



Eklem içine uygulanan hyalüronik asidin erken evreli osteoartritte kıkırdak koruyucu etkisi: Tavşanda deneysel çalışma

The chondroprotective effect of intra-articular hyaluronic acid at early stages of osteoarthritis: An experimental study in rabbits

Cengiz ŞEN,¹ Taner GÜNEŞ,¹ Baransel SAYGI,² Mehmet ERDEM,¹ Reşit Doğan KÖSEOĞLU,³ Nurten KILIÇ⁴

Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, ¹Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, ³Patoloji Anabilim Dalı;

²PTT Eğitim ve Araştırma Hastanesi Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği;

⁴İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Merkezi (Vet. Hek.)

Amaç: Hyalüronik asit (HA), osteoartritik eklemlerde özellikle ağrıyı gidermek için kullanılmaktadır. Bu deneysel çalışmada, eklem içine uygulanan HA'nın erken evredeki osteoartrit üzerine etkileri araştırıldı.

Çalışma planı: On adet tavşanın her iki dizinin ön çapraz bağı, ketamin ve ksilazin ile intramusküler anestezi altında kesilerek osteoartrit oluşturuldu. Sağ dizlere, haftada bir olmak üzere toplam üç kez 0.6 ml (15 mg/ml) HA, sol dizlere aynı şekilde 0.6 ml serum fizyolojik (SF) uygulandı. Çalışmanın değişik zamanlarında ölmeleri nedeniyle üç tavşan değerlendirmeden çıkarıldı. On ikinci haftada yüksek doz anestezi altında yaşamları sonlandırılan hayvanların dizlerinde kıkırdak alanı ölçümleri ve Mankin skalasına göre histopatolojik değerlendirmeler yapıldı.

Sonuçlar: Hyalüronik asit ve SF uygulanan dizlerde kıkırdak alanı ortalaması açısından anlamlı farklılık bulundu (sırasıyla 1.097 mm² ve 0.477 mm², p<0.05). Mankin skalası toplam puan ortalaması HA grubunda SF grubuna göre anlamlı farklılık gösterdi (sırasıyla 3.57 ve 11.14; p<0.05). Skalanın hücresel anormallik, matriks boyanması ve tidemark devamlılığı kriterlerinde gruplar arasında farklılık anlamlı değilken (p>0.05), kıkırdak yapısı açısından fark anlamlı idi (sırasıyla 0.86 ve 4.43; p<0.05). Tidemark devamlılığı açısından HA uygulanan dizlerin hiçbirinde bozukluk görülmezken, SF uygulanan dizlerin dördünde bozulma saptandı.

Çıkanmlar: Bulgularımız, HA uygulanan dizlerde erken evrede osteoartrit gelişiminin yavaşladığını, dolayısıyla kıkırdakın korunduğunu ortaya koymaktadır.

Anaharsözcükler: Kartilaj, artiküler/yaralanma/ilaç etkisi; hastalık modeli, hayvan; hyalüronik asit/terapötik kullanım; enjeksiyon, intra-artiküler; osteoartrit, diz/patoloji/ilaç tedavisi; tavşan.

Objectives: Hyaluronic acid (HA) is used in osteoarthritis, especially for the control of pain. In this study, we investigated the effect of intra-articular HA on experimental osteoarthritis of early stage.

Methods: Osteoarthritis was induced in both knees of 10 rabbits by transecting the anterior cruciate ligament under intramuscular anesthesia with ketamine and xylazine. Intra-articular HA at a dose of 0.6 ml (15 mg/ml) and physiologic saline solution (0.6 ml) were injected into the right and left knees, respectively, three times with a week interval. Three rabbits died during the study period and were excluded. The remaining rabbits were sacrificed in the 12th week via high dose anesthesia to remove the the distal femora for histological evaluation using the Mankin scale and for measurements of the cartilage area.

Results: The mean cartilage areas calculated in HA- and saline-injected knees differed significantly (1.097 mm² and 0.477 mm², respectively; p<0.05). The overall mean Mankin score was significantly lower in HA-injected knees (3.57 versus 11.14; p<0.05). Although, there were no significant differences between the two groups with respect to cellular abnormality, matrix staining, and tidemark continuity (p>0.05), the mean scores for the structure of the cartilage were significantly different (0.86 versus 4.43; p<0.05). The integrity of the tidemark was preserved in all the HA-administered knees, though a notable disruption was observed in four control knees.

Conclusion: Our results suggest that HA delays the development of osteoarthritis at early stages through exerting a chondroprotective effect.

Key words: Cartilage, articular/injuries/drug effects; disease models, animal; hyaluronic acid/therapeutic use; injections, intra-articular; osteoarthritis, knee/pathology/drug therapy; rabbits.

Sinovyal eklem osteoartritinin tedavisinde, cerrahi ve konservatif birçok yöntem kullanılmışsa da, eklemdeki patolojik süreci tersine çeviren ve osteoartriti tamamen tedavi edebilen bir uygulama henüz bulunamamıştır. Osteoartritli hastalarda, ana semptom olan diz ağrısının giderilmesinin yanında, osteoartrit gelişiminin durdurulması veya yavaşlatılması da büyük önem taşımaktadır. Bunun için kıkırdağın korunması gerekir. Günümüzde osteoartritli eklemelerde, özellikle ağrının giderilmesi ve fonksiyonların iyileştirilmesi için hiyalüronik asit (HA) kullanılmaktadır.^[1,2] Yapılan çalışmalarda, HA'nın analjezik, antienflamatuvar, anabolik ve kıkırdak koruyucu etkilere sahip olduğu bildirilmiştir.^[3-5] Ancak, kıkırdak koruyucu özelliğini gösterici çalışmalar^[6,7] bulunmasına rağmen, bunun yeterince kanıtlanmadığına dikkat çekilmiştir.^[3-5]

Bu çalışmada, osteoartritin kıkırdak yüzeyinden subkondral kemiğe doğru ilerlediği^[8] göz önüne alınarak, tavşanda erken evreli bir osteoartrit modeli üzerinde HA'nın kıkırdak üzerine koruyucu etkisi araştırıldı. Osteoartrit, ön çapraz bağın kesilmesiyle oluşturuldu. Ön çapraz bağın kesilmesinden sonra oluşan instabilite, eklem kıkırdağında bozulmayı ve onunla birlikte osteoartrit gelişimini de başlatmaktadır. Tavşanlarda, ön çapraz bağın kesilmesiyle yaratılan instabiliteye bağlı olarak osteoartrit geliştiği gösterilmiştir.^[6,9-11]

Gereç ve yöntem

Çalışma grubu

Çalışmada, ortalama 3.2 kg (dağılım 2.7-4.5 kg) ağırlığında, 10 adet Yeni Zelanda türü yetişkin erkek tavşan kullanıldı. Çalışma için etik kurul onayı alındı. Her bir tavşanın her iki dizinde ön çapraz bağ kesilerek osteoartrit modeli oluşturuldu. Ameliyat sonrası birinci haftadan itibaren tavşanların sağ dizlerine (çalışma grubu), haftada bir kez olmak üzere üç kez 0.6 ml (15 mg/ml) hiyalüronik asit (Orthovisc, Biomeks; Woburn, MA, ABD); kontrol grubunu oluşturan sol dizlere aynı şekilde 0.6 ml serum fizyolojik (SF) uygulandı. Tüm enjeksiyonlar aynı kişi tarafından uygulandı. Beşinci, sekizinci ve 10. haftalarda ölen üç tavşan çalışma dışı bırakıldı.

Cerrahi teknik

Tavşanlara 100 mg/kg ketamin ve 8 mg/kg ksilazin ile intramusküler anestezi uygulandı. Ameliyat öncesinde 50 mg/kg sefazolin Na ile profilaksi uy-

gulandı. Tavşanların dizlerinde traşlama, saha temizliği ve steril örtüm işlemleri yapıldıktan sonra, her bir dize uzunlamasına anterior orta hat kesisiyle girildi. Cilt altı dokular geçildi ve medial parapatellar artrotomiyle diz eklemine girildi. Patella laterale çekildi. Ön çapraz bağ 11 no'lu bistüriyle kesildi. Eklem içi serum fizyolojikle yıkandı; medial retinakulum 4/0 krome katgüt, cilt ise 4/0 ipek kullanılarak devamlı dikişlerle kapatıldı. Ameliyattan sonra her bir tavşan 60x60x40 cm'lik bir kafese yerleştirildi. Ameliyat sonrası dönemde analjezi sağlamak için tavşanlara verilen içme suyu içine 1-2 mg/kg/100 ml asetaminofen kondu. Tavşanlara herhangi bir immobilizasyon uygulanmadı. Ameliyattan sonra 12. haftada tavşanlar, intravenöz uygulanan yüksek doz (200 mg/kg) pentotal ile öldürüldü.

Histoloji ve histomorfometri

On ikinci haftada öldürülen hayvanlarda femur distal kısmı kondilleriyle birlikte çıkarıldı ve taponlu %10 formalin solüsyonu içine kondu. Daha sonra, dekalsifikasyon solüsyonunda bir gece bekletildi. Dehidratasyon, şeffaflaştırma ve infiltrasyon işlemlerinin ardından, femur medial kondilinden sagittal planda kesilen parçalar parafine gömüldü. Her bir bloktan 4 mikrometrelik kesitler hazırlandı. Deparafinizasyon işleminden sonra kesitler hematoksilin-eozin ve safranin O FCF ile boyandı.

Hematoksilin-eozin ile boyalı kesitlerde, kıkırdak yapısı, hücrel anormallik, matriks boyanması ve tıdemark devamlılığı Mankin skalasına^[12] (Tablo 1) göre değerlendirilerek puanlama yapıldı. Safranin O ile boyalı kesitlerde kıkırdak ara maddenin boyanması değerlendirildi. Bu kesitlerde, özellikle ara maddenin boyandığı alanlar temel alınarak kıkırdak alanı ölçüldü. Ölçümlerde her medial femoral kondilden hazırlanan dört adet frontal kesit preparatı kullanıldı. Preparattaki kıkırdak bölgesinin alanı, kareli oküler mikrometrede kaplanan birim sayısı ile ölçüldü. Dört kesitte elde edilen tüm değerlerin ortalaması hesaplandı. Ölçümler x40'lık objektifte gerçekleştirilerek alan değeri milimetre kare cinsinden kabul edildi.

Tüm histolojik ve histomorfometrik değerlendirmeler, deney hayvanlarının hangi gruba ait olduğunu bilmeyen iki patoloji uzmanı tarafından birbirinden bağımsız olarak yapıldı.

İstatistiksel değerlendirmede, kıkırdak alanları için Mann-Whitney U-testi ve Mankin skorlaması

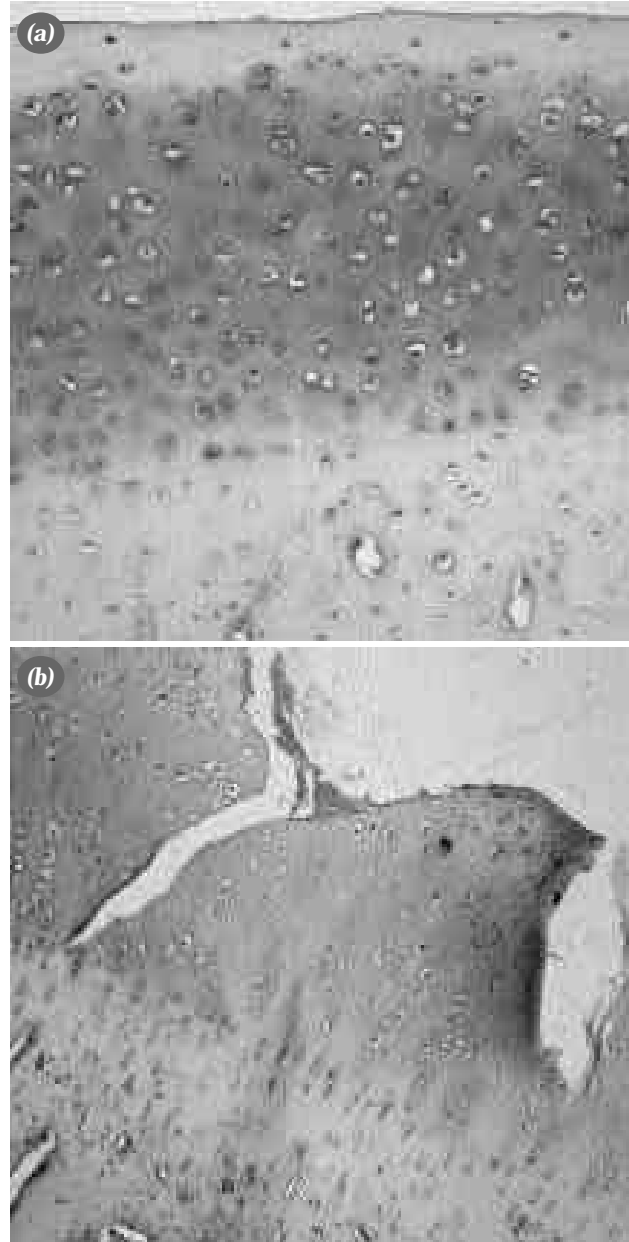
Tablo 1. Mankin skalası

1. Kıkırdak yapısı	
Normal	0
Yüzey düzensizlikleri, radial tabakaya kadar fissür gelişimi	1
Pannus	2
Yüzeyel kartilaj tabakası kaybı	3
Hafif organizasyon kaybı, hücre kolonlarının yokluğu, seyrek hücre kümeleri	4
Kalsifiye kartilaj tabakasına kadar fissür oluşumu	5
Tam organizasyon kaybı, hücre kümeleri, osteoklast aktivitesi	6
2. Hücresel anormallik	
Normal	0
Hipersellülarite, küçük yüzeyel hücre kümeleri dahil	1
Hücre kümeleri	2
Hiposellülarite	3
3. Matriks boyanması (Safranin O)	
Normal/hafif azalma	0
Radial tabakada boyanma azalması	1
İnterterritorial matrikste boyanma azalması	2
Sadece perisellüler matrikste boyanma	3
Boyanma yok	4
4. Tidemark devamlılığı	
İntakt	0
Destrüksiyon	1

için two-sample Kolmogorov-Smirnov testi kullanıldı; $p < 0.05$ değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

Sonuçlar

Deney sırasında hiçbir hayvanda enjeksiyonlara bağlı yan etki gözlenmedi ve cerrahi müdahaleden sonra enfeksiyon gelişmedi. Hiyalüronik asit ve SF uygulanan dizler arasında kıkırdak alanı ortalaması açısından anlamlı farklılık bulundu (sırasıyla 1.097 mm^2 ve 0.477 mm^2 , $p < 0.05$). Mankin skalası toplam puan ortalaması HA uygulanan grupta SF grubuna göre anlamlı farklılık gösterdi (sırasıyla 3.57 ve 11.14; $p < 0.05$). Skalanın hücresel anormallik (1.29 ve 2.57), matriks boyanması (1.43 ve 3.57) ve tidemark devamlılığı (0.0 ve 0.57) kriterlerinde gruplar arasında farklılık anlamlı değilken ($p > 0.05$), kıkırdak yapısı açısından fark anlamlı idi (sırasıyla 0.86 ve 4.43; $p < 0.05$). Tidemark devamlılığı kriterine göre HA uygulanan dizlerin hiçbirinde bozukluk görülmezken, SF uygulanan dizlerin dördünde bozulma saptandı (Şekil 1).



Şekil 1. (a) Hiyalüronik asit grubundaki bir tavşanın dizinin histolojik görünümü. Yüzeyel kondrositlerde kayıp ve proteoglikan içeriğinde azalma (safranin O, x20). (b) Serum fizyolojik uygulanan bir tavşanın dizinin histolojik görünümü. Tidemark'a kadar uzanan fissür oluşumları; proteoglikan içeriğinde belirgin azalma (safranin O, x20).

Tartışma

Bir polisakkarit zinciri olan HA, N-asetilglükosamin ve glükuronik asitlerin disakkarit birimlerinin tekrarlanması ile oluşur,^[1,3] tip B sinovisitler ve sinovyal fibroblastlar tarafından sentezlenerek eklem içine salgılanır.^[3] Kartilaj üzerinde yaklaşık 0.6-2

üm'lik amorf bir tabaka olarak bulunan HA, kartilajı litik enzimler ve enflamatuvar hücrelerin penetrasyonuna karşı kısmi koruma sağlar.^[1,13] Hiyalüronik asidin ana fonksiyonu diz ekleminin elastisite ve viskozitesini sağlamaktır.^[3] Bu etkiler dize uygulanan stresin miktarıyla belirlenir. Dize gelen yüksek stres kuvvetine karşı HA'nın elastisitesi artarken, viskozitesi azalır. Yavaş hareketlerde ise tersi söz konusudur.^[1,3] Osteoartritli dizlerde HA'nın miktarı yarıya, hatta 1/3'e kadar düşerken, yarıömrü de azalmaktadır.^[10] Bunun sonucunda, sinovyal sıvının fiziksel ve bariyer özellikleri bozulmakta ve kartilajın bütünlüğünü sağlayan kollajen liflerde ayrılmalar ve dolayısıyla kartilajda kayıp ortaya çıkmaktadır.^[13]

Osteoartritli dizlere, HA verilmesi viskosuplementasyon olarak adlandırılmakta ve HA'nın ana etkisinin bu mekanizmayla gerçekleştiği düşünülmektedir.^[3] Hiyalüronik asidin, fiziksel etkiler yanı sıra antienflamatuvar, anabolik, analjezik ve kıkırdak koruyucu etkilere de sahip olduğu bildirilmiştir.^[3-5] Bu etkilerini, nitrik oksit üretimini baskılayarak ortaya koyduğu ve terapötik etkisini de bu yolla gösterdiği düşünülmektedir.^[14] Hiyalüronik asidin kıkırdak koruyucu etkisinin yeterince kanıtlanmadığını öne süren görüşler de vardır.^[3] Dışarıdan verilen HA'nın, sinovyal eklemlerde lubrikasyonu artırdığı^[15] ve deneysel olarak osteoartrit oluşturulan dizlerde artmış olan sürtünmeyi azalttığı gösterilmiştir.^[16] Ayrıca, osteoartrit gelişimi sırasında artan fibrinolitik faktörleri azalttığı^[17] ve kıkırdak matriksinin içeriğini oluşturan glikozaminoglikanları artırdığı^[18] bildirilmiştir. Hasarlı menisküs dokusunda kollajen remodelasyonunu artırarak ve ödemi önleyerek menisküs rejenerasyonunu artırdığı da belirtilmiştir.^[19,20]

Osteoartritli hastalarda eklem içi HA uygulamasından beklenen faydaların elde edilemediğini belirten çalışmalar varsa da, birçok çalışmada, bu uygulamanın hasta şikayetlerinde ve antienflamatuvar/analjezik ilaç kullanımında azalma, değerlendirme skalalarında düzelme sağladığı bildirilmiştir.^[4,21,22] Osteoartritli dizlerde artroskopik debridmandan sonra uygulanan HA tedavisinin, ağrı ve fonksiyon açısından yalnız altı ay etkili olduğu saptanmıştır.^[23]

Osteoartrit kıkırdak dokusunun yüzeyinden başlayarak derine, subkondral kemiğe doğru ilerler.^[1] Hiyalüronik asidin uzun dönemde osteoartritten koruma etkisine sahip olduğu^[6] ve bu etkinin tekrarla-

nan enjeksiyonlarla daha fazla olduğu bildirilmiştir.^[7] Çalışmamızdaki bulgular, özellikle de HA uygulanan dizlerde tidemark'ın etkilenmemiş olması osteoartrit gelişiminin yavaşladığını, dolayısıyla kartilajın korunduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda, HA tedavisinin yalnızca yeni gelişmekte olan osteoartrit üzerine etkileri araştırılmıştır. Kondrositin osteoartrit değişikliklerine ilk yanıtı proliferasyon ve programlanmış hücre ölümüdür; bu nedenle, erken evrede kondrosit sayısında azalma meydana gelir.^[24] Çalışmamızda, Mankin skalasının hücresel anormallik kriteri açısından iki grup arasındaki farkın belirgin olmamasının nedeni, bu modelde osteoartritin erken evreli olması olabilir. Tidemark devamlılığı kriteri açısından farklılık anlamlı olmamasına karşın, HA grubunda hiçbir dizde tidemark devamlılığında bozulma olmaması, öte yandan SF grubunda dört dizde bozulma saptanması HA'nın osteoartritin yüzeyden başlayarak subkondral kemiğe doğru olan ilerlemesini yavaşlattığını düşündürmektedir. Farklılığın anlamlı olmamasının nedeni, gruplardaki denek sayısının yetersizliği olabilir.

Osteoartritli dizlerde HA'nın kondrosit yoğunluğunda ve matriks görünümünde düzelme sağladığı gösterilmiştir.^[25] Buna karşın, HA uygulamasının geç evre osteoartritte, özellikle radyolojik olarak iyileşme sağlayamadığı^[26] ve olumlu etkilerinin yaşın artmasıyla birlikte azaldığı belirtilmiştir.^[27] Bununla birlikte, HA'nın erken evre osteoartriti önleyici veya gelişimini yavaşlatıcı bir etkiye sahip olduğu açıktır. Bu bulgunun, ileri evre osteoartritte yapılan deneysel ve klinik çalışmalarla desteklenmesi, HA preparatlarının klinik önemini ortaya koyacaktır.

Kaynaklar

1. Kirwan J. Is there a place for intra-articular hyaluronate in osteoarthritis of the knee? *Knee* 2001;8:93-101.
2. Akgün I, Ögüt T. Osteoartrit tedavisinde viskosuplementasyonun yeri. *TOTBİD Dergisi* 2002;1:60-5.
3. Watterson JR, Esdaile JM. Viscosupplementation: therapeutic mechanisms and clinical potential in osteoarthritis of the knee. *J Am Acad Orthop Surg* 2000;8:277-84.
4. Brandt KD, Block JA, Michalski JP, Moreland LW, Caldwell JR, Lavin PT. Efficacy and safety of intraarticular sodium hyaluronate in knee osteoarthritis. *ORTHOVISC Study Group. Clin Orthop* 2001;(385):130-43.
5. Williams JM, Rayan V, Sumner DR, Thonar EJ. The use of intra-articular Na-hyaluronate as a potential chondroprotective device in experimentally induced acute articular cartilage injury and repair in rabbits. *J Orthop Res* 2003;21:305-11.
6. Shimizu C, Yoshioka M, Coutts RD, Harwood FL, Kubo T, Hirasawa Y, et al. Long-term effects of hyaluronan on exper-

- imental osteoarthritis in the rabbit knee. *Osteoarthritis Cartilage* 1998;6:1-9.
7. Amiel D, Toyoguchi T, Kobayashi K, Bowden K, Amiel ME, Healey RM. Long-term effect of sodium hyaluronate (Hyalgan) on osteoarthritis progression in a rabbit model. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11:636-43.
 8. Bobinac D, Spanjol J, Zoricic S, Maric I. Changes in articular cartilage and subchondral bone histomorphometry in osteoarthritic knee joints in humans. *Bone* 2003;32:284-90.
 9. Brandt KD, Braunstein EM, Visco DM, O'Connor B, Heck D, Albrecht M. Anterior (cranial) cruciate ligament transection in the dog: a bona fide model of osteoarthritis, not merely of cartilage injury and repair. *J Rheumatol* 1991;18:436-46.
 10. McDevitt C, Gilbertson E, Muir H. An experimental model of osteoarthritis: early morphological and biochemical changes. *J Bone Joint Surg [Br]* 1977;59:24-35.
 11. Yoshioka M, Coutts RD, Amiel D, Hacker SA. Characterization of a model of osteoarthritis in the rabbit knee. *Osteoarthritis Cartilage* 1996;4:87-98.
 12. Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg [Am]* 1971;53:523-37.
 13. Guidolin DD, Ronchetti IP, Lini E, Guerra D, Frizziero L. Morphological analysis of articular cartilage biopsies from a randomized, clinical study comparing the effects of 500-730 kDa sodium hyaluronate (Hyalgan) and methylprednisolone acetate on primary osteoarthritis of the knee. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9:371-81.
 14. Takahashi K, Hashimoto S, Kubo T, Hirasawa Y, Lotz M, Amiel D. Hyaluronan suppressed nitric oxide production in the meniscus and synovium of rabbit osteoarthritis model. *J Orthop Res* 2001;19:500-3.
 15. Mabuchi K, Obara T, Ikegami K, Yamaguchi T, Kanayama T. Molecular weight independence of the effect of additive hyaluronic acid on the lubricating characteristics in synovial joints with experimental deterioration. *Clin Biomech* 1999;14:352-6.
 16. Obara T, Mabuchi K, Iso T, Yamaguchi T. Increased friction of animal joints by experimental degeneration and recovery by addition of hyaluronic acid. *Clin Biomech* 1997;12:246-252.
 17. Nonaka T, Kikuchi H, Shimada W, Itagane H, Ikeda T, Hamanishi C, et al. Effects of sodium hyaluronic acid on fibrinolytic factors in the synovial fluid (in vivo). *Pathophysiology* 1999;6:41-4.
 18. Yoshimi T, Kikuchi T, Obara T, Yamaguchi T, Sakakibara Y, Itoh H, et al. Effects of high-molecular-weight sodium hyaluronate on experimental osteoarthrosis induced by the resection of rabbit anterior cruciate ligament. *Clin Orthop* 1994;(298):296-304.
 19. Kobayashi K, Amiel M, Harwood FL, Healey RM, Sonoda M, Moriya H, et al. The long-term effects of hyaluronan during development of osteoarthritis following partial meniscectomy in a rabbit model. *Osteoarthritis Cartilage* 2000;8:359-65.
 20. Sonoda M, Harwood FL, Wada Y, Moriya H, Amiel D. The effects of hyaluronan on the meniscus and on the articular cartilage after partial meniscectomy. *Am J Sports Med* 1997;25:755-62.
 21. Buckwalter JA, Stanish WD, Rosier RN, Schenck RC Jr, Dennis DA, Coutts RD. The increasing need for nonoperative treatment of patients with osteoarthritis. *Clin Orthop* 2001;(385):36-45.
 22. Miltner O, Schneider U, Siebert CH, Niedhart C, Niethard FU. Efficacy of intraarticular hyaluronic acid in patients with osteoarthritis-a prospective clinical trial. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:680-6.
 23. Akman S, Sen C, Gogus A, Demirhan M, Kilicoglu O. The efficacy of intraarticular sodium hyaluronate injection following arthroscopic debridement in the treatment of gonarthrosis. [Article in Turkish] *Acta Orthop Traumatol Turc* 2001;35:107-10.
 24. Sandell LJ, Aigner T. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res* 2001;3:107-13.
 25. Barbucci R, Lamponi S, Borzacchiello A, Ambrosio L, Fini M, Torricelli P, et al. Hyaluronic acid hydrogel in the treatment of osteoarthritis. *Biomaterials* 2002;23:4503-13.
 26. Toh EM, Prasad PS, Teanby D. Correlating the efficacy of knee viscosupplementation with osteoarthritic changes on roentgenological examination. *Knee* 2002;9:321-30.
 27. Williams JM, Zhang J, Kang H, Ummadi V, Homandberg GA. The effects of hyaluronic acid on fibronectin fragment mediated cartilage chondrolysis in skeletally mature rabbits. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11:44-9.