



## Sıçan eklem kıkırdağında kortikosteroide bağlı gelişen kondrosit apoptozu üzerinde zoledronik asidin koruyucu etkisi

Alpay Merter ÖZENCİ<sup>1</sup>, Tefvik ASLAN<sup>2</sup>, Zeliha ŞAHİN<sup>3,4</sup>, Özlem ÖZBEY<sup>3</sup>, Nuray ACAR<sup>3</sup>, İsmail ÜSTÜNEL<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Antalya;

<sup>2</sup>Özel Medstar Hastanesi, Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği, Antalya;

<sup>3</sup>Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Antalya;

<sup>4</sup>Yakın Doğu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Lefkoşa, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti

**Amaç:** Bu çalışmamızda sistemik kortikosteroid uygulamasının *in vivo* eklem kıkırdağı kondrositleri üzerindeki apoptotik etkilerini ve zoledronik asidin kortikosteroide bağlı apoptoz üzerindeki olası etkileri olup olmadığını değerlendirmeyi amaçladık.

**Çalışma planı:** Yirmi dört adet Wistar sıçanı rastgele 3 gruba ayrıldı. Kontrol grubunda, intramusküler izotonik tuz çözeltisi haftalık olarak enjekte edildi. İkinci grupta ise, kas içine 10 mg/kg dozunda kortikosteroid (metilprednizolon) enjeksiyonu 8 hafta boyunca haftada bir uygulandı. Üçüncü grupta, 10 mg/kg intramusküler kortikosteroid (metilprednizolon) enjeksiyonu 8 hafta boyunca haftada bir doz uygulanırken, ek olarak 0.1 mg/kg zoledronik asit 0, 21 ve 42. günde deri altına enjekte edildi. Tedavinin sonunda her gruptan femur başı örnekleri alındı ve apoptotik kondrositleri saptamak için TUNEL yöntemi kullanıldı. Karşılaştırmalı analizler için ANOVA yöntemi ve Tukey testinden yararlanıldı.

**Bulgular:** Kortikosteroid grupla diğer iki grup (kontrol grubu için  $p=0.005$  ve kortikosteroid + zoledronik asit grubu için  $p=0.047$ ) arasında anlamlı bir fark vardı. Zoledronik asit tedavisi eklem kıkırdağında kortikosteroide bağlı gelişen apoptotik kondrosit sayısını anlamlı olarak azalttı ( $p<0.05$ ).

**Çıkarımlar:** Zoledronik asit, kondrositlerde kortikosteroide bağlı gelişen apoptoz nedeniyle oluşabilecek eklem kıkırdağı bozulmasını önleyici bir potansiyele sahip olabilir.

**Anahtar sözcükler:** Apoptoz; kıkırdak; kondrosit; kortikosteroid; zoledronik asit.

Eklem içi uygulamadan sonra kortikosteroidlerin eklem kıkırdağı üzerindeki etkileri daha önce çalışılmış olmasına rağmen, eklem kıkırdağı üzerinde sistemik kortikosteroid kullanımının etkileri ile ilgili az sayıda çalışma vardır. Bu hayvan deneylerinde, eklem kıkırdağının yapısal değişiklikleri, sistemik kortikosteroid uygulamasından sonra araştırılmış ve doza bağımlı bir şekilde matriks sentezinin bozulduğu, protein ve proteoglikan sentezinin

azaldığı ve kıkırdak yüzeyinde bozulma meydana geldiği bildirilmiştir. Bu çalışmaların bazılarında kortikosteroidlerin artan hücre ölümüne neden olabileceği bildirilmiş ancak apoptozu ortaya koyacak özel yöntemler uygulanmamıştır.<sup>[1-9]</sup>

Apoptoz, programlanmış hücre ölümü anlamına gelir ve çeşitli etkiler nedeniyle hücre ölümü ile sonuçlanan bir süreci açıklar. Apoptozu tanımlamak için özel bir

**Yazışma adresi:** Dr. Alpay Merter Özenci, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, 07070, Antalya.

Tel: 0242 - 249 61 71 e-posta: merteroz@yahoo.com

**Başvuru tarihi:** 14.12.2012 **Kabul tarihi:** 20.08.2013

©2013 Türk Ortopedi ve Travmatoloji Derneği

Bu yazının çevrimiçi İngilizce versiyonu  
www.aott.org.tr adresinde  
doi:10.3944/AOTT.2013.3136  
Karekod (Quick Response Code):



yöntem, TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling*) yöntemidir. Bu yöntemle, DNA sarmal zincirindeki kırılmalar enzimatik etiketleme ile saptanır.<sup>[10,11]</sup> Kortikosteroid tedavisinin neden olduğu kondrosit apoptozunu araştıran sınırlı sayıdaki çalışmada tedavi, eklem içi uygulama<sup>[12]</sup> ya da hücre kültürü modelleri<sup>[13-17]</sup> üzerinde incelenmiş, bir çalışmada da sıçanlardaki böbrek yetmezliği modelinde kortikosteroidlerin büyüme plağı üzerindeki etkileri araştırılmıştır.<sup>[18]</sup> Yukarıda belirtilen çalışmaların tümünde kortikosteroid tedavisinin neden olduğu kondrosit apoptozu ve kırıkdağ hücreleri üzerinde zararlı etkiler bildirilmesine rağmen, bildiğimiz kadarıyla eklem kırıkdağı üzerinde sistemik kortikosteroid tedavisinin apoptotik etkilerini araştıran *in vivo* bir çalışma yoktur.

Kortikosteroidler yaygın olarak çeşitli hastalıkların olduğu kadar kafa travması veya organ nakli sonrasında belirtileri tedavi ya da kontrol etmek için de kullanılabilir. Eklem kırıkdağının geleceği ile ilgili yeterli bilimsel veri olmadığı için, sistemik kortikosteroid tedavisinin eklem kırıkdağını ne derece etkilediği ve kortikosteroid tedavisi alanlar için kortikosteroidlerin eklem kırıkdağı üzerindeki zararlı etkilerini önleyici bir önlemin olup olmadığı konusunda bilgi sahibi değiliz.

Bifosfonatların antioksidan özelliklere sahip olduğu ve bu yolla kondrosit lipid peroksidasyonunu önlediği ve romatoid artrit tedavisi edici potansiyele sahip olduğu belirtilmiştir.<sup>[19]</sup> Buna ek olarak, kondrosit kültürlerinde eklem kondrositlerinde kortikosteroide bağlı apoptoz üzerinde bifosfonatların koruyucu etkisi gözlenmiştir.<sup>[20]</sup>

Bu çalışmanın amacı, sistemik kortikosteroid uygulamasının apoptotik etkilerini *in vivo* sorgulamak ve kortikosteroide bağlı apoptoz üzerine bifosfonatların herhangi bir etkisinin olup olmadığını araştırmaktır.

## Gereç ve yöntem

Bu çalışmada, her birinin ağırlığı 200-250 g olan 24 erişkin dişi Wistar sıçan kullanıldı. Sıçanlar her birinde 8 adet olacak şekilde rastgele 3 gruba ayrıldı. Hayvanların standart sıçan laboratuvar diyeti ve musluk suyuna serbest olarak ulaşmalarına izin verildi. Kontrol grubundaki hayvanlara 8 hafta boyunca izotonik tuz solüsyonu haftada bir kez kas içine enjekte edildi. Kortikosteroid grubunda hayvanlara 8 hafta boyunca metilprednizolon (Prednol-L ampul, Mustafa Nevzat, İstanbul, Türkiye) haftada bir kez 10 mg/kg dozunda kas içi enjekte edildi. Yüksek doz kortikosteroid enjeksiyonları kırıkdağ ve kemik hücrelerinde apoptoz gelişimine neden olabilirken,<sup>[17]</sup> düşük doz metilprednizolon uygulamasının sıçanlarda kalsiyum dengesi ve kemik yapısı üzerinde herhangi önemli bir etkisi yoktur.<sup>[21]</sup> Bu nedenle biz, pilot çalış-

mamıza bağlı olarak kondrosit apoptozuna neden olabilecek bir doz ve uygulamak için pratik bir yol seçtik.

Kortikosteroid + zoledronik asit grubunda, 8 haftalık bir süre boyunca haftada bir kez 10 mg/kg kas içi metilprednizolon enjekte edildi ve ayrıca 0, 21 ve 42. günlerde 0.1 mg/kg deri altı zoledronik asit (Zometa®; Novartis Pharma AG, Basel, İsviçre) uygulandı. Cerrahi sonrası 1. ve 4. haftalarda uygulanan 0.1 mg/kg zoledronik asit enjeksiyonunun sıçanlarda cerrahiye bağlı femur başında oluşturulan osteonekroz sonrası femur başı mimarisini koruduğu gösterilmiştir.<sup>[22]</sup> Ayrıca, Zometa® klinik kullanımında 3 ila 4 haftada bir uygulanmaktadır,<sup>[23]</sup> bu nedenle 0.1 mg/kg deri altı zoledronik asit enjeksiyonunu 0, 21 ve 42. günlerde uygulamayı tercih ettik.

Bu deneysel protokol, kurumumuzun Hayvan Bakım ve Kullanım Kurulu tarafından onaylanmıştır ve aynı zamanda Helsinki Bildirgesi ve Uluslararası Ağrı Çalışmaları Birliği'nin yönergeleri ile uyumludur.

Sekiz haftalık dönemin sonunda, fareler yüksek dozda anestezi ile öldürüldü ve femur başları çıkarıldı. Dokular immünohistokimyasal incelemelerde kullanılmak üzere parafine gömme işlemi için işlendi. Femur başı örnekleri 1 hafta boyunca %10 formalin içinde tespit edildi. Daha sonra, dokular 24 saat boyunca musluk suyu ile yıkandı, 3 gün boyunca %25 formik asit (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) içinde dekalsifiye edildi, tekrar 24 saat musluk suyu ile yıkandı ve 0.35 M sodyum sülfat (Lachema, Brno, Çek Cumhuriyeti) çözeltisi içinde 3 gün boyunca nötralize edildi. Takiben, dokular 24 saat boyunca musluk suyu ile bir kez daha yıkandıktan sonra, kademeli bir dizi etanol serisinden geçirilerek kurutuldu ve parafin balmumu içine gömüldü. Tüm numunelerden 5 µm kalınlığında seri kesitler alındı ve hematoksilin-eozin (HE) boyama sonrası rutin histolojik inceleme için veya immünohistokimyasal etiketleme için boyandı.

Eklem dokusundaki apoptoz DNA zincirindeki kırılmaların enzimatik etiketlenmesi ile TUNEL yöntemi kullanılarak saptandı. Femur başından alınan 5 µm kalınlığındaki parafin kesitler kesildi ve poli-L-lisin kaplı slaytlar üzerine yerleştirildi; kurutmadan sonra slaytlar inkübatörde 45°C'de bir gece ve 60°C'de 1 saat boyunca bırakıldı. Deparafinizasyon ve rehidrasyondan sonra slaytlar iki kez fosfat tamponlu tuz içinde 5 dakika boyunca yıkandı. Sekiz dakika boyunca 4°C'de geçirgenlik çözeltisi (%0.1 sodyum sitrat içinde %0.1 Triton X-100) ile inkübasyondan ve fosfat tamponlu tuzlu su ile iki kez 5 dakika boyunca yıkamadan sonra her bir örnek için 50 µL TUNEL reaktifi kullanılarak etiketleme reaksiyonu uygulandı. Negatif kontrolde ise, enzim olmadan bu reaktif ilave edildi ve 1 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi. Fosfat tamponlu tuzlu su ile yıkama sonrasında slaytlar 30 dakika boyunca 37°C'de dönüştürücü reaktif ile inkübe

edildi. Yıkamadan sonra, işaretli DNA sarmal kırılmalarını içeren hücrelerin lokalizasyonu için, slaytların 10 dakika boyunca Fast Red substrat çözeltisi ile inkübe edilmesiyle renklendirme işlemi gerçekleştirildi. TUNEL ile işaretleme, bir Hücre Ölümü Tespit Kiti (Roche, Mannheim, Almanya) ile ve üreticinin talimatlarına uygun olarak yapıldı.

TUNEL işaretli hücreler hem kontrol hem de deney gruplarında özel bir mercek ölçeği olan Axioplan mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Almanya) kullanılarak değerlendirildi. Her gruptan birer adet olacak şekilde rastgele seçilen üç slayttan,  $\times 80$  büyütmede beş farklı alanda TUNEL pozitif hücreler analiz edildi. Deney gruplarına kör iki gözlemci, TUNEL pozitif hücre sayımını yaptı ve ortalama puanlar kullanıldı.

TUNEL pozitif hücre sayımı verileri tek yönlü ANOVA testi ile analiz edildi. Gruplar arasında anlamlılık post-hoc Tukey testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama $\pm$ SS olarak sunuldu. İstatistiksel hesaplamalar SigmaStat for Windows v.3.0 (Jandel Scientific Corp., San Rafael, CA, ABD) kullanılarak yapıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi  $p < 0.05$  olarak belirlendi.

## Bulgular

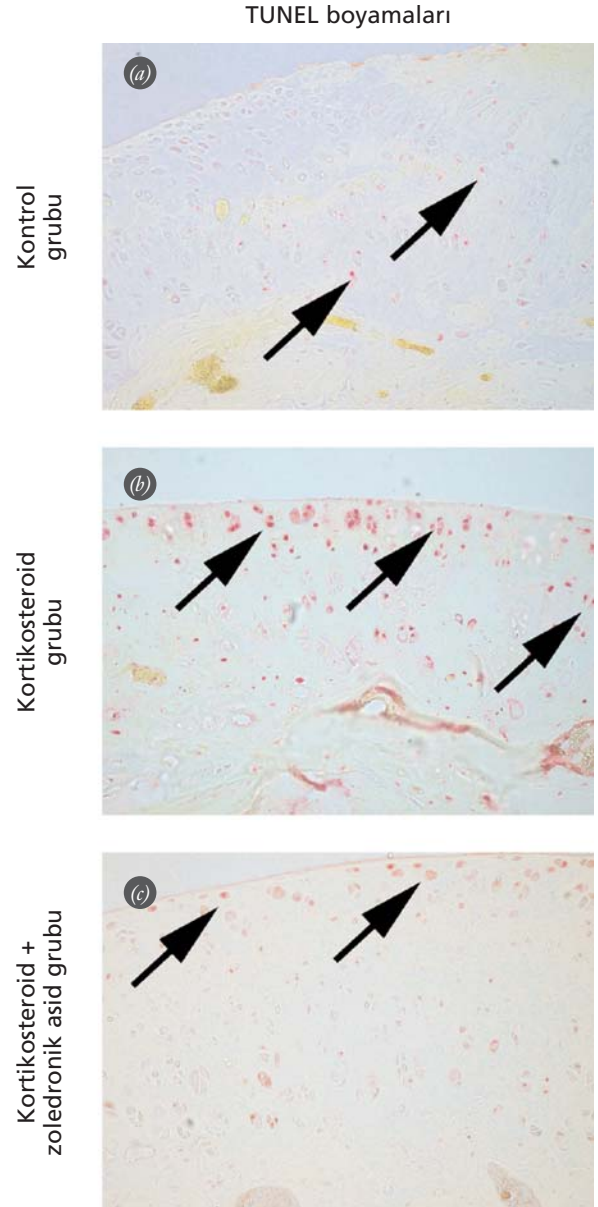
Deney ve kontrol gruplarından elde edilen apoptotik hücre değerleri (ortalama $\pm$ SS) Tablo 1'de sunulmuştur.

Apoptotik kondrosit değerleri kortikosteroid grubunda, kontrol ve kortikosteroid + zoledronik asit grupları ile karşılaştırıldığında, anlamlı bir artış gösterdi (sırasıyla  $p=0.005$  ve  $p=0.047$ ). Kontrol ve kortikosteroid + zoledronik asit grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu. TUNEL boyamada gruplar arasındaki farklılıklar Şekil 1'de açık bir şekilde görülmektedir. Kortikosteroid tedavi grubunda yoğun apoptoz yüzeysel bölgeye yakın alanlarda daha çok görüldü.

## Tartışma

Kortikosteroidler çok çeşitli hastalıkların belirtilerini kontrol veya tedavi etmek için, ya da kafa travması sonrası ve organ nakilleri sonrasında sık kullanılırlar. Bu gibi klinik durumlarda eklem kıkırdağının uzun vadedeki akıbeti belirsizdir. Organ nakli sonrasında kortikosteroid

idi tedavisi temel immünsüpresif tedavi ile birlikte standart bir protokoldür. Bu tedavi protokolünün kıkırdak üzerine zararsız olduğu kabul edilmekle birlikte, transplant hastalarında avasküler nekroza (AVN) bağlı osteoartrit (OA) dışında, ana eklemlerde ilerleyici kıkırdak sorunları ise ortaya konmamıştır.<sup>[2,4]</sup> Karaciğer nakli son-



**Şekil 1.** Grupların TUNEL boyamaları. (a) Kontrol grubunda, TUNEL pozitif hücrelerin normal dağılımı görülmekte. Oklar kıkırdak orta bölgesindeki pozitif hücreleri gösteriyor. (b) Kortikosteroid grubunda, kıkırdığın yüzeysel bölgesinde TUNEL pozitif hücrelerin önemli ölçüde sayısı ve yoğunluğu artmıştır. Oklar işaretlenmiş pozitif hücreleri gösteriyor. (c) Kortikosteroid + zoledronik asit grubunda, TUNEL pozitif hücrelerin sayısı ve yoğunluğu kortikosteroid grubuna göre azalmıştır. Oklar pozitif hücreleri gösteriyor (HE,  $\times 80$ ). [Bu şekil, derginin [www.aott.org.tr](http://www.aott.org.tr) adresindeki çevrimiçi versiyonunda renkli görülebilir.]

**Tablo 1.** Sığan eklem kıkırdağındaki apoptotik kondrosit sayıları (ortalama $\pm$ SS).

	Kontrol	Kortikosteroid	Kortikosteroid + Zoledronik asit
TUNEL pozitif kondrositler	18 $\pm$ 14	77 $\pm$ 40*	36 $\pm$ 21

\* $p < 0.05$

rasında AVN olmaksızın hızlı multifokal kondroliz bildirilen toplamda 5 olgunun incelendiği ve yakın zamanda yayınlanan iki çalışmada, kortikosteroid immünsüpresif tedaviye yardımcı olarak kullanılmış ve hiçbir kemikte mikrokırık saptanmamıştır.<sup>[2,24]</sup> Her iki yayında da, kırıkta bozulmasına yol açabilecek birden fazla potansiyel faktör olmasına rağmen kondrolizin muhtemel nedeni olarak çok faktörlü etkileşim öne sürülmüştür. Bizim çalışmamız ise kortikosteroid tedavisi sonrası artmış kondrosit apoptozuna bağlı kırıkta yıkımının olası nedenlerinden birinin kortikosteroidler olduğunu göstermiştir. Bu yüzden, organ nakli sonrası kırıkta bozulmasını araştıran gelecekteki çalışmalarda kortikosteroidler dikkate alınmalıdır.

Kortikosteroidlerin eklem kırıkta kondrositleri üzerindeki apoptotik etkilerini inceleyen çalışmalar literatürde yer almaktadır.<sup>[12-18]</sup> Bu çalışmalarda, sistemik kortikosteroid tedavisinin terminal hipertrofik kondrositlerdeki apoptozu tetikleyerek ve kondrosit çoğalmasını baskılayarak büyüme kırıkta kalınlığında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir,<sup>[18]</sup> Bcl-2'nin azaltılması ve Bax salınımının artırılması yoluyla da çoğalan ve hipertrofik kondrositlerdeki apoptozu arttırdığı ifade edilmiştir.<sup>[15,18]</sup> Bizim çalışmamızda, sistemik kortikosteroidlerin eklem kırıkta kondrositleri üzerindeki apoptotik etkileri *in vivo* çalışıldı ve apoptozun arttığı gözlemlendi. Bu açıdan çalışmamız, kortikosteroidlerin eklem kırıkta kondrositleri üzerindeki apoptotik etkilerini *in vivo* gösteren ilk çalışmadır. Sonuçlarımız, kortikosteroidlerin kondrosit kültürleri üzerindeki etkilerini gösteren çalışmalar ile uyumludur. Bu çalışmalarda kortikosteroidlerin zararlı etkileri gösterilmiştir.<sup>[13-18]</sup>

Apoptotik yolak, birden fazla bileşeni ile karmaşık bir sistemdir. Apoptoz geçirecek hedeflenen hücrelerin bozulmasından sorumlu bir protein ailesi olan kaspaz enzimleri bu yolağın önemli bileşenlerindedir. Başlatıcı kaspaz-8 ya da kaspaz-9 aktivasyonundan sonra apoptoz oluşabilir.<sup>[25]</sup> Kaspazlara bağımlı bu iki yolağın yanı sıra, fosfatidilinozitol 3-kinaz (PI3K)/Akt yolağı da kortikosteroid kaynaklı apoptozda önemli bir bileşen olarak kabul edilir.<sup>[26]</sup> Yakın zamanlı bir çalışmada, kortikosteroidlerin Akt fosforilasyonunu ve bu sayede PI3K/Akt sinyal ileti yolağını inhibe ederek kondrosit apoptozunu arttırdığı gösterilmiştir.<sup>[12]</sup>

Yakın zamanlı bir OA modeli çalışmasında, nitrojen içeren bir bifosfonat olan alendronatın kırıkta MMP13, IL-1b, RANKL, COLX ve VEGF ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir.<sup>[27]</sup> MMP13 ve IL-1b'nin OA'da kırıkta hasarına yol açtığı bilinmektedir ki, bu da kondrositlerin aracılığı ile olmaktadır.<sup>[28]</sup> RANKL ise osteoklast farklılaşmasını düzenlemektedir ve aynı zamanda kırıkta bulunur.<sup>[29]</sup> Artritli diz eklemlerinin inflamuar hücreleri ve kırıkta dokusu yüksek düzeyde

RANKL<sup>[30]</sup> ve COLX<sup>[31]</sup> içerir. Osteoartritte, bir anjiyojenik faktör olan VEGF ekspresyonu kondrositlerde artmıştır.<sup>[32]</sup> Yazarlar, alendronatın MMP13, IL-1b, COLX, VEGF ve RANKL ekspresyonunu inhibe etmesi ile eklem kırıkta koruduğu sonucuna varmışlardır.<sup>[27]</sup> Bizim çalışmamızda ise, kortikosteroid kaynaklı apoptozun önlenmesi için nitrojen içeren bir bifosfonat olan zoledronik asit kullanılmıştır.

Osteosit ve osteoblastlarda glukokortikoid nedenli apoptozu araştıran bir çalışmada, bifosfonatların pro-apoptotik uyarana bakmaksızın apoptozu inhibe ettiği gösterilmiş ve yazarlar bifosfonatların pro-apoptotik yoldan bağımsız olarak hücre ölümünü inhibe ettiği sonucuna varmışlardır.<sup>[33]</sup> Bir diğer çalışmada,<sup>[34]</sup> bifosfonatların osteositik hücreler ve osteoblastlar üzerindeki anti-apoptotik etkisinin hücre dışı sinyalle regüle olan kinazların (ERK) hızlı aktivasyonunu içerdiği gösterilmiştir. Bisfosfonatlar ile indüklenen ERK ilişkili anti-apoptotik sonuç, ERK'lerin sitoplazmik hedef bölgesinin kinaz aktivitesini gerektirir ki, bu da, pro-apoptotik protein BAD ve C/EBP'nin (CCAAT/güçlendirici bağlayıcı protein) fosforilasyonunu sağlar.

Fareler üzerinde gerçekleştirilen yakın zamanlı bir çalışmanın bulguları, glukokortikoide bağlı artmış osteoblast apoptozunda sağkalım sinyal aktivasyonunda bifosfonatların bir rolü olabileceğini destekler niteliktedir.<sup>[35]</sup>

Elimizde zoledronik asidin kortikosteroide bağlı apoptozunun önlenmesine dair kesin mekanizmalar ve yolları açıklayacak ayrıntılı veriler olmamasına rağmen, daha önce gösterildiği gibi, pro-apoptotik uyarana ne olursa olsun, zoledronik asidin ERK'lar üzerinden apoptozu inhibe edebileceğini düşünüyoruz.

Bu çalışmada, hipotezimizi sadece TUNEL yöntemini kullanarak test ettik. Bu da çalışmanın zayıf bir yönü olarak kabul edilebilir. Kültür hücrelerinde apoptotik kondrositlerin belirlenmesi için bir başka kabul edilen yöntem, kondrositlerin FITC etiketli aneksin-V ve propidyum iyodür (PI) ile boyanması olup bu yöntemde akış sitometrisi kullanılır.<sup>[36,37]</sup> Akış sitometrisi için kondrosit kültürü veya izolasyonu gerekli olduğundan, çalışmamızda bu tekniği kullanmamız mümkün olmadı.

Önceki bir çalışmada, sistemik kortikosteroid tedavi sonrası sıçan eklem kırıkta kök hücre belirteçlerinde (CD105 ve CD166) önemli bir azalma bildirilmiş ve söz konusu hücre yüzey moleküllerindeki azalmanın kondrosit canlılığı ve genel eklem kırıkta yapısını etkilemiş olabileceği öne sürülmüştür.<sup>[38]</sup> Bizim çalışmamızda, eklem kırıkta yüzeyel bölgesinde belirgin olan kondrosit apoptozunun uzun vadede kırıkta bozulmasına yol açabilecek potansiyele sahip olduğu hipotezini desteklemektedir.



Çalışmamızdan elde edilen ikinci sonuç, zoledronik asit tedavisinden sonra sistemik kortikosteroidle bağlı apoptozun azalmasıdır. Bu konudaki tek çalışma, kondrosit kültürlerinde zoledronik asit tedavisi sonrası kortikosteroidle bağlı kondrosit apoptozunun azaldığını bildiren *in vitro* çalışmadır ve bulguları bizim çalışmamız ile tutarlıdır.<sup>[20]</sup>

Sonuç olarak, uzun süreli kortikosteroid tedavisinin eklem kıkırdığı kondrositleri üzerinde zararlı etkilere neden olabileceği ve bunun gelecekte dejeneratif eklem hastalığına yol açabileceği ihtimaline dair hastalar bilgilendirilmelidir. Uzun süreli sistemik kortikosteroid tedavisi alan hastalarda bifosfonatların etkisini incelemek için yeni klinik çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca, kortikosteroid tedavisinin neden olduğu kıkırdak bozulması üzerine bifosfonatların rejeneratif etkisinin olup olmadığını görmek için de yeni klinik çalışmalar tasarlanmalıdır.

### Teşekkür

Histolojik kesitlerin elde edilmesinde ve hazırlanmasındaki teknik yardımları için Bayan Sibel ÖZDEN ÖZER'e, zoledronik asit (Zometa®) ve bu çalışmada kullanılan TUNEL kitleri ve gereken malzemenin sağlanmasındaki katkıları için Novartis Türkiye'ye teşekkürlerimizi sunarız.

**Çıkar Örtüşmesi:** Çıkar örtüşmesi bulunmadığı belirtilmiştir.

### Kaynaklar

- Anefeld M. The dose dependent effect of glycosaminoglycan peptide complex on corticosteroid-induced disordered metabolism in cartilage tissue of rats. [Article in German] *Z Rheumatol* 1989;48:188-93.
- Chechik O, Dekel S. Bilateral chondrolysis of the hip following liver transplantation. *Skeletal Radiol* 2009;38:297-300.
- Higuchi M, Masuda T, Susuda K, Ishii S, Abe K. Ultrastructure of the articular cartilage after systemic administration of hydrocortisone in the rabbit: an electron microscopic study. *Clin Orthop Relat Res* 1980;(152):296-302.
- Itani T, Kanai K, Watanabe J, Ogawa R, Kanamura S. Quantitative analysis of rough endoplasmic reticulum in chondrocytes of articular and tracheal cartilage of rabbits following the systemic administration of hydrocortisone. *J Anat* 1992;181:357-63.
- Mankin HJ, Zarins A, Jaffe WL. The effect of systemic corticosteroids on rabbit articular cartilage. *Arthritis Rheum* 1972; 15:593-9.
- Podbielski A, Raiss R. Dose related effects of dexamethasone treatment on the ultrastructure of articular cartilage in rats. *Agents Actions* 1986;17:322-4.
- Shaw NE, Lacey E. The influence of corticosteroids on normal and papain-treated articular cartilage in the rabbit. *J Bone Joint Surg Br* 1973;55:197-205.
- Silbermann M, Finkelbrand S. Reversibility of systemic corticosteroid-induced mandibular osteoarthritis: an experimental study in A/J mice. *J Oral Surg* 1980;38:660-3.
- Weiss A, Raz E, Silbermann M. Effects of systemic glucocorticoids on the degradation of glycosaminoglycans in the mandibular condylar cartilage of newborn mice. *Bone Miner* 1986;1:335-46.
- Kyrylkova K, Kyryachenko S, Leid M, Kiuoussi C. Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods Mol Biol* 2012;887:41-7.
- Loo DT. In situ detection of apoptosis by the TUNEL assay: an overview of techniques. *Methods Mol Biol* 2011;682:3-13.
- Farkas B, Kvell K, Czömpöly T, Illés T, Bárdos T. Increased chondrocyte death after steroid and local anesthetic combination. *Clin Orthop Relat Res* 2010;468:3112-20.
- Chrysis D, Zaman F, Chagin AS, Takigawa M, Säwendahl L. Dexamethasone induces apoptosis in proliferative chondrocytes through activation of caspases and suppression of the Akt-phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway. *Endocrinology* 2005;146:1391-7.
- Hossain MA, Park J, Choi SH, Kim G. Dexamethasone induces apoptosis in proliferative canine tendon cells and chondrocytes. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2008;21:337-42.
- Mocetti P, Silvestrini G, Ballanti P, Patacchioli FR, Di Grezia R, Angelucci L, et al. Bcl-2 and Bax expression in cartilage and bone cells after high-dose corticosterone treatment in rats. *Tissue Cell* 2001;33:1-7.
- Nakazawa F, Matsuno H, Yudoh K, Watanabe Y, Katayama R, Kimura T. Corticosteroid treatment induces chondrocyte apoptosis in an experimental arthritis model and in chondrocyte cultures. *Clin Exp Rheumatol* 2002;20:773-81.
- Silvestrini G, Ballanti P, Patacchioli FR, Mocetti P, Di Grezia R, Wedard BM, et al. Evaluation of apoptosis and the glucocorticoid receptor in the cartilage growth plate and metaphyseal bone cells of rats after high-dose treatment with corticosterone. *Bone* 2000;26:33-42.
- Sanchez CP, He YZ. Alterations in the growth plate cartilage of rats with renal failure receiving corticosteroid therapy. *Bone* 2002;30:692-8.
- Dombrecht EJ, De Tollenaere CB, Aerts K, Cos P, Schuerwegh AJ, Bridts CH, et al. Antioxidant effect of bisphosphonates and simvastatin on chondrocyte lipid peroxidation. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;348:459-64.
- Van Offel JF, Schuerwegh AJ, Bridts CH, Stevens WJ, De Clerck LS. Effect of bisphosphonates on viability, proliferation, and dexamethasone-induced apoptosis of articular chondrocytes. *Ann Rheum Dis* 2002;61:925-8.
- Voulgaris A, Liapi C, Papadopoulos J. Effect of low-dose methylprednisolone on calcium balance and bone composition in rats. *J Endocrinol Invest* 1997;20:659-63.
- Little DG, Peat RA, Mcevoy A, Williams PR, Smith EJ, Baldock PA. Zoledronic acid treatment results in retention of femoral head structure after traumatic osteonecrosis in young Wistar rats. *J Bone Miner Res* 2003;18:2016-22.
- Zometa.com [Internet]. [Cited 2013 Mar 28]. Available from: <http://www.us.zometa.com>
- Taillandier J, Alemanni M, Samuel D, Bismuth H, Lioté F. Rapid multifocal chondrolysis after liver transplantation in four patients. *Ann Rheum Dis* 2006;65:118-20.
- Barnhart BC, Alappat EC, Peter ME. The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol* 2003;15:185-93.
- Singleton JR, Baker BL, Thorburn A. Dexamethasone inhibits insulin-like growth factor signaling and potentiates myoblast apoptosis. *Endocrinology* 2000;141:2945-50.

27. Shirai T, Kobayashi M, Nishitani K, Satake T, Kuroki H, Nakagawa Y, et al. Chondroprotective effect of alendronate in a rabbit model of osteoarthritis. *J Orthop Res* 2011;29:1572-7.
28. Kobayashi M, Squires GR, Mousa A, Tanzer M, Zukor DJ, Antoniou J, et al. Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor  $\alpha$  in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 2005;52:128-35.
29. Komuro H, Olee T, Kühn K, Quach J, Brinson DC, Shikhman A, et al. The osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B/receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand system in cartilage. *Arthritis Rheum* 2001;44:2768-76.
30. van Lent PL, Grevers L, Lubberts E, de Vries TJ, Nabbe KC, Verbeek S, et al. Fc $\gamma$  receptors directly mediate cartilage, but not bone, destruction in murine antigen-induced arthritis: uncoupling of cartilage damage from bone erosion and joint inflammation. *Arthritis Rheum* 2006;54:3868-77.
31. Boos N, Nerlich AG, Wiest I, von der Mark K, Ganz R, Aebi M, et al. Immunohistochemical analysis of type X-collagen expression in osteoarthritis of the hip joint. *J Orthop Res* 1999;17:495-502.
32. Pufe T, Petersen W, Tillmann B, Mentlein R. The splice variants VEGF121 and VEGF189 of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor are expressed in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 2001;44:1082-8.
33. Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC, Bellido T. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest* 1999;104:1363-74.
34. Plotkin LI, Aguirre JI, Kousteni S, Manolagas SC, Bellido T. Bisphosphonates and estrogens inhibit osteocyte apoptosis via distinct molecular mechanisms downstream of extracellular signal-regulated kinase activation. *J Biol Chem* 2005;280:7317-25.
35. Plotkin LI, Bivi N, Bellido T. A bisphosphonate that does not affect osteoclasts prevents osteoblast and osteocyte apoptosis and the loss of bone strength induced by glucocorticoids in mice. *Bone* 2011;49:122-7.
36. Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods* 2000;243:167-90.
37. D'Lima DD, Kuhn K, Lotz MK. Detection of apoptosis in cartilage in situ and in isolated chondrocytes. *Methods Mol Med* 2004;100:275-90.
38. Ozbey O, Sahin Z, Özenci AM, Acar N, Ustunel I. The effect of systemic corticosteroid treatment on the immunolocalisation of Notch-1, Delta, CD105 and CD166 in rat articular cartilage. *Acta Histochem* 2010;112:424-31.