

## Affection of Blood Calcium, Ino-Phosphorus and Alkaline Phosphatase Activity Inject with Paraquat on Rats

Wha Jae Lee<sup>†</sup>

Clinical Phathology of Sohae College Kunsan City Jounbuk Do Korea

Paraquat (N,N'-dimethyl-4,4'-bipyrrimidinium-dichlorides (PQ): MW 186.6) has been used to killing veriertly of hubside plants. For this study were use Sprague-dawely rats (190±10 gm) and injection 40 mg/kg BW of paraquat (LD<sub>50</sub>) to 24 hrs PQ and 4 days PQ group excepte normal control. For the measurement of blood calcium, Ino-phosphorus and activity of alkaline phosphatase (ALP) by HITTACH 746. In serum phosphoruse of normal control were 8.0±1.2 mg/dl and 24 hrs PQ group were 8.9±1.0 mg/dl (P<0.05) and 4 days PQ group were 8.8±0.42 gm/dl (P<0.05). In serum phosphorus were very sensitive uptaked to 10% within only 24 hours, but 4 days of PQ were similar uptake level than 24 hrs PQ. So this 8.9 mg/dl of serum phosphorus may be thought threshold level because does not more encrease. In blood calcium normal of rats were measured 9.5±0.3 mg/dl and 24 hrs of PQ group were 9.9±0.51 mg/dl (uptaked 4.5%, P>0.05). This uptake cannot fined meaning mathmatic statistics but 4 days PQ groups of calcium were 10.43±0.37 gm/dl (uptaked 10%, P<0.05). That 24 hrs PQ groups of caclium dose not reacted sensitive to irritated by PQ. So, when use oxidants of PQ, the blood calcium and Ino-phosphorus were linear correlated uptake that reasone thought may be move out form hardness bone tissue to in blood it does not take feeding to hunger for 4 days. In ALP normal of rats were measured 991±106 unit/L. In 24 hrs irritated PQ rats were fall down by 629±91 unit/L (P<0.001) but in 4 days of PQ rats were 792±85 unit/L (P<0.0011) that the activity of level were mild recovered activity from 629 unit (63%) to 792 unit (80%). So, that the reasone of ALP were very sensitive activity and reverse correlated to blood calcium or phosphorus irritated by PQ.

**Key Words:** Paraquat, Calcium, Phosphorus, Alk. phosphoruse, Blood

### 서 론

Paraquat (N,N'-dimethyl-4,4'-bipyridilium-dichloride: (MW-186.7)이라는 methyl viologen (PQ)<sup>4,9)</sup> 물질은 산소를 이용하여 살아가는 대다수 생물체에서 산화제로 작용하여 독성을 갖는 유리산소기 (Oxygen free radical)<sup>3,7,10)</sup>를 많이 생성하여 세포내에서 지질과산화와 노화를 촉진하고, 신경조절기능 장애를 초래와 암 유병을 증가 보고가 있어 왔고, DNA 의존성 단백질합성 장애로 식물체를 고사시켜서 잡초 제거<sup>25)</sup>에 사용되어 온 물질이다. 한편 체내 calcium<sup>13,22)</sup>과 phosphorus<sup>19)</sup>의 98%는 칼슘히드록시아포티트 (Ca<sub>10</sub>(HPO)<sub>7</sub>(OH)<sub>5</sub>)<sup>19,21)</sup>라는 분자물질로 뼈와 같은 경조직 구성<sup>19)</sup>에 이용되고, 다만 2~3%만이 혈액응고와 효소활성, 신경전달, 정보전달과 삼투조절 등에 이용되

고 있음으로서, 척추동물 체내에서는 없어서는 아니 될 무기물로 알려지고 있다. 이들 무기물들은 Vitamine-D와 calcitonine, parathyroide와 같은 홀몬 지배<sup>6,12)</sup>를 받는 것으로 알려지고 있다. 한편 체내 calcium과 phosphorus는 Alkaline phosphatase (ALP)<sup>11,15,24)</sup>라는 효소활성의 영향을 받고 있어서, 골수 붕괴성 임상질환 진단에 ALP 효소가 이용되고 있는 것도, ALP 효소가 이들 물질들과 어떤 관계가 있는 것으로 생각되고 있다. 이 같은 견해에 대하여 Barnard<sup>2)</sup>는 체내 calcium ion이 paraquat ion의 산화작용 억제에 대한 생체 방어작용에 기여한다는 calcium 의존설을 제기하였고, Kojima-S<sup>14)</sup>는 paraquat ion 독성작용에 대하여 dextrane sulfate나 polyvinyl sulfate라는 물질들도 생체 방어작용을 한다는 보고들도 제기되고 있다. 실제로 paraquat ion의 체내 독성작용에 의해 겪을 고통을 받다가 죽거나 아니면 일정 기간이 지나면 생동력을 회복하는 것을 볼 수 있었다. 본 실험에서는 경조직 골수 구성물인 calcium이나 phosphorus가 산화체인 paraquat 투여로 골수로부터 혈액내로 유리되는 것을 확인하기 위해서 초기 생체반응상태와 극한상태 후기반응상태를 관찰함으로써 cal-

\* 논문 접수: 2002년 3월 8일  
수정재접수: 2002년 5월 14일

<sup>†</sup>Corresponding author: Wha Jae Lee, Clinical Phathology of Sohae College Kunsan City Jounbuk Do Korea  
e-mail: Hilee777@hanmail.net

cium과 phosphorus가 이산화로 유리되는 과정의 혈중농도 변화를 확인할 수 있을 것으로 생각되었으며, 이때 Alkaline phosphatase 효소활성도와 연관성이 있을 것으로 생각되었다. 그 관계를 규명하기 위해 paraquat가 경조직 골수에 미치는 영향에 대한 실험결과가 의의 있다고 판단되어서 실험결과를 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물 사육

경기도 오산 쥐 사육장에서 albino 흰쥐 체중 190~210 gm의 수컷들을 구입하고, 이들 쥐를 23±3℃ 사육온도와 70% 내의 습도, 12시간 명암주기에서 물과 사료를 자유롭게 먹게 한 조건에서 사육하면서 실험전 처리 기간을 사육하였다.

### 2. 실험군과 약제 동물투여

각 실험군은 5마리로 구성된 실험쥐군에 물과 사료를 자유롭게 먹게 하고, 정상대조군을 제외한 모든 실험군에는 methyl viologen라 하는 paraquat (PQ) 물질을 체중 kg당 40 mg의 반치사량 (LD<sub>50</sub>)을 복강내에 투여하였다. 초기 24시간 반응군과 쥐가 죽어가는 4일군 (96시간) 생존극한상태에서 쥐들을 ethyl ether로 1~2분간 마취시킨 후 21 gage 바늘이 접지 된 10 ml 소독된 주사기로 심장천자하여 5~7 ml 혈액을 채혈하였고, 이 혈액을 3000 rpm에서 15분간 냉장 원심분리후 한 후 혈청분리하여 본 실험재료로 사용하였다.

### 3. 분석자료 및 통계처리

본 실험에서 이용된 calcium량 측정은 OCPC법으로, Ino-phosphorus는 molybdous blue U-V법으로, Alkaline phosphatase 활성도 측정은 p-Nitrophenol법으로 HITTATCH 746 생화학자 동분적기에서 오차범위를 줄일 수 있도록 동일동시 조건에서 분석하였고, 그 결과는 정상대조군 평균값에 대한 t-검정으로 유의성을 각각 확인하였다.

## 결 과

Paraquat에 의해서 쥐의 동물체 내에서 일어난 calcium, phosphorus의 혈중농도와 Alkaline phosphatase 활성도에 미치는 실험결과는 아래 Table 1, 2, 3과 Fig. 1, 2, 3과 같이 분석되었다.

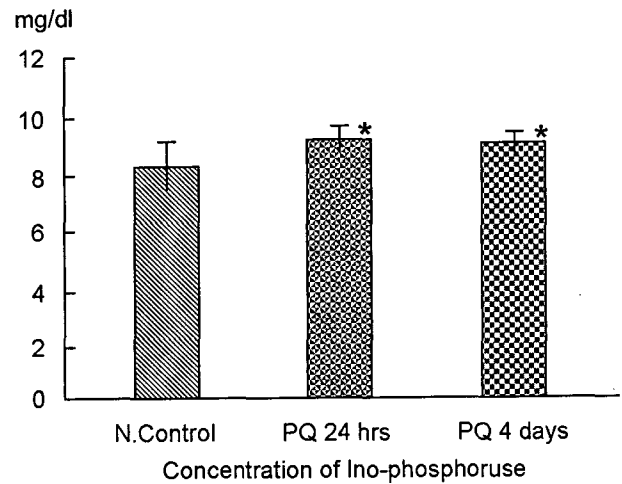
### 1. Paraquat 투여와 Phosphorus 혈중농도

Table 1과 Fig. 1에서 보듯이 정상대조군의 혈액내 무기인(Ino-phosphorus: Ino-pi)의 혈중농도 평균치는 8.0 mg/dl로 나타났다. 정상대조군의 무기인(Ino-Pi)의 평균치를 100%로 하

**Table 1.** Affection of blood Ino-phosphorus concentration injection with paraquat in peritoneal cavity of rats

Test group	Blood Ino-phosphorus (mg/dl)		
	Normal control	PQ 1 day	PQ 4 day
Mean	8.0±1.2	8.9±1.0	8.8±0.42
Effect	100%	111.3%	110%
t-Test		P<0.05*	P<0.05*

\*Percentage against control group statistical significance (P-value)  
\*P<0.05, \*\*P<0.01, compare with normal control



**Fig. 1.** Effect of ginseng extracts on blood Ino-phosphorus after inject with paraquat in peritoneal cavity of rats.  
1. Normal control, 2. Paraquat 24 hrs group, 3. Paraquat 96 hrs

였을 때, paraquat 투여 후 초기 24시간 반응군의 무기인 혈중농도 평균치는 8.9 mg/dl로 나타났으며, 대조군에 비하여 111.3%의 혈중농도 증가반응을 보였다. 한편 paraquat 투여로 20% 쥐들이 죽어가는 생존극한상태 (4일: 96시간)에서 나타난 무기인 (Ino-Pi) 혈중농도 실험결과는 8.8 mg/dl로 나타나서, 대조군에 대비 111.0%의 증가를 보여서 공복상태에서도 11.0%의 혈중농도 실질증가를 보였다.

### 2. Paraquat 투여와 Calcium 혈중농도

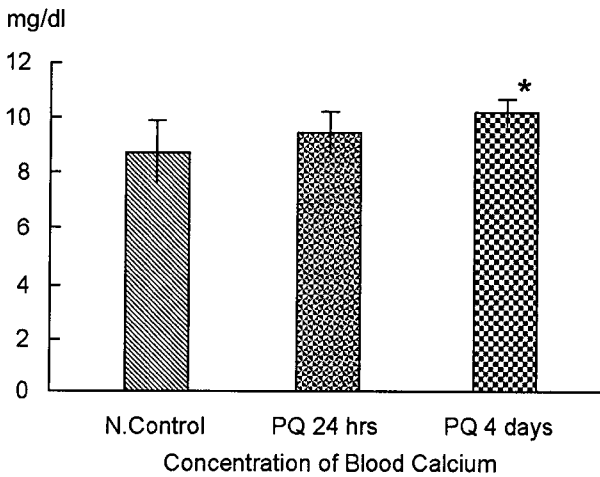
한편 Table 2와 Fig. 2에서 보는 칼슘의 정상대조군의 혈중농도는 9.5 mg/dl를 나타나 보였다. 정상대조군 혈중농도 9.5%를 100%로 할 때, 산화제 paraquat를 투여한 후 쥐의 혈액내 칼슘 혈중농도는 24시간군 초기반응에서는 9.9 mg/dl를 나타내 보였다.

이 결과는 정상대조군에 비하면 24시간 공복상태이면서도 혈중농도가 104.5%로 4.5%의 실질증가를 보였다. t-검정에서는 P<0.05 보다 낮지 않은 유의성 변화를 찾아 볼 수 없어서 통계학적 의의를 갖지 못하는 변화였다. 그러나 PQ 투여 4일

**Table 2.** Affection of blood calcium concentration after injection with paraquat in peritoneal cavity of rats

Test group	Blood calcium (mg/dl)		
	Normal control	PQ 1 day	PQ 4 day
Mean	9.5±1.2	9.9±0.51	10.45±0.37
Effect	100%	104.5%	109.5%
t-Test		<i>P</i> >0.05	<i>P</i> <0.05*

\**P*<0.05, \*\**P*<0.01, compare with control or standard  
\*Percentage against control group statistical significance (*P*-value)



**Fig. 2.** Effect of ginseng extracts on blood calcium after inject with paraquat in peritoneal cavity of rats.  
1. Normal control, 2. Paraquat 24 hrs group, 3. Paraquat 4 days

간의 공복상태의 생존극한상태에 빠진 쥐들의 혈액내 칼슘 혈중농도는 10.4 mg/dl로 나타남으로서 혈중농도 변화에 있어서 *P*<0.05여서 통계학적 의의를 나타낸 유의성 변화를 갖는 증가반응을 보였다.

### 3. Paraquat 투여와 Alkaline phosphatase 활성도

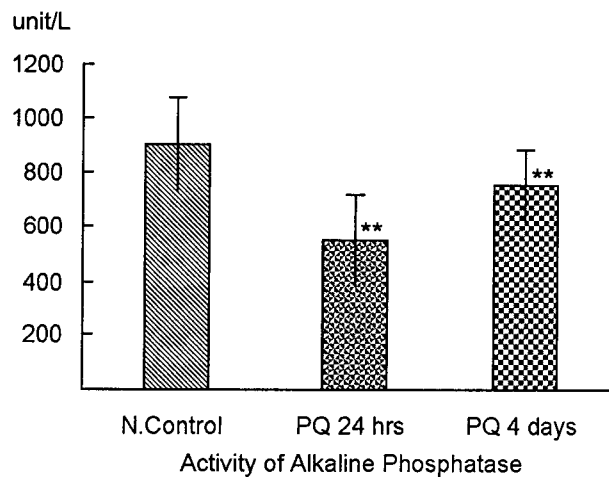
한편 Table 3에서 보는 Alkaline phosphatase (ALP) 효소는 칼슘이나 무기인과 같은 비금속 무기이온이 치아나 뼈와 같은 골수 경조직 구성에 물질 형성이나 분해작용을 촉매하는 효소단백질로서 정상대조군이나 paraquat 투여군의 혈중활성도는 Table 3와 같이 나타나 보였다.

혈액내 알칼리성 인산화효소 (Alkaline phosphatase: ALP) 효소활성도 정도는 정상대조군에서는 991 unit/L을 보였다. 정상대조군의 ALP 활성도 991 unit/L를 100%로 하였을 때, paraquat 투여 24시간군 초기반응에서는 629±0.51 unit/L 이어서, 정상대조군에 비하여 약 37%나 활성도 억제가 일어난 63% 효소활성도 만을 보였다. 이 결과는 t-검정에서 *P*<0.01 보다 낮아 높은 유의성 변화를 보여서 통계학적 의의가 높은

**Table 3.** Affection of activity of Alkaline phosphatase injection with paraquat in peritoneal cavity of rats

Test group	Alkaline phosphatase (unit/L)		
	Normal control	PQ 1 day	PQ 4 day
Mean	991±106	629±91	792±85
Effect	100%	63.5%	80.0%
t-Test		<i>P</i> <0.01**	<i>P</i> <0.01**

\*Percentage against control group statistical significance (*P*-value)  
\**P*<0.05, \*\**P*<0.01, compare with normal control



**Fig. 3.** Effect of ginseng extracts on activity of Alkaline phosphatase after injection with paraquat in peritoneal cavity of rats.  
1. Normal control, 2. Paraquat 24 hrs group, 3. Paraquat 4 days

억제를 보여서 ALP 효소가 paraquat에 민감한 활성억제반응을 보였다. 반면에 PQ 투여 생존극한상태 4일군에서 ALP 활성도는 792±80 unit/L를 보여서, 초기반응에서 보다는 오히려 높았다. t-검정에서 *P*<0.01 보다 낮아 효소활성도에 유의성 있는 억제변화를 보였으며, 통계학적 의의도 높은 변화를 보였다. 이 같은 ALP 효소활성도는 paraquat에 대하여 대단히 민감한 반응으로 억제되는 결과를 볼 수가 있었다.

## 고 찰

Paraquat (N,N'-dimethyl-4,4'-bipyridinium-dichloride=PQ)<sup>4,9)</sup>는 methyl biogen이란 물질로 분자내에 chloride (Cl)가 2분자를 갖고 있어 철 (Ferric)과 Fenton 반응<sup>16)</sup>으로 독성이 많은 유리산소 (Oxizne free radical)<sup>3,7,16)</sup>를 많이 생성하여 산소를 이용하는 생물체내에서 지질과산화물을 자극하여 노화를 촉진하고, 효소활성을 억제하며, 신경조직에 기능장애를 일으키며, DNA의존성 단백질합성 장애를 일으켜 식물체를 고사시키고, 암 발생율을 증가시킨다는 여러 학설들이 제기되어온 물질이

다<sup>25)</sup>. 이같은 성질을 가진 PQ 물질을 190±10 gm Sprague-Dawley 쥐 체중 kg당 40 mg 반치사량 (LD<sub>50</sub>)을 복강내에 투여하였다. 이때 쥐들은 2시간 내에 모든 활동과 식이를 멈춘 채 상지척추부 폐에서 격렬한 경련성 호흡반응을 볼 수 있었고, 3~4일간 지속하다가 20% 쥐들이 죽어 가는 생존극한상태에서 혈액을 채취하였고, 이 검체로 혈청내 칼슘 (Ca<sup>2+</sup>)과 무기인 (Ino-Pi) 혈중농도와 alkaline phosphatase (ALP) 활성도를 측정하였다.

Table 1에서 무기인 (phosphorus: Ino-Pi)<sup>19,21)</sup>은 알카리 비급속 물질로서 대조군 혈중농도는 8.0 mg/dl이었다. 그러나 paraquat (PQ) 투여 24시간 후 초기반응에는 8.9±0.1 mg/dl로 혈중농도가 상승되었으며, 대조군보다 111.3%로 11.3%의 실질증가를 보였고, t-검정에서 P<0.05여서 통계학적 의의를 보인 변화를 보였다. 또 4일 극한상태실험군은 8.8±0.42 mg/dl로서 11.0%의 실질증가를 보였으며, t-검정에서 P<0.05 보다 낮은 유의성 변화를 보여 통계학적 의의를 보였다. 이 같은 실험결과로 무기인 (Ino-Pi)은 PQ 투여 24시간 초기반응 혈중농도가 최고치로 민감한 반응을 보였는데 이는 무기인이 PQ 독성에 대한 PQ-Pi 이온결합 중화반응을 일으켜서 체외배설이 촉진되려는 것으로 판단되며, 시간이 경과된 극한상태에서는 초기반응 수치가 보다 높아질 것으로 예측하였으나 실제로는 8.9 mg/dl로 동일한 혈중농도를 보인 것은 더 높아질 수 없는 신역치라는 것을 예측케 하였다.

한편 Table 2에서 보는 칼슘 (Ca<sup>++</sup>)<sup>13,22)</sup>의 대조군 혈중농도는 9.5±0.3 mg/dl로 분석되었다. PQ 투여 24시간 후 혈중농도는 9.9±0.5 mg/dl를 보였으며, 대조군에 비하여 4.5%의 실질증가를 보였고, t-검정에서 P>0.05 보다 높아 통계학적 의의를 갖지 못하는 변화를 보였다. 그러나 4일간의 공복 극한상태에서도 10.4±0.37 mg/dl로 대조군에 비하여 10.4%의 실질증가를 보였으며, 이는 t-검정에서 P<0.05 보다 낮은 변화를 보여 통계학적 의의가 있는 변화로 조사되었다. 칼슘 (Ca<sup>2+</sup>)의 혈중농도 10.4±0.37 mg/dl는 더 높을 수 없는 것은 신역치라는 것을 알 수 있었다. 칼슘의 혈중농도 상승정도는 무기인보다 빠른 반응으로 혈중농도를 상승시켰다.

또 Table 3에서 Alkaline phosphatase (ALP)<sup>11,15,24)</sup>의 대조군 활성도는 991 unit/L을 보였다. 반면에 PQ 투여 24시간 초기 반응에서 629 unit/L로 낮아졌으며, t-검정에서 P<0.001 보다 낮은 유의성을 볼 수 있어서, 통계학적 의의가 높은 변화임을 보였다. 한편 극한상태 4일치는 792 unit/L로 분석되어서, t-검정에서도 P<0.001 보다 낮아진 변화를 보여, 통계학적 의의도 높은 실험변화라고 판단되었다. ALP 효소는 그 분자구조에 아연 (Zn<sup>2+</sup>)이 자리하고 있으며, 활성인자로는 마그네슘 (Mg)의 도움을 받는 것으로 알려진 ALP 효소는 활성도가 민감하고 빠른 억제를 보였다.

Table 1, 2에서 이들 관계물질들은 4일간의 식이를 금한

공복상태에서도 11% 가까운 혈중농도 물질증가는 PQ이온의 독성을 억제하기 위해서는 PQ이온 독성작용 불활성 중화반응으로 신속히 체외배설량을 증가시켜야 하는 생리반응이 최우선 반응이라고 생각되며, 그러기 위해서는 기존 혈액내 농도만으로는 해결할 수 없는 혈중농도 진공상태를 매우기 위해서는 생체 인지반응을 통해서 경조직에 저장된 칼슘이나 무기인의 풀 (pool) 조직으로부터 유리되어져야만 하겠기 때문이다. 이 과정에서 PQ 분자는 분자내에 Cl과 같은 음이온이 있어서 생체방어를 위한 상대 이온기와 중화반응을 통해서 체외배설을 최우선하는 반응으로서 판단되며, 다 소모해버린 혈액내 관계물질의 진공상태를 매우기 위해서는 경조직으로부터 강요된 대량의 수평이동이 없고서는 극한상태를 극복할 수 있는 방법이 없기 때문이며, 그렇지 않고는 20% 쥐들이 죽는 죽음을 받아드릴 수밖에 없기 때문이다. 이렇게 살아 남은 쥐들은 극한상태 4일을 넘기면서 허기진 체내 관계물질을 보충하기 위해서 왕성한 식욕을 과시나 하듯이 갑작스런 생리적 반응을 보였기 때문이다. 이 과정에서 무기인은 칼슘보다 더 적극적이고 민감한 반응을 보였으며, 이런 관계를 감시하는데 있어서는 ALP 효소활성도는 중요한 관찰점으로 생각되었다.

## 참 고 문 헌

- 1) Ahmed S, O'Neill KD, Hood AF, Evan AP and Moe SM (2001): Calciphylaxis is associated with hyperphosphatemia and increased osteopontin expression by vascular smooth muscle cells. *Am J Kidney Dis*, **Jun**; **37(6)**: 1267-1276.
- 2) Barnard-JW, Womack-WA, Smith-SM, Engerson-TD and Taylor-AE (1992): J-Appl Physiol: Lung protection against paraquat is calcium dependent. *Feb*; **72(2)**: 498-504.
- 3) Burkitt MJ, Kadiiska MB, Hanna PM, Jordan SJ and Mason RP (1993): Electron spin resonance spin-trapping investigation into the effects of paraquat and desferrioxamine on hydroxyl radical generation during acute iron poisoning. *Mol-Pharmacol*, **Feb**; **43(2)**: 257-263.
- 4) Bus JS, Cagen SZ, Olgard M and Gibson JE (1976): A mechanism of paraquat toxicity in mice and rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, **35**: 501.
- 5) Bus JS, Aust SD and Gibson JE (1974): Superoxide and singlet oxygen-catalyzed lipid peroxidation as a possible mechanism for paraquat toxicity. *Biochem Biophys Res Commun*, **58**: 749-755.
- 6) Bushinsky DA (2001): Dysregulation of the calcium, phosphorus, parathyroid hormone, and vitamin D axis: what are the causes and risks? *Am J Kidney Dis*, **Jun**; **37(6)**: 1310-1312.

- 7) Demple B and Halbrook J (1983): Inducible repair of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. *Nature (London)*, **304**: 466.
- 8) Ferreira A, Ghazali A, Galvao J, Souberbielle JC, Jehle PM, Mohan S, Descamps-Latscha B, Oprisiu R, Fournier A and Druke T.B.L (2001): Effect of type of dialysis membrane on bone in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*, **Jun**; **16(6)**: 1230-1238.
- 9) Fuke C, Ameno K, Ameno S, Kiriu T and Shinohara T (1993): In vitro studies of the metabolism of paraquat and diquat using rat liver homogenates--isolation and identification of the metabolites of paraquat and diquat]. *Nippon-Hoigaku-Zasshi*, **Feb**; **47(1)**: 33-45.
- 10) Jackson JA, Akay V, Franklin ST and Aaron DK (2001): The effect of cation-anion difference on calcium requirement, feed intake, body weight gain, and blood gasses and mineral concentrations of dairy calves. *J Dairy Sci*, **Jan**; **84 (1)**: 147-153.
- 11) Jurima-Romet M and Shek PN (1990): Biochemical changes in rat lung during acute paraquat intoxication. Biosciences Division, Defence and Civil Institute of Environmental Medicine, North York, Ontario. *Biomed Environ Sci*, **Sep**; **3(3)**: 343-352.
- 12) Keith DS (2001): Re-evaluating our approach to calcium and phosphorus management in dialysis patients. *Am J Kidney*, **37(6)**: 1331-1333.
- 13) Keith DS (2001): Re-evaluating our approach to calcium and phosphorus management in dialysis patients. *Am J Kidney Dis*, **Jun**; **37(6)**: 1331-1333.
- 14) Kojima-S, Miyazaki-Y, Honda-T, Kiyozumi-M, Shimada-H and Funakoshi-T (2001): Protective effects of dextran sulfate and polyvinyl sulfate against acute toxicity of paraquat in mice. *Biochem*, **Nov**; **64**: 2316-2319.
- 15) Kui-Nyung Yi, MPH, Chong soon Rhee (1996): Clinical pathology file text book. (Calcium and Ino-phosphorus). Euihak Munwhasa Co. Seoul, Korea. p. 229-233., p. 300-309.
- 16) Kukielka E and Arthur IC (1994): Feeritin stimulation of hydroxyl radical production by rat liver nuclei. *Arch of Biochem Biophi Vol*, 308, No.1, Jan., pp70-77.
- 17) Laquerriere P, Kilian L, Bouchot A, Jallot E, Grandjean A, Guenounou M, Balossier G, Frayssinet P and Bonhomme P (2001): Effect of hydroxyapatite sintering temperature on intracellular ionic concentrations of monocytes. *J Biomed Mater Res*, **May**; **1**; **58(3)**: 238-246.
- 18) Lugon JR, Andre MB, Duarte ME, Rembold SM and Cruz E (2001): Effects of in-center daily hemodialysis upon mineral metabolism and bone disease in end-stage renal disease patients. *Sao Paulo Med J*, **May**; **119(3)**: 105-109.
- 19) Liu DM, Troczynski T and Tseng WJ (2001): Water-based sol-gel synthesis of hydroxyapatite: process development. *Biomaterials*, **Jul**; **22(13)**: 1721-1730.
- 20) Masuyama R, Uehara M and Suzuki K (2000): High Pi diet induces acute secretion of parathyroidhormone without alteration of serum calcium levels in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, **Nov**; **64(11)**: 2316-2319.
- 21) Niedhart C, Maus U, Redmann E and Siebert CH (2001): In vivo testing of a new in situ setting beta-tricalcium phosphate cement for osseous reconstruction. *J Biomed Mater Res*, **Jun**; **15**; **55(4)**: 530-537.
- 22) Nordin B.E.C editor (1976): Calcium, phosphorus, magnesium, metabolism: physiology and diagnostic procedure, Edinburgh, Churchill livingston.
- 23) Pontier C, Viana M, Champion E, Bernache-Assollant D and Chulia D (2001): About the use of stoichiometric hydroxyapatite in compression- incidence of manufacturing process on compressibility. *Eur J Pharm Biopharm*, **May**; **51(3)**: 249-257.
- 24) Rogister TC, McLean FM, Low MG and Wuthier RE (1986): Roles of alkaline phosphatase and alibile internal mineral in matrix vesicle-mediated calcification. *J Biol Chem*, **Jul**; **15**: **261(20)**: 8354-8360.
- 25) Straub B, Muller M, Schrader M, Heicappell R and Miller K (2001): Related Articles: Osteoporosis and mild metabolic acidosis in the rat after orchietomy and their prevention: should prophylactic therapy be administered to patients with androgen deprivation? *J Urol*, **May**; **165(5)**: 1783-1789.
- 26) Yamada-Y, Akahori-F, Masaoka-T, Sirai-M and Kohzaki-K (1993): Chlorpromazine and paraquat poisoning. *Vet-Hum-Toxicol*, **Apr**; **35(2)**: 112-115.
- 27) Yoshida S, Takano Y, Moriwake Y, Tohno Y, Masuda M, Tohno S, Minami T, Yamasaki M, Morikawa H and Yuri K (2000): Increases of calcium and magnesium and decreases of phosphorus and iron with aging in human uterine tubes. *Biol Trace Elem Res*, **Apr**; **80(1)**: 13-22.