

Cyclophosphamide가 백서 발치창 치유과정에 미치는 영향에 관한 실험적 연구

서울대학교 대학원 치의학과 구강외과학 전공

(지도교수 : 민 병 일)

최 진 건

— 목 차 —

- I. 서 론
- II. 실험재료 및 방법
- III. 실험성적
- IV. 총괄 및 고안
- V. 결 론
- 참고문헌
- 영문초록
- 사진부도 및 설명

I. 서 론

Cyclophosphamide는 1957년 Arnold와 Bourseaux¹⁾에 의하여 최초로 합성 개발된 alkylating 제제로 현 급까지 광범위한 항종양제로 사용되고 있으며, 최근에 이르러서는 장기이식시 거부반응을 예방 또는 억제시키기 위한 면역억제제로^{2,3)} 나아가서는 Wegner氏 육아종, 류마티성 관절염, 그리고 전신적 홍반성 낭창 (systemic lupus erythematosus) 등의 비종양성 염증질환의 치료에 유효한 항염제로 투여되고 있다.^{4,5,6)}

이상적인 항종양제는 종양세포에 대해서는 높은 친화력을 가지는 반면 정상세포에는 낮은 (little) 친화력을 가지고 종양세포만 선택적으로 파괴해야 한다는 것은 주지의 사실이다. 그러나 cyclophosphamide는 세포의 핵산에 비선택적으로 작용하는 것으로 알려져 있으며,²⁵⁾ 특히 D.N.A. 의 guanine base에 cross link를 이루어 세포분열을 억제시키는 alkylating 제제로 간혹 돌연변이를 유발

시키기도 한다.²⁶⁻³²⁾ 이에 따라 cyclophosphamide의 표적세포가 되는 것은 급속히 분열하는 세포로 종양세포는 물론이러나와, 상피, 모발, 조혈장기 및 미분화 증배엽세포와 같은 정상세포도 동시에 파괴함으로 정상조직에 대한 세포독작용을 발현한다.

이러한 cyclophosphamide가 창상의 치유과정에 미치는 영향에 대해서는 Wie, Bruast¹⁷⁾Hansen,^{4,5)} Cohen¹⁸⁾ 등이 연구한 바 있으나, 발치술이 구강외과 영역에서 가장 빈번하게 수행되는 술식이며, 악안면 영역의 악성종물의 외과적 적출시 수반되는 술식인데도 불구하고, 현급까지 본 약제가 발치창의 치유과정에 미치는 영향에 관한 연구는 희유하여 본인은 cyclophosphamide가 백서의 발치창 치유과정에 미치는 영향에 대해 조직학적으로 관찰하고, 이에 그 결과를 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

(1) 실험재료

본 실험에서는 체중 130gm 내지 150gm이 되는 생후 6개월된 웅성백서 60두를 사용하였으며 이중 30두를 실험군으로 하고 나머지 30두를 대조군으로 배정하였다. 본 실험에서 사용된 항종양제는 cyclophosphamide로서 종양치료제로서의 치료투여량은 25mg/kg 으로 추천 되어져 있었다.

(2) 실험방법

실험군에서는 백서의 하악우측 제1대구치를 발거한 후 그 즉시로부터 25 mg /kg의 본 제제를 2일에 1회씩 총3회 복강내 주사하고, 대조군에서도 하악 우측 제1대구치를 가능한 한 최소한의 의

상으로 발거하였다.

대조군과 시험군은 공히 발치후 그 다음날을 실험 제 1일로 하여 7일, 10일, 14일, 21일, 30일후에 각기 6두씩 희생시켰다. 희생직후 백서의 두부를 절제한 후 즉시 10% buffered neutral formalin 용액에 일주일 이상 고정시키고, 하악을 적출하여 발치와를 중심으로 협설면 방향으로 절단한 후 5% nitric acid에 1~2일간 탈회한 후 통법에 의하여 수세 및 탈수하고 paraffin에 포매하여 4~6 μ의 박절표본을 제작한후 Hematoxylin-Eosin 중염색하고 경검하였다. 특히 발치와의 치유과정을 보다 적절히 관찰하기 위하여 다음과 같은 6가지의 특수염색을 첨가 시행하였다. 결체조직을 관찰하기 위한 Van Gieson 염색, 교원질 섬유 및 신생골 기질을 관찰하기 위한 Masson's trichrome 염색, 육아조직내 나타나는 비만세포 및 변염성 (metachromasia)을 보기위한 Toluidin blue 염색, 파단 및 상피기저막의 재생 그리고 진균을 관찰하기 위한 PAS 염색 및 PAS after diastase (소위 DPAS) 염색, 진균을 보다 확실하게 관찰하기 위한 Grocott氏 방법(소위 GMS) 등의 특수염색을 보조적으로 시행하였다.

III. 실험성적

1) 대조군

(1) 발치후 제 7일 : 발치와 상부는 유섬유소 피사물과 다형핵 백혈구들의 침윤이 혼재된 막으로 피개되어져 케양상을 보였고, 인접치은상피의 기저부 세포들이 케양변연부로 1~2층의 비박한 세포층을 이루면서 이동 증식해가는 상을 인지할수있었다. 바로 그 직하에는 임파구 및 대식세포가 혼재되어 침윤되어 있는 육아조직이 형성되어 있었고 섬유아세포들의 증식상을 보였다. 이때 Van Gieson 염색 및 Masson's trichrome 염색에서 육아조직내로 교원질이 형성되는 상이 관찰되었다.

발치와 저에서는 인접 치조골벽으로부터 신생골양조직의 증식상이 인지되었는데, 이때 골주는 미성숙되어 비박하고 다수의 조골세포들을 함유하며 골주사이에 개재되어 있는 교원성 섬유조직의 양이 많았다.

(2) 발치후 제 10일 : 발치와 상부는 rete ridge가 다소 미약하게 발달되어 있는 각화신생 상피로 피개되어 있었고, 바로 그 직하에는 염증세포의 침윤

으로 부종상을 보이며 섬유아세포의 증식이 현저한 육아조직으로 구성되어 있었다. Van Gieson 염색 및 Masson's trichrome 염색에서 제 7일군에 비하여 교원질의 형성이 현저하였다.

발치와내는 성숙된 교원성 섬유조직과 석회화된 골양조직으로 충만되어 있었고, 이때 골양조직의 골주는 제 7일군에 비하여 비후화되었으며 골의 침착과 흡수가 활발하여 cemental line이 보다 명확하게 인지되었다. 그리고 발치후 잔존된 치조골정의 흔적은 명확하게 인지할 수 있었다.

(3) 발치후 제 14일 : 발치와 상부는 rete ridge가 명확하고 현저하게 발달된 각화중층 편평상피로 피개되고 있었으나 인접치은상피에 비하여 다소 함몰되어져 발치와의 흔적을 쉽게 인지할 수 있었다. 상피의 직하에는 미약하게 침윤된 염증세포가 개재되어 있고 섬유아세포의 증식이 현저하고 활발한 육아조직으로 구성되는데, Van Gieson 및 Masson's trichrome 염색에서 교원질의 양이 상당히 증가되어 있었다.

발치와내는 성숙된 골양조직이 출현하여 골양조직간에 개재된 교원질 섬유조직의 양이 감소되며 부분적으로 골양조직은 골주가 비후하며 cemental line이 명확한 치밀골로 대체되고, 발치와 저부에서는 인접 골주세포들이 이동하면서 증식하는 상이 인지되었으나 그 정도는 아직 미약하였다. 발치와의 치조골정의 흔적은 인지할 수 있었다.

(4) 발치후 제 21일 : 발치와 상부의 소견은 제 14일군과 대동소이하나, 상피직하에는 염증세포의 침윤이 미약한, 성숙 교원섬유조직으로 구성되어

표 1. 발치창 치유과정중 상피치유시기에 대한 비교

발치후경과일		7일	10일	14일	21일	30일
상피의 이동 (epithelial migration)	대조군	○				
	실험군				×	
상 피 피개	대조군		○			
	실험군					×
rete ridge 의 발달	대조군			○		
	실험군					×
각 화	대조군		○			
	실험군					×

○ : 대조군에서 최초로 인지된 시기

× : 실험군에서 최초로 인지된 시기.

있었다.

발치와 내부는 상당부분이 치밀골로 대체되어져 있었고, 성숙 교원섬유조직의 양은 현저히 감소되면서, 인접 골주조직들이 이동증식하는 상이 제 14 일군보다 현저해졌다. 그러나 아직도 치조골정의 흔적은 미약하게나마 인지할 수 있다.

(5) 발치후 제 30일 : 발치와 상부의 소견은 제 21 일군과 대동소이 하였다.

발치와 내부에는 거의 치밀골로 대체되어져 치조 골정의 흔적을 인지할 수 없었다.

2) 실험군

(1) 발치후 제 7 일 : 발치와 상부는 PAS 염색과 Eosin에 호염되는 광범위한 응고성 피사물로 피개되어 지고, 인접치은조직에도 응고성 피사물 수반하여 발치와는 설측과 개통되어 있었다.

발치와내의 저부에서는 미약하나마 치유하려는 태동을 보여 중등도의 염증세포의 침윤을 보이는 비박한 육아조직이 형성되고 있었으며, Van Gieson 및 Masson's trichrome 염색에서 미약한 교원질의 형성이 인지되었다. 그러나 골양조직의 증식상은 관찰할 수 없었다. 또한 Toluidin blue 염색에서 육아조직내로 비만세포들이 탈과립하는 상이 관찰 되었다.

진균을 관찰하기 위한 PAS, DPAS, 및 GMS 氏 염색을 시행하여 경검한 결과, 6두의 실험동물 발치와중 3마리의 발치와에서 표재성으로 진균이 군집상으로 번식하는 것이 확인되었으나, 진균의 정확한 종류를 조직 병리학적으로 분별하기는 곤란하였다.

표 2. 결체조직 및 골조직의 출현시기에 대한 비교

발치후경과일 조직소견		7일	10일	14일	21일	30일
육 아 조 직	대조군	○				
	실험군	×				
교원섬유조직	대조군	○				
	실험군		×			
신생골양조직	대조군	○				
	실험군		×			
치 밀 골	대조군			○		
	실험군				×	
골주조직이동 및 증식	대조군		○			
	실험군				×	

○ : 대조군 × : 실험군

(2) 발치후 제 10일 : 발치와 상부에 대한 소견은 제 7일군과 대동소이하였으나, 피개하고 있는 응고성 피사물의 양이 감소되어 있었다. 그러나 아직도 인접 치은상피로부터 발치와 중심부로 상피세포가 이동 증식해 들어가는 상은 인지할 수 없었다.

발치와저에는 제 7 일군보다 섬유아세포의 증식이 현저한 육아조직이 형성되고 있었으며, 미약하나마 신생골양조직이 치조골 벽으로부터 증식하는 상이 인지되었으며, Van Gieson 및 Masson's trichrome 염색에서 교원질의 형성이 증가되는 상을 보였다. 또한 Toluidin blue 염색에서 제 7 일군보다 다량의 비만 세포들이 탈과립하는 상이 관찰되었다.

상기 특수염색으로 경검한 결과, 6마리의 실험 동물중 2마리의 발치와에서 표재성으로 진균감염을 확인할 수 있었다.

표 3. 실험군 발치창에서 진균감염된 동물수 및 백분율

발치후경과일	7일	10일	14일	21일	30일	합 계
감염동물/ 실험동물	%	%	%	%	%	%
백 분 율	50%	33.3%	33.3%	16.7%	0	26.7%

(3) 발치후 제 14일군 : 발치와 상부는 표재성으로 응고성 피사물이 피개되어 있어 궤양상을 보였으나, 인접치은상피로부터 궤양중심부로 상피세포가 1~2열의 비박한 층을 이루면서 이동 증식해 들어가는 상이 매우 미약하게 인지되었다. 이때 재생된 상피의 핵은 Hematoxylin에 다소 농염되는 상을 보였다.

인접치조골 벽으로부터 발치와 내부로 신생골양 조직이 증식하면서 들어가는 상이 제 10일군보다 현저하기는 하나 골주들은 비박하고 석회화가 미약한 상을 보였다. Van Gieson 및 Masson's trichrome 염색에서 제 10일군보다 교원질의 형성이 증가되어 지고 있었다.

상기 특수염색으로 경검한 결과, 6마리의 실험 동물중 2마리의 발치와에서 표재성으로 진균감염을 확인할 수 있었다.

(4) 발치후 제 21일군 : 발치와 상부는 아직도 피사물이 표재성으로 잔존 피개되어 있었으나, 제 14일군보다 궤양의 폭이 좁아지고 있었고 인접상피에서 궤양면을 향한 상피세포들의 이동 및 증식이 제 14일군보다 현저하였고 이때 재생상피세포층에는 세포가

분열하는 상도 인지 되었다.

발치와 내에서는 골양조직이 치밀골로 대체되는 상이 현저해져, 골주들의 폭경은 제 14일군에 비하여 증가되어있고 cemental line도 분명해지며 다량 관찰 되었다. 발치와저에서는 인접골수조직들이 이동 증식하는 상이 인지 되었다.

상기 특수염색으로 경검한 결과, 6두의 실험동물중 1두의 발치와에서 표재성으로 진균감염증을 확인할 수 있었다.

(5) 발치후 제 30일군: 발치와 상부는 rete ridge가 발달된 각화층중편평상피로 피개되어져 있었으나, 인접 건전치은상피보다 함몰되어져 발치와의 흔적은 쉽게 인지 되었다.

발치와 내부는 상당부분이 치밀골로 충만되어 있었고, 그 사이로 골수세포의 증식이 현저하였다. 치조골정의 흔적은 아직 인지할 수 있었다.

상기 특수염색으로 경검한 결과, 6두의 실험동물중 진균감염증은 없었다.

IV. 총괄 및 고안

본 연구의 목적은 cyclophosphamide가 발치창 치유과정에 미치는 영향을 조직 병리학적으로 관찰하고 논의하는 데 있다. 본 실험성적에서 상술한 바와 마찬가지로 실험군의 발치창 치유는 대조군의 것에 비해서 상당히 지연되는 소견을 보였다. 즉 본 약제의 투여는 발치창 치유과정중 각화상피에 의한 피개, 골양조직의 증식, 치밀골로의 대체, 골수조직의 이동 및 증식등 일련의 경시적 과정에 지연적 효과를 나타냈다. 이에 따라 저자는 cyclophosphamide의 세포독작용(cytotoxicity) 및 일반세포에 미치는 영향에 관한 고찰을 선행하고, 이어서 발치창 치유과정에 대한 영향을 논의하기로 한다.

Cyclophosphamide를 치료의 목적으로 투약중 세포독작용(cytotoxicity)이 발현되는 예가 다수 존재하는데^{11-15, 21-24} 본 제제는 투여후 간(liver)에 도달하여 평활소로체내의 혼재된 과립체(microsome)들에 의하여 활성화되어 약효를 발휘하면서 노로 배설된다.^{3, 19, 20, 35-38} 상기과정중 일부의 활성화된 cyclophosphamide는 방광에 저류하여 방광의 상피 및 결체조직에 세포독작용을 발휘하고 출혈성방광염을 발생시킨다는 것에 대해서는 비교적 상술되어 있다.^{3, 15, 19, 20, 21, 25} 이외에도 Ringborg 등에 의한 혈소판감소증, Kende 등에 의한 시력동요 및 저하,

shah등에 의한 손톱착색증 등의 가역적인(reversible) 세포독작용에 대한 보고가 있다.

Wysocki등⁴⁰은 바이러스가 원인이 되어 발생하는 구내심상성 우체(Intraoral veruca vulgaris)에서 핵내 봉입체를 발견하였고 구내 심상성 우체가 유두상(papillary)으로 상피의 증식을 보이는 일종의 상피비후증이라는 사실을 감안할 때, Koss의 주장 즉 cyclophosphamide는 바이러스와 유사한 작용기전으로 상피의 증식을 촉진시킬 수 있다는 시사는 가능성이 높은 것으로 사료할 수 있겠다.

상기와 같은 세포에 대한 작용을 갖는 cyclophosphamide가 발치창 치유과정에 미치는 영향은 세 항목으로 대별하여 논의할 수 있다. 첫째는 발치와 상부에서 관찰되는 상피의 치유과정으로 상당한 지연적 효과를 나타냈으며(표.1 참조), 둘째는 중배엽성 세포인 결체조직 및 골조직의 치유과정으로 이도 역시 지연적 영향을 나타냈고(표.2 참조), 셋째는 발치와 표면에 표재성으로 진균감염증이 존재하였다는 사실이다. 이에 따라 저자는 cyclophosphamide와 상기 세 항목과의 관계를 순서대로 논의하기로 한다.

본 실험에서 대조군에서는 발치후 7일에 인접건전상피로부터 발치와 중심부로 상피세포들이 이동 증식하여 발치후 10일에 발치와 표면이 상피로 피개된 상이 관찰된 반면, 실험군에서는 21일에 상피로 피개되는 소견을 인지할 수 있어, 상피의 치유과정에 있어서 실험군이 대조군에 비해서 현저히 지연됨을 보였다.

이는 Wie와 그의 동료들에¹⁶에 의한 실험결과와 일치하는 소견으로 Wie등은 cyclophosphamide를 투여한 백서피부에 침공형성후, 치유과정을 조직병리학적으로 관찰하고 본 약제의 투여는 창상의 상피피개 과정을 지연시킨다고 하였다. 그리고 Beyer-Boon과 그의 동료들²⁰은 cyclophosphamide를 투여한 환자의 방광상피에서 상피내암(carcinoma in situ)에서 관찰되는 것과 같은 세포의 이형(atypism)을 보고하면서, 이러한 변화는 본 제제가 D.N.A.를 알킬화시킴으로, 발현되는 유도적 효과(inductory effect)에 기인하는 것이라고 하였다. 또 Koss¹⁸는 백서에 cyclophosphamide를 과량 투여후, 투여 1일이내에 방광상피에서 괴사, 탈락, 및 마박(dentudation)등의 상피손상이 경시적으로 나타남을 보고하고 투여후 3일에는 손상부위에서 상피재

생의 징후를 보이는데 이때 재생상피에서 비후현상을 관찰하였다.

이와 같이 본 약제는 상피에 다양한 영향을 미치는데, 요약하면 상피의 손상, 재생상피의 이행(atyplism) 및 비후화, 창상의 상피피개 지연 등의 영향을 미치는 것으로 볼수 있다. 본 실험에서 cyclophosphamide 투여군에서 발치창 상피피개를 포함하는 상피 치유과정이 지연된 소견도 위와 같은 본 제제의 상피세포에 대한 작용에 기인하리라 사료된다.

그러나 본 실험의 cyclophosphamide 투여군에서 발치창 피개상피의 이행(atyplism)이 관찰되지 않는 것은 Wie등¹²⁾이나 Koss¹⁹⁾의 발견과 일치하지 않는 것으로 지적할 수 있으나, 백서에서 본 약제의 반감기는 6시간 30분이며 알킬화 작용은 24시간 동안만 지속되므로,²⁰⁾ 본 실험의 경우 cyclophosphamide를 5일간 총 3회 투여하였으므로 30일후에 출현하는 발치창 피개상피에는 cyclophosphamide의 작용이 미약하게 발휘할 것으로 사료되어 재생상피의 이행을 야기시키지 않을 것으로 사료한다.

본 실험에서 cyclophosphamide 투여군 발치창에서 결체조직 및 골조직의 치유과정이 대조군의 것에 비해서 상당히 지연됨을 보여(표 2참조), 본 제제가 결체조직 및 치유과정에도 지연적 효과를 나타냈다.

Cyclophosphamide와 육아조직의 관계에 대한 연구로서, Hansen^{4, 5)}은 cyclophosphamide가 류마티스관절염의 치료에 유효하다는 사실에 착안하여 본 제제와 교원질과의 연구를 시행하여 탁월한 결과를 획득하였다. 그는 cyclophosphamide는 육아조직에서 교원질 합성 및 분해를 억제시키며 특히 proline이 수산화되는 것을 방해한다고 하면서, 본 제제는 류마티스 관절염의 특징적 병변인 만성 육아조직의 생성 및 지속과 염증반응에 수반 속발되는 결체조직의 분해를 방해하여 치료효과를 얻었다고 하였다. 따라서 cyclophosphamide 투여는 결체조직 및 골조직의 기질성분에 교원질 형성을 방해함으로써, 발치창 치유과정에 지연적 영향을 발휘할 것으로 사료된다.

또한 cyclophosphamide와 증배염성세포에 대한 연구로서²⁶⁻³²⁾ Adatia^{26, 27)}는 본 약제가 백서전치에 미치는 영향을 연구하고 cyclophosphamide는 투여량에 비례하여, 치아형성에 비 정상적인 영향을 주며, 치계상피세포보다 미분화 증배염세포가 cyclophos-

phamide의 세포독작용에 더욱 과민하다고 하였다. Koppang²⁸⁾은 임신 백서에 본 제제를 투여후 신생백서의 치아에 다양한 기형을 조래한다고 하고, 특히 법랑질보다 상아질의 형태적 변화가 심하다 하였다. 따라서 cyclophosphamide는 미분화 증배염세포에 세포독작용을 준다고 사료할 수 있으며, 신생조직에서 나타나는 미분화 증배염세포에 현저한 영향을 미쳐 발치창 치유과정에 지연적 영향을 가질 것으로 사료된다.

본 실험에서 cyclophosphamide 투여군의 발치창 표면에 표재성으로 진균감염이 발생되었는데 이는 본 약제가 면역기능을 억제하므로써 진균감염을 야기시킬 것으로 사료된다. 대다수의 진균감염증의 특징은 기회주의적 감염(opportunistic infection)으로 악성종양이나 비조절성 당뇨병과 같은 만성소모성 질환이나 면역기능 저하시 병발된다는 것은 주지의 사실이다.⁴¹⁾ 그런데 cyclophosphamide는 면역기능을 억제시키는 제제로 알려져 있다.^{2, 3, 12, 25, 33, 34)}

Balow와 그의 동료들³³⁾은 cyclophosphamide는 세포중재면역(cell mediated immunity)반응에 영향을 미치며, Wagner 등³⁴⁾은 cyclophosphamide는 일시적으로 임파구의 세포분열을 정지시키고 백혈구 전구세포의 증식을 방해하므로 면역억제기능을 발휘한다고 하였다.

이상과 같이 cyclophosphamide는 면역기능을 억제시키기 때문에, 발치창 표면에 진균감염증이 나타난다고 사료된다. Ansel등¹²⁾도 본 약제가 면역억제제 이므로 투여시 결핵이나 진균감염증에 특히 조심해야 한다고 하였으며, Lane²⁵⁾은 cyclophosphamide 투여시 칸디다증이 발생될 수 있다 하면서 nystatin이나 amphotericin B와 같은 항진균제의 겸용투여를 추천하고 있다.

이상에서 상술한 바와 같은 작용기전에 의하여 cyclophosphamide는 발치창 치유과정을 지연시키며 또한 세포독작용을 발휘하는 것으로 알려져 이러한 cyclophosphamide의 부작용을 감소시키기 위하여 투약양식에 있어서 몇가지 변이(variation)를 갖춘 시도를 하고있다. Present와 그의 동료들^{8, 10)}과 Koyama등⁹⁾은 악성종물의 외과적 적출후 화학요법시 단독투여보다는 혼합투여가 부작용을 감소 시키는 데 기여한다고 하였으며, Alberts^{37, 38)} 등은 phenobarbital을 전투여하여 간세포에서 파립체의 증산을 유발시킨 후 cyclophosphamide를 투여하는 것이 cyclophosphamide의 부작용을 감소시킬 수 있다고 하였으나,

이에는 아직 논쟁의 여지가 있다.³⁵⁻³⁸⁾ 따라서 앞으로 악안면 영역에서도 종물의 외과적 적출후 cyclophosphamide의 단독투여 보다는 혼합투여 및 phenobarbital의 투여를 고려하여 시도하는 연구결과가 나와야 할 것으로 사료된다.

본 연구에서 cyclophosphamide가 발치창 치유과정에 지연적 영향을 미치는 것을 조직병리학적으로 연구하였으나, 보다 완벽한 연구가 이루어지기 위해서는 본 제제의 투여가 골화 중에 나타나는 극회침착의 정량 분석에 대한 연구나, 조직화학 및 약리학적인 측면에서 보다 많은 연구가 시행되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

저자는 구강 및 악안면 영역의 악성종양의 치료시 악성종물의 외과적 적출을 전후로 빈번하게 투여되는 cyclophosphamide가 발치창 치유과정에 미치는 영향을 관찰하고자, 백서의 하악 우측 제 1대구치를 발치한 후, 그 즉시로부터 cyclophosphamide 25 mg/kg을 2일에 1회 5일간 총 3회 복강내 투여하고, 실험동물을 발치후 7, 10, 14, 21, 30일에 각기 희생시켜 발치와를 중심으로 조직학적으로 관찰하고 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. cyclophosphamide 투여군이 대조군에 비하여 발치창 치유가 현저히 지연되어 대조군에서 발치후 21일에 치유의 완성을 보였으나 실험군에서는 발치후 30일에서도 치유과정이 계속되었다.

2. cyclophosphamide 투여군은 상피화 과정에도 대조군에 비하여 상당히 지연되었다. 대조군에서는 창상의 상피피개가 발치후 10일에 완료되어졌으나, 실험군에서는 발치후 30일에 완료되어 졌다.

3. cyclophosphamide 투여군은 대조군에 비하여 결체조직 및 골조직의 치유과정에도 지연적 영향을 보였다.

4. cyclophosphamide 투여군의 발치와 표면에는 표재성으로 진균감염이 존재하였으며, 이는 cyclophosphamide의 면역억제 효과와 직관되어 발생된다고 사료된다.

(본 논문을 완성하는 데 있어 시종 지도편달하여 주신 민병일 지도교수님께 진심으로 감사드리며 표본제작 및 해독에 조언을 주셨던 구강병리학 교실

의 임창윤 교수님께 감사하오며 홍삼표 선생과 그동안 지도 및 협조를 아끼시지 않았던 구강외과 제 교수님들께 진심으로 감사드립니다.)

- REFERENCES -

1. Arnold, H. and Bourseaux, F.: Synthese und abbau cytostatisch wirksamer cyclischer n-phosphamidster des bis (beta-chlorathyl)amins, *Angew. Chemie.* 70: 539-544, 1958.
2. Meyers, F.H., Jawetz, H., and Goldfin, A.: Review of medical pharmacology; cyclophosphamide, ed. 5, Los Altog, 1976, Lange Medical Publications. pp. 509.
3. Goodman, L.S. and Gilman, A.: The pharmacological basis of therapeutics; Cyclophosphamide, ed. 5, New York., Macmillan Publishing Company, pp. 1262-1264.
4. Hansen, T.M.: Cyclophosphamide and collagen, *Danish Medical Bulletin.* 26; 45-57, 1979.
5. Hansen, T.M. and Lorenzen, I.: Cyclophosphamide effect on collagen metabolism in granulation tissue, skin, and aorta of rats, *Acta. Pharmacol. et. Toxicol.* 40: 347-355, 1977.
6. Stevens, J.E. and Willoughby, D.A.: Anti-inflammatory effect of some immunosuppressive agents, *J. Path.* 97:367-373, 1977.
7. Parker, L.M. and Griffiths, T.: Combination chemotherapy with adriamycin, cyclophosphamide for advanced ovarian carcinoma, *Cancer.* 46:669-674, 1980.
8. Presant, C.A., Ratkin, G., Klahr, C., and Brown, C.: Adriamycin, BCNU plus Cyclophosphamide in advanced carcinoma of the head and neck, *Cancer.* 44:1571-1575, 1979.
9. Koyama, H., Wada, T., et al.: Surgical adjuvant chemotherapy with mitomycin C and cyclophosphamide in japanese pati-

- ents with breast cancer, *Cancer*. 46:2373-2379, 1980.
10. Presant, C.A., Ambury, A.V., Klahr, C., and Metter, G.E.: Chemotherapy of advanced prostatic cancer with adriamycin, BCNU, and cyclophosphamide, *Cancer*. 46: 2389-2392, 1980.
 11. Arseneau, J. C., Sponzo, R. W., et al.: Nonlymphomatous malignant tumors complicating Hodgkin's disease; possible association with intensive therapy, *New. Engl. J. Med.* 287:1119-1122, 1972.
 12. Ansell, I.D. and Castro, J.E.: Carcinoma of the bladder complicating cyclophosphamide treatment, *Brit. J. Urology*. 47:413-418, 1975.
 13. Wood, L.: Cyclophosphamide and neoplasia, *Lancet*. (7885): 898-899, 1974.
 14. Kapadia, S.B. and Kaplan, S.S.: Acute myelogenous leukemia following immunosuppressive therapy for rheumatoid arthritis, *Am. J. Clin. Pathol.* 70:301-302, 1978.
 15. Blotz, P. H., Klippelm, J. H., et al.: Bladder complications in patients receiving cyclophosphamide for systemic lupus erythematosus or rheumatoid arthritis, *Annals. Int. Med.* 91:221-223, 1979.
 16. Elias, E.G.: Chemotherapy and wound healing, *Clinics in Plastic Surg.* 6:27-30, 1979.
 17. Wie, H., Bruast, I., and Eckersberg, T.: Effects of cyclophosphamide on open, granulation skin wounds in rats, *Acta. Path. Microbiol. Scand, Sect. A.* 87:185-192, 1979.
 18. Cohen, S.C., Gabelnick, H.L., Johbson, R. K., and Goldin, A.: Effects of cyclophosphamide and adriamycin on the healing of surgical wounds in mice, *Cancer*. 36: 1277-1281, 1975.
 19. Koss, L.G.: A light and electron microscopic study of the effects of a single dose of cyclophosphamide on various organs in the rat, *Lab. Invest.* 16:44-65, 1967.
 20. Beyer-Boon, M.E., De Voogt, H.T., and Schaberg, A.: The effect of cyclophosphamide treatment on the epithelium and stroma of the urinary bladder, *Europ. J. Cancer*. 14:1029-1035, 1978.
 21. Rubin, J.S. and Rubin, R.T.: Cyclophosphamide and hemorrhagic cystitis, *J. Urol.* 96:313-316, 1966.
 22. Ringborg, U. and Lewensohn R.: Factors responsible for bone marrow toxicity after treatment of myeloma patients with different alkylating agents, *Acta. Med. Scand.* 203:276-278, 1978.
 23. Kende, G., Sirkin, S.R., Thomas, P.R.M., and Freeman, A.I.: Blurring of vision: A previously undescribed complications of cyclophosphamide therapy, *Cancer*. 44:69-71, 1979.
 24. Shah, P.C., Rao, K.R.P., and Petel, A.R.: Cyclophosphamide induced nail pigmentation, *Br. J. Dermatol.* 68:675-680, 1978.
 25. Del Regato, J.A. and Spjut, H.J.: Ackerman and del Regato's *Cancer; Chemotherapy of cancer*, ed.5, St. Louis, 1977, The C.V. Mosby Company, pp. 105-130.
 26. Adatia, A.K.: Cytotoxicity of cyclophosphamide in the rat incisor, *Br. J. Cancer*. 32:208-218, 1975.
 27. Adatia, A.K.: The effect of cyclophosphamide on dentinogenesis in the rat, *Archs. Oral. Biol.* 20:141-144, 1975.
 28. Koppang, H.S.: Histomorphologic investigations of dentinogenesis in incisors of offspring of cyclophosphamide treated pregnant rats, *Scand. J. Dent. Res.* 86:444-458, 1978.
 29. Reade, P.C. and Roberts, M.L.: Some long term effects of cyclophosphamide on the growth of rat incisor teeth, *Archs. Oral Biol.* 23:1001-1005, 1978.
 30. Vahlsing, H.L., Kim, S.K., and Feringa, E.R.: Cyclophosphamide induced abnormali-

- ties in the incisors of the rat, *J. Dent. Res.* 56:809-816, 1977.
31. Singh, S., Sanyal, A.K., and Singh, S.P.: Dental abnormalities induced by cyclophosphamide in rat fetuses, *Acts. Orthop. Scan.* 45:21-35, 1974.
32. Vahlsing, H. L., Ferringa, E. R., et al: Dental abnormalities in rats after a single large dose of cyclophosphamide, *Cancer. Res.* 35:2199-2202, 1975.
33. Balow, J.E., Parrillo, J.E., and Fauci, A.S.: Characterization of the effect of cyclophosphamide on cell mediated immunological responses, *Immunology.* 32:899-903, 1977.
34. Wegner, H. P., Chanana, A. D., et al.: Zellteilung, Zytolyse und Regeneration nach Cyclophosphamide, *Schweiz. Med. Wschr.* 106:40, 1976.
35. Dincalci, M., Bolis, G., et al.: Clinical pharmacology of cyclophosphamide, *Cancer. Res.* 33:226-233, 1973.
36. Bagley, C. M., Bostick, F. W., et al.: Clinical pharmacology of cyclophosphamide, *Cancer. Res.* 33:226-233, 1973.
37. Alberts, D.S., and Wetters, T.V.D.: The effect of phenobarbital on cyclophosphamide antitumor activity, *Cancer Res.* 36:2785-2789, 1976.
38. Alberts, D. S., Peng, Y. M., et al.: Effect of phenobarbital on plasma levels of cyclophosphamide and its metabolites in the mouse, *Br. J. Cancer.* 38:316-324, 1978.
39. Sela, J. and Jaffe, A.: The role of bone remodelling in the healing of extraction socket in rats, *Acta. Anat.* 97:241-247, 1971.

THE EXPERIMENTAL STUDY OF THE EFFECT OF CYCLOPHOSPHAMIDE ON THE HEALING PROCESS OF EXTRACTION SOCKET IN RATS

Jin Keun, Choi., D.D.S., M.S.D.

*Dept. of Oral Surgery, Graduate School, Seoul National University.
(Directed by Professor Byung Il, Min., D.D.S., Ph.D.)*

..... > Abstract <.....

Author performed the experimental study in order to observe the effect of cyclophosphamide on the healing process of the extraction socket in the male albino rats. Cyclophosphamide has been widely used as anticancer drug, immunosuppressive agent, and antiinflammatory drug. And it is well known that this drug has been effectively and prophylactically administered before or after surgical excision of advanced neoplastic mass. So it is very important to recognize the effect of this drug on the healing process of surgical wound, particularly of the extraction wound which is most frequently accompanied by surgical excision of neoplastic mass in the head and neck. However, there are few studies about this.

In this experiment, 60 male rats were used and divided into two groups, experimental and control one comprising 30 animals each. The experimental animals were administered with 25 mg/kg of cyclophosphamide intraperitoneally 3 times every other day, and the control animals were treated with the same method but with saline. The extraction was carried out on the right mandibular first molar in both experimental and control group at the time of first administration. Thereafter they are sacrificed at the intervals of 7, 10, 14, 21, and 30 days after experiments. The excised mandibles were immediately immersed in 10% buffered neutral formalin solution for at least 7 days, and they were decalcified in 5% nitric acid for 1-2 days. And they were processed on the routine procedure. The microscopic sections were made at 4-7 μ thickness. They were stained with hematoxylin and eosin, and with special stains such as Van Gieson, Masson's trichrome for collagen fiber, toluidinblue for metachromasia and mast cells, PAS and DPAS for glycogen and fungi, and Crocott's method for fungi.

Following results were obtained;

1. Cyclophosphamide had a remarkable retarding effect on the healing process of the extraction wound, including epithelial migration and covering, collagen laydown in the granulation tissue, and the healing process of bone.

2. Cyclophosphamide showed a marked retarding effect on the healing process of epithelium. In control group, epithelial covering was completed on the 10th day after experiment, while in experimental group it was done on the 30th day.
 3. Cyclophosphamide showed a retarding effect on the healing process of fibrosis and ossification. The animals treated with cyclophosphamide showed retardation in the proliferation of osteoid tissue, replacement by dense cortical bone, and in the migration and proliferation of bone marrow cells.
 4. The superficial fungal infection in some cases occurred at the surface of extraction socket. This can be construed to be closely related to the fact that cyclophosphamide is immunosuppressive agent.
-

— EXPLANATION OF MICROPHOTOGRAPHS —

- Fig. 1. Control 7th day: Fibroblastic proliferation X100.
- Fig. 2. Control 14th day: Mature rete ridge X100.
- Fig. 3. Control 14th day: (Van Gieson) Mature bone formation X100.
- Fig. 4. Control 21st day: (Van Gieson) Proliferation of bone marrow tissue X100.
- Fig. 5. Control 30th day (HE) Nearly normal epithelialization X100.
- Fig. 6. Control 30th day: Compact bone marrow tissue X100.
- Fig. 7. EXP 7th day: (HE) Necrotic tissue & granulation tissue X100.
- Fig. 8. EXP 7th day: (Masson's trichrome) Granulation tissue & collagen fibre X100.
- Fig. 9. EXP 7th day: (PAS) Proliferation of fungal Hyphae X100.
- Fig. 10. EXP 10th day: (HE) Mild bone formation X100.
- Fig. 11. EXP 10th day: (PAS) Net works of capsule-like materials X400.
- Fig. 12. EXP 10th day: (PAS) Negative staining of capsule-like materials X400.
- Fig. 13. EXP 10th day: (GMS Strongly positive staining of capsule-like materials X100.
- Fig. 14. EXP 14th day: (Masson's trichrome) New bone formation. & remaining granulation tissue X100.
- Fig. 15. EXP 21st day: (Masson's trichrome) Bone formation & collagenous fibrous tissue X100.
- Fig. 16. EXP 30th day: (Masson's trichrome) Nearly compact bone formation & collagenous tissue. X100.

