

비스포스포네이트 관련
악골 괴사증 동물 모델 확립

연세대학교 대학원

치 의 학 과

장 효 원

비스포스포네이트 관련
악골 괴사증 동물 모델 확립

지도 차 인 호 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2014년 12월 10일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

장 호 원

장효원의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 차인호 

심사위원 김형준 

심사위원  

연세대학교 대학원

2014년 12월 일

감사의 글

무엇보다 지금의 저를 있게 해주신 사랑하는 부모님과 제 쌍둥이 동생에게 깊은 감사를 드립니다. 이 논문이 나오기까지 많은 지도 편달해주시고, 구강악안면외과 수련 기간 동안 많은 가르침을 주신 차인호 교수님께도 깊은 감사를 드립니다.

또한 구강악안면외과 의사로서의 열정과 학문에 대한 흥미를 주신 박형식 교수님, 이상휘 교수님, 김형준 교수님, 정영수 교수님, 강정완 교수님, 남웅 교수님, 정휘동 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 또한 이 논문이 있기까지 함께 의논해주고 같이 실험에 동참해주신 김진우 선생님께도 깊은 감사를 드립니다.

3년의 수련 기간 동안 함께 고생한 동기들, 박혜정, 박정현, 박진후, 백지웅을 비롯한 의국 선후배들에게도 감사의 마음을 전합니다.

항상 정진하는 자세로 공부하고 환자를 먼저 생각하는 구강악안면외과 의사가 되겠습니다. 감사합니다.

2014 년 12 월

장 효 원

차 례

차례	i
그림 차례	iii
표 차례	iv
국문요약	v
I. 서 론	1
II. 연구 대상 및 방법	3
1. 연구 대상	3
2. 연구 방법	3
3. 육안적 평가	6
4. 방사선학적 평가	6
5. 조직학적 평가	6
6. 이학적 평가	6
7. 통계 분석	7
III. 결 과	8
1. 육안적 소견	8
2. 방사선학적 소견	11
3. 조직학적 소견	14
4. 이학적 소견	17
5. 통계 분석 결과	18

IV. 고찰.....	20
V. 결론.....	27
참고문헌	28
영문요약	32

그림 차례

Figure 1. Time table of study	4
Figure 2. Clinical appearance of extraction sites on maxillary & mandibular ridge in rats	10
Figure 3. Radiographic examination of extraction sites on maxillary & mandibular ridge in rats	13
Figure 4. Incidence of ONJ lesion(%), experimental group.....	14
Figure 5. Histologic examination of extraction sites on maxillary & mandibular ridge in rats	16
Figure 6. CTX & TRACP 5b level between normal & BRONJ group	17
Figure 7. CTX & TRACP 5b level between normal & BRONJ group	18
Figure 8. Linear mixed test equation and Effect factor	19

표 차례

Table 1. Group information of BRONJ	4
Table 2. Clinical examination of extraction sites 2,4,8 weeks after extraction.....	8
Table 3. Radiographic examination of extraction sites 2,4,8 weeks after extraction.....	11
Table 4. Histologic examination of extraction sites 2,4,8 weeks after extraction.....	14

국문 요약

비스포스포네이트 관련 악골 괴사증 동물 모델 확립

골다공증 등에서 치료 목적으로 비스포스포네이트를 투여하며, 매우 드물지만 그 합병증으로 악골 괴사증이 유발되기도 한다. 본 연구의 목적은 Bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw(이하 BRONJ)의 발병기전, 치료 및 예방에 관한 연구의 기초를 마련하고자, BRONJ 동물 모델을 확립하고 이를 임상적, 방사선학적, 조직학적으로 검증하였다.

본 실험에 총 27마리의 쥐를 사용하였으며 3 그룹으로 나누었다. 4주 동안 매주 복막내 약물(saline, zoledronate, dexamethasone)을 투여하였다. 4번째 주사 후 3일 뒤 상하악 좌측 제1,2 대구치를 발거하였다. 발치 2, 4, 8 주 후 대조군은 3마리씩, 실험군은 2, 2, 5 마리씩 희생하였다. 모든 실험 동물은 희생 시키기 전에 육안적 관찰을 하였으며, 희생 시킨 후에는 표본을 방사선학적, 조직학적으로 BRONJ 진단에 합당한지 검증하였다. 그리고 희생 전 채취한 쥐의 혈액으로 C-terminal crosslinked telopeptide of Type I collagen(이하 CTX) 와 Serum tartrate-resistant acid phosphate(이하 TRACP 5b)를 분석하여 BRONJ와의 관계를 검증하였다.

본 실험을 통해 비스포스포네이트와 스테로이드 제제를 병용 투여한 쥐 모델은 BRONJ를 발생시킬 수 있는 믿을 수 있고 재현 가능한 모델이며, BRONJ의 병태생리를 이해하고 진단과 치료에 도움이 될 수 있는 생체 표지자를 발굴하는데 유용한 동물 모델로 이용이 가능할 것으로 사료된다.

핵심되는 말 : 비스포스포네이트, 악골 괴사증, BRONJ, 동물 모델

비스포스포네이트 관련 악골 괴사증 동물 모델 확립

< 지도 교수 : 차 인 호 >

연세대학교 대학원 치의학과

장 효 원

I. 서 론

비스포스포네이트(Bisphosphonates, 이하 BPs)는 골다공증(Osteoporosis), 악성 종양의 골전이(Bone metastasis), 대사성 골질환(e.g Paget's disease, Osteogenesis imperfecta, Primary hyperparathyroidism) 등에 의한 2차적인 고칼슘혈증(Hypercalcemia), 병적 골절(Pathologic fracture)을 예방 및 치료하는 약제로 쓰인다. BPs는 두 개의 포스포산(Phosphonate)을 포함한다는 점에서 피로인산(Pyrophosphate)과 구조적으로 유사하며 파골 세포(Osteoclast)의 활성을 억제하여 골량의 손실(Loss of bone volume)을 감소시킨다. 이들 BPs는 질소 포함 여부에 따라 질소 포함 BPs(Nitrogen containing BPs : pamidronate, alendronate, risedronate, zoledronate, etc.)와 질소 불포함 BPs(Non-nitrogen containing BPs : clodronate, etidronate, etc.)로 나뉘는데 질소 포함 BPs는 체내에서 잘 대사되지 않으며, 파골 세포 억제 효과가 더 강하다. 반면 질소 불포함 BPs는 체내에서 빠르게 대사된다.

Marx는 2003년 질소 포함 BPs(pamidronate(Aredia®), zoledronate(Zometa®)) 사용 환자에서 악골 괴사증(Osteonecrosis of the jaw)이 발생함을 처음 보고하였으며, (Marx, 2003) 이후 이 질환의 발생 기전, 이환율, 치료 방법에 대한 많은 논의가 있었다.

American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons(AAOMS)에서 2014년 발표한 성명서(position paper)에 따르면 현재, 혹은 이전에 골흡수억제제나

혈관신생억제제를 복용한 병력이 있거나, 골노출 혹은 노출되지 않더라도 구강내외로 탐침이 가능한 구강악안면부위 병변이 8주 이상 지속되거나, 이전에 구강악안면부위 방사선 치료를 받은 적이 없으며, 구강악안면부위로 확실한 병소의 전이가 없는 경우 BRONJ 로 정의하고 있다. (Ruggiero et al., 2014)

아직까지 BRONJ 유병률은 명확히 알려지지 않았으나 The American Society for Bone and Mineral Research(ASBMR) Task Force의 조사에 따르면, 골다공증(Osteoporosis) 치료를 위해 BPs 제재를 경구 복용하는 경우 1:100,000 에서 1:10,000 사이의 유병률을 보이지만, 치료 기간에 따라 그 유병률은 더 높을 것으로 예상되며, 항암 치료를 받는 환자군에서 고용량으로 BPs 제재를 정맥 주사할 경우 유병률은 1% ~ 10% 정도까지 보고된다.(Khosla et al., 2007; Marx et al., 2005) BRONJ 를 유발하는 위험 인자들 - BPs 종류, 투여 방법, 환자의 나이, 해부학적 위치, 기존 치주 질환의 유무, 침습적 치과 치료, 기타 약제 병용 여부 - 은 매우 다양하며(Kyrgidis et al., 2008; Marx et al., 2005) Kyrgidis A 등에 의하면 그 중 BPs 제재 복용 중 발치 등 외과적 치료는 BRONJ 발생 가능성을 높이는 인자로 보고되었다.(Kyrgidis et al., 2008) 최근 ASBMR Task Force 에 의하면 중양의 치료와 관련된 전신적인 위험 요소가 BRONJ 의 발생 및 악화에 관여하며, BPs 제재와 동시 투여하는 항암 제재, 스테로이드 제재가 상승 작용을 하는 것으로 보고되고 있다.(Chiu et al., 2010; Marx et al., 2005; Sonis et al., 2009)

대다수의 BRONJ 환자는 다발성 골수종, 유방암, 전립선암으로 진단된 환자에서 많이 발생하였으며, 이들 환자는 모두 질소 포함 BPs 및 dexamethasone 과 같은 스테로이드 제재를 정맥 투여하였다.(Kyrgidis et al., 2008) 그러나 이들 전신적 요인, 약물 병용과 BRONJ 악화와와의 상호 작용 기전은 아직 확립되지 않았다.

이 연구의 목적은 비스포스포네이트 관련 악골 괴사증 동물 모델을 확립하고 이를 임상적, 방사선학적, 조직학적으로 검증하며, 특히 BPs 와 스테로이드 제재 병용 투여시 BRONJ 발생 및 악화에 영향을 미치는지 여부를 확인하는 것이다. 또한 악골 괴사증 동물 모델을 기반으로 BRONJ 의 발병기전, 치료 및 예방에 관한 연구의 기초를 마련하고자 한다.

II. 연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

본 실험은 8주령의 암컷 백서(Female Sprague-Dawley rat) (250-300g) 27마리의 좌측 상, 하악 제 1,2대구치 총 54 부위를 이용하였다. 본 실험은 Institutional Animal Care and Use Committee(이하 IACUC) 규정을 준수하였으며 실험 동물은 연세대학교 의료원 임상 의학 연구센터의 동물 실험 지침에 따랐다.

2. 연구 방법

가. 실험 설계

실험 동물은 3 그룹으로 나누었다. 그룹 1(대조군)은 Normal saline 만 복강내(Intra-peritoneal) 주사하였고, 그룹 2(실험군)는 Zoledronic acid(Zometa[®], Sigma Aldrich, Republic of Korea) 0.2mg/kg 을 복강내 주사하였다. 그룹 3(실험군)는 Zoledronic acid 0.2mg/kg 에 추가적으로 Dexamethasone (Dexamethasone[®], Sigma Aldrich, Republic of Korea) 5mg/kg 을 복강내 주사하였다. (Table. 1)

실험 기간은 총 12주이며, 실험 진행표는 다음과 같다. (Fig. 1)

Group number	Group information	Medication
1 (n=9)	Control	Normal saline
2 (n=9)	Zoledronic acid injection	Zoledronic acid 0.2mg/kg
3 (n=9)	Zoledronic acid + Dexamethasone injection	Zoledronic acid 0.2mg/kg + Dexamethasone 5mg/kg

Table. 1 We used 27 rats, divided into 3 groups.

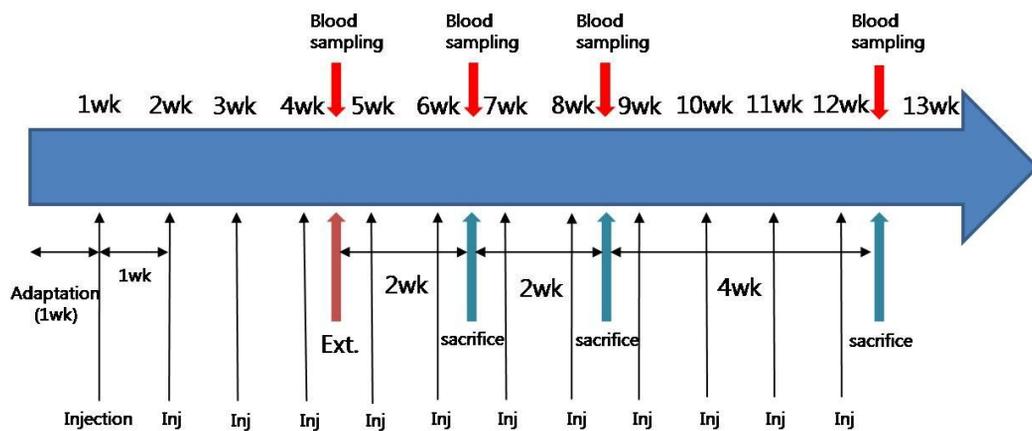


Figure. 1 Time table of study is shown above. It takes 12 weeks, and 2,4,8 weeks after extraction, we sacrifice 2,2,5 rats of experimental group, taking blood samples at the same time.

나. 실험 방법

실험 동물은 연세대학교 의료원 실험 동물부 지침에 따라 1주일의 순화 기간을 거쳐 실험 시작일부터 4주 동안 1주일 간격으로 1회씩, 동일 실험자가 복강내로 약물을 주입하였다. 4주 주입 후 3일 뒤, 모든 쥐의 좌측 상하악 제 1,2 대구치를 발치하면서 혈액 샘플을 채취하였다. 발치 2주, 4주 및 8주에 대조군은 3마리씩, 실험군은 각각 2마리, 2마리, 5마리 희생하면서(CO₂ asphyxiation chamber) 동시에 혈액 샘플을 채취하였으며, 모든 표본에 대한 육안적, 방사선학적, 조직학적 검사를 시행하였다. 혈액 샘플은 ELISA kit를 사용하여 각각 CTX, TRACP 5b 농도를 측정하였다.

발치 (Tooth extraction)

모든 실험 대상 쥐의 좌측 상하악 제 1,2 대구치를 발치하였다. 모든 발치는 무균적으로 이루어졌으며 전신 마취하에 이루어졌다.(Tiletamine/zolazepam[®]-milan, Italy; xylazine-Rompun[®] Bayer AG, Leverkusen, Germany) 모든 발치는 치과용 탐침(dental explorer)을 사용하여 치주인대절제술 및 아탈구, 탈구, 발치, 소파술을 순차적으로 시행하였다.

발치 시행 직후 연세대학교 의료원 임상 의학 연구 센터의 동물 실험 지침에 따라 meloxicam(Metacam[®], Boehringer-Ingelheim, Germany)을 10mg/kg 으로 복강내 주사하여 수술 후 통증을 관리하였다.

3. 육안적 평가

발치 후 2주, 4주, 8주에 희생된 백서의 상, 하악골을 연조직과 함께 절단하여 구강 점막의 치조골 피개 여부 및 부골 형성 여부를 육안적으로 확인하고 사진 촬영 후, 10% buffered-formalin 에 즉시 보관하였다.

4. 방사선학적 평가

절제한 조직은 표준 치과 방사선 필름을 이용한 Plain X-ray 촬영을 실시하여 영상을 비교하였다. (Voltage (kV)=60, Current (mA)=70, Exposure (s)=0.08)

5. 조직학적 평가 (H-E staining)

절제한 조직은 10% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 에 1주일간 탈회시킨 후, 파라핀에 포매하였다. 파라핀 포매 후, 하악골의 전,후 방향으로 4 μ m 두께로 절단하였다. 병리 조직학적인 소견을 관찰하고 Empty osteocytic lacunae / Total osteocytic lacunae 비율을 계산하고자 하였다.

6. 이학적 평가 (Serum chemistry)

발치 직전, 발치 2주, 4주, 8주 후 희생 직전에 각각 안와하(Infraorbital) 채혈을 시행하여 1 ~ 1.5cc 의 전혈(whole blood)을 얻었다. 이 혈액 샘플은 원심분리 후, ELISA Kit 에 적용하여 각각 CTX, TRACP 5b 농도를 측정하였다.

가. CTX (C-terminal crosslinked telopeptide of type I collagen)

Type I bone tropocollagen 의 Non-helical C-terminal 로서 type I collagen 의 흡수 정도 및 파골 세포의 활성 정도를 평가하는 지표이다. 본 연구에서는 동물 모델에서 악골 괴사증과 이학적 소견과의 관계를 평가하기 위해 사용되었다.

나. TRACP 5b (Serum tartrate-resistant acid phosphate)

TRACP 5b 란 생체 표지자를 사용하여 비스포스포네이트가 골흡수를 억제하는데 효과적이라는 연구가 진행되고 있으며(Kuroshima et al., 2012), 본 연구에서는 대조군과 실험군 사이에 TRACP 5b 농도가 유의한 차이를 보이는지, BRONJ 진단에 TRACP 5b 가 유용한 생체 표지자로 사용될 수 있는지 여부를 확인하였다.

7. 통계 분석

실험군내 BRONJ가 발생하지 않은 그룹(n=6)과 발생한 그룹(n=12)의 CTX, TRACP 5b를 비교하였다. 모집단 개수가 충분하지 않아 (n=18) t-검정 통계분석을 시행하였다.

또한 실험군내 BRONJ가 발생한 그룹에서 시간에 따른 TRACP 5b 변화량을 조사하여(Linear mixed test) TRACP 5b가 BRONJ 의 발생 여부를 예측할 수 있는 생체 표지자인지 여부를 평가하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 육안적 소견

최종적인 소견은 아래 **Table. 2**에 정리되어 있다.

육안적으로 구강 점막의 열개 없이 회복된 경우 정상 회복으로 정의하였으며, 구강점막의 열개 및 하방 골조직의 노출, 혹은 하방 골조직이 노출되지 않더라도 구강점막의 변연이 완전히 융합되지 않고 점막의 충혈이 관찰될 경우 불완전 회복으로서 BRONJ 로 진단하였다.

	2 weeks	4 weeks	8 weeks
Control group	*0/3	0/3	0/3
Z group	2/2	2/2	5/5
Z+D group	0/2	2/2	5/5

Table. 2 Clinical appearance of extraction sites on maxillary & mandibular ridge in rats

* BRONJ 의심 개체수 / 전체 개체수

Z group : Zoledronate만 복용 투여한 group

Z+D group : Zoledronate + dexamethasone 병용 복용 투여한 group

가. 2주 희생군

(1) 대조군

모든 대조군에서 발치와 부위의 완전한 회복이 관찰되었다. 골결손이 보이지 않았고, 발치와 상방은 구강 점막으로 완전히 피개되어 있었다. 또한 연조직의 감염, 염증 소견은 보이지 않았다. 4주, 8주 희생군에서도 완전한 회복이 관찰되었다.

(2) 실험군

Zoledronate 만 복용 투여한 그룹 (이하 Z 그룹) 에서 2개체의 불완전한 회복이 관찰되었다. 발치와 상방 점막의 열개 관찰되었으며, 하방으로 골조직이 노출되었다. 반면 Zoledronate 와 Dexamethasone 병용 복용 투여한 그룹 (이하 Z+D 그룹) 에서는 발치와 상방 점막 열개 없이 완전한 회복이 관찰되었다.

나. 4주 희생군 (실험군)

Z 그룹 과 Z+D 그룹에서 모두 불완전한 회복이 관찰되었다.

다. 8주 희생군 (실험군)

Z 그룹 과 Z+D 그룹에서 모두 불완전한 회복이 관찰되었다. 4주 희생군에 비해 하방의 괴사된 골조직 명확하게 관찰되었으며, 특히 Z+D 그룹에서 점막의 열개가 더 명확하고 크기가 컸다. 일부 표본에서는 점막 열개 변연부에서 명확한 충혈이 관찰되었다. (Fig. 2)

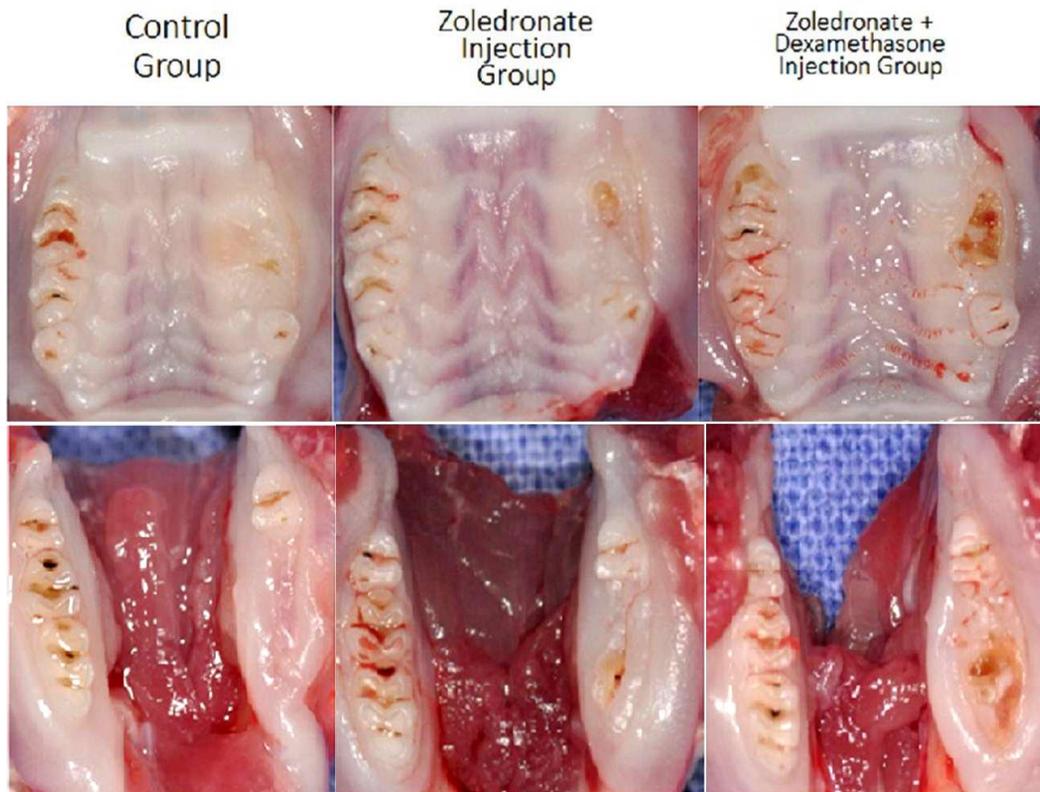


Figure. 2 Representative photographs of gross clinical appearance of maxillary & mandibular ridge in rats. (All sacrificed 8weeks after extraction)

1. Control group shows complete healing of oral mucosa covering extraction site.
2. Z group shows incomplete healing of oral mucosa, showing exposed, necrotic alveolar bone.
3. Z + D group shows incomplete healing of oral mucosa, showing definitely wide, exposed necrotic alveolar bone.

2. 방사선학적 소견

최종적인 소견은 아래 **Table. 3**에 정리되어 있다.

방사선학적으로 발치와 부위에서 가골, 혹은 성숙골이 채워져 있지 않으며, 주변으로 부분적인 골파괴가 보이는 경우 BRONJ 로 진단하였다. 단순 골결손만 보이고 주변으로 골파괴가 없을 경우, 발치와에 연조직 내성장에 의한 회복 가능성이 있으므로 정상 회복으로 진단하였다.

	2 weeks	4 weeks	8 weeks
Control group	*0/3	0/3	0/3
Z group	2/2	2/2	2/5
Z+D group	0/2	2/2	2/5

Table. 3 Radiographic examination of extraction sites on maxillary & mandibular ridge in rats

* BRONJ 의심 개체수 / 전체 개체수

Z group : Zoledronate만 복용 투여한 group

Z+D group : Zoledronate + dexamethasone 병용 복용 투여한 group

가. 2주 희생군

(1) 대조군

모든 대조군에서 발치와 부위의 회복이 관찰되었다. 아직 발치와에 골결손이 관찰되나, 주변으로 골파괴가 없는 표본의 경우 정상 회복으로 진단하였다. 4주, 8주 희생군에서도 완전한 회복이 관찰되었다.

(2) 실험군

Z 그룹에서 2개체의 불완전한 회복이 관찰되었다. 발치와 내에 빈공간이 그대로 남아 있었으며, 발치와 주위로 부분적인 골파괴가 관찰되었다.

반면 Z+D 그룹에서는 모두 완전한 회복이 관찰되었다.

나. 4주 희생군 (실험군)

Z 그룹과 Z+D 그룹에서 모두 불완전한 회복이 관찰되었다.

다. 8주 희생군 (실험군)

Z 그룹과 Z+D 그룹 모두 2 / 5 (40%)에서 BRONJ 가 관찰되었다. 나머지 3 / 5에서는 발치와 공간이 신생골로 채워져 있지 않거나 잔존 치근이 남아있는 경우가 있었으나 주변으로 골파괴가 보이지 않아 정상 회복으로 진단하였다.

Z 그룹에 비해 Z+D 그룹에서 발치와 주위로 더 넓은 골파괴가 관찰되었다.

(Fig. 3)

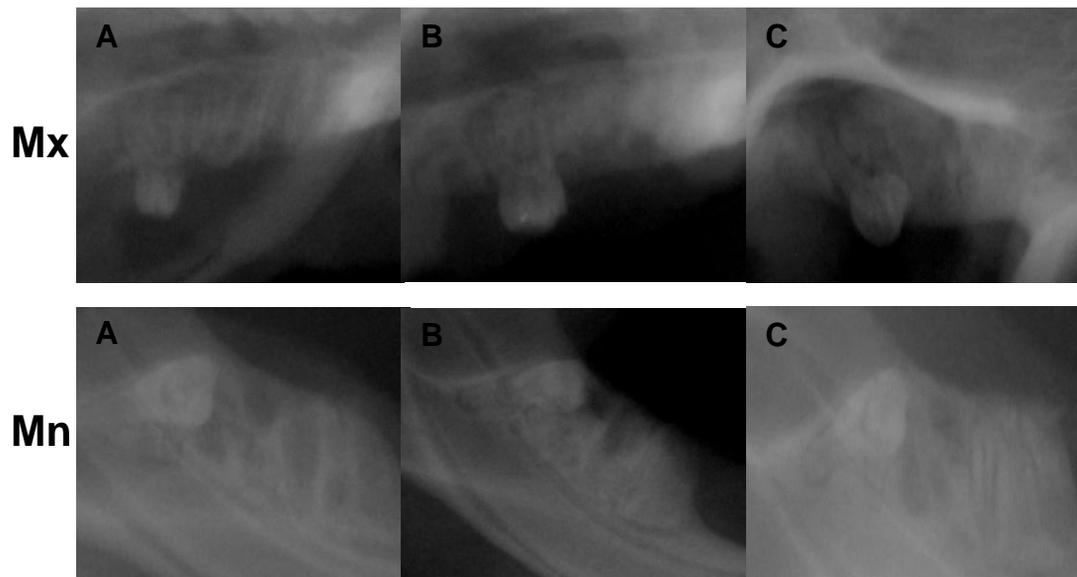


Figure. 3 Representative radiograph of extraction sites on maxillary & mandibular ridge in rats. (All sacrificed 8 weeks after extraction)

- A. Linear opaque radio-density around extraction socket (Control group)
- B. Mottled trabecular pattern around extraction socket (Z group)
- C. More definite, wider mottled trabecular pattern around extraction socket (Z + D group)

3. 조직학적 소견

최종적인 소견은 아래 **Figure. 4, Table. 4**에 정리되어 있다.

조직학적으로 피사된 골조직 주변으로 염증 세포가 침윤되어 있으며, 상방 점막의 열개가 관찰되고 발치와 주변에 empty lacunae가 관찰될 경우 BRONJ 로 진단하였다. 이는 BRONJ 를 최종 확진하기 위한 소견이며, 조직학적으로 BRONJ 진단된 경우에만 BRONJ 발생 모델로 선정하였다.

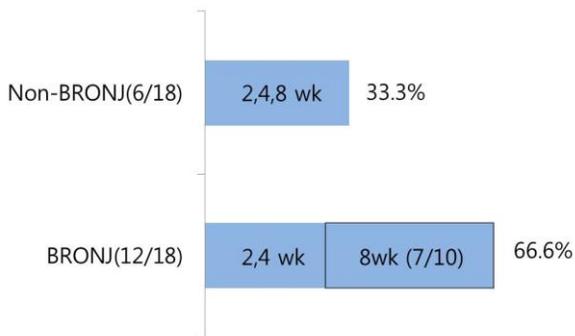


Figure. 4 Incidence of ONJ lesion(%),experimental group

	2 weeks	4 weeks	8 weeks
Control group	*0/3	0/3	0/3
Z group	1/2	2/2	3/5
Z+D group	0/2	2/2	4/5

Table. 4 Histologic examination of extraction sites on maxillary & mandibular ridge in rats

* BRONJ 의심 개체수 / 전체 개체수

Z group : Zoledronate만 복용한 group

Z+D group : Zoledronate + dexamethasone 병용 복용한 group

가. 2주 희생군

(1) 대조군

모든 대조군에서 발치와 부위의 정상적인 회복이 관찰되었다. 4주, 8주 대조군에서도 동일한 소견 관찰되었다.

(2) 실험군

Z 그룹에서 1 /2 (50%) 의 불완전한 회복이 관찰되었다. 반면 Z+D 그룹에서는 모두 정상적인 회복이 관찰되었다.

나. 4주 희생군 (실험군)

Z 그룹과 Z+D 그룹에서 모두 불완전한 회복이 관찰되었다. 발치와 주변으로 empty lacunae 가 관찰되어 괴사된 골조직이 관찰되었으며, 일부 표본에서는 주변으로 부골(sequestra)이 관찰되었다. 발치와 상방으로 구강 점막의 열개가 관찰되었으며, 괴사된 골조직 주변으로 다수의 백혈구 세포 침윤이 관찰되었다.

다. 8주 희생군 (실험군)

Z 그룹과 Z+D 그룹에서 모두 불완전한 회복이 관찰되었다. (Fig. 5)

Z 그룹에 3개체 (3/5, 60%)에서 BRONJ 진단되었고, Z+D group에서 4개체 (4/5, 80%)에서 BRONJ 진단되었다. (Table. 4)

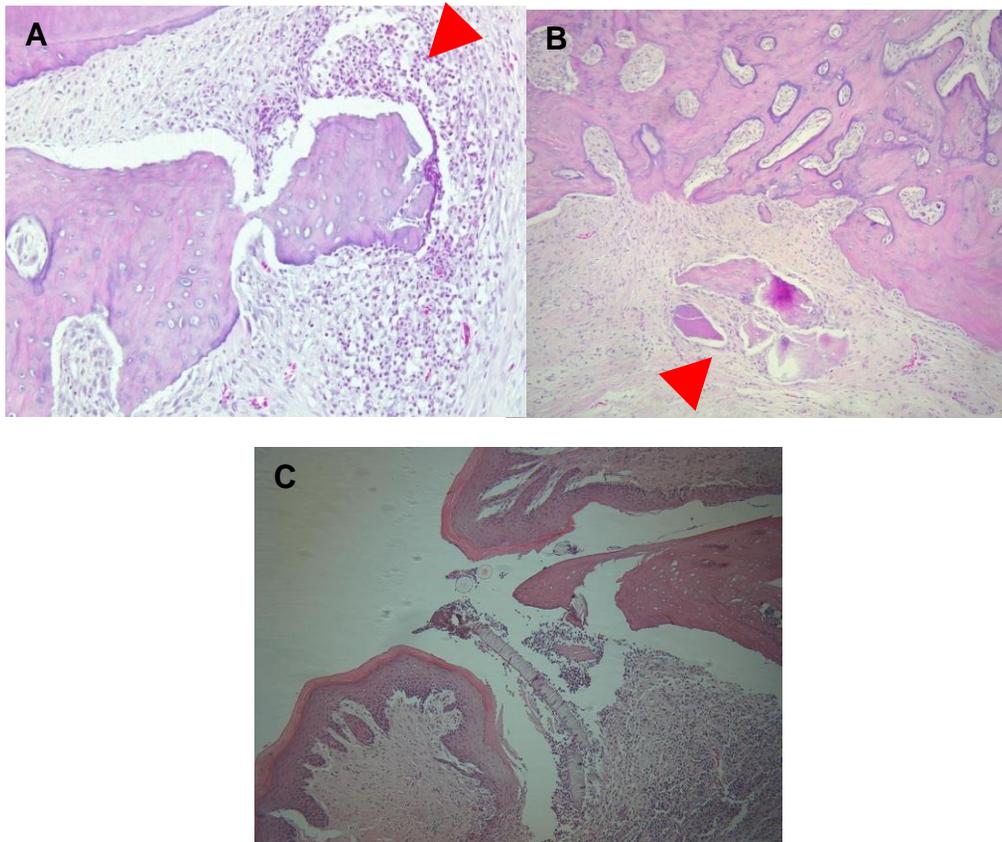


Figure. 5 Representative histologic features of extraction sites.
(All sacrificed 8 weeks after extraction)

- A. Inflammatory cells (neutrophils) surround necrotic alveolar bone with empty lacunae (Z group, Mn, x50, sacrificed 8wks after ext.)
- B. Sequestra formation apart from alveolar bone with empty lacunae (Z group, Mn, x100, sacrificed 8wks after ext.)
- C. Ulcerative overlying mucosa invaginates into extraction socket, and necrotic bone with empty lacunae on the surface of exposed alveolar bone (Z + D group, Mx, x200, sacrificed 8wks after ext.)

4. 이학적 소견

아래 도표는 실험군에서 정상 회복 그룹과 BRONJ 그룹 간의 CTX, TRACP 5b를 비교한 것이다. (Fig. 6)

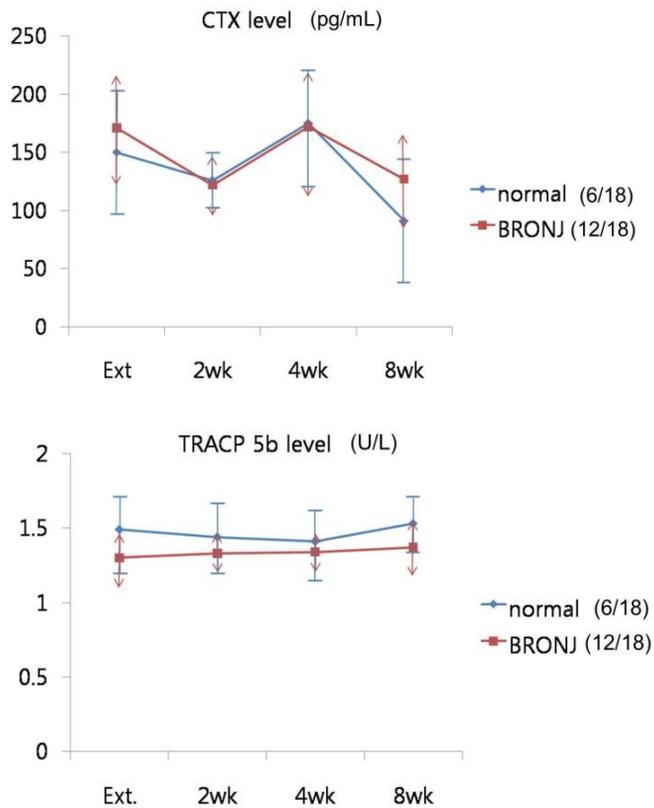


Figure. 6 CTX shows no tendency neither between normal and BRONJ group, nor within each group.

TRACP 5b consistently shows lower value of BRONJ group than normal healing group, although time and TRACP 5b level are not inversely proportional.

5. 통계 분석 결과

A. Bivariate analysis (Independent t-test)

모집단의 개수가 적어서 (n=18) 독립 t-test 를 시행하였다. 결과는 아래 도표로 표기하였다. (Fig. 7)

CTX	Non-BRONJ (6/18)	BRONJ (12/18)	P value
	Mean(pg/mL)	Mean(pg/mL)	
Baseline	150.63±50.69	171.36±45.05	0.23
2wks	126.24±21.97	122.79±24.58	0.87
4wks	175.13±48.28	172.71±40.78	0.90
8wks	91.69±53.30	127.53±38.00	0.12

TRACP 5b	Non-BRONJ (6/18)	BRONJ (12/18)	P value
	Mean(U/L)	Mean(U/L)	
Baseline	1.49±0.19	1.30±0.07	0.00
2wks	1.44±0.18	1.33±0.05	0.01
4wks	1.42±0.17	1.34±0.04	0.07
8wks	1.53±0.16	1.37±0.12	0.03

Figure. 7 TRACP 5b can distinguish between normal and BRONJ group with statistical significance. (P value< 0.05)

B. Linear mixed test

Linear mixed test 를 사용하여 BRONJ 발생 그룹 내에서 TRACP 5b 농도에 대한 time effect 를 측정하였다. 이는 Effect factor (e^{SE}) 로 표현된다. (Fig. 8)

	Estimated Measures (SE)	95% CI	P value
BRONJ	0.18±0.05	0.08±0.28	0.001
Time	0.02±0.01	0.003±0.05	0.023
BRONJ × Time	-0.02±0.02	-0.05±0.01	0.229

Effect factor = e^{SE}

$$y = X\beta + Zu + \epsilon$$

y: TRACP 5b measures
β: Fixed effects
u: Random effects
ε: Random error

Figure. 8 Linear mixed test equation and Effect factor

위 방정식을 해석하면

1. TRACP 5b는 정상 회복 그룹과 BRONJ 그룹을 구분하는데 $e^{0.18}$ 만큼 effect 가 있으며 이는 통계적 유의성이 있다. (P value = 0.001)
2. TRACP 5b는 시간변화에 따라 BRONJ 의 발병률을 예측하는데 $e^{0.02}$ 만큼 effect가 있으며 이는 통계적 유의성이 없다. (P value = 0.023)
3. TRACP 5b는 BRONJ 를 진단하는 생체 표지자로 사용될 수 있는 가능성이 있다.

IV. 고 찰

비스포스포네이트 제제는 현재 가장 효과적인 골 흡수 억제제로 Paget's disease 치료를 위해 임상에 처음 도입되었다. (Rodan and Martin, 2000)

Food and Drug Administration(이하 FDA)에서는 다발성 골수종 및 유방암과 같은 고형 종양의 골전이를 억제하기 위해 pamidronate 와 zoledronic acid 의 정맥 비스포스포네이트 제제의 사용을 승인하였으며, 이외에도 비스포스포네이트는 골다공증(Osteoporosis), Paget's disease 를 포함한 골형성 부전증(Osteogenesis imperfect), 원발성 부갑상선 항진증(Primary hyperparathyroidism)과 같은 골대사성 질환에 광범위하게 사용되고 있다. (Kremer et al., 2014; Nussbaum et al., 1993; Rosen et al., 2004)

비스포스포네이트는 피로인산(pyrophosphate)계열의 합성물질이며 칼슘 포스페이트 결정(calcium phosphate crystal)의 응집을 억제하고 이러한 무정형 칼슘 포스페이트 결정(amorphous calcium phosphate crystal)이 수산화인회석(hydroxyapatite)으로 변환되는 것을 억제한다.(Fleisch, 1998) 비스포스포네이트 제제의 가장 중요한 작용은 파골세포(osteoclast)의 활성을 억제하는 것이다.(Van Beek et al., 2002) 비스포스포네이트 제제는 파골세포-골아세포(osteoclast-osteoblast)의 상호작용을 억제함으로써 궁극적으로 골재형성을 억제하게 된다.

비스포스포네이트 제제의 전신 투여 시 나타날 수 있는 소화기계의 부작용과 (Yoshioka et al., 2013) 최근 관심을 모으고 있는 Bisphosphonate-related osteonecrosis of jaw (BRONJ)의 합병증은 비스포스포네이트 제제의 선별적인 투여,

적용 대상의 선정 및 용량 선택에 대한 논란을 불러일으켰다.(Aguirre et al., 2010; Allen et al., 2010)

BRONJ 환자 발생에 대한 기존의 후향적 연구에서 비스포스포네이트 제재를 정맥 투여한 환자군에서 BRONJ 발생률은 0.8 ~ 12% 로 조사되었으며 투여 후 6개월 이후에 BRONJ 발생률이 급격히 증가하는 것으로 나타났다. (Bamias et al., 2005; Pozzi et al., 2007; Thumbigere Math et al., 2012; Wang et al., 2007)

특히 BRONJ 환자가 고령 환자에 주로 분포되어 있고, 암환자와 같이 다수의 면역억제제(multiple-immunosuppression drug)를 사용하는 환자에게 발병률이 높다는 사실은 주목할 필요가 있다. (Sonis et al., 2009; Then et al., 2012) 특히 다발성 골수종 환자나 골다공증 환자는 생존율이 높아 비스포스포네이트 제재의 적용 기간이 길고 결과적으로 비스포스포네이트의 누적 용량(cumulative dose)이 증가하여 BRONJ 가 더 쉽게 발생한다. 크론병(만성 장염)환자에 대한 장기간 스테로이드 사용이 고관절의 무혈관성 괴사(avascular necrosis)를 유발하여 골괴사를 초래한다는 보고도 있어서(Klingenstein et al., 2005) Zoledronate 와 Dexamethasone 의 병용 투여는 BRONJ 의 발병률을 증가시키는데 임상적 상관성이 있다.

본 연구는 비스포스포네이트 제재와 스테로이드 제재를 병용 투여하여 BRONJ 환자의 임상적, 병리학적인 양상을 재현하는 동물 모델을 제시하는 것이며, 기존 실험에서는 안정적인 BRONJ 재현성과 약물 투여의 용의성을 고려하여 8주령의 Sprague-Dawley 쥐를 사용하였다.

실험군을 Zoledronate 만 투여한 그룹과 Zoledronate 와 Dexamethasone 을 병용 투여한 그룹으로 구분하였으며, 암환자에게 투여하는 양과 동일한 수준으로

등가 용량(equivalent dose)을 투여하였다. 다만 다발성 골수종 환자의 경우 zoledronic acid 4mg / 60kg / 4 weeks (1.6×10^{-4} g/kg/week)를 정맥내 투여하는데 본 실험의 경우 복막내 투여를 하게 되어 유효 약물 농도가 감소할 것을 우려하여 2.0×10^{-4} g/kg/week 의 zoledronic acid 를 복막내 투여하였다. 따라서 투여 약물의 누적 용량이 암환자에 비해 증가하였다.

Dexamethasone 같은 면역 억제제는 일반적으로 임상에서 암환자에게 투여하는 양과 동일한 수준으로 (5mg/kg/week) 적용하였다.

결과적으로 실험군의 66.6%에서 BRONJ 가 발생하였으며, 이는 암환자의 임상적 발병률(0.8 ~ 12%) 보다 훨씬 높았다.

이전 실험에서 보고한 바로는 Spraque-Dawley 쥐의 상하악 제1,2대구치 발치 2일 후 발치와에 골형성이 시작되며, 14일 후 발치와가 신생골로 완전히 채워짐이 관찰되었다.(Iizuka et al., 1992; Johansen, 1970) 본 실험에서도 발치 후 2,4,8주 희생 결과 대조군의 spraque-dawley 쥐는 특기할 합병증 없이 발치와가 신생골로 치유되었다.

다만, 발치시 치과용 탐침기를 사용하여 치주인대절제술 및 아탈구, 탈구, 발치, 소파술을 순차적으로 시행하였으나 쥐의 상하악 제1,2 대구치의 치근이 다근치이며 사람보다 치근 이개도가 커서 발치 후 x-ray 촬영 상에 잔존 치근이 남아있는 경우가 있었다. 2주 뒤 Zoledronate 만 투여한 그룹에서는 BRONJ 가 발생하였으나 (1/2, 50%) Zoledronate 와 Dexamethasone 을 병용 투여한 그룹에서는 오히려 BRONJ 가 발생하지 않았는데(0/2, 0%), 이는 잔존 치근의 존재 여부가 원인이 될 수 있다. 잔존 치근이 남을 경우 골결손(bone defect) 양이

완전히 발거된 발치와에 비해 작고, 골손상량도 상대적으로 작아서 BRONJ 발생률이 감소할 수도 있다.

치아치조골 수술(dentoalveolar surgery)을 시행한 환자군은 단순히 pamidronate 제제만 투여한 환자군보다 7배 정도 BRONJ 발생률이 높다고 보고하였으며(Badros et al., 2006), 본 실험에서 잔존 치근이 남은 경우보다 완전 발치(complete extraction) 후 발치와를 소파하는 것이 골결손을 더 크게 남겨 BRONJ 발생률을 증가시킬 가능성이 높다고 생각된다. 실제로 Z+D 그룹 2주 희생군 중 한 표본에서 잔존 치근이 발견되었으며, 나머지 한 표본에서는 잔존 치근이 발견되지 않았다.

Zoledronate 와 Dexamethasone 의 병용 투여는 BRONJ의 발병률을 증가시킨다. 다만 Spraque-Dawley 쥐의 경우 사람과 회복 기전이 다르며, dexamethasone 이 단기간 사용되었을 경우 오히려 술 후 염증을 감소시켜 BRONJ 발생을 억제했을 가능성도 있다. 실제 다발성 골수종이나 골다공증으로 비스포스포네이트 제제와 스테로이드 제제를 병용 투여하는 환자는 50 ~60대 이상의 고령군이며, 장기간 약물을 투여 받고, 추가적으로 면역 억제제, 항암제 (e.g Docetaxel etc) 등으로 정맥 투여 받는다. Spraque-Dawley 쥐의 평균 수명을 24개월, 96주로 추정하였을 때, 본 실험에 사용된 쥐는 8주령이며, 실험에 총 12주가 소요되었음을 고려할 때 실험 종료시에도 쥐는 20주령의 정상적인 면역력을 가진 상태이다.

발치 4주후 희생한 실험군에서 Z 그룹과 Z+D 그룹 모두에서 BRONJ 가 발생하였으며, 발치 8주후 희생한 실험군에서는 Z 그룹의 3/5 (60%), Z+D 그룹의 4/5 (80%) 가 BRONJ 에 이환된 것으로 확인되어 zoledronate 와 dexamethasone 의 병용 투여 시 누적 용량 증가 및 소요된 시간(Time factor)이

BRONJ 발생의 위험 인자(Risk factor)임을 확인할 수 있다.(Hikita et al., 2009; Sonis et al., 2009; Tabuchi et al., 2005; Yamamoto et al., 2006) 다만 BRONJ의 발생률을 유의하게 증가시키는 스테로이드 농도 및 적용 기간에 대해서는 더 많은 실험이 필요하다.

Ruggiero 등은 비스포스포네이트가 신생 혈관의 생성을 방해하여 골내 혈관 분포(Bone vascularity)의 감소가 파골 세포의 활성 감소, 괴사 및 결과적으로 골의 무혈관성 괴사(Avascular necrosis)가 유발된다고 하였다. (Ruggiero, 2008) 괴사골 주변의 혈액 공급 감소는 비스포스포네이트의 항혈관 형성(Anti-angiogenic) 특성으로 잘 설명될 수 있으며, 기존의 실험 논문에서 비스포스포네이트를 투여한 실험군의 표본을 병리학적으로 분석하였을 때, 괴사골 주변에 혈관 분포가 감소하였다고 하였다. 본 실험에서는 혈관 분포를 정량적으로 계산하지는 못하였으나, 괴사골 주변으로 괴사된 골세포 및 empty lacunae 가 발견되었고 그 공간으로 미세혈관 충전(Capillary refill)이 관찰되지 않아 혈행의 감소가 뚜렷하게 확인되었다. 괴사골 상방으로 심한 염증반응을 보이는 점막 조직에는 많은 백혈구와 신생 혈관이 관찰되었으나, 괴사골의 범위가 더 넓어서 결과적으로 전체적인 혈관 분포는 감소된 양상이었다.

최근 *in vivo*, *in vitro* 실험에서 이러한 혈관 분포의 감소 양상이 신생 혈관의 내피 세포(Endothelial cell)의 기능을 감소시킨다는 보고가 있으며 혈관 내피세포 성장 인자(VEGF : Vascular endothelial growth factor)와 같은 생체 표지자를 통해 BRONJ의 발병률 및 진행 상태를 분류하는 방법도 논의되고 있다. (Fournier et al., 2002) (Stresing et al., 2011)

CTX 는 골아세포(Osteoblast)에 의해 형성된 콜라겐 전구물질(Procollagen)이 세포외 공정(Extracellular process)에 의해 N, C-extension 이 분해되어 100kDa 분자량의 propeptide 가 생성되는데 이중에 C-terminal telopeptide 가 CTX 농도이며 N-terminal crosslinked telopeptide of Type I collagen(이하 NTX) 보다 혈액내 변화량이 작다.

Marx 등은 CTX 농도가 150pg/ml 이상일 경우 BRONJ 의 발생률이 유의하게 증가한다고 주장하였다. (Marx, 2003; Marx et al., 2005) 또한 CTX 는 혈액 내에서 빠르게 대사되나(Short serum half-life) 90%가 골의 type I 콜라겐에서 합성되어 새롭게 형성된 콜라겐 분자와 1:1 비율로 형성되므로 콜라겐 합성, 골 형성을 확인할 수 있는 생체 표지자로서 의의를 지닌다고 하였다. (Marx et al., 2005)

CTX 를 이용하여 BRONJ 의 발생률 및 진행 정도를 예측하는 논문은 이전에 많이 있었으며, 최근에는 CTX 뿐만 아니라 osteocalcin, RANKL/OPG ratio, Cathepsin K 등의 생체 표지자에 대한 실험이 진행 중이다.(Chao et al., 2010; Khosla et al., 2008)

본 논문에서는 TRACP 5b 를 BRONJ 를 진단하는 생체 표지자로서 유의성이 있는지 검증해보았다. TRACP 5b는 2가지의 동형(Isoform)이 있다. Type 5a는 소수로 혈소판, 적혈구 등에 존재하며 Type 5b는 대다수로서 파골 세포에 존재한다. 따라서 TRACP 5b 를 정량적으로 분석하면 파골 세포의 수와 활성화도 - 부착(Adhesion), 콜라겐 단백질의 분해 정도 - 를 직접적으로 확인할 수 있다.

또한 기존의 혈청 표지자들이 간과 신장의 기능에 영향을 많이 받지만 (False positive), TRACP 5b 는 이들 장기에 영향을 받지 않는 독특한 생체 표지자이다.

또한 CTX 값이 주간 변동성(Diurnal variability) 가 심한 반면 TRACP 5b 는 그러한 변동성이 크지 않아 그 의미가 더 크다. 이러한 TRACP 5b 는 골다공증 치료를 평가하기 위한 골교체율 표지자(Bone turn-over marker)로서 주로 채택되어 왔으나, BRONJ 영역에서는 시도되지 않았다는 점에서 본 논문의 의의가 있다. (Chao et al., 2010; Civitelli et al., 2009; Martini et al., 2007)

본 실험에서 TRACP 5b ELISA 분석 결과 정상 회복 그룹은 평균 1.5U/L, BRONJ 그룹은 1~1.25U/L 의 값을 보였으며, Linear mixed test 결과 정상 회복 그룹과 BRONJ 그룹을 구분할 수 있는 가능성이 있는 생체 표지자임을 확인하였다. 반면 누적 용량이 증가할수록 시간에 따라 TRACP 5b 값이 반비례하여 감소할 것으로 예상하였으나 큰 변화량은 없었다. (Fig. 6)

CTX, TRACP 5b를 포함한 골교체율 표지자의 농도는 성인 남성, 폐경기 전후의 여성 등에 따라 다르지만, 아직 BRONJ 환자에서는 확립되지 못했다. 이에 대해서는 후향적 연구가 더 필요하며 BRONJ 를 진단할 수 있는 추가적인 표지자 발견도 가능할 것으로 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서 성공적인 비스포스포네이트 관련 악골 괴사증(BRONJ) 동물 모델을 확립하였으며 다음과 같은 결론을 도출하였다.

1. 비스포스포네이트 제재와 스테로이드 제재의 병용 투여로 누적 용량이 증가하게 되면 BRONJ가 발생하는 동물 모델을 구현할 수 있다.
2. 비스포스포네이트 제재와 스테로이드 제재의 병용 투여만으로 자발적으로 BRONJ 가능성이 높아지는 것은 아니며, 치아 발거와 같은 외과적 국소 요인이 BRONJ 발생 가능성을 높게 한다.
3. TRACP 5b 는 BRONJ 진단에 유용하게 이용할 가능성이 있는 생체 표지자가 될 수 있다.

본 실험을 통해 비스포스포네이트와 스테로이드 제재를 병용 투여한 쥐 모델은 BRONJ 를 발생시킬 수 있는 믿을 수 있고 재현 가능한 모델로서 향후 BRONJ 의 병태생리를 이해하고 진단과 치료에 도움이 될 수 있는 생체 표지자를 발굴하는데 유용한 동물모델로 이용이 가능할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Aguirre JI, Altman MK, Vanegas SM, Franz SE, Bassit AC, Wronski TJ: Effects of alendronate on bone healing after tooth extraction in rats. *Oral diseases* 16(7): 674-685, 2010.
- Allen MR, Kubek DJ, Burr DB: Cancer treatment dosing regimens of zoledronic acid result in near-complete suppression of mandible intracortical bone remodeling in beagle dogs. *Journal of bone and mineral research* 25(1): 98-105, 2010.
- Badros A, Weikel D, Salama A, Goloubeva O, Schneider A, Rapoport A, et al.: Osteonecrosis of the jaw in multiple myeloma patients: clinical features and risk factors. *Journal of clinical oncology* 24(6): 945-952, 2006.
- Bamias A, Kastritis E, Bamia C, Mouloupoulos LA, Melakopoulos I, Bozas G, et al.: Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: incidence and risk factors. *Journal of clinical oncology* 23(34): 8580-8587, 2005.
- Chao T, Wu Y, Janckila AJ: Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b (TRACP 5b) as a serum maker for cancer with bone metastasis. *Clinica chimica acta* 411(21-22): 1553-1564, 2010.
- Chiu C, Chiang W, Chuang C, Chang S: Resolution of oral bisphosphonate and steroid-related osteonecrosis of the jaw--a serial case analysis. *Journal of oral and maxillofacial surgery* 68(5): 1055-1063, 2010.
- Civitelli R, Armamento Villareal R, Napoli N: Bone turnover markers: understanding their value in clinical trials and clinical practice. *Osteoporosis international* 20(6): 843-851, 2009.
- Fleisch H: Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocrine reviews* 19(1): 80-100, 1998.
- Fournier P, Boissier S, Filleur S, Guglielmi J, Cabon F, Colombel M, et al.: Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats. *Cancer research* 62(22): 6538-6544, 2002.

- Hikita H, Miyazawa K, Tabuchi M, Kimura M, Goto S: Bisphosphonate administration prior to tooth extraction delays initial healing of the extraction socket in rats. *Journal of bone and mineral metabolism* 27(6): 663-672, 2009.
- Iizuka T, Miller SC, Marks SC: Alveolar bone remodeling after tooth extraction in normal and osteopetrotic (ia) rats. *Journal of oral pathology & medicine* 21(4): 150-155, 1992.
- Johansen JR: Repair of the post-extraction alveolus in the Wistar rat. A histologic and autoradiographic study. *Acta odontologica scandinavica* 28(4): 441-461, 1970.
- Khosla S, Burr D, Cauley J, Dempster DW, Ebeling PR, Felsenberg D, et al.: Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *Journal of bone and mineral research* 22(10): 1479-1491, 2007.
- Khosla S, Burr D, Cauley J, Dempster DW, Ebeling PR, Felsenberg D, et al.: Oral bisphosphonate-induced osteonecrosis: risk factors, prediction of risk using serum CTX testing, prevention, and treatment. *Journal of oral and maxillofacial surgery* 66(6): 1320-1321, 2008.
- Klingenstein G, Levy RN, Kornbluth A, Shah AK, Present DH: Inflammatory bowel disease related osteonecrosis: report of a large series with a review of the literature. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 21(3): 243-249, 2005.
- Kremer R, Gagnon B, Meguerditchian AN, Nadeau L, Mayo N: Effect of oral bisphosphonates for osteoporosis on development of skeletal metastases in women with breast cancer: results from a pharmaco-epidemiological study. *Journal of the National Cancer Institute* 106(11), 2014.
- Kuroshima S, Go VA, Yamashita J: Increased numbers of nonattached osteoclasts after long-term zoledronic acid therapy in mice. *Endocrinology* 153(1): 17-28, 2012.
- Kyrgidis A, Vahtsevanos K, Koloutsos G, Andreadis C, Boukovinas I, Teleioudis Z, et al.: Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a case-control study of risk factors in breast cancer patients. *Journal of clinical oncology* 26(28): 4634-4638, 2008.
- Martini G, Gennari L, Merlotti D, Salvadori S, Franci MB, Campagna S, et al.: Serum OPG and RANKL levels before and after intravenous bisphosphonate treatment in Paget's disease of bone. *Bone* 40(2): 457-463, 2007.

- Marx RE: Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *Journal of oral and maxillofacial surgery* 61(9): 1115-1117, 2003.
- Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V: Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *Journal of oral and maxillofacial surgery* 63(11): 1567-1575, 2005.
- Nussbaum SR, Younger J, Vandepol CJ, Gagel RF, Zubler MA, Chapman R, et al.: Single-dose intravenous therapy with pamidronate for the treatment of hypercalcemia of malignancy: comparison of 30-, 60-, and 90-mg dosages. *The American journal of medicine* 95(3): 297-304, 1993.
- Pozzi S, Marcheselli R, Sacchi S, Baldini L, Angrilli F, Pennese E, et al.: Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: a review of 35 cases and an evaluation of its frequency in multiple myeloma patients. *Leukemia & lymphoma* 48(1): 56-64, 2007.
- Rodan GA, Martin TJ: Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 289(5484): 1508-1514, 2000.
- Rosen LS, Gordon DH, Dugan W, Major P, Eisenberg PD, Provencher L, et al.: Zoledronic acid is superior to pamidronate for the treatment of bone metastases in breast carcinoma patients with at least one osteolytic lesion. *Cancer* 100(1): 36-43, 2004.
- Ruggiero SL: Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Compendium of continuing education in dentistry* 29(2): 96-98, 100, 2008.
- Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al.: American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update. *Journal of oral and maxillofacial surgery* 72(10): 1938-1956, 2014.
- Sonis ST, Watkins BA, Lyng GD, Lerman MA, Anderson KC: Bony changes in the jaws of rats treated with zoledronic acid and dexamethasone before dental extractions mimic bisphosphonate-related osteonecrosis in cancer patients. *Oral oncology* 45(2): 164-172, 2009.

- Stresing V, Fournier PG, Bellahcène A, Benzaïd I, Mönkkönen H, Colombel M, et al.: Nitrogen-containing bisphosphonates can inhibit angiogenesis in vivo without the involvement of farnesyl pyrophosphate synthase. *Bone* 48(2): 259-266, 2011.
- Tabuchi M, Miyazawa K, Kimura M, Maeda H, Kawai T, Kameyama Y, et al.: Enhancement of crude bone morphogenetic protein-induced new bone formation and normalization of endochondral ossification by bisphosphonate treatment in osteoprotegerin-deficient mice. *Calcified tissue international* 77(4): 239-249, 2005.
- Then C, Hörauf N, Otto S, Pautke C, von Tresckow E, Röhnisch T, et al.: Incidence and risk factors of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in multiple myeloma patients having undergone autologous stem cell transplantation. *Onkologie* 35(11): 658-664, 2012.
- Thumbigere Math V, Tu L, Huckabay S, Dudek AZ, Lunos S, Basi DL, et al.: A retrospective study evaluating frequency and risk factors of osteonecrosis of the jaw in 576 cancer patients receiving intravenous bisphosphonates. *American journal of clinical oncology* 35(4): 386-392, 2012.
- Van Beek ER, Löwik CW, Papapoulos SE: Bisphosphonates suppress bone resorption by a direct effect on early osteoclast precursors without affecting the osteoclastogenic capacity of osteogenic cells: the role of protein geranylgeranylation in the action of nitrogen-containing bisphosphonates on osteoclast precursors. *Bone* 30(1): 64-70, 2002.
- Wang EP, Kaban LB, Strewler GJ, Raje N, Troulis MJ: Incidence of osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma and breast or prostate cancer on intravenous bisphosphonate therapy. *Journal of oral and maxillofacial surgery* 65(7): 1328-1331, 2007.
- Yamamoto Y, Udagawa N, Matsuura S, Nakamichi Y, Horiuchi H, Hosoya A, et al.: Osteoblasts provide a suitable microenvironment for the action of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand. *Endocrinology* 147(7): 3366-3374, 2006.
- Yoshioka T, Okimoto N, Okamoto K, Sakai A: A comparative study of the effects of daily minodronate and weekly alendronate on upper gastrointestinal symptoms, bone resorption, and back pain in postmenopausal osteoporosis patients. *Journal of bone and mineral metabolism* 31(2): 153-160, 2013.

Abstract

Development of animal model for Bisphosphonates–related osteonecrosis of the jaw (BRONJ)

Hyo Won Jang

Department of Dental science

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor In Ho Cha, D.D.S., M.S.D., Ph.D.)

Bisphosphonates, which is used to treat various bone diseases including osteoporosis, can induce osteonecrosis of the jaw. However, pathophysiology, treatment and prevention of Bisphosphonate–related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) are still unclear. The objective of this study was to develop a rat model of BRONJ with clinical, radiological and histological demonstration.

Twenty seven rats were divided into 3 groups; control group (I), zoledronate group (II), zoledronate and dexamethasone group (III). Rats received weekly intraperitoneal injection of the drugs for 4 weeks and extraction of left maxillary and mandibular 1st, 2nd molars were followed. Consecutive injections were performed, and 3 rats were sacrificed at 2, 4, and 8 weeks each in the control group, and 2, 2, and 5 rats were sacrificed at 2, 4, and 8 weeks, respectively, in groups II and III. After clinical determination of the extraction wound, all specimens were further evaluated by radiological and histological

measures. Blood sampling for measurement of C-terminal crosslinked telopeptide of type I collagen and tartrate-resistant acid phosphate 5b rats were performed at the time of 2, 4 and 8 weeks.

Based on this study, the rat model with bisphosphonates and steroid administration was found to be a reliable and reproducible model for BRONJ. This rat model can be used as a valuable model for the detection of biomarkers of BRONJ, which could help further understanding of the pathophysiology of BRONJ.

Key words : Bisphosphonate, jaw necrosis, BRONJ, animal model