

## Effects of Chlorella Dietary Supplementation on Bone Biochemical Markers of Turnover in Postmenopausal Women

Yong-Ho Kim<sup>1†</sup>, Yoo-Kyeong Hwang<sup>1</sup>, Jung-Min Hwang<sup>1</sup>, Hee-Kyung Seoung<sup>2</sup> and Dong-Uk Kim<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomedical Laboratory Science, Inje University, Kimhae 621-749,

<sup>2</sup>Department of Clinical Pathology, Sangge Paik Hospital, Seoul 139-707,

<sup>3</sup>Department of Internal Medicine, Pusan Paik Hospital, Inje University, Pusan 633-165

Currently bone biochemical markers are considered to be the best indicators of present and the future state of bone turnover. A recent study has reported that chlorella increases the bone mineral density (BMD) on postmenopausal women, but presently there are no studies on bone biochemical markers treated with chlorella dietary supplementation. The purpose of the present study was to assess the bone biochemical markers for the short term and long term treatment groups, and non-treatment group as a control. Twenty two postmenopausal woman were treated for four months and eighteen for one year with 4 gm of chlorella dietary supplementation per day, and then assessed bone biochemical markers from serum and urine samples. Bone turnover rates calculated with Osteocalcin (OC), bone specific alkaline phosphatase (BAP) as a bone formation markers and deoxypyridinoline (Dp), cross-linked N-telopeptides of type I collagen (NTx) as a bone resorption markers, showed  $113 \pm 87\%$  for control group,  $61 \pm 11\%$  for short term treated group and  $190 \pm 101\%$  for long term treated group. We conclude that chlorella dietary supplementation enhances the bone formation, and NTx as a single markers, OC/Dp as a single markers of bone turnover rate were very useful tools for determine the effectiveness of chlorella dietary supplementation for the postmenopausal women.

**Key. Words:** Chlorella, Postmenopausal women, Bone biochemical marker, Dietary supplementation

### 서 론

골다공증이나 골절의 위험성을 예측하기 위한 골상태의 평가는 폐경후 여성의 건강관리에 중요하다<sup>1)</sup>.

골상태의 평가 방법으로 현재 일반적으로 이용되어지고 있는 방법으로는 동위원소 칼슘 역동학 (calcium kinetics), 생검 표본을 이용한 조직형태학적 평가, 정량적 골밀도 측정 및 생화학적 골 표식자를 들 수 있으며, 평가시점에서 골량을 정밀하게 반영시킬 수 있는 분석법은 정량적인 골밀도의 측정이 매우 유효하다<sup>2,4)</sup>. 그러나 골량의 형성에는 상당한 기간이 필요하므로 정량적인 골밀도 측정 결과는 골밀도의 측정 시점으로부터 상당 기간 이전의 골상태에 대한 반영이라고 볼 수 있다. 이에 비하여 생화학적 골 표식자는 골상태에 대한 현재, 미래에 대한 평가 및 예측 지표로 유용하다<sup>3,14)</sup>.

한편, 녹색식물군에 해당하는 미세 녹조류인 클로렐라 투여가 폐경후 여성들의 골밀도를 현저하게 증가시켰다는 연구 보고가 있다<sup>11)</sup>. 골밀도 측정에 의한 평가는 클로렐라를 복용하고 있는 시점에서의 골상태에 대하여 정확하게 반영되지 못하기 때문에 현재의 상태에 대한 평가 및 미래에 대한 예측을 위하여 생화학적 골 표식자에 대한 분석 결과가 필요하나 아직 이에 대한 연구 보고는 없다.

또한 클로렐라 투여에 의한 생화학적 골 표식자의 동향에 대한 연구는 폐경후 여성, 골다공증 환자의 골상태에 대한 유용한 정보를 제공하여 골다공증의 예방이나 치료에 대한 정보를 제공할 수 있을 것으로 본다.

저자 등은 폐경후 여성 40명을 대상으로 단기, 장기 클로렐라 투여군으로 나누어, 클로렐라를 전혀 복용한 경험이 없는 대조군과 비교하여 클로렐라 투여 효과를 생화학적 골 표식자를 이용하여 측정·평가하고자 실시하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 클로렐라

(주) 대상에서 암소 배양시켜 건강보조식품으로 제조한 정

\*논문 접수: 2003년 1월 5일

수정재접수: 2003년 2월 14일

†별책 요청 저자: 김용호, (우) 621-749 경남 김해시 어방동 607번지, 인제대학교 임상병리과

Tel: 055-320-3481, Fax: 055-334-3426

e-mail: mlskimyh@ijnc.inje.ac.kr

제를 공급받아 1일 4 gm씩 2회에 나누어 복용시켰다. 중군의 분리는 청정지역의 수개소 저수지에서 채취한 녹조류 함유액 1 ml를 120±5°C에서 10~15분 동안 살균된 50 ml의 분리용 액체배지 (포도당 1%, 제1인산칼륨 0.1%, 제2인산칼륨 0.1%, 황산마그네슘 0.2%, 황산제1철 0.001%, 구연산나트륨 0.1%, 요소 0.2%, pH 7.5)가 들어 있는 500 ml의 삼각후라스크에 접종하고 차광된 암배양 조건의 항온진탕기 내에서 분당 120회의 왕복진탕으로 7~10일간 30°C에서 배양 후, 이 배양액을 멸균된 한천 평판배지 (분리용 액체배지에 agar를 2% 첨가)에 희석도말하여 30°C에서 7~10일간 정치배양 후 집락이 크고, 진한 녹색을 나타내는 것을 선택하였다.

## 2. 연구 대상

### 1) 대조군

클로렐라를 전혀 복용한 경험이 없는 폐경후 여성 22명을 선정하였으며, 이들의 평균 폐경후 기간은 6년이었다. 선정 조건은 실험 성적의 신뢰성을 높이기 위하여 실험 기간 중 매일 4시간 이상의 규칙적인 활동, 적어도 하루 한끼 이상의 식사는 동일한 식단으로 하며, 하루 중의 8시간 이상을 유사한 환경 조건에서 생활하고 임상적인 진단 결과 정상인 아들을 선정하였다.

### 2) 단기 실험군

대조군으로 선정된 클로렐라를 전혀 복용한 경험이 없는 폐경후 여성들에게 대조 자료로 필요한 관련 혈액, 뇨중의 생화학적 골 표식자를 측정한 후 클로렐라 복용지침대로 4개월 동안 클로렐라를 복용시켰으며, 이 기간 동안에는 특별한 칼슘제제, 골다공증 치료제를 복용하지 못하도록 지도하였고, 정기적인 임상진단을 실시하였다.

### 3) 장기 실험군

단기 실험군이 한시적인 일을 하는 직장인들로 구성되어 있기 때문에 수시 이직으로 인한 장기 실험이 불가능하였으며, 또한 생화학적 골 표식자 활성 변화는 비록 측정 대상이 바뀌더라도 측정시점에서 어떤 투여 시료에 대한 실험군의 현재 골대사에 대한 상태를 그대로 반영한다는 점을 참조로 하여, 단기 실험군과 다른 집단에서 클로렐라를 1년 이상 꾸준히 복용하였고 임상적인 진단 결과 건강하며, 1년 이내에 다른 질병 치료를 받았던 경험이 없는 폐경후 여성 18명을 무작위로 선정하여 장기 양성 대조군으로 하였다.

## 3. 생화학적 골생성 지표의 측정

Osteocalcin (OC)은 Osteocalcin/RMA kit (Biosource, Belgium)으로 측정하였다.

대조, 실험군의 시료는 채취 직후 각각 측정하였다. 시료 및 표준용액 50 µl씩 고정 항체가 coating된 시험관에 가한 다음, 다시 50 µl의 anti h-OST1125 (tracer)를 각 시험관에 모두

가한 다음 잘 혼합시켜 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 2시간 동안의 반응이 끝난 후 모든 시험관을 60초 동안 gamma counter로 total count를 실시한 다음, 시험관 내의 모든 액체를 제거시키고, 2.0 ml의 세정용액을 이용하여 세정한 다음 다시 60초 동안 동위원소 활성을 측정하였다.

Bone-specific alkaline phosphatase (BAP)의 측정은 Alkphase-B® (Metra Biosystem, INC, USA)로 하였다.

측정용 완충액 125 µl를 각 well에 가한 다음 시료, 대조 및 표준액 20 µl씩 가하고, 가볍게 혼합시켜 20~28°C의 실온에서 3시간 동안 반응시켰다. 1×세정용액 250 µl씩 가하여 세정하고 총 4회 세정시킨 후 150 µl working substrate를 가한 다음 실온에서 30분 동안 반응시켰다.

다시 100 µl 반응 정지액을 가한 다음 405 nm에서 흡광도를 구하였다.

## 4. 생화학적 골흡수 지표의 측정

Cross-linked N-telopeptides of type I collagen (NTx)는 Osteomark® (PN9009, Belgium) ELISA kit을 이용하여 방부제를 가하지 않은 아침 첫 뇨중에서 측정하였다.

25 µl의 시료, 대조 및 표준액을 microwell에 취한 다음 200 µl의 conjugate 용액을 넣고 잘 혼합 후 실온에서 90±5분 동안 반응시켰다. 350 µl의 세정액으로 5회 세정한 다음 충분히 수분을 제거시키고, 발색액을 사용하기 10분 전에 완충용액으로 1:101로 희석시킨 발색/완충용액을 200 µl씩 가한 다음 실온에서 5분 동안 방치 후 450~630 nm에서 흡광도를 구하였다.

측정 결과는 nM BCE (Bone Collagen Equivalents)/mM Creatinine값으로 나타내었다.

Deoxypyridinoline (Dp)은 Pylinks (Metra Biosystem, USA) kit을 이용하여 분석하였다. 뇨를 assay buffer로 1:10으로 희석하고 희석된 뇨 검체를 50 µl씩 monoclonal mouse anti-D-PYD를 흡수시킨 well에 분주하였다. 각 well에 D-PYD alkaline phosphatase 100 µl를 가한 다음 2~8°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 세정액으로 각 well을 세정한 후 p-Nitrophenyl Phosphate 150 µl를 가하였다. 20~28°C의 실온에서 60분 동안 반응시킨 후 반응 정지액 1 N NaOH 100 µl씩 분주하고 405 nm에서 흡광도를 구하였다. 뇨의 농도 변화에 의한 영향을 배제하기 위하여 NTx와 같이 D-PYD 결과 (nM)를 각 검체의 Creatinine값 (mM)으로 교정하여 결과는 nM/mM Creatinine으로 나타내었다.

## 결 과

대조 및 단기 실험군의 연령적 분포는 62±4세이었으며 골다공증의 위험인자와 관련된 운동, 식이 및 생활습관 등은

**Table 1.** Means (SD) of biochemical markers of bone turnover in control and subjects in relation to treatment with chlorella

Biochemical markers	Control (n=22)	Short term subject <sup>a</sup> (n=22)	Long term subject <sup>b</sup> (n=18)
Osteocalcin (ng/ml)	5.05±3.6	8.84±5.44 ( <i>P</i> <0.005)	10.36±4.86 ( <i>P</i> <0.18)
Bone ALP* (U/L)	27.2±7.8	37.0±11.8 ( <i>P</i> <0.005)	22.1±5.1 ( <i>P</i> <0.000)
N-telopeptide** (nM BCM/mM Cre)	35.86±26.21	73.93±38.58 ( <i>P</i> <0.002)	15.92±10.56 ( <i>P</i> <0.000)
Deoxypyridinoline (nM/mM Cre)	5.78±1.59	5.65±1.22 ( <i>P</i> <0.865)	5.22±2.05 ( <i>P</i> <0.210)

\*ALP: Alkaline phosphatase, \*\*BCE/Cre: Bone collagen equivalents/Creatinine, <sup>a</sup>: Short term subject VS Control, <sup>b</sup>: Long term subject VS Short term subject

**Table 2.** Mean rates of change of the bone formation calculated from biochemical markers of bone turnover in control and subjects in relation to treatment with chlorella

Rates of change (%)	Control (n=22)	Short term subject (n=22)	Long term subject (n=18)
OC/Dp	95±71	155±89	211±90
BAP/Dp	484±139	680±239	473±174
OC+BAP/Dp	289±82	422±143	342±119
OC/NTx	30±46	12±7	86±60
BAP/NTx	179±276	54±12	194±132
OC+BAP/NTx	105±156	33±6	140±94
OC+BAP/Dp+NTx	113±87	61±11	190±101

OC: Osteocalcin, BAP: Bone Alkaline Phosphatase, Dp: Deoxypyridinoline, NTx: N-telopeptide

비교적 잘 지키고 있었다. 장기 실험군의 평균 연령은 59±5세이었으며 대조, 단기군 및 장기군의 대상자들은 임상적 진단 결과는 건강한 사람들이었다.

### 1. 생화학적 골형성 표식자

대조군의 OC의 평균 측정값은 5.05±3.61 ng/ml로써 참조값의 범위인 5.0~25 ng/ml에 들어가지만, 4개월 동안 클로렐라를 복용시킨 결과 클로렐라 복용 전에 비하여 155% 증가된 8.84±5.44 ng/ml, 1년 이상 클로렐라를 복용한 실험군은 단기 실험군에 비하여 117%가 증가된 10.36±4.86 ng/ml을 보였다.

BAP는 대조군에서 27.2±7.8 U/L이었으며 클로렐라를 4개월 동안 복용한 실험군에서는 대조군에 비하여 136% 증가된 37.0±11.8 U/L이었으며 클로렐라를 1년 이상 장기 복용한 실험군에서는 단기 실험군에 비하여 41% 감소된 22.1±5.1 U/L을 보였다.

### 2. 생화학적 골흡수 표식자

대조군의 NTx는 35.86±26.21 nM BCM/mM Creatinine을 보여 각 대상자간 측정값의 변화가 매우 심하였고, 단기 복용군은 대조군에 비하여 206% 증가된 73.90±38.58 nM BCM/

mM Creatinine을 보였으며, 장기 실험군은 단기 실험군에 비하여 79% 감소된 15.92±10.56 nM BCM/mM Creatinine값을 보여 가장 현저하게 변동된 측정값을 보였다.

Dp는 대조군에서 5.78±1.59 nM/mM Creatinine이었으며 단기 실험군은 대조군에 비하여 약 3% 감소된 5.65±1.22 nM/mM Creatinine이었고, 장기 실험군은 단기 실험군에 비하여 약 8% 감소된 5.22±2.05 nM/mM Creatinine값을 보였으며 개인간 측정 변이가 가장 적고 클로렐라 복용 기간에 따라 안정적으로 감소된 값을 보였다 (Table 1).

### 3. 생화학적 골 표식자로부터 계산된 골전환율

대조군의 생화학적 골흡수 표식자인 Dp, NTx와 OC를 비교해 보면 각각 95±71%, 30±46%의 골흡수 표식자의 활성이 높아 골흡수 활성이 높은 골전환율이 활발한 것으로 나타났다. 그러나 OC+BAP/Dp+NTx의 비율은 113±87%를 보여 OC에 비하여 BAP의 활성이 큰 값을 보이는 것을 알 수 있으며 골형성력은 매우 약한 것을 알 수 있었다.

클로렐라를 4개월 동안 복용한 단기 실험군에서는 Dp를 제외한 모든 생화학적 골흡수, 골형성 표식자의 활성이 크게 증가되어 대조군에 비하여 전체적인 골전환율은 61±11%를 보여, 측정값 사이의 표준편차가 크게 줄었다. 단기 실험군에 대하여 Dp를 분모로 할 경우 모든 골형성 표식자는 양의 값을 가지게 되나, 가장 높은 활성 증가를 보인 NTx를 분모로 할 경우 모든 골형성률은 음의 값을 보여 OC 12±7%, BAP 54±12%를 나타내었다. 장기 실험군에서는 OC는 계속 증가된 상태를 보인 반면 다른 생화학적 골 표식자는 모두 감소되었다. OC에 대한 Dp, NTx는 각각 단기 실험군에 비하여 211±90%, 86±60%를 보였으며, 모든 생화학적 골 표식자를 고려한 골전환율은 190±101%를 보여 대조 및 단기 실험군에 비하여 크게 증가되었다 (Table 2).

## 고 찰

폐경후 여성들은 호르몬 대사의 변화로 인하여 골밀도 저하가 현저하게 진행된다<sup>9)</sup>. 골밀도의 심각한 저하로 인한 골다공증을 예방, 치료하기 위한 약물로 현재 이용되어지고 있

는 종류로는 여성호르몬, Calcitonin, Bisphosphonate, Calcium, Vitamin-D 제제와 같은 골흡수 억제제와 불소제제, 부갑상선 호르몬과 같은 골형성 증진제제가 있다<sup>16)</sup>. 이러한 약제의 사용에 따른 효과를 판정하기 위하여는 정량적 골밀도 측정에 비하여 10배 정도 예민하게 골상태가 반영되고, 3~6개월 이내에 약효 판정이 가능한 생화학적 골 표식자가 권장되고 있다<sup>7,13)</sup>. 한편 녹조식물에 해당되는 클로렐라 복용에 따른 골밀도 증가가 연구 보고되었지만, 이는 이미 상당 기간 이전의 골대사 변화에 의한 것이므로 클로렐라 복용시점에서 보다 예민하게 골상태의 변화를 반영하거나 예측할 수 있는 생화학적 골 표식자에 대한 연구가 필요하다. 본 연구에서 클로렐라를 단, 장기간 복용시킨 그룹에 대하여 임상적으로 흔히 이용되고 있고, 골상태의 변화를 빠르게 반영할 수 있는 생화학적 골 표식자 즉, 골형성 세포인 BAP, OC 그리고 골흡수 지표인 NTx, Dp를 이용하여 분석하였다<sup>8)</sup>.

클로렐라를 복용한 경험이 없는 폐경후 여성 대조군의 생화학적 골 표식자에 대한 분석 결과를 상호 비교한 결과 높은 활성을 보인 순서는 NTx, BAP, Dp와 OC순으로 나타났다. 또한 측정된 총 골흡수 지표에 대하여 총 골생성 지표의 비율로 계산한 결과 113±87%로 비교적 높은 골전환율을 보였으며 이는 폐경 1년 이후에는 골흡수율이 골형성률 보다 높다고 한 Gorai 등의 연구 보고<sup>7)</sup>와 일치하였다. 4개월 동안 클로렐라를 복용시킨 결과 대조군에 비하여 Dp만 2.3% 감소되었고 나머지 NTx, OC, BAP의 순으로 크게 활성이 증가되어 높은 골전환율을 보였다. 즉 골흡수 지표와 골형성 지표의 변화율은 다르지만 같은 경향으로 변화되어 감을 보여 높은 골형성력을 보이고 있다<sup>10)</sup>. 그러나 골흡수 지표인 NTx의 활성이 가장 두드러지게 높아 전체적인 골전환율은 61±11% 나타내었다. 이는 대조군에 비하여 안정적인 골전환율을 보이고 있으며 골흡수를 반영하는 생화학적 골 표식자의 급격한 증가는 골형성력을 반영시키기도 하며<sup>11)</sup>, 대조군과 단기 복용군은 동일한 대상임에도 불구하고 측정 대상간의 표준 편차는 ±11%로 대조군 ±87%에 비하여 측정자 개인간의 활성 차이가 현저하게 좁혀진 현상을 보여 모든 실험 대상자의 클로렐라 복용 후 생체 내 골전환율의 변화 경향이 유사함을 알 수 있다.

클로렐라를 1년 이상 장기 복용한 실험군에 대하여 생화학적 골 표식자를 측정해 본 결과 대조, 단기 복용군에 비하여 OC만을 제외한 NTx, Dp, BAP는 크게 활성이 저하되었고, 특히 골흡수 지표인 NTx 활성 저하가 현저하여 총 골전환율은 190±101%로 클로렐라 단기 복용군에 비교하여 현저하게 증가되었다. Dp는 클로렐라 복용 기간에 따라서 점차 감소되는 경향을 뚜렷이 안정적으로 보여주었다. 이는 Dp가 NTx 및 Cross Laps (CTX)에 비하여 가장 일관되고 신뢰성 있는 결과를 제공한다는 Hesley<sup>8)</sup>, Hsin-shan<sup>10)</sup> 등의 연구 결과와도 유

사한 경향을 나타내었다.

Dp를 골흡수 지표로 하여 단기, 장기군의 골형성력을 비교하면 OC에서는 단기, 장기 즉 클로렐라 복용 기간이 증가됨에 따라서 꾸준히 증가되고 있는 경향을 보인 반면, BAP에 대하여는 단기 복용군에서는 급격하게 증가를 보이다가 장기 복용군에서는 급격하게 떨어져 대조군의 활성 보다 저하된 결과를 보였다. 이에 비하여 골다공증 치료약제의 치료 효과 평가에 유용하다고 보고된 NTx는 클로렐라 복용 기간에 따라서 가장 크고 현저한 변화를 보여서 골다공증 치료약제인 alendronate에서 보인 경향과 유사한 경향을 보였다<sup>1)</sup>. 따라서 NTx는 클로렐라 복용 후에도 골전환율을 평가할 수 있는 좋은 마커로 이용될 수 있음을 보였다.

또한 폐경후 골다공증의 치료에서 골흡수 지표가 골형성 지표 보다 먼저 회복된다고 한 연구 결과와도 일치하였다<sup>9)</sup> NTx를 분모로 한 골형성력 평가에서 OC에서는 클로렐라 단기 복용군에서는 대조군에 비하여 50% 이하로 감소되었다가 장기 복용군에서는 다시 대조군에 비하여 3배 가까운 증가율을 보였다.

BAP에서는 단기 복용군에서는 3배 이하로 감소되었다가 장기 복용군에서는 대조군에 비하여 8% 정도 증가된 골형성력을 보였다. 클로렐라 복용 전후 단, 장기 실험군에 대한 생화학적 골 표식자 분석에서 보여준 바와 같이 생화학적 골 표식자 측정은 골다공증 치료를 위한 약제 선정시 매우 유용하다고 한 Kleerekoper의 연구 결과와 같이 클로렐라 복용 효과 판정에도 매우 유용한 정보를 제공할 수 있음을 알 수 있었다<sup>12)</sup>.

본 연구에 이용된 생화학적 골 표식자 4가지 중 한 종류를 이용한 클로렐라 복용 효과 판정에는 NTx가 가장 현저하고 유용한 정보를 제공할 수 있으며, 클로렐라 복용에 대한 골형성력의 평가에는 OC/Dp가 가장 안정적인 경향을 나타낼 수 있을 것으로 본다.

즉, 본 연구 결과에서도 BAP/Dp, OC/NTx 및 BAP/NTx는 모두 클로렐라 단장기 복용 후 심한 증감을 보인데 비하여 OC/Dp는 클로렐라 복용 기간에 비례하여 1년까지는 지속적으로 증가되는 경향을 보였다.

결론적으로 본 연구 결과 폐경후 여성들의 클로렐라 복용은 골형성력을 현저하게 높일 수 있고, NTx, OC/Dp와 같은 생화학적 골 표식자는 클로렐라 복용 효과를 단, 장기적으로 판정하는데 매우 안정적이고 유용한 정보를 제공할 수 있음을 밝혔다.

## 참 고 문 헌

- 1) Adami S, Passeri M, Ortolani S, Broggin M, Carratelli L, Caruso I, Gandolini G, Gnessi L, Laurenzi M and Lombardi

- A (1995): Effects of oral alendronate and intranasal salmon calcitonin on bone mass and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women with osteoporosis. *Bone*, **17(4)**: 383-390.
- 2) Anastasopoulou C and Rude RK (2002): Bone mineral density screening: Assessment of influence on prevention and treatment of osteoporosis. *Endocr Pract*, **8(3)**: 199-201.
  - 3) Arnaud CD (1996): Osteoporosis: using bone marker's for diagnosis and monitoring. *Geriatrics*, **51(4)**: 24-30.
  - 4) Bikle DD (1997): Biochemical markers in the assessment of bone disease. *Am J Med*, **103**: 427-436.
  - 5) Eastell R, Mallinak N, Weiss S, Ettinger M and Pettinger M (2000): Biological variability of serum and urinary N-telopeptides of type I collagen in postmenopausal women. *J Bone Miner Res*, **15(3)**: 594-598.
  - 6) Garnero P, Sornay-Rendu E, Chapuy MC and Delmas PD (1996): Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. *J Bone Miner Res*, **11(3)**: 337-349.
  - 7) Gorai I, Taguchi Y, Chaki O, Nakayama M and Minaguchi H (1997): Specific changes of urinary excretion of cross-linked N-telopeptide of type I collagen in pre-and postmenopausal women: correlation with other markers of bone turnover. *Calcif Tissue Int*, **60(4)**: 317-322.
  - 8) Hesley RP, Shepard KA, Jenkins DK and Riggs BL (1998): Monitoring estrogen replacement therapy and identifying rapid bone losses with an immunoassay for deoxypyridinoline. *Osteoporosis Int*, **18**: 159-164.
  - 9) Hidaka T, Hasegawa T, Fujimura M, Sakai M and Saito S (2002): Treatment for patients with postmenopausal osteoporosis who have been placed on HRT and show decrease in bone mineral density: effects of concomitant administration of vitamin K (2). *J Bone Miner Metab*, **20(4)**: 235-239.
  - 10) Hsin SJ, Ju SL, Bradley B, Matthew AS and Scott L (1997): Comparison of analytical performance and biological variability of three bone resorption assays. *Clinical Chemistry*, **43(9)**: 1570-1576.
  - 11) Kim YH, Hwang YK, Ko SM, Hwang JM, Seong HK and Kim DU (2002): An effect of dietary chlorella on bone mineral density in postmenopausal women. *J Biomed Lab Sci*, **8(4)**: 217-221.
  - 12) Kleerekoper M (1996): Biochemical markers of bone remodeling. *Am J Med Sci*, **312(6)**: 270-277.
  - 13) Lim SG (1994): Application and clinical trend of bone turnover markers. *K J Bone Metab*, **1**: 1-11.
  - 14) Philip DR and William K (1998): Rapid bone loss is associated with increased levels of biochemical markers. *J Bone Miner Res*, **13(2)**: 5-10.
-