

백서모델에서 장기간 파미드로네이트 투여가 골 강도와 골절 치유에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 영동세브란스병원 정형외과, 한림제약 중앙연구소¹

양규현 · 박희완 · 원정훈 · 유제현 · 류종현¹ · 추교석¹ · 김재신¹

- Abstract -

Effect of the Long-term Administration of Pamidronate on Bone Strength and Fracture Healing in a Rat Model

Kyu Hyun Yang, Hui Wan Park, Jung Hoon Won, Je Hyun Yoo, Jong Hyeon Ryu¹,
Kyo Seok Choo¹, Jae Shin Kim¹

Department of Orthopaedic Surgery, Youngdong Severance Hospital, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea; ¹Central Research Institute, Hanlim Pharmaceutical Co., Ltd., Korea

Background: Increased bone mineral density and reduced fracture incidences have been achieved by using bisphosphonates in osteoporosis and osteogenesis imperfecta. However, they cannot eliminate fracture episodes completely. Therefore, it is important to determine whether the long-term administration of strong antiresorptive agents compromises bone strength and the fracture healing procedure. So, We investigated the effects of the long-term administration of pamidronate on long bone strength and fracture healing in rat osteoporosis model.

Methods: We performed bilateral ovariectomy in sixty-six Sprague-Dawley female rats, average age is 3-month-old. Three months after ovariectomy, animals were randomized into two groups (n=33). Disodium pamidronate (0.5 mg/kg) was injected every month for 6 months in the treated group, and physiologic saline was administered in the control group. After the six-month administration periods, the left femoral shaft was fractured by the Bonnarens and Einhorn technique after intramedullary nailing with 1.14 mm nonthreaded K-wire. Five weeks after fracture, rats were euthanized and both femurs were removed. We checked the mechanical properties of normal (right) and fractured (left) femurs and the bone mineral density of the right femoral head. Pamidronate concentration in bone was checked by high-performance liquid chromatography.

Results: The maximum strength of right femora was 154.4 ± 17.5 N in the pamidronate-treated group and 129.7 ± 28.0 N in the control group ($p=0.0002$), and stiffness was 452.5 ± 122.8 N/mm in the pamidronate-treated group and 378.6 ± 126.2 N/mm in the control group ($p=0.036$). Maximum strength of the callus was $22.7 \pm 7.2\%$ compared to right femur in the pamidronate-treated group and $29.7 \pm 13.5\%$ in the control group ($p=0.025$). The mean bone mineral density of the right femoral head was 230 ± 9 mg/cm² in pamidronate-treated group and 219 ± 13 mg/cm² in the control group ($p=0.0007$). The mean pamidronate concentration in bone was 62.3 ± 15.2 ng/mg. A tendency toward a negative

책임저자: 양규현, 135-720 서울특별시 강남구 도곡동 146-92, 연세대학교 의과대학 영동세브란스병원 정형외과학교실
Tel: (82) 2-3497-3414, Fax: (82) 2-573-5393, e-mail: kyang@yumc.yonsei.ac.kr

relationship between pamidronate concentration and the maximum strength of the femur normalized by animal body weight was observed, but this was not statistically significant ($p=0.067$).

Conclusion: Pamidronate effectively protects the femur from bone resorption and preserves strength and stiffness after ovariectomy. However, fracture healing was impaired during the early stage of healing after long-term administration of pamidronate.

Key Words: Pamidronate, Osteoporosis, Fracture healing

서 론

비스포스포네이트 (bisphosphonate)는 강한 골흡수 억제제로 파골세포의 동원과 활성을 억제시키고 수명을 단축시킨다. 이 약제는 골다공증, 골의 파제트 병과 골 형성 부전증을 치료하는 데 이용되고 있다. 더구나 이 병들은 비스포스포네이트의 장기간 투여를 필요로 한다¹⁻³. 비스포스포네이트는 수산화인회석에 강한 친화력을 보이고 골에 결합된 후에는 골내 반감기는 매우 길다. 비스포스포네이트는 파골세포 매개의 정상 및 비정상 골 재형성을 억제시키기 때문에 미세구조적 결손의 축적과 회복 과정의 저하로 인한 골 약화가 의심된다^{2,4,5}.

골다공증과 골 형성 부전증에서 비스포스포네이트의 사용으로 골밀도의 증가와 골절 빈도의 감소가 이루어져 왔지만 골절 자체를 완전히 방지할 수는 없었다^{1,3}. 그러므로, 강한 골흡수 억제제의 장기간 투여가 골 강도와 골절 치유 과정을 저하시키는 지를 결정하는 것이 중요하다. 그러나 골절 전에 장기간 투여된 비스포스포네이트 (클로드로네이트)의 골절 치유에 대한 영향에 관한 동물 실험연구는 단 1례만이 보고되고 있다⁶. 파미드로네이트는 아미노 그룹을 포함하고 있는 2세대 비스포스포네이트로 그 반감기는 약 90에서 140일이다^{2,4}. 본 저자들은 백서 골다공증 모델에서 파미드로네이트의 장기간 투여가 장관골 강도와 골절 치유에 대한 영향을 알아보고자 본 동물 실험을 시행하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

3개월된 암컷으로 체중 350 g 내외의 성숙 흰쥐

(Sprague-Dawley) 66마리를 이용하였으며, 배측 접근으로 양측성 난소 적출술을 시행하였고^{7,8}, 3개월 후에 임의로 실험군 및 대조군으로 각각 33마리씩 나눴다.

2. 연구 방법

1) 실험 원안

실험군에서는 6개월 동안 매일 파미드로네이트 (0.5 mg/kg)를 복막내 투여를 하였고, 대조군에서는 생리 식염수를 투여하였다. 6개월의 투여기간 후에 좌측 대퇴골 간부를 Bonnarens과 Einhorn⁹에 의한 도수 골절방법으로 골절시켰다. 내측 슬개건주위 접근법으로 과간절흔으로부터 대퇴골 골수강내로 1.14 mm의 nonthreaded K-wire를 삽입하였다. 골절은 대퇴골 중간 간부에서 이루어졌으며, 이 부위에서의 단순 골절을 전 후면 및 측면 단순 방사선 사진에서 확인하였다. 분쇄상 골절, 골간단부 골절과 30도 이상의 사선 골절은 제외하였다. 이 때부터 파미드로네이트와 식염수의 투여를 중지하였다. 골절 후 5주째, 에테르로 백서들을 안락사시키고 양측 대퇴골을 제거하였다. 골막과 연가골을 제외한 모든 연부 조직들을 제거하였다. 좌측 대퇴골 골절 가골의 최대 직경 (Dmax)과 최소 직경 (Dmin)을 활주 캘리퍼스로서 측정하였다. 가골크기는 그 단면이 타원형이라는 가정하에 계산되었다 ($\pi \times D_{max} \times D_{min} / 4$)⁶. 양측 대퇴골은 식염수로 적신 거즈로 싸서 연구가 끝날 때까지 영하 20도에서 보관하였다. 일반적으로 생후 3개월된 쥐에서는 골절 치유실험을 골절 후 3주에 시행하나 본 실험과 같이 파미드로네이트의 장기 투여에 따라 노화된 쥐에서는 5~10주 사이에 골절 치유실험을 실시하는데, 본 실험에서는 골내 파미드로네이트의 농도가 높을 것으로 추측된 초기에 모든 실험을 실시하였다.

2) 생역학적 검사 (biomechanical testing)

동결된 대퇴골을 검사 전 2시간 동안 해동시킨 후, 정상 (우측) 및 골절된 (좌측) 대퇴골의 역학적 성향을 삼중점 굴곡 과정을 통해 분석하였다^{7,10-13}. 골절된 좌측 대퇴골의 과간절흔에서 골수강내 K-강선을 제거한 후 골절부위의 불유합이 있는 경우는 제외시켰다. 본 검사는 역학 검사기계 (Instron model 6022, Instron Co., Massachusetts, U.S.A.)를 이용하였으며, 부하와 편향도를 기록하였고 최대 하중과 강성을 부하 편향도 곡선을 통해 계산하였다. 우측의 정상 대퇴골의 강도를 비교하기 위해 측정된 최대 하중과 강성을 체중으로 표준화하였고, 골절된 좌측 대퇴골의 치유과정을 비교하기 위해 측정된 최대 하중과 강성을 각각의 정상 우측 대퇴골에서 측정된 최대 하중과 강성으로 나누었다. 좌측 대퇴골에 대한 수치는 각각의 우측 대퇴골의 역학적 강도에 대한 백분율로 표시하였다¹⁰.

3) 골밀도 (bone mineral density)

우측 대퇴골두에 대한 골밀도는 생역학적 검사 후 이중에너지 방사선 흡수 계측기 (QDR-2000, Hologic Co, Waltham, MA, U.S.A.)를 통해 측정하였다. 우측 대퇴골은 파미드로네이트 골내 농도 측정을 위해 검사 후 즉시 영하 20도에서 동결시켰다.

4) Pre-column derivatization, high-performance liquid chromatography (HPLC)를 이용한 백서 대퇴골에서의 파미드로네이트 농도 측정^{14,15}

(1) 표준 용액 (standard solutions)

파미드로네이트 (pamidronate disodium)와 internal standard (IS, pentamethylene-1,1-bis-phosphonate monosodium salt, BFI 8739, Gador S.A., Buenos Aires, Argentina)를 물에 용해하여 각각 50 µg/ml와 200 µg/ml의 농도로 만들었다. 이 용액을 4도에 보관하고 원액으로 사용하였다. 이 원액을 필요한 농도로 희석하여 polypropylene tube에 표준 용액으로 준비하였다.

(2) 크로마토그래피의 구성

HPLC 체계는 PU-980 (JASCO, Tokyo, Japan) 직렬 펌프 (series pump), AS-950 (JASCO, Tokyo, Japan) 자동채취기 (autosampler), FP-920 (JASCO, Tokyo, Japan) 형광 탐색기 (fluorescence detector), 그리고 PLRP-S column (15×0.46 cm I.D., Phenomenex, Torrance, CA, USA)으로 구성되었다. 자료 수집과 분석은 Millen-

nium 32 소프트웨어 (Waters, Milford, MA, USA)를 이용하였다.

(3) 표본 추출 (sample extraction)

12.5 mg에 해당하는 우측 대퇴골 표본을 250 µm 이하의 분말가루로 만든 후 0.2M HCl 1 ml에 용해시키고 IS 용액 50 µl을 각 표본에 추가하였다. 실온에서 하룻밤 보온시킨 뒤 원심분리를 시행하였다. 골 3.13 mg에 해당하는 250 µl에, pamidronate disodium과 calcium phosphate를 침전시키기 위해 0.01 M NaOH 0.5 ml와 10 M NaOH 25 µl를 추가하였다. 원심분리 (1000 g, 10 min)를 통해 침전물을 분리한 후 아민을 포함한 화합물을 제거하기 위해 0.5 ml의 물로 세척하였다. 또 한번의 원심분리를 통해 상청액을 제거하고 칼슘염 (calcium salt)을 0.2 M phosphoric acid 300 µl에 용해시켰다. 이어 칼슘을 제거하기 위해 0.2 M EDTA 375 µl와 AG 50W-X8 (K+/-form) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Canada) 300 µl를 추가하였다. 원심분리 후 부분 표본 550 µl를 0.45 µm 막으로 여과시키고 10 M NaOH 8 µl로 알칼리화하였다. 1 M Carbonate buffer (pH 10.7) 120 µl와 1 mg/ml 2, 3-naphthalene dicarboxylaldehyde (Aldrich, Milwaukee, WI, USA) 24 µl 및 1 mg/ml N-acetyl-D-penicillamine (Fluka Biochemika, Ronkonkooma, NY, USA) 24 µl를 각 준비된 표본의 일정량인 120 µl에 추가함으로써 파미드로네이트 (pamidronate disodium)를 유도할 수 있었다. 그리고 나서 2분간 보온 후 100 µl만을 HPLC column에 사용하였다. 각 표본들은 분석 전에 정확히 동시에 유도하였다.

(4) 표준화 곡선 (calibration curves)의 작성

표준화 곡선은 HPLC column에 투여된 표준 용액의 농도 대 최고 영역을 도면화하여 작성되었고, 표본의 농도는 표준화 곡선을 사용한 Millennium 32 소프트웨어를 이용하여 계산할 수 있었다.

5) 통계학적 분석

모든 결과는 평균±표준 편차로 표시하였다. 실험군과 대조군의 차이는 unpaired two-tailed t test를 이용하여 분석하였고, 통계적 유의수준은 p 값이 0.05 이하인 경우로 하였다. 파미드로네이트의 골 농도와 우측 대퇴골 강도의 관계를 알아보기 위해 단순 선형 회귀분석 (simple linear regression analysis)은 이용하였고, 역시 통계적 유의수준은 p 값이 0.05 이하인

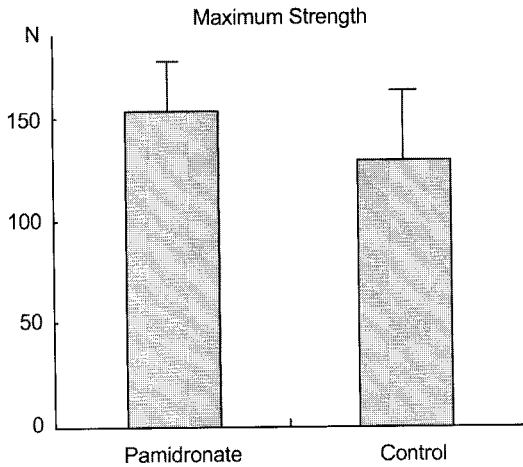


Figure 1. Maximum strength of intact femur. Maximum strength was normalized by animal body weight. The bar indicates one standard deviation. Pamidronate effectively protects the femur after ovariectomy ($p=0.0002$).

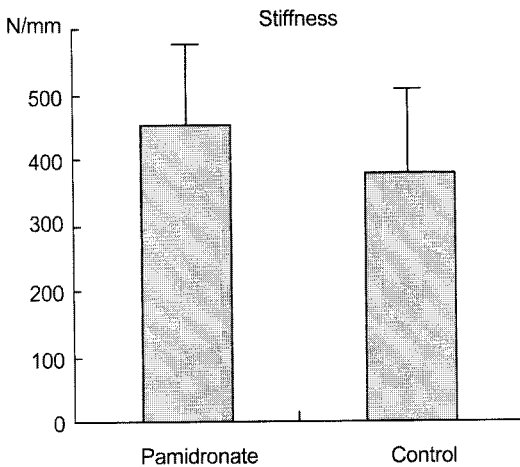


Figure 2. Stiffness of intact femur. Stiffness was normalized by animal body weight. The bar indicates one standard deviation. Pamidronate effectively protects the femur after ovariectomy ($p=0.036$).

경우로 하였다. 통계학적 분석은 SAS 8.02 version (SAS Institute Inc. North Carolina, U.S.A.)을 이용하였다.

결 과

1. 골절 모형

각각 실험군과 대조군에서 좌측 대퇴골 간부 골

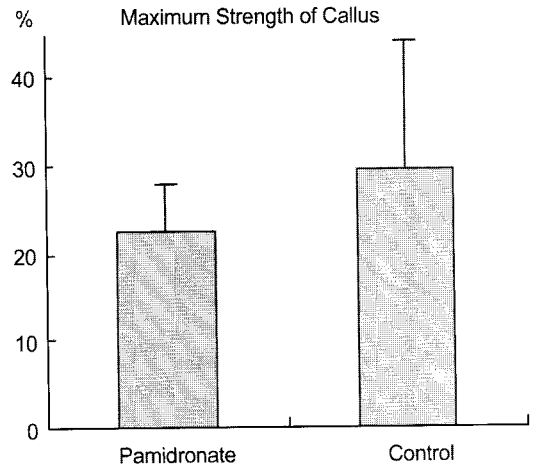


Figure 3. Maximum strength of left femoral callus (as % of intact contralateral right femur). The bar indicates one standard deviation. Early fracture healing was impaired in the pamidronate-treated group ($p=0.025$).

절이 분쇄상인 2마리와 5마리는 제외시켰고, 생역학적 검사시 각 군에서 2개의 좌측 대퇴골 골절부위에 불유합 소견을 보여서 결국 실험군과 대조군에서 각각 29쌍과 26쌍의 대퇴골만을 계속 실험할 수 있었다.

2. 생역학적 검사

1) 우측 정상 대퇴골

체중으로 표준화된⁷⁾ 최대 강도는 실험군에서 154.4 ± 17.5 N, 대조군에서는 129.7 ± 28.0 N였으며 ($p=0.0002$) (Figure 1), 강성은 실험군에서 452.5 ± 122.8 N/mm, 대조군에서는 378.6 ± 126.2 N/mm였다 ($p=0.036$) (Figure 2). 정상 대퇴골에서 표준화된 최대 강도와 강성은 대조군보다 실험군에서 유의하게 높게 나왔다.

2) 좌측 대퇴골 골절 가골의 평가

골절 가골 크기 (단면적)는 실험군에서 30.1 ± 6.5 mm², 대조군에서 30.6 ± 6.7 mm²였으며 ($p=0.77$), 우측 정상 대퇴골에 비교하여 측정된 가골의 최대 강도는 실험군에서 $22.7 \pm 7.2\%$, 대조군에서 $29.7 \pm 13.5\%$ 였고 ($p=0.025$) (Figure 3), 가골의 강성은 실험군에서 $14.8 \pm 5.9\%$, 대조군에서 $17.8 \pm 11.4\%$ 였다 ($p=0.247$). 골절 치유는 실험군에서 대조군에 비해 초기 단계 동안 저해되는 것으로 나타났다.

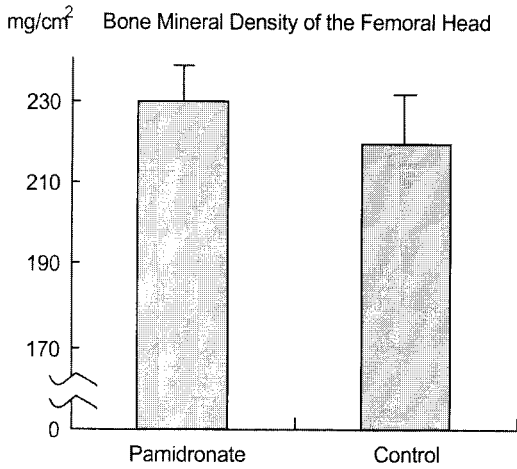


Figure 4. Bone mineral density of the femoral head. The bar indicates one standard deviation. The bone mineral density of the pamidronate-treated group was higher than that of the control group ($p=0.0007$).

3. 골밀도

우측 대퇴골두의 평균 골밀도는 실험군에서 $230 \pm 9 \text{ mg/cm}^2$, 대조군에서 $219 \pm 13 \text{ mg/cm}^2$ 였다 ($p=0.0007$) (Figure 4).

4. 우측 대퇴골의 파미드로네이트 골 농도와 강도와와의 관계

파미드로네이트의 평균 골 농도는 $62.3 \pm 15.2 \text{ ng/mg}$ 였고, 파미드로네이트 농도와 체중으로 표준화된 대퇴골의 최대 강도 사이에 상반관계가 보였지만 통계적으로 유의하지 않았다 ($p=0.067$) (Figure 5).

고 찰

본 연구의 목적은 골다공증을 유발시킨 백서 모델에서 장기간 파미드로네이트 투여의 효과를 자세히 알아 보기 위함이다. 6개월의 투여기간은 백서 수명의 6분의 1에 해당한다⁶⁾. 파미드로네이트는 난소 적출술 후^{7,8)} 높은 골 교체율 (turnover rates)로 인한 골 흡수로부터 대퇴골을 효과적으로 보호하고 골강도와 강성을 유지시킨다. 그렇지만 본 연구 결과, 통계적인 유의성은 없었지만 ($p=0.067$) 파미드로네이트의 대퇴골내 농도와 대퇴골 강도사이에 상반관계가 있는 것으로 나타났다. 파미드로네이트는 파골세포의

Relationship between pamidronate concentration in bone and maximum strength of the femur

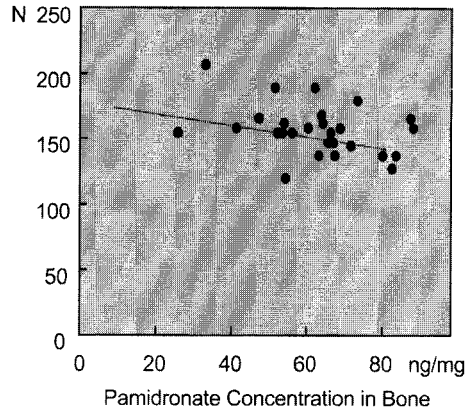


Figure 5. Relationship between pamidronate concentration in bone and the strength of the right femur. The mean pamidronate concentration in bone was $62.3 \pm 15.2 \text{ ng/mg}$. A tendency toward a negative relationship between pamidronate concentration and the maximum strength of the femur normalized by animal body weight was observed, but this was not statistically significant ($p=0.067$).

활성을 감소시켜 골 교체율에 직접적으로 영향을 주고, 결국 골내로부터 그 자체의 제거에도 영향을 줄 것으로 사료된다. 그러므로, 파미드로네이트의 높은 골내 농도는 약의 긴 반감기, 지속되는 약 효과, 저하된 골 교체와 계속되는 미세손상을 초래할 수 있다^{2,4,5,11)}. 비스포스포네이트의 골내 농도와 골 강도에 관한 연구는 단 몇 편만이 보고되고 있다. Peter 등¹⁶⁾은 동물에서 알렌드로네이트의 골내 농도는 용량에 따라 의존적으로 증가한다고 보고하였는데, 개 모델에서 3년간 각각 알렌드로네이트 0.25, 0.5 및 1.0 mg/kg/day 용량으로 2.41, 5.97 및 11.58 $\mu\text{g/g}$ 의 골내 농도를 유지하였지만 척추체의 최종 하중과 강성에는 군간에 차이가 나지 않는다고 보고하였다. 본 저자들은 사람에서처럼 개의 척추는 체중부하 구조가 아니므로 이 보고의 결과가 적절할지 의심된다. 본 연구에서는 좌측 대퇴골이 골절된 상태이므로 정상 우측 대퇴골에 더 많은 체중이 부하되었다. 파미드로네이트의 골내 농도와 골 강도와와의 상반 관계는 본 연구에서 처음으로 보고 되고 있다.

골절된 대퇴골의 치유 과정은 실험군에서 의미있게 저하되었고 ($p=0.025$), 실험군과 대조군에서 골절 가골 크기 (단면적)의 차이는 없었다. 골절 후 약의

중단은 비스포스포네이트가 투여된 동물군에서 전형적으로 발견되는 가골의 성장에 영향을 주는 것으로 사료된다^{6,7,12}).

본 연구에서 투여된 파미드로네이트의 용량은 6개월간 0.5 mg/kg이었고 그것은 1년간 180 mg 이상의 용량이었으며, 이는 섬유성 골 이형성증과 파제트병에서 무기질화의 일시적인 억제를 초래한다고 보고되었다^{17,18}). 본 연구에서 쓰인 용량은 일반적으로 임상에서 골다공증에 권장되는 양의 3배 이상이었지만 골 형성 부진증, 섬유성 골 이형성증과 파제트병에 사용되는 양보다는 적은 양이었다^{23,17,18}). 가골의 저해된 무기질화는 실험군에서 가골의 약화를 가져온 하나의 이유일 수 있다. Li 등¹¹)은 골절 수술 전 후에 계속되는 고용량의 인카드로네이트 (incadronate disodium)의 장기간 투여가 백서에서 골절 치유과정을 지연시킨다고 보고하였다. 그렇지만, Koivukangas 등⁶)은 골절전 클로드로네이트의 장기 투여가 골절 치유를 억제하지 않는다고 보고하였다. 다양한 비스포스포네이트의 단기간 투여에 대한 보고들은 골절 치유과정에 심각한 영향을 미치지 않는다고 보고하고 있다^{6,7,11,12,19,20}).

비스포스포네이트는 10년 이상 골다공증을 예방하고 치료하는 데 쓰여져 왔다¹²). 그렇지만, 장기간의 안전성과 골 강도와 골절 치유에 대한 이들 치료의 효과에 대한 보고는 부족하다. 불소 치료에 대한 경험은 골밀도의 단순한 증가가 골 강도의 증가와 골절 위험의 감소를 장담할 수 없다는 것을 알게 해준다. 정상적으로는 파골세포에 의해 재형성되는 미세구조적 손상의 축적이 골흡수 억제제의 장기간 투여 후 보고되어 왔고⁹), 소아에서 파미드로네이트 투여로 인한 골 화석증 (osteopetrosis)이 보고되었다²¹). 파미드로네이트로 치료하는 골 형성 부진증 환자에서 골절이나 절골 술 후 자연 유합이나 불유합의 빈도가 증가하는 것은 파미드로네이트의 골내 축적이 초기 골절 치유과정에서 해로운 영향을 미치기 때문일 것이다²²). Lehman 등²³)도 토끼 척추 모델에서 알렌드로네이트가 골유합을 억제하거나 지연시킨다고 보고하였다. 본 연구에서도 파미드로네이트의 장기간 투여가 골절 치유를 지연시킨다고 보고하고 있다.

결 론

파미드로네이트는 난소 적출 술 후 골흡수로부터 대퇴골을 효과적으로 보호하였고 강도와 강성을 유지하였지만, 파미드로네이트의 장기 투여 후 골절 치유가 지연되었다.

참 고 문 헌

- 1) Bone HG, Hosking D, Devogelaer JP, Tucci JR, Emkey RD, Tonino RP, Rodriguez-Portales JA, Downs RW, Gupta J, Santora AC, Liberman UA. *Ten year's experience with alendronate for osteoporosis in postmenopausal women. N Eng J Med 350: 1189-1199, 2004*
- 2) Fleisch H. *Bisphosphonates in bone disease. Fourth ed. San Diego: Academic Press 2000*
- 3) Glorieux FH, Bishop NJ, Plotkin H, Chabot G, Lanoue G, Travers R. *Cyclic administration of pamidronate in children with severe osteogenesis imperfecta. N Eng J Med 339: 947-952, 1998*
- 4) Hoggarth CR, Bennett R, Daley-Yates PT. *The pharmacokinetics and distribution of pamidronate for a range of doses in the mouse. Calcif Tissue Int 49: 416-420, 1991*
- 5) Komatsubara S, Mori S, Mashiba T, Ito M, Li J, Kaji Y, Akiyama T, Miyamoto K, Cao Y, Kawanishi J. *Long-term treatment of incadronate disodium accumulates microdamage but improves the trabecular bone microarchitecture in dog vertebra. J Bone Miner Res 18: 512-520, 2003*
- 6) Koivukangas A, Tuukkanen, Kippo, Jamsa T, Hannuniemi, Pasanen I, Vaananen K, Jalovaara P. *Long-term administration of clodronate does not prevent fracture healing in rats. Clin Orthop 408: 268-278, 2003*
- 7) Cao Y, Mori S, Mashiba T, Westmore M, Ma L, Sato M, Akiyama T, Shi L, Komatsubara S, Miyamoto K, Norimatsu H. *Raloxifen, estrogen and alendronate affect the processes of fracture repair di-*

- fferently in ovariectomized rats. *J Bone Min Res* 17: 2237-2246, 2002
- 8) Seedor JG, Quartuccio HA, Thopson DD. *The bisphosphonate alendronate (MK-217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. J Bone Miner Res* 6: 339-346, 1991
 - 9) Bonnarens F, Einhorn TA. *Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. J Orthop Res* 2: 97-101, 1984
 - 10) Brown KM, Saunders MM, Kirsch T, Donahue HJ, Reid J. *Effect of COX-2-specific inhibition on fracture healing in the rat femur. J Bone Joint Surg [Am]* 86-A: 116-123, 2004
 - 11) Li C, Mori S, Li J, Kaji Y, Akiyama T, Kawanishi J, Norimatsu H. *Long-term effect of incadronate disodium (YM175) on fracture healing of femoral shaft in growing rats. J Bone Min Res* 16: 429-436, 2001
 - 12) Li J, Mori S, Kaji Y, Mashiba T, Kawanishi J, Norimatsu H. *Effect of bisphosphonate (incadronate) on fracture healing of long bones in rats. J Bone Min Res* 14: 969-979, 1999
 - 13) Wheeler DL, Eschbach EJ, Montfort MJ, Maheswari P, McLoughlin SW. *Mechanical strength of fracture callus in osteopenic bone at different phases of healing. J Orthop Trauma* 14: 86-92, 2000
 - 14) Usui T, Watanabe T, Higuchi S. *Determination of a new bisphosphonate, YM175, in plasma, urine and bone by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. J Chromatography* 23: 213-220, 1992
 - 15) King LE, Vieth R. *Extraction and measurement of pamidronate from bone samples using automated pre-column derivatization, high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. J Chromatography & Biomedical Application* 12: 678: 325-330, 1996
 - 16) Peter CP, Guy J, Shea M, Bagdon W, Kline WF, Hayes WC. *Long-term safety of the aminobisphosphonate alendronate in adult dogs. 1. general safety and biomechanical properties of bone. JPET* 276: 271-276, 1996
 - 17) Liens D, Delmas PD, Meunier PJ. *Long-term effects of intravenous pamidronate in fibrous dysplasia of bone. Lancet* 343: 953-954, 1994
 - 18) Adamson BB, Gallacher SJ, Byars J, Ralston SH, Boyle JT, Boyce BF. *Mineralization defects with pamidronate therapy for Paget's disease. Lancet* 342: 1459-1460, 1993
 - 19) Goodship AE, Walker PC, McNally D, Chambers T, Green JR. *Use of a bisphosphonate (pamidronate) to modulate fracture repair in ovine bone. Ann Oncology (suppl. 7)* 5: 53-55, 1994
 - 20) Hyvonen PM, Karhi T, Kosma V, Liimola-Luoma L, Hanhijarvi. *The influence of dichloromethylene bisphosphonate on the healing of a long bone fracture, composition of bone mineral and histology of bone in the rat. Pharmacol Toxicol* 75: 384-390, 1994
 - 21) Whyte MP, Wenkert D, Clements KL, McAlister WH, Mumm S. *Bisphosphonate-induced osteopetrosis. N Eng J Med* 349: 457-463, 2003
 - 22) Munns CFJ, Rauch F, Zeitlin L, Fassier F, Glorieux FH. *Delayed fracture and osteotomy healing in pediatric osteogenesis imperfecta patients receiving pamidronate. Proceeding twenty-fifth annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research S33*, 2003
 - 23) Lehman RA, Kuklo TR, Freedman BA, Cowart JR, Mense MG, Riew KD. *The effect of alendronate on spinal fusion: A rabbit model. Spine J* 4: 36-43, 2004

