인 pyrophosphate와는 달리 화학적 및 효소에 의한 가수분해에 안정적인 P-C-P bond를 가지고 있어 가수분해에 저항성이 강하기 때문에 많이 이용되고 있다. 최근에 개발된 bisphosphonate 중 alendronate가 널리 이용되며, 이는 다른 bisphosphonate보다 골흡수 억제효과가 강력하고 부작용이 적은 것으로 알려져 있다.

Alendronate가 골소실에 미치는 영향에 관한 연구로서, Seedor 등¹¹⁾은 estrogen deficiency를 일으킨 백서에서 alendronate 투여시 골다공증에 의한 골소실이 약물 투여량에 비례하여 감소함을 보고하였고, Weinreb 등¹⁾은 원숭이의 실험적 치주염에서 alendronate가 0.05~0.25 mg/kg의 농도에서 치조골 소실을 감소시킴을 관찰하였다. 또한 Yaffe 등¹⁷⁻¹⁸⁾은 백서에서 치주관막 거상후 치조골 흡수에 대한 alendronate의 영향을 연구하여 0.5 mg/kg의 농도에서 치조골 흡수가 크게 감소한다고 보고하였다. Tenenbaum 등¹⁴⁾은 저농도의 alendronate가 석회화 결절 형성을 증진시킨다고 하였고, Giuliani 등¹⁵⁾은 alen-

dronate가 조골세포의 전구세포 형성을 촉진한다고 보고하였다. 국내에서는 김¹⁶⁾의 연구에서 alendronate가 세포증식, 알칼리성 인산분해효소 활성 및 석회화 결절 형성을 증가시킨다고 보고하였다.

이러한 배경 하에 본 연구는 alendronate의 투여가 골재생에 기여할 수 있는지 알아보고자 백서의 두개골에 골결손을 형성하고 alendronate 투여한 3주와 6주후에 골재생 양상을 관찰하게 되었다.

Alendronate는 흡수된 양의 1/2은 골조직으로 가고 나머지는 소변으로 배설되는데, 백서에서 alendronate의 골조직에 대한 반감기는 약 2-4주라고 알려져 있다.¹⁹⁾ 이에 근거하여 이번 실험에서 alendronate의 투여간격은 3주로 하였다. Alendronate 투여량에 대하여, Seedor 등¹¹⁾은 백서에서 0.056~7.0 mg/kg의 alendronate를 피하주사하였을 때 골소실이 억제됨을 보고하였고, Yaffe 등¹⁸⁾은 백서에서 alendronate를 정맥 내로 투여했을 때 0.05 mg/kg의 용량에서는 효과가 없었고 0.5 mg/kg에서 골흡수가 현저히 억제됨을 보고하였다. 본 실험에 사용된 alendronate는 이들의 보고에 근거하여 백서에서 골흡수 억제효과가 나타날 것으로 예상되는 0.25 mg/kg과 1.25 mg/kg의 용량을 사용하였다.

알칼리성 인산분해효소는 유기인산 에스테르를 가수분해하여 석회화가 이루어지는 부위에서 국소적으로 인산이온의 농도를 증가시키는 효소로, 세포외기질에 인산 칼슘을 침착시킴으로써 석회화를 유도하는데 기여한다²⁰⁻²²⁾. 이번 연구에서는 투여한 alendronate 용량과 투여 3-6주 후 혈중 알칼리성 인산분해효소의 활성도 간의 연관성을 알아보기 위해서 혈액내 알칼리성 인산분해효소 활성을 측정된 결과 술후 3주에서 대조군이 실험군보다 높은 경향을 보였으나 각 군간에 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다. 술후 6주에는 3주에 비해 모든 군에서 호소활성이 두 배 정도 높았으며, 실험 I군에서는 대조군이나 실험 II군과 비하여 알칼리성 인산분해효소의 활성이 약 1.7배 정도 높게 측정되었다. 이러한 결과는 예상된 바와 달랐는데 혈액을 이용해 측정함으로써 생체 내에서 알칼리성 인산분해효소 활성에 영향을 미치는 다른 전신적 인자 등이 고려되지 않

았기 때문으로 보인다. 따라서 이를 고려하여 골조직내 효소활성에 대한 분석이 이루어졌더라면 알칼리성 인산분해효소 활성과 골 치유과정 사이의 관계 규명이 가능했을 것으로 추정된다.

체내의 골조직은 성장 중이나 외상 후 신생골을 형성하게 된다. 이렇게 형성된 골조직은 골개조의 과정을 거치게 되는데, 그 기간은 백서에서 4-5주, 토끼에서 6주, 개가 12주 그리고 사람에서 17주 정도이다²³⁾. 본 실험에서는 이에 따라 백서에서 골결손 형성 후 3주와 6주후의 치유과정을 평가하게 되었다. 술 후 3주에는 모든 군에서 미성숙 골조직이 골결손 변연부에서 관찰되었고, 대조군에서는 골결손의 중앙부에 대부분 육아조직이 결손부에 채워진 양상으로 보였지만, 실험 I군과 II군에서는 골결손의 중앙부에서도 미성숙 골조직이 자주 관찰되었다. 술 후 6주에는 골결손주위 조골세포의 형태가 편평해지고 염색성이 감소한 것으로 미루어 세포활성이 감소된 것으로 보였다. 모든 군에서 골결손 변연부를 따라 더 많은 신생골조직이 관찰되었고, 신생골조직은 좀 더 성숙되어 1차 골원모양이 관찰되었다. 또한 실험 I군과 II군에서는 골결손부 변연에서부터 중앙을 향하여 신생골의 형성이 활발하여 신생골소주간 연결양상을 보이고 있었다.

조직계측학적 분석은 신생골조직의 형성량을 결손부 골변연에서부터 형성된 신생골의 거리와 면적을 측정함으로써 이루어졌는데, 골면적은 그 골의 두께와 잘라진 단면 각에 따라 오차가 있을 거라는 것을 고려하여 거리도 측정하게 되었다. 그 결과 측정치 간에 유의한 차이는 보이지 않았으나, 술 후 3주에 신생골면적을 측정한 결과 대조군, 실험 I군, 실험 II군 순으로 골형성이 증가하였으나, 과 신생골 성장거리는 대조군, 실험 II군, 실험 I군 순으로 증가하였다. 따라서 술 후 3주에는 실험 I군과 II군에서 대조군에 비교하여 통계적으로 유의하게 많은 양의 골형성이 관찰되었다. 술 후 6주에는 골면적과 거리 모두에서 실험 I군에서 실험 II군과 대조군보다 골형성이 많은 경향을 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었고, 대조군과 실험 I군에서는 3주에 비해 골형성이 유의하게 증가하였다.

이상의 연구로부터 백서에서 0.25 mg/kg과 1.25 mg/kg 용량의 alendronate 투여시 골형성이 후기에는 군간에 큰 차이를 보이지 않았으나, 술 후 초기에 alendronate 투여군에서 대조군에 비해 골형성이 증가되었다. 이러한 결과는 alendronate를 골다공증 환자에 투여시 치주치료와 골재생 치료, 발치 후 치조골의 흡수를 억제하고, 임프란트 매식 후 치조골의 흡수 억제 및 초기의 골형성을 촉진하는데 alendronate가 이용될 수 있을 것을 시사한다. 이를 위하여 향후 치조골 재생에 기여하는 alendronate의 적정 용량과 창상부의 억제농도, 적용방법 등에 대한 연구가 필요할 것으로 보인다.

V. 결론

백서에서 두개골 결손을 형성한 후, alendronate 0.25 mg/kg(실험 I군) 및 1.25 mg/kg(실험 II군)를 복강내 투여하고 3주와 6주 후 혈중 알칼리성 인산분해효소 활성도를 측정하였고 희생 후 조직학적 관찰 및 골형성에 대한 조직계측학적 분석을 통하여 다음의 결과를 얻었다.

1. 알칼리성 인산분해효소의 활성은 술 후 3주에 세 군이 모두 유사하였으나, 6주에는 모든 군의 경우 활성이 3주 후보다 2-3배 이상 증가하였고, 특히 실험 I군이 다른 군에 비해 약 1.7배 높았다.
2. 조직학적 관찰 결과 술 후 3주에서는 모든 군에서 미성숙 골조직이 골결손 변연부에서 관찰되었고, 술 후 6주에서는 모든 군에서 골결손 변연부를 따라서 더 많은 신생골조직이 관찰되고, 신생골조직은 좀 더 성숙되어 1차 골원모양이 자주 관찰되었고, 층판골의 형성이 실험 II군에서 가장 두드러졌다.
3. 조직계측학적 분석 결과 술 후 3주에는 실험군에서 대조군에 비교하여 통계적으로 유의하게 많은 골형성이 관찰되었고, 6주 후에는 실험군과 대조군의 골형성이 양이 유사하였고, 대조군과 실험 I군에서는 3주 후에 비해 6주 후에 유의

하게 많은 골형성을 보였다.

이상의 연구로부터 백서에서 alendronate 투여시 골조직의 형성이 신속히 이루어짐을 관찰하였고, 이를 골재생에 이용할 수 있음을 시사하였다.

VI. 참고문헌

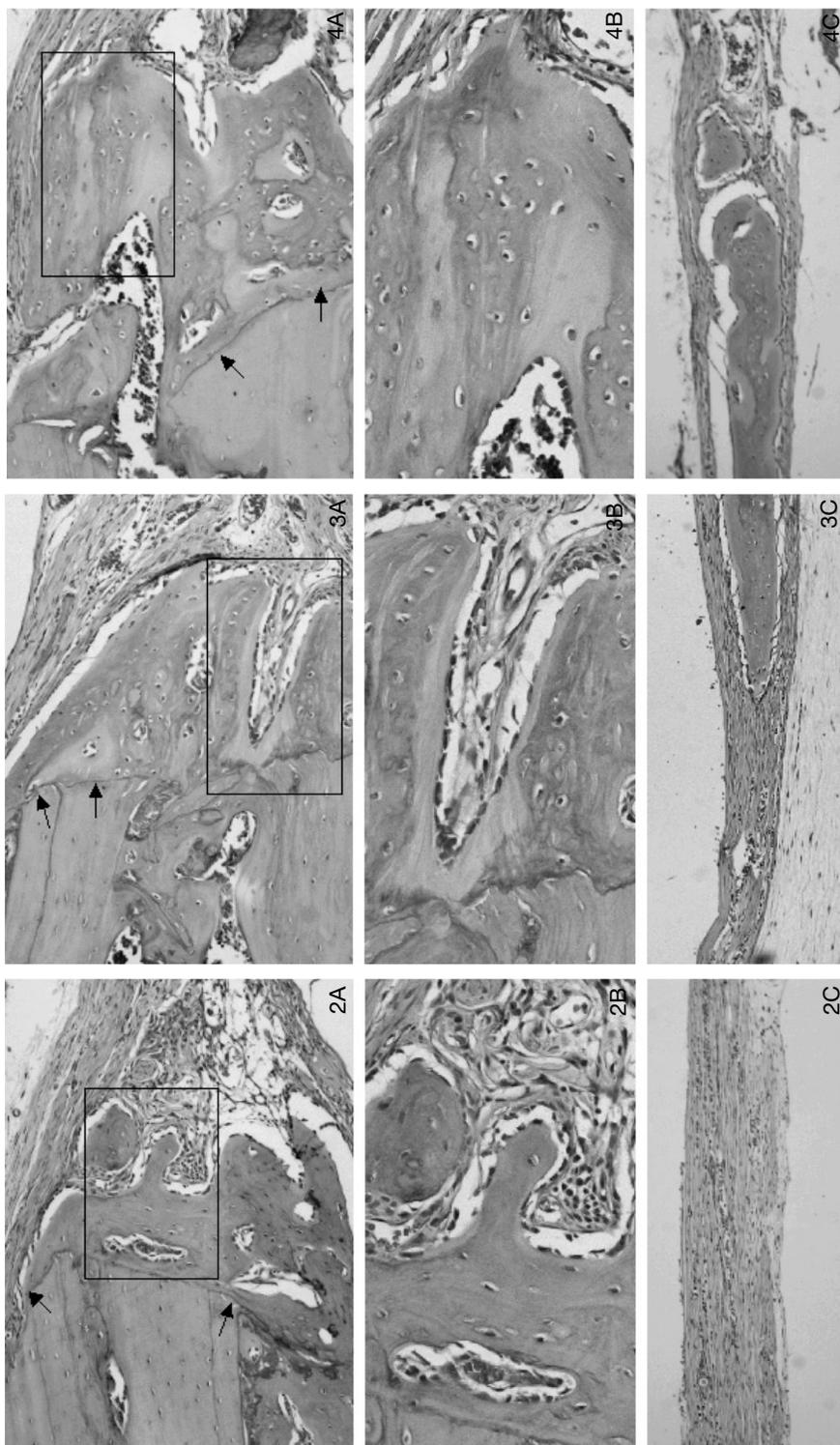
1. Weinreb M, Quartuccio H, Seedor JG, Aufdemorte TB, Brunsvold M, Chaves E, Kornman KS, Rodan GA. Histomorphometrical analysis of the effects of the bisphosphonate alendronate on bone loss caused by experimental periodontitis in monkeys. *J Periodont Res* 29: 35-40, 1994.
2. Reddy MS, Weatherford TW, Anne Smith C, West BD, Jeffcoat MK, Jacks TM. Alendronate treatment of naturally-occurring periodontitis in Beagle dogs. *J Periodontol* 66: 211-217, 1995.
3. Shoji K, Hourichi H, Shinoda H. Inhibitory effects of a bisphosphonate(risedronate) on experimental periodontitis in rats. *J Periodont Res* 30: 277-284, 1995.
4. Brunsvold MA, Chaves ES, Kornman KS, Aufdemorte TB, Wood R. Effects of a bisphosphonate on experimental periodontitis in monkeys. *J Periodontol* 63: 825-830, 1992.
5. Fast DK, Felix R, Dowse C, Newman WF, Fleisch H. The effects of diphosphonates on the growth and glycolysis of connective-tissue cells in culture. *Biochem J* 172: 97-107, 1978.
6. Shinoda H, Adamek G, Felix R, Fleisch H, Schenk R, Hagan P. Structure-activity relationship of various bisphosphonates. *Calcif Tissue Int* 35: 87-99, 1983.
7. Carano A, Teitelbaum SL, Konsek JD, Schlesinger PH, Blair HC. Bisphosphonates directly inhibit the bone resorption activity of isolated avian osteoclast in vitro. *J Clin Invest* 85: 456-461, 1990.
8. Felix R, Russell RGG, Fleisch H. The effect of several diphosphonates on acid phosphohydrolases and other lysosomal enzymes. *Biochem Biophys Acta* 429: 429-438, 1976.
9. Felix R, Bettex JD, Fleisch H. Effect of diphosphonates on the synthesis of prostaglandins in cultured calvaria cells. *Calcif Tissue Int* 33: 549-552, 1981.
10. Igarashi K, Mitani H, Adachi H, Shinoda H. Anchorage and retention effects of bisphosphonate(AHBUbP) on tooth movements in rats. *Am J Orthod* 106: 279-289, 1994.
11. Seedor GJ, Quartuccio HA, Thompson DD. The bisphosphate alendronate(MK-217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. *J Bone Mineral Res* 6: 1991.
12. Breuil V, Cosman F, Stein L, Horbert W, Nieves J, Shen V, Lindsay R, Dempster DW. Human osteoclast formation and activity in vitro: Effect of Alendronate. *J Bone Mineral Res* 13: 1721-1729, 1998.
13. Garcia-Moreno C, Serrano S, Nacher M, Farre M, Diez A, Marinoso ML, Carbonell J, Mellibovsky L, Nogues X, Ballester J, Aubia J. Effect of alendronate on cultured normal human osteoblasts. *Bone* 22: 233-239, 1998.
14. Tenenbaum HC, Torontali M, Sukhu B. Effects of bisphosphonates and inorganic pyrophosphate on osteogenesis in vitro. *Bone* 13: 249-255, 1992.
15. Giuliani N, Pedrazzoni M, Negri G, Passeri G, Impicciatore M, Girasole G. Bisphosphonates stimulate formation of osteoblast precursors and mineralized nodules in murine and human bone marrow cultures in vitro and promote early osteoblastogenesis in young and aged mice in vivo. *Bone* 22: 455-461, 1998.
16. 김은영. Bisphosphonate가 배양된 치주인대세포의 조골작용에 미치는 효과. PhD. Thesis. Chon-

- nam National University 2000.
17. Yaffe A, Iztzkovich M, Earon Y, Alt I, Lilov R, Binderman I. Local delivery of an amino bisphosphate prevents the resorptive phase of alveolar bone following mucoperiosteal flap surgery in rats. *J Periodontol* 68: 884-889, 1997.
 18. Yaffe A, Fine N, Alt I, Binderman I. The effect of bisphosphonate on alveolar bone resorption following mucoperiosteal flap surgery in the mandible of rats. *J Periodontol* 66: 999-1003, 1995.
 19. Lin JH, Duggan DE, Chen IW, Ellsworth RL. Physiological disposition of alendronate, a potent anti-osteolytic bisphosphonate, in laboratory animals. *Merck Sharp & Dohme Res Lab* 19: 403-409, 1991.
 20. Beertsen W, Van den Bos T. Calcification of dentinal collagen by cultured rabbit periosteum: The role of alkaline phosphatase. *Matrix* 9: 159-171, 1989.
 21. Anderson HC. Mechanism of mineral formation in bone. *Lab Invest* 60: 320-330, 1989.
 22. Bellows CG, Aubin JE, Heershe JNM. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: The role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone Mineral* 14: 27-40, 1991.
 23. Roberts WE, Turley PK, Breniak N, Fielder PJ. Bone physiology and metabolism. *J Calif Dent Assoc* 15: 54-61, 1987.

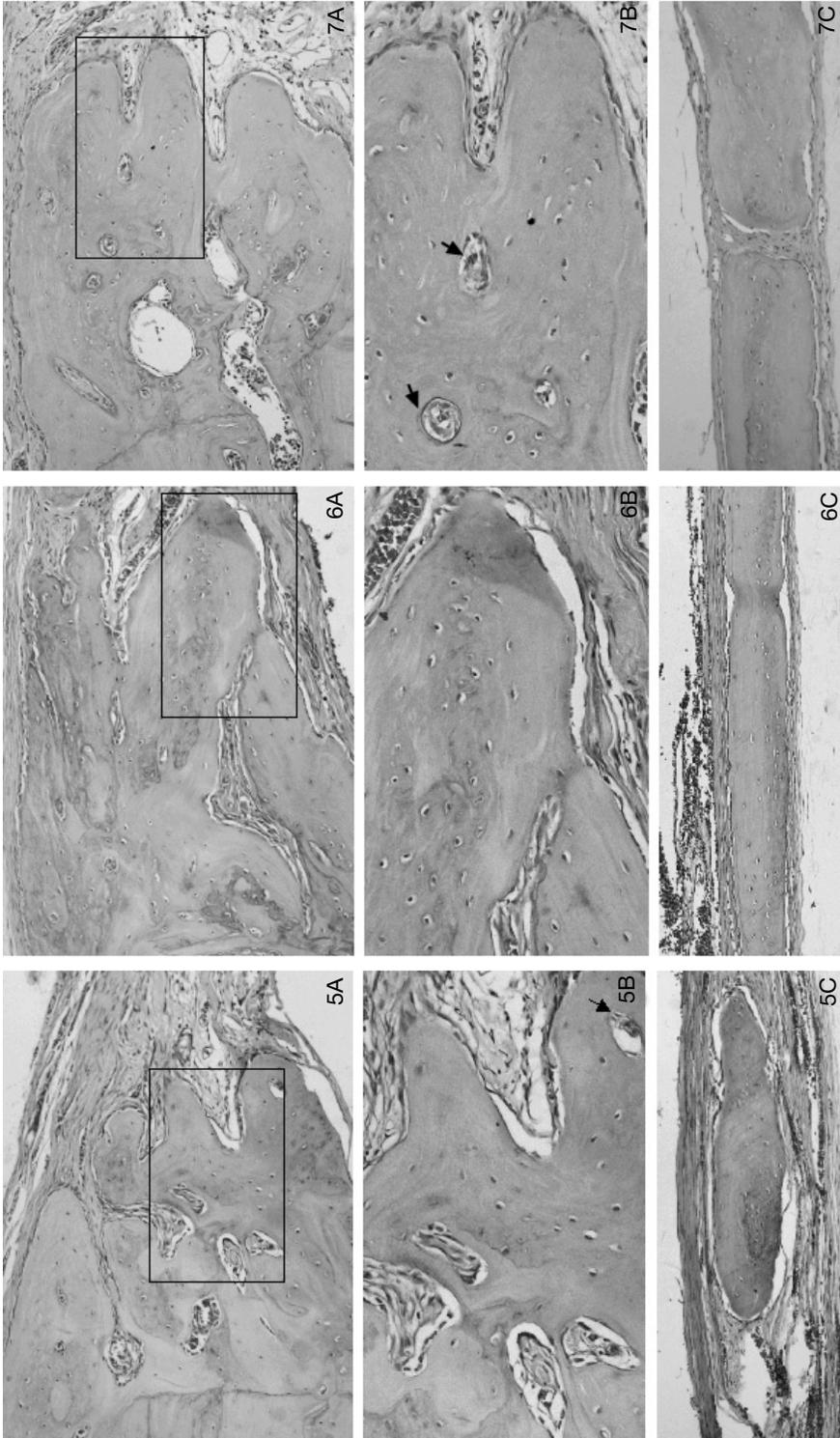
사진부도 설명

- Figure 2 Micrograph of bone regeneration at 3 weeks on control groups. A: Osteoblasts rimming are observed and minimal amount of new bone formation is shown, (Arrows indicate original border of defect, H-E stain X100). B: Osteoid tissues are seen, and osteoblasts rimming are observed(H-E stain X200). C: Granulation tissues are seen, and no bone formation in the central portion of defect(H-E stain X100).
- Figure 3 Micrograph of bone regeneration at 3 weeks on 0.25 mg/kg alendronate group. A: Osteoblasts rimming are observed and new bone formation is observed(Arrows indicate original border of defect, H-E stain X100). B: Osteoid tissues are seen, and osteoblasts rimming are observed(H-E stain X200). C: Osteoblasts rimming and new bone formation is observed in the central portion of defect(H-E stain X100).
- Figure 4 Micrograph of bone regeneration at 3 weeks on 1.25 mg/kg alendronate group. A: Osteoblasts rimming are observed and new bone formation is observed(Arrows indicate original border of defect, H-E stain X100). B: Osteoid tissues are seen, and osteoblasts rimming are observed(H-E stain X200). C: Osteoblasts rimming and new bone formation is observed in the central portion of defect(H-E stain X100).
- Figure 5 Micrograph of bone regeneration at 6 weeks on control groups. A: Osteoblasts rimming are observed and new bone formation is observed(H-E stain X100). B: Osteoblasts rimming are observed but the cells become flat(Arrows indicate primary osteon, H-E stain X200). C: Defect is filled with fibrous connective tissue with bone formation in the central portion of defect(H-E stain X100).
- Figure 6 Micrograph of bone regeneration at 6 weeks on 0.25 mg/kg alendronate group. A: Osteoblasts rimming are observed and new bone formation is observed(H-E stain X100). B: Osteoblasts rimming are observed but the cells become flat(H-E stain X200). C: The defect is almost closed with new bone, but new bone is thinner than original bone in the central portion of defect(H-E stain X100).
- Figure 7 Micrograph of bone regeneration at 6 weeks on 1.25 mg/kg alendronate group. A: Osteoblasts rimming are observed and new bone formation is observed(H-E stain X100). B: Osteoblasts rimming are observed but the cells become flat(Arrows indicate primary osteon, H-E stain X200). C: The defect is almost closed with new bone, but new bone is thinner than original bone in the central portion of defect(H-E stain X100).

사진부도 (I)



사진부도 (II)



Effect of Alendronate on Bone Regeneration in Defect of Rat Calvaria

Chan-Doo Jeong, Ok-Su Kim, Hyun-Ju Chung

Department of Periodontology, College of Dentistry
and Dental Science Research Institute, Chonnam National University

Previous studies have demonstrated an increase in bone mass and density with the use of bisphosphonate in osteoporosis. This agent acts as an inhibitor of osteoclastic activity, and results in increase of net osteoblastic activity. Currently, it has been reported that bisphosphonate has direct effect on osteoblast.

This study was designed to evaluate the effect of alendronate on bone regeneration in defect of rat calvaria. The animals used for these experiments were 48 male rats, over 6-8 weeks old. They were divided into three groups according to the dose of alendronate(MK-217[®], Merck, USA) administered. After the calvarial defects were surgically created, the rats received a peritoneal alendronate(0.25mg/kg) in group I, a peritoneal alendronate(1.25mg/kg) in group II, and a peritoneal normal saline injection in the control group. Three and six weeks later, blood was sampled and evaluated for alkaline phosphatase activity. The animals were sacrificed for histological observation and histometric analysis of the level of bone formation.

The alkaline phosphatase activity was similar in three groups at 3 weeks of experiment. The activity at 6 weeks increased more than twice, compared to 3 weeks, and was slightly higher in group I than the other two groups.

In histological observation, all the groups at 3 weeks, osteoblast rimming and new bone formation were observed along the defect margin. At 6 weeks, the defect was almost closed with new and more mature bone, but new bone is thinner than original bone in the central portion of defect.

In histometric analysis, group I and II at 3 weeks showed significantly greater new bone formation than the control, and all the groups at 6 weeks showed similar amount of bone formation.

These result suggest that alendronate administration in the dose of 0.25mg/kg and 1.25mg/kg promote osseous regeneration.