

Kondroptosis: Dead but still alive

Tarvo Sillat¹, Yrjö T. Konttinen^{1,2,3}, Zygmunt Mackiewicz^{1,2}, Vesa-Petteri Kouri¹, Jürgen Steinmeyer⁴

¹Sisätautien osasto, Kliininen laitos, HY

²Sairaala ORTON

³Tekonivelsairaala COXA

⁴Clinic and Policlinic of Orthopaedics and Orthopaedic Surgery, University Hospital Giessen, Giessen, Germany

Background

To analyze cell peculiar mechanisms of chondrocyte apoptosis.

Methods.

Synchronous chondrocyte apoptosis was induced by subjecting cartilage explants from metacarpophalangeal condyles of young adult steers to uniaxial sinusoidal cyclic loading at 0.1 Hz-frequency and 0.5 MPa peak stress force for 1, 3, 6 or 9 days. Samples were analysed for DNA fragmentation (active caspase-3 and TdT-mediated dUTP nick end labelling = TUNEL) and loss of membrane integrity (propidium iodide/PI staining with concurrent loss of fluorescein diacetate staining).

Results

Caspase-3 and TUNEL always disclosed a) high proportions of cells undergoing DNA fragmentation compared to PI-positive/fluorescein-negative cells b) also in the transitional and radial zones, whereas PI-positive/fluorescein-negative cells were mostly restricted to the superficial zone and c) an increase of the positive cells over time, whereas the proportion of the PI-positive/fluorescein negative cells remained relatively stable.

Conclusion

Active caspase-3 forms nicks to DNA strands and TUNEL extends them. Fluorescein diacetate only labels cells with an active uptake and cytosolic esterification, which staining is lost upon loss of membrane integrity leading to staining of cellular DNA by PI. It is concluded that the apparent quantitative, topological and kinetic discrepancy between DNA fragmentation and loss of cell membrane integrity is explained by an extended delay of the secondary necrosis of chondrocytes as a result of a peculiar form of apoptosis, known as kondroptosis. Chondrocyte plays a double role in the process having to undergo a programmed cell death, but also to clean after itself, protected by an intact plasma membrane. This hitherto undescribed mode of apoptosis might reflect lack of professional scavengers in chondrocyte lacunae.

Rustosolu on sopeutunut elämään erakkona lakunassaan. Sieltä käsin se ylläpitää perisellulaarista ja territoriaalistakin soluväliainetta tuottaen ja muokaten sitä. Koska rustosolun kuolema estää tämän rustokudoksen ylläpidon, liittyy ruston rappeutuminen ja nivelrikko olennaisesti kondrosyyttien ohjelmoituun solukuolemaan eli apoptoosiin (1,2). Apoptoosi on pääasiallinen kuoleman mekanismi monisoluisessa eliössä. Rustosolun yksinäinen ohjelmoitu kuolema poikkeaa muiden solujen vastaavasta kuolemasta. Rustosolun läheisyydessä ei ole solujäänteitä syöviä scavenger-soluja, kuten monosyyttejä tai makrofageja, jotka normaalissa apoptoosissa poistavat (siivoavat) solujätteet ilman että tämä fagosyytosi tässä yhteydessä aiheuttaa tulehdusta. Siksi tätä erikoisissa olosuhteissa tapahtuvaa apoptoosia on ruvettu kutsumaan nimellä kondroptoosi (3,4). Eroksi klassisesta apoptoosista kondroptoosiin liittyy preterminaalinen solun ilmiäsuun muutos niin että endoplasminen solukalvosto ja Golgin laite hypertrofoituvat tyyppin 2 rustosoluissa. Nämä aktivoituneet solut muuttuvat vasta myöhemmin tyyppilliseksi solulimaltaan ja kromatiiniltaan pyknoottisiksi tyyppin 3 rustosoluiksi (3). On arveltu, että tämä solun sisäisen kalvoston hypertrofia jakaisi soluliman osastoihin, joiden turvissa rustosolu voisi läpikäydä apoptoosia ilman että sen ympärillä on syöjäsoluja (5). Oletuksemme mukaan tähän kondroptoosiin liittyy vielä kolmaskin tyyppillinen piirre, nimittäin solukalvon eheyden ylläpito samalla kun solu jo sisältä käsin hajoaa apoptoosin ja tuman DNA:n pilkkoutumisen myötä. Tämä estää ennenaikaisen apoptoottisten kappaleiden vapautumisen ja niiden sekundaarinekroosin. Tällä tavalla rustosolun on mahdollista kuolemansa jälkeen jättää jälkeensä tyhjää ja siistiä lakuna vaikkei paikalla olekaan scavenger-soluja.

Testataksemme oletustamme käytimme härän vuohisen (fetlock eli mcp-nivel) rustoa, joka altistettiin in vitro osteoartrogeeniselle intermittoivalle, sykliselle kuormalle 9 päivän ajan. Tämän mallin on aiemmin osoitettu johtavan nivelrikon kaltaisiin muutoksiin (6). Nopeasti alkava ja suhteellisen samanlaisesti etenevä apoptoosi antaa hyvän tilaisuuden tutkia näitä varhaisia rustosolun kuoleman tapahtumia ja sitä kautta saattaa olla mahdollista tunnistaa niitä keskeisiä tapahtumia, joihin puuttamalla ruston rappeutumista ja nivelrikkoa voitaisiin estää.

Apoptoosin markkereiksi valittiin aktivoitunut kaspasi-3 (pilkkoo tuman DNA:tä eli tekee siihen lovia = "nicks"), joka tunnistettiin immunohistokemiallisella värjäyksellä, sekä DNA:n lovet, jotka tunnistet-

tiin TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end-labeling) menetelmällä, joka tunnistaa kaspasi-3 pilkkomia vapaita DNA:n päitä rakentaen niihin leiman sisältävän jatkeen. Molempia muutoksia pidetään merkinä siitä, että prosessi on edennyt yli "point-of-no-return":in eikä ole enää palautuva. Solukalvon eheyden säilymistä tutkittiin käyttäen nekroottiset solut ja apoptoottiset kappaleet tunnistavaa propidiumjodidi-menetelmää. Propidiumjodidi ei pysty tunkeutumaan elävään soluun, mutta nekroottisen solun tai apoptoottisen kappaleen DNA:n (tuman tai sen fragmentit) se värjää, koska niiden solukalvo on rikkoutunut. Siihen oli vielä yhdistetty käänteisesti käyttäytyvä soluliman viitaaliväri fluoreskeiinidiasetaatti.

Potilaat ja menetelmät

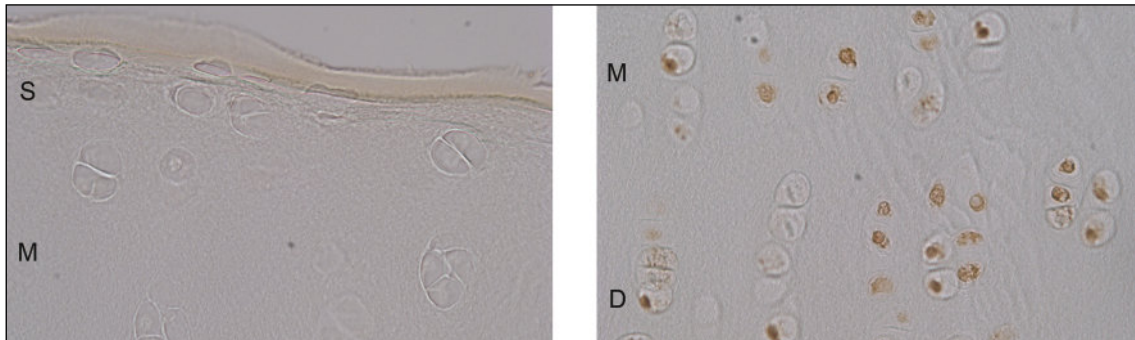
Rustoecksplanttien intermittoiva kuormitus

Tutkimuksessa käytimme mekaanista, tietokoneohjattua kuormituslaitetta, jossa rustokappaleita voidaan kuormittaa steriileissä kudosiselityolosuhteissa (7). Makroskooppisesti terveen näköinen 18–24 kuukautisen härän vuohisen rusto poistettiin painoa kantavalta alueelta. Siitä otettiin 7 mm lävistimellä kiekkomaiset rustonäytteet, jotka pestiin ja laitettiin näyteenpidikkeisiin ruston liukupinta ylöspäin. Näitä rustonäytteitä viljeltiin 2,5 millilitrassa Ham F-12 soluviljelynestettä, johon oli lisätty seerumin korvikkeena CR-ITS (8). Elatusaine vaihdettiin kolmen päivän välein.

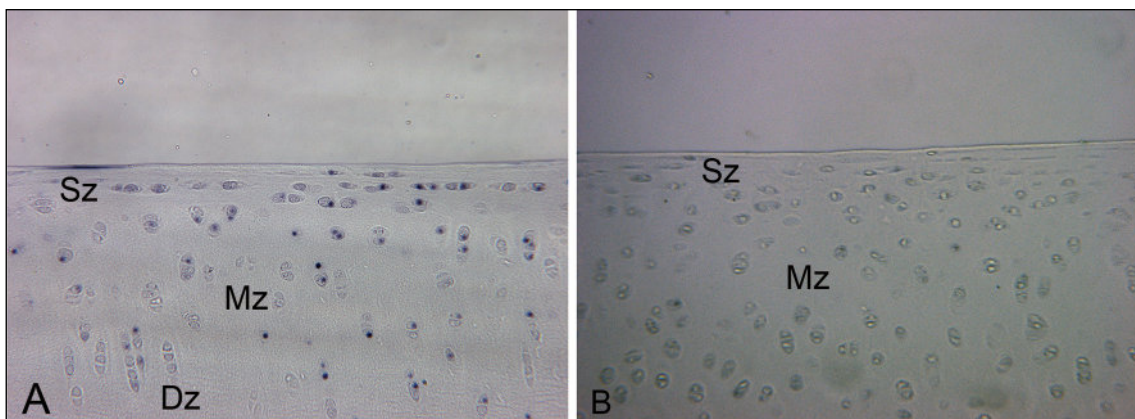
Kuormituslaite laitettiin kahdeksi tunniksi tasapainottamaan 95 % kosteutettuun 5 % CO₂-ilma seokseen. Sen jälkeen radiaalisuunnassa vapaasti laajeneviin rustopaloihin kohdistettiin 1, 3, 6 ja 9 päivän ajan intermittoivasti uniakiaalinen syklinen kuorma, joka oli sinikäyrän muotoinen, taajuudeltaan 0,1 Hz ja huippukuormaltaan 0,5 MPa. Kuormitusjaksot olivat 10 sekuntia pitkät ja tauot 100 sekuntia pitkät. Taukojen aikana kuormituslevy nostettiin pois ruston pinnalta. Kompression aste kuormituksen aikana monitoroitiin (9).

Aktiivisen kaspasi-3:n immunohistologinen värjäys

Kuormitetut rustonäytteet kiinnitettiin formaliiniin ja valettiin parafiiniin. Blokeista valmistettiin 7 µm kudosiselkkeet kromalaun-tymoli-laseille. Kudosiselkkeet deparafinisoitiin ja rehydroitiin, käsiteltiin hyaluronidaasilla ja pestiin fosfaatti-puskuroidussa fysiologisessa keittosuolassa, johon oli lisätty 0,1 % Triton X-100 -detergenttiä. Endogeeninen peroksidaasi salvattiin



Kuva 1. Kuvassa on vasemmalla negatiivinen kontrollivärjäys. Leikkeessä näkyy pinnallinen (tangentiaalinen, superficial) rustokerros (merkattu S kirjaimella) ja transitionaalinen välivyöhyke (merkattu M kirjaimella). Oikealla näkyy kaspasi-3-immunovärjäys. Kaspasi-3 on aktiivinen entsyymi, joka tekee lovia DNA:han. Jos sitä on soluissa, värjäytyvät ne ruskeiksi. Tässä näkyy sekä apoptoosia eli ohjelmoitua solukuolemaa läpikäyviä rustosoluja (ruskeita) että eläviä rustosoluja (eivät ole värjäytyneet) välivyöhykkeessä (merkattu M kirjaimella) ja sitäkin syvemmällä olevassa radiaalisessa vyöhykkeessä (merkattu D kirjaimella).



Kuva 2. Kuvassa vasemmalla TUNEL-positiivisia apoptoosia läpikäyviä soluja pinnallisessa (Sz), transitionaalisessa (Mz) ja radiaalisessa (Dz) vyöhykkeessä. Niiden tumassa on kaspasi-3:n loveamia DNA:n päitä, joihin menetelmän avulla on tehty tunnistamisen mahdollistama "häntä" (end labelling). Oikealla on leimauskontrolli, josta häntää rakentava terminaalinen deoksi-nukleotiditransferaasi on jätetty pois (negatiivinen menetelmäkontrolli).

käyttäen 0,3 % H₂O₂ ja epäspesifistä värjäytymistä vähennettiin käyttäen 1:20 laimennettua vuohen normaalia seerumia esi-inkubaatioissa. Aktivoitunut kaspasi-3 värjättiin käyttäen 2.5 µg/ml kanissa tuotettua aktiiville ihmisen kaspasi-3:lle spesifistä IgG luokan vasta-ainetta (joka ristireagoi härän kaspasi-3:n kanssa). Primaari vasta-aineinkubaatio tehtiin yli yön 4 °C ja antigeeni-vasta-ainereaktio visualisoitiin käyttäen avidiini-biotiini-peroksidaasi-kompleksimetodia (10). Positiiviset solut värjäytyvät ruskeiksi (kuva 1, oikea paneeli).

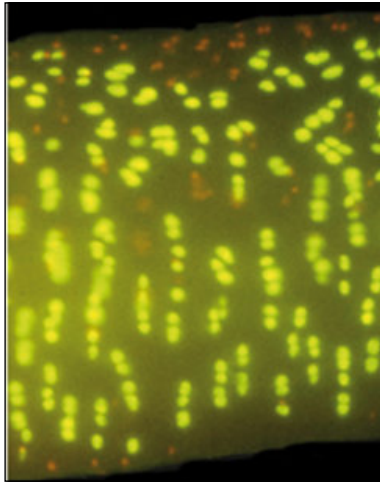
TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end-labeling)

Samat rustonäytteet leimattiin myös käyttäen loven loppupään TUNEL leimausta (11) (kuva 2, vasen pa-

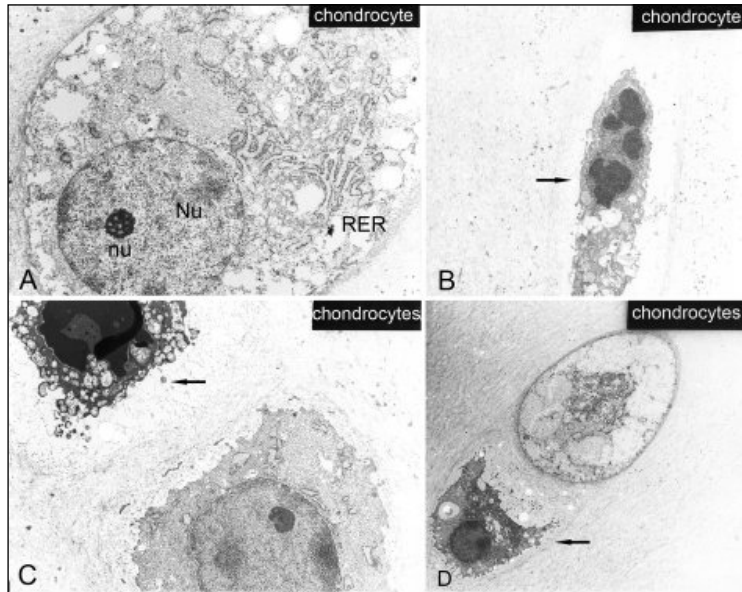
neeli). Negatiivisena menetelmäkontrollina terminaalinen deoksi-nukleotiditransferaasi (TdT) -entsyymi jätettiin pois protokollasta. Positiivisena näytekontrollina käytettiin apoptoottisia osteoklasteja. Näytteestä valmistettuja leikkeitä käsiteltiin myös 0.2 U (100 ng/ml) DNAasilla positiivisten näytekontrollien tuottamiseksi.

Propidiumjodidivärjäys

Samaan aikaan valmistetut ja rinnakkain näiden näytteiden kanssa käsitellyt näytteet pestiin kahdesti steriilissä fosfaatilla puskuroidussa fysiologisessa keittosuolassa. Kuormitetuista näytteistä leikattiin 50 µm paksuisia leikkeitä kohtisuoraan kuormitusakselia vastaan. Leike laitettiin yhden tipan puskuria sisältävälle



Kuva 3. Kuvassa näkyy fluoreskeini-diasetaatti-propidiumjodidi kaksoisvärjäys. Elävät ja ehjät solut ottavat fluoreskeinidiasetaatin sisäänsä ja esteröivät sen, jonka jälkeen se näkyy keltaisen-vihreästi fluoresoivana sopivia eksitaatio-emissio-aallonpituuksia käytettäessä. Kuolleet ja nekroottiset solut eivät pysty näin tekemään ja ne ovat fluoreskeini-negatiivisia. Sen sijaan ne ovat propidiumjodidi-positiivisia ja näkyvät punaisina. Propidiumjodidi ei pääse elävän ja ehjän solun sisään, mutta nekroottiseen solun kalvo rikkoutuu ja propidiumjodidi pääsee solun sisään ja sitoutuu DNAhan solun tumassa tai DNAta sisältävissä sekundaarinekroosin läpikäyneissä apoptoottisissa kappaleissa.



Kuva 4. Transmissioelektronimikroskopiakuvia rustonäytteistä. Paneelissa A näkyy terve rustosolu, jossa on karkeaa ergoplasmaa (RER), tuma (Nu) ja sen sisällä tumajyvänen (nu). Paneelissa B näkyy apoptoottinen rustosolu, jonka tuma on kondensoitunut ja fragmentoitunut. Paneelissa C näkyy apoptoottinen solu, jonka tuma on pyknoottinen ja tumma ja jota ympäröi kondensoitunut ja rakkuloiva (blebbing) solulima (ylhäällä vasemmalla) ja terve tytär-solu (alhaalla oikealla). Paneelissa D näkyy paisunut nekroottinen rustosolu (ylhäällä oikealla) ja apoptoosiin mennyt tytär-solu (alhaalla vasemmalla).

Taulukko 1. Kaspasi-3-, TUNEL- ja propidiumjodidi (PI) -positiiviset solut 1, 3, 6 ja 9 päivän kuormituksen jälkeen (keskiarvot).

Vyöhyke	Biomarkkeri	Day 1	Day 3	Day 6	Day 9
Pinnallinen	Kaspasi-3	60	62	73	95
	TUNEL	67	63	51	82
	PI	78	90	83	98
Transitionaalinen	Kaspasi-3	35	57	71	94
	TUNEL	64	39	54	81
	PI	12	22	15	36
Radiaalinen	Kaspasi-3	43	56	68	94
	TUNEL	30	63	47	79
	PI	9	7	6	15

objektiivilaseille. 200 µl Ham F-12 elatusainetta, johon oli lisätty 0.1 mM fluoreskeiinidiasetaattia ja 0.3 mM propidiumjodidia, laitettiin leikkeille, joita inkuboitiin 5 minuuttia pimeässä 37 °C lämpötilassa ja 95 % kosteudessa. Propidiumjodidia pääsee kuolleisiin rikkinäisiin soluihin, joissa se värjää tumaa (tai apoptoottisten kappaleiden) DNA:n punaiseksi, kun taas vain elävät solut pystyvät aktiivisen kuljetusjärjestelmän avulla ottamaan sisäänsä fluoreskeiinidiasetaattia, joka esteröityy solulimassa ja fluoresoi kellanvihreänä (kuva 3).

Transmissioelektronimikroskopia

Joistain leikkeistä valmistettiin myös ohutleikkeet transmissioelektronimikroskopian varten (kuva 4).

Analyysi

Vähintään 100 kaspasi-3- tai TUNEL-leimattua solua laskettiin tangentiaalisesta pinnallisesta vyöhykkeestä, transitionaalisesta välivyöhykkeestä ja radiaalisesta vyöhykkeestä käyttäen Leitz valomikroskooppia ja Diaplan linssisysteemiä (Wetzlar, Germany). Propidiumjodidi-positiiviset solut laskettiin fluoresenssimikroskoopilla käyttäen 450-490 nm eksitaatiota ja 510-20 nm emissiota 200 x suurennoksella (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Tulokset

Ensimmäisen päivän näytteissä oli pinnallisessa vyöhykkeessä suurin piirtein yhtä paljon kaspasi-3- ja TUNEL-leimattuja kuin propidium-odidi-positiivisia soluja (taulukko 1). Myöhemmin kuitenkin sekä kaspasi-3- että TUNEL-positiivisten solujen lukumäärä lisääntyi varsinkin välivyöhykkeessä ja radiaalisessa vyöhykkeessä (taulukko 1).

Propidiumjodidi-positiivisia soluja näkyi heti alkuun pinnallisessa vyöhykkeessä (kuva 3 ja taulukko 1). Niiden prosenttiosuus ei kuitenkaan ajan myötä kasvanut vaan pysyi melko vakiona sekä pinnallisessa, transitionaalisessa ja radiaalisessa (taulukko 1) vyöhykkeessä koko 9-päiväisen kokeen aikana. Negatiiviset metodikontrollit kaspasi-3- (kuva 1, vasen paneeli) ja TUNEL-menetelmälle (kuva 2, oikea paneeli) sekä positiiviset näytekontrollit vahvistivat leimausmenetelmien toiminnan.

Pohdinta

Apoptoosi tapahtuu hyvin säännönmukaisesti joko ulkoisten (ulkoinen reitti) tai sisäisten (sisäinen reitti) apoptoosia aiheuttavien ärsykkeiden laukaisemana. Tällöin solut kutistuvat samalla kuin niiden tumasta tulee pyknoottinen ja se hajoaa solun muodostaessa apoptoottisia kappaleita. Professionaaliset scavenger-solut poistavat apoptoottisia kappaleita niin että tulehdusreaktiota ei pääse syntymään. Rustosolun kannalta tämä on ongelmallista, koska se elää yksin lakunsaan eikä lähistöllä ole puhtaanaapidoista huolehtivia scavenger-soluja. Ehkä tästä johtuen rustosolun apoptoosissa on havaittu solutyypillisiä piirteitä, jotka erottavat sen läpikäymän apoptoottisen prosessin muiden solujen vastaavasta. Aikaisessa vaiheessa rustosolujen apoptoosiin kuuluu solun aktivaatio ja transdifferentaatio, jolloin endoplasminen solukalvosto ja Golgin laite kasvavat samalla kun ilmeisesti solu hyvin aktiivisesti tuottaa valkuaisaineita, ilmeisesti yrittäen muokata soluväliaineen rakennetta. Onkin esitetty, että tässä vaiheessa soluelimet jakaisivat rustosolun soluliman osastoihin, joissa apoptoosi voisi edetä häiriintymättä eräänlaisena autofaagisena prosessina, jossa solu syö itse itseään sisältä käsin. Muuten on uhkaamassa vaara, että puutteellisesti hajotetut solun osat ja rakenteet vapautuvat rustosolun lakunaan. Tämäntapaista solun sisällä pitkälle etenevää apoptoosia solukalvon samalla säilyessä ehjänä on ehdotettu elektronimikroskooppisten löydösten perusteella (12). Tämän oletuksen testaamiseksi käytimme kahta apoptoosin tunnistamiseen laajalti käytettyä menetelmää, kaspasi-3- ja TUNEL-leimausta samalla kun selvitimme solukalvojen eheyttä käyttäen PI- ja fluoreskeiinidiasetaatti kaksoisvärjäystä. Yleensä scavenger-solujen puuttuessa, esimerkiksi aiheutettaessa apoptoosi joissain soluviljelmissä, sekundaarinen nekroosi seuraa muutamassa tunnissa ja viimeistään 48 tunnin sisällä prosessin alusta (13). Näin ei käynyt rustossa.

Ym. menetelmiä käyttäen osoitimme selvät kvantitatiiviset, topologiset ja kineettiset erot DNAn pilkkoutumista ja solukalvon eheyttä luotaavien menetelmien välillä. DNAn pilkkoutumista läpikäyvien solujen %-osuus oli suurempi kuin solukalvon integriteetin menettäneiden PI-positiivisten, fluoreskeiini-negatiivisten rikkonaisten solujen. Kaspasi-3- ja TUNEL-positiivisten solujen prosenttiosuus oli varsinkin transitionaalisessa ja radiaalisessa vyöhykkeessä suurempi kuin PI-positiivisten solujen %-osuus. Kolmanneksen, kaspasi-3- ja TUNEL-positiivisten solujen %-

osuus kasvoi ajan funktiona kun taas PI-positiivisten solujen %-osuus pysyi melko vakiona.

Päättelemme, että rustosolun apoptoosi etenee melko pitkään ehjän solukalvon sisällä ja suojissa. Jo kaspaaasi-3- ja TUNEL-positiivisiksi muuttuneiden solujen apoptoosin katsotaan olevan palautumaton koska tapahtumaketju on jo edennyt ohi ”point-of-no-return” checkpointin. Sen sijaa usein apoptoosin tutkimiseen käytettävät pro-apoptoottiset merkkiaineet kuten Bax, Bid ja Bak voivat esiintyä soluissa, jotka vielä elpyvät, mutta DNAn pilkkoutuminen vie solulta mahdollisuuden ylläpitää normaalia rakennetta ja toimintaa. Tämän vuoksi tämä työ vahvistaa aiemmat oletukset kondroptoosista erityisenä kondrosyytityypillisenä tapahtumasarjana. Tähän liittyy solujen pre-terminaalinen aktivaatio, jonka vaikutuksesta käyttämässämme ex vivo mallissa syntyy nivelrikolle tyypilliset soluväliainemuutokset yhdeksän päivän sisällä vaikka tämä ihmisrustossa vaatii vuosikymmeniä. Tämä aktivaatio tuottaa myös ne lyyttiset mutta solun sisällä pysyvät entsyymit, joita solun sisältä käsin tapahtuva hajoaminen edellyttää silloin kun paikalla ei ole scavenger-toimintaa hallitsevia soluja.

Tällä intermittoivalla ja sykliellä kuormituksella on voitu tuottaa nivelrikon kaltaisia muutoksia proteoglykaaneissa, fibronectiinissä ja kollageenissa (9,14). Tämä hämmästyttävä samankaltaisuus nivelrikkoisen ruston kanssa viittaa siihen, että kyseessä on aktiivinen rustosolujen (apoptoosiin) liittyvä muutos pikemminkin kuin passiivinen kuluminen (3,4). Tämä kondrosyytityypillinen varhainen apoptoosin ”loppukiri”-muutos aiheuttaa endoplasmisen kalvoston ja Golgin laitteen liikkasvun ja ilmeisesti myös soluväliaineen komponenttien ja sitä muokkaavien entsyymien kiihtyneen synteesin. Täten selittyy se, miten on mahdollista että yleensä vuosikymmenien ajan pituista kypsyttelyä vaativat muutokset syntyvät alle 1/2000 ajassa, runsaassa viikossa.

Päättelemme, että käyttämässämme mallissa nivelrikon kaltaiset muutokset, aivan niin kuin ihmisen nivelrikossakin, ovat kytkettyjä rustosolujen apoptoosiin. Nivelrikossa usein suuri osa rustosoluista on kuollut apoptoosin myötä, mutta ex vivo mallissa voidaan vielä tunnistaa tätä ohjelmoitua solukuolemaa läpikäyvät solut. Voidaan päätellä, että solukalvon eheys säilyy ainakin 9 vuorokautta, mutta ei ole tarkempaa tietoa siitä miten paljon pidempään se säilyy. Tavalisesti se menetetään alle kahdessa vuorokaudessa, usein vain muutamassa tunnissa. Tuloksemme ei voi olla väärä negatiivinen tulos, koska pinnallisessa vyö-

hykkeessä oli kaikissa näytteissä PI-positiivisia nekroottisia soluja positiivisena näytteen sisäisenä näytekontrollina. Kokeelliselta kannalta tämä rustosolujen samaan aikaan alkuun laitettu apoptoosi on edullinen, koska sen avulla voidaan tutkia prosessin kriittisen alkuvaiheen säätelyä. Koska kyseessä on aktiivinen soluvetoinen tapahtumasarja saattaa näin löytyä ruston degeneraatiota ja nivelrikon etenemistä sääteleviä intervention mahdollisuuksia, joiden avulla olisi mahdollista kehittää uusia hoitomuotoja nivelrikon hoitoon (15).

Kiitos

Sigrid Juseliuksen säätio, evo, TEKES:n Matera ohjelma, Finska Läkaresällskapet ja Wilhelm och Else Stockmannin säätio ovat tukeneet tutkimustamme.

Kirjallisuus

1. Sharif M, Whitehouse A, Sharman P, Perry M, Adams M: Increased apoptosis in human osteoarthritic cartilage corresponds to reduced cell density and expression of caspase-3. *Arthritis Rheum* 2004;50:507-515.
2. Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S, Lotz M: Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:1632-1638.
3. Kouri JB, Lavalle C: Do chondrocytes undergo "activation" and "transdifferentiation" during the pathogenesis of osteoarthritis? A review of the ultrastructural and immunohistochemical evidence. *Histol Histopathol* 2006;21:793-802.
4. Perez HE, Luna MJ, Rojas ML, Kouri JB: Chondroptosis: an immunohistochemical study of apoptosis and Golgi complex in chondrocytes from human osteoarthritic cartilage. *Apoptosis* 2005;10:1105-1110.
5. Roach HI, Aigner T, Kouri JB: Chondroptosis: a variant of apoptotic cell death in chondrocytes? *Apoptosis* 2004;9;3:265-277.
6. Steinmeyer J, Ackermann B, Raiss RX: Intermittent cyclic loading of cartilage explants modulates fibronectin metabolism. *Osteoarthritis Cartilage* 1997;5:331-341.
7. Steinmeyer J: A computer-controlled mechanical culture system for biological testing of articular cartilage explants. *J Biomech* 1997;30:841-845.
8. Wolf A, Raiss RX, Steinmeyer J: Fibronectin metabolism of cartilage explants in response to the frequency of intermittent loading. *J Orthop Res* 2003;21:1081-1089.
9. Steinmeyer J, Knue S, Raiss RX, Pelzer I: Effects of intermitently applied cyclic loading on proteoglycan metabolism and swelling behaviour of articular cartilage explants. *Osteoarthritis Cartilage* 1999;7:155-164.

10. Kontinen YT, Mandelin J, Li TF, Salo J, Lassus J, Hukkanen J, ym: Acidic cysteine endoproteinase cathepsin K in the degeneration of the superficial articular hyaline cartilage in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:953-960.
11. Čeponis A, Hietanen J, Tamulaitienė M, Partsch G, Päätiälä H, Kontinen YT: A comparative quantitative morphometric study of cell apoptosis in synovial membranes in psoriatic, reactive and rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 1999;38:431-440.
12. Ahmed YA, Tatarczuch L, Pagel CN, Davies HM, Mirams M, Mackie EJ: Physiological death of hypertrophic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15:575-586.
13. Sánchez-Alcázar JA, Rodríguez-Hernández A, Cordero MD, Fernández-Ayala DJ, Brea-Calvo G, Garcia K, ym: The apoptotic microtubule network preserves plasma membrane integrity during the execution phase of apoptosis. *Apoptosis* 2007;12:1195-1208.
14. Ackermann B, Steinmeyer J: Collagen biosynthesis of mechanically loaded articular cartilage explants. *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13:906-914.
15. Steinmeyer J, Kontinen YT: Oral treatment options for degenerative joint disease – presence and future. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2006;58:168-211.