

DENEYSEL OSTEARTRİTİS OLUŞTURULAN KÖPEKLERDE SODİUM HYALURONATE'İN EKLEM KIKIRDAĞI METABOLİZMASINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Mustafa Arıcan¹

Cengiz Ceylan²

The research on effect of Sodium Hyaluronate for cartilage metabolism in dogs with experimental Osteoarthritis

Summary: Bu çalışmada, deneysel osteoarthritis (OA) oluşturulan köpeklerde Hyalovet® 20 (Trans Bussan S.A., Geneve, Suisse, hyaluronik asit)'nin intra-artiküler etkisini ortaya koymak amaçlandı. Altı yetişkin köpekte, sağ articulatıo genudaki ligamentum cruciate anterior kesilerek deneysel osteoarthritis oluşturuldu. Eklem sıvısı ve kan serum örnekleri steril koşullar altında operasyon öncesi operasyonu takiben eden 7 gün sonunda ve Hyalovet® 20 uygulanmasından 15 gün sonra toplanarak analiz edildi. Metalloproteinaz (Jelatinaz) aktivitesi enzimgrafi yöntemi ile eklem sıvısında analiz edildi. Glikozaminoglikanlar ve keratan sulfat miktarları, eklem sıvısı ve kan serumunda ölçüldü. Hyaluronik asit' in köpeklerdeki dejeneratif artritiserin sağaltımında kısa sürede sonuç alınması açısından başarılı ile kullanılabiliceği kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler : Köpek, eklem hastalığı, metalloproteinazlar, jelatinaz

Özet: The aim of this study was to determine the effects of intra-articular Hyalovet® 20 (Trans Bussan S.A., Geneve, Suisse, hyaluronic acid) on experimental osteoarthritis in dogs. The anterior cruciate ligament of the right knee was cut by blind section in 6 adult dogs. Synovial fluids and sera were obtained under sterile condition before and after operation by needle aspiration. They were also collected after Hyalovet® 20 treatment within 15th days. The metalloproteinases (MMP) activity was measured in synovial fluids by gelatine zymography. Glycosaminoglycans and keratan sulphate has been measured in sera and synovial fluids. Hyaluronic acid provided good clinical benefits and an acceptable safety profile is current clinical practice.

Key words: Canine, joint disease, matrix metalloproteinases, gelatinase

Giriş

Osteoarthritis (OA), köpeklerde sık görülen dejeneratif eklem hastalığıdır. Köpeklerde görülen ekstremiteler hastalıkları içerisindeki oranı % 37 'dir (Bennett, 1980). Osteoarthritis 'in oluşumunda primer, idiopatik (sebebi tam belli olmayan) ve sekonder (ligamentum cruciatum anterior kopuğu ve osteochondrosis) etkenlerin önemli olduğu belirtilmiştir (Bennett, 1991). Ligamentum cruciatum anterior'un kesilmesi köpeklerde deneysel OA oluşumuna zemin hazırlar. Ligamentum cruciatum anterior'un kesilmesi deneysel olarak OA oluşturmak için 20 yılı aşkın süredir kullanılmaktadır (Pond ve Nuki, 1973; McDevitt ve Muir, 1976).

Osteoarthritis olgularında ilk etkilenen bölge eklem kıkırdağının yapısını oluşturan kollajen iplikçikleri ve proteoglikan (PG) molekülleri dir. Pro-

teoglikanlar kıkırdağın esnekliğini sağladığı gibi her türlü deformasyona karşı kıkırdağı korumaktadır (Heinegard ve Paulsson, 1984). Komplike bir yapı gösteren PG ler kore proteinleri ile hyaluronik asite bağlanır. Proteoglikanların yapısını, kondroitin sulfat ve keratan sulfattan meydana gelen glikozaminoglikanlar (GAG) oluşturmaktadır (Thonar ve ark. 1985).

İnsan ve köpek OA olgularında, proteoglikan ve glikozaminoglikan miktarları eklem sıvısı ve serumda ölçülmüştür (Saxne ve ark. 1987; Arıcan ve ark. 1994; Arıcan, 1995). Köpeklerdeki osteoarthritis olguları üzerinde yapılan çalışmalarda (Arıcan ve ark. 1994; Arıcan, 1995), eklem sıvısı keratan sulfat miktarı kıkırdağın metabolizmasındaki yıkımlanma hakkında bilgi vermiştir.

Matriks metalloproteinazları (MMPs) (jelatinaz) çinko endopeptidler grubundan olup, moleküler ağırlıklarına göre MMP-2 ve MMP-9 olarak ay-

Materyal ve Metot

rılmıştır. MMP lerin bağ dokusundaki fizyolojik rollerine rağmen, ekstrasellular matriks'in yıkılmasında önemli etkileri vardır (Brandt ve Mankin, 1986; Hirose ve ark. 1992; Arican ve ark. 1998). Çeşitli araştırmacılar tarafından (Hirose ve ark. 1992; Koolwijk ve ark. 1995; Gruber ve ark. 1996) insanlarda romatoid artritli olgulardan toplanan eklem sıvılarında MMP ların eklem patolojisindeki rolü belirtilmiştir. Osteoartritli, romatoid ve septik artritli köpeklerden toplanan eklem sıvılarında MMP-2 ve 9 daki artışlar enzimgrafi yöntemi ile gösterilmiştir (Cawston ve ark. 1989; Spiers ve ark. 1994; Coughlan, 1997).

Osteoarthritis olgularının sağaltımında non-steroidal anti-enflamatuvar, steroidler ve hyaluronik asit kullanılmaktadır (Weiss ve ark. 1981; Balazs ve Denlinger, 1993; Wollheim, 1996). Fakat, non-steroidal anti-enflamatuvarların, renal ve gastrointestinal toksitesinden bahsedilmiştir (Wollheim, 1996). Glikokortikoidlerin ise etkisinin semptomatik olduğu bildirilmiştir (Wollheim, 1996). Eklem içi hyaluronik asit (HA) uygulamaları, travmatik ve dejeneratif artropatilerin sağaltımında 25 yıldır kullanılmaktadır (Weiss, 1981 ; Balazs ve Denlinger, 1993). Romatolojide ve ortopedik hastalarda intra artiküler HA tedavisi başarı ile kullanılmakta olup, sağaltımı takiben bu ilacın etkisinin bir-kaç ay sürdüğü belirtilmiştir (Wollheim, 1996). Eklem içine enjekte edilen HA'nın eklem sıvısı' nın viskoelastikiyetini sağladığı, eklemi kayganlaştırıp, kırıldak yıkılmasını azalttığı ifade edilmektedir (Lussier, 1995). Yangı giderici özelliğinden bahsedilen HA'nın kortisol ve akut faz proteine bağlanarak, yangısel mediatörlere ilgi gösterdiği bildirilmiştir (Lohmander, 1993). Hyaluronik asit'in lökositlerin göçünü, prostaglandin E2 baskılayarak sağladığı kanıtlanmıştır (Tew, 1984; Aviad ve Houpt, 1994). Köpeklerdeki osteoarthritis olgularında başarıyla kullanılan HA' in eklemde yıkılma yapan metalloproteinaz enzimleri üzerine etkisi bugüne kadar araştırılmamıştır.

Bu çalışmada deneysel OA oluşturulan köpeklerden toplanan eklem sıvılarında keratan sulfat (KS), glikozaminoglikan (GAG) ve metalloproteinazların (jelatinaz) miktarları ölçülerek, HA sağaltımı sonucunda bu biyokimyasal parametrelerde meydana gelen değişikliklerin hastalığın prognozuna olan etkisi araştırılmıştır.

Çalışma materyalini, farklı yaş, ırk ve cinsiyette 15-30 kg ağırlığında 6 köpek oluşturdu. Köpekler klinik olarak muayene edildikten sonra genu eklemine problemi olmayanlar deneysel çalışmada kullanıldı.

Denemeye alınacak olan köpekler 1 gün önceden aç bırakıldı, sadece su içmelerine izin verildi. Operatif işlemden önce, premedikasyon için 0.1 ml/kg dozunda Rompun (Bayer xylazin hydrochlorid 23.32 mg/ml) intramusküler ve canlı ağırlıklarına göre 20 mg/kg dozunda sodium thiopental intravenöz uygulandı. Hayvanlar operasyon masasına sırt üstü yatırıldı. Sağ articulatio genudaki ligamentum cruciate anterior kesildi (Şekil 1). Operasyonu takiben bütün hayvanlara Pronapen -800 İM olarak enjekte edildi. Günlük olarak hayvanlara eksersizler yaptırıldı.

Eklem sıvısı ve kan serum örnekleri steril koşullar altında operasyon öncesi ve operasyonu takip eden 7 gün sonunda sağaltımdan önce toplandı. Operasyonu takip eden 1 hafta sonra sağaltım amacıyla Hyalovet® 20 (20 mg natrii hyaluronata 2ml; Trans Bussan S.A., Geneve, Suisse) 7 gün arayla 1ml lik, iki aplikasyon olarak intra artiküler uygulandı. Uygulamayı takiben 15 gün sonrasında kan serum ve eklem sıvıları toplanarak santrifüj edildikten sonra analizler yapılmaya kadar -20°C'de saklandı. Eklem sıvısındaki farklı yapıdaki lökositler Giemsa boyama ile gösterildi. Köpeklerden çalışma boyunca ilk alınan örnekler kontrol olarak kullanılmak üzere, toplam 18 eklem sıvısı ve 18 serum örneği toplandı. Glikozaminoglikan ve keratan sulfat miktarları eklem sıvısı ve kan serumunda ölçüldü. Metalloproteinaz miktarı ise eklem sıvısında ölçüldü. Kan serumundaki metalloproteinazlar serum protein miktarlarının fazlalığından dolayı değerlendirilmedi.

Çalışmada alınan örneklerin analizleri İngiltere'de Liverpool Üniversitesi Veteriner Fakültesi Klinik bilimleri laboratuvarında yapıldı.

Jelatin Enzimgrafi; Eklem sıvısındaki jelatin enzimi miktarları, Coughlan (1997) çalışması modifiye edilerek analiz edildi. Eklem sıvıları, Tris-HCl içeren % 1.5 SDS, % 5 glycerol and % 0.005 Bromophenol blue, pH 6.8 içerisinde sulandırıldı ve 37°C bir saat elektroforez için bekletildi. 7.5 µl. ılık örnek elektroforeze konularak analiz edildi.

Standart olarak % 10 luk fetal buzağı serumu her analiz yapıldığında kullanıldı. 100mM EDTA ve 50mM PMSF (Serine proteinaz enzim bas-

Bulgular

kılayıcıları) kullanılarak enzimlerin metalloproteinaz olduğu gösterildi.

Metalloproteinazların Bilgisayar Analizi : Bilgisayardan yararlanılarak, enzim grafi jelleri üzerindeki aktif enzimler analiz edildi. Jel görüntüleri Macintosh bilgisayarı ile link yapan video kamera ile görüntülendi. Bu amaçla (NIH imaj 1.44) programı kullanıldı. Her bir enzim bandı, belirgin hale getirildikten sonra bu enzimin kapladığı alan ölçüldü. Bu işlemler esnasında standart uygulanarak aktif enzim düzeyleri saptandı.

Jelatin Yıkılma ELISA analizleri : Kısaca, ELISA plakaları, jelatin enzimi ile kaplandı. Bunun için 100 µl jelatin ilave edildikten sonra 1 saat 37°C ve 24 saat 4°C de bekletildi. Eklem sıvıları, 1/10 Tris-HCl (0.05M), CaCl₂ (0.005M), Brij 35 (0.05%) pH 7.6 ile sulandırıldı. ELISA plakaları PBS/ Tween ile yıkanıp jelatine karşı tavşan antikoruna ilave edildi. Bunun üzerine 1/4000 dilusyonda tavşana karşı IgG alkaline fosfat konjugatı ilave edildi. Konjugatın uzaklaştırılmasını takiben, fosfat substratı katılarak 405 nm de okundu.

Glikozaminoglikan analizi : Eklem sıvısı ve serumdaki glikozaminoglikan miktarları, Farndale (1986)'nın metodu modifiye edilerek analiz edildi (Taylor ve Jeffree, 1969 ; Arıcan ve ark. 1994). Eklem sıvısı örnekleri 1/10 50mM PBS (Fosfat Buffer Saline) pH 7.0 ile sulandırıldı. 100 µl, poliesteren tüplere (LP3, Luckham) transfer edildi. Standartlar, balina kıkırdak kondroitin sulfatından (Sigma) hazırlandı. Tüplere N-acetylcysteine (Sigma) eklendi. Papain (0.13 Unite, Sigma) reaksiyon durdurmak için tüplere katılarak, son volüm 250 ml olacak şekilde hazırlandı. Analiz sonuçlarının güvenilirliği için yüksek ve düşük örnekler kullanıldı.

Keratan Sulfat Analizi : Eklem sıvısı ve serumdaki KS miktarları ELISA yöntemi ile analiz edildi (Arıcan, 1994 ; Arıcan, 1995). ELISA plakaları PG monomer ile kaplandıktan sonra, kondroitinase-abc enziminden geçirilen örnekler plakaya katıldı. Plakalara eşit miktarlarda keratan sulfat antikorları (5-D-4 ICN) ve fareye-karşı keçi IgG konjugatı ilave edildi. Plakalara en son alkaline fosfat substratı konularak 405 nm de ELISA okuyucusunda sonuçlar alındı.

İstatistik Analizler : İstatistik analiz için Mann-Whitney U testi kullanıldı.

Operasyon Öncesi

Enzim Seviyeleri : 1/20 sulandırma yapılan normal eklem sıvılarında 66 kilodalton (kDa) gelen zayıf metalloproteinaz (jelatin) bantları görüldü. Bu bantlar MMP-2 aktivitesini göstermektedir (Şekil 2). Normal eklem sıvısında 90 kDa gelen MMP-9' lara rastlanmadı.

Glikosaminoglikan seviyeleri : Eklem sıvısı ve serum GAG seviyesi kontrol grubunda normal seviyelerinde bulundu. Operasyon öncesi GAG miktarları Tablo 1'de gösterildi.

Keratan sulfat seviyeleri : Eklem sıvısı ve serumdaki KS seviyesi kontrol grubunda normal seviyelerinde bulundu. Operasyon öncesi KS miktarları Tablo 1'de gösterildi.

Operasyondan bir hafta sonra

Enzim Seviyeleri : 66 kDa gelen MMP-2 enzimin aktivitesinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında artışlar görüldü (p<0.001) (Şekil 3). 90 kDa gelen MMP-9 enzimi görüntülendi. 232 kDa gelen ise MMP-9 enziminin inaktif formu olarak belirlendi (Şekil 3).

Glikosaminoglikan seviyeleri : Eklem sıvısındaki GAG seviyesi OA köpeklerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında arttığı bulundu (p<0.04). Serum GAG seviyesinde artışlar kaydedildi. Operasyondan 7 gün sonraki GAG miktarları Tablo 1 de gösterildi.

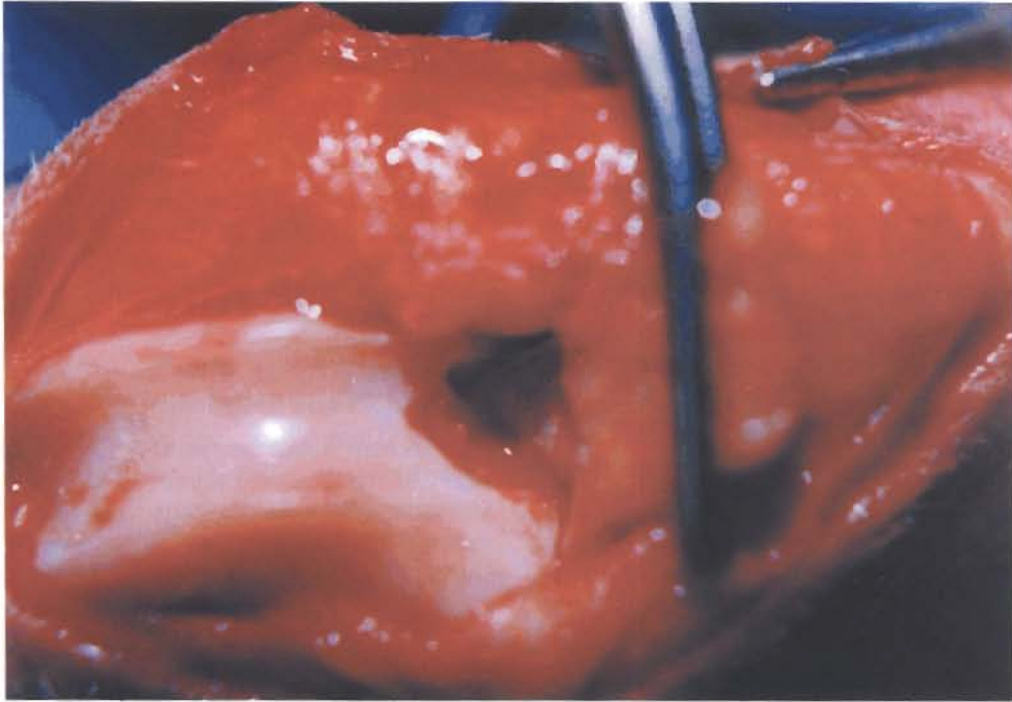
Keratan sulfat seviyeleri : Osteoartritli hayvanlardan toplanan eklem sıvısındaki KS miktarında kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalarda artışlar bulundu (p<0.03) (Şekil 3). Serum KS seviyesinde artışlar kaydedildi (p<0.01). Operasyondan 7 gün sonraki KS miktarları Tablo 1 de gösterildi.

Hyaluronik Asit Sağaltımından sonra

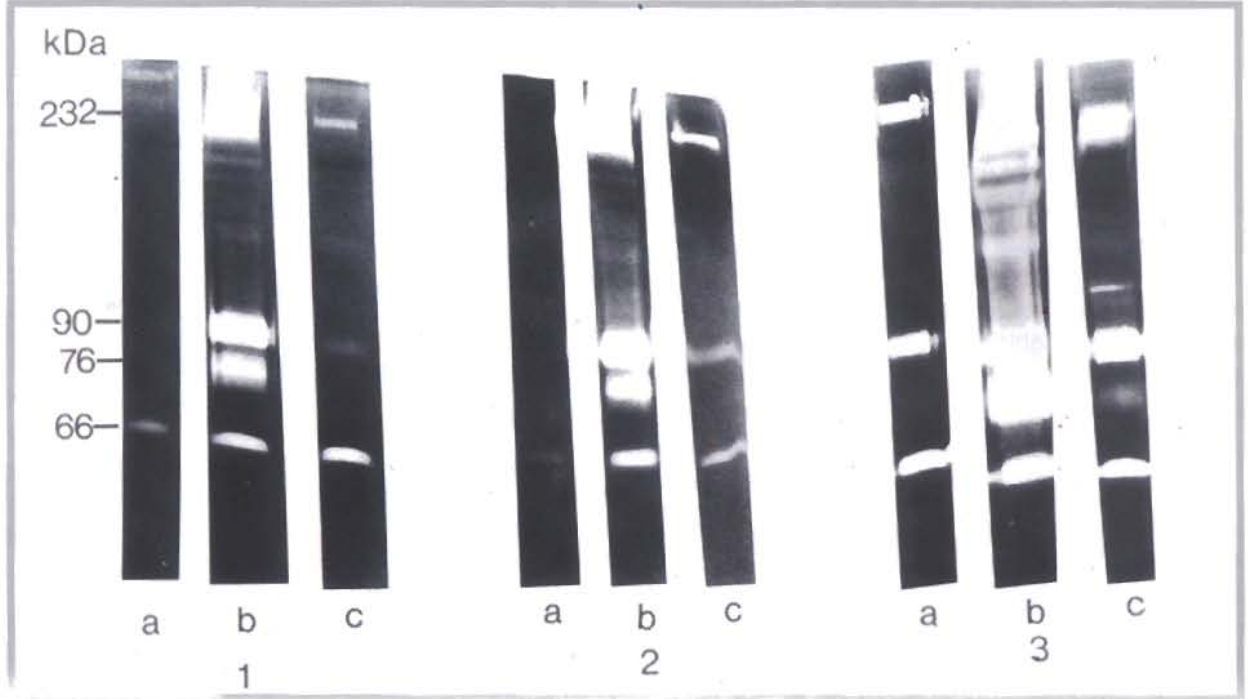
Enzim Seviyeleri : 90 kDa gelen MMP-9 enziminde ve 66 kDa gelen MMP-2 enzimidaki istatistik azalış belirgindi (Şekil 3). Klinik olarak da hayvanlardaki düzelmeler kaydedildi.

Glikozaminoglikan seviyeleri : Hyalovet® 20 ile sağaltım sonucunda eklem sıvısındaki GAG seviyesinde değişiklik olmadı. Serumdaki GAG seviyelerinde ise gruplar arasında fark gözlenmedi. Sağaltımdan 7 gün sonraki GAG miktarları Tablo 1 de gösterildi.

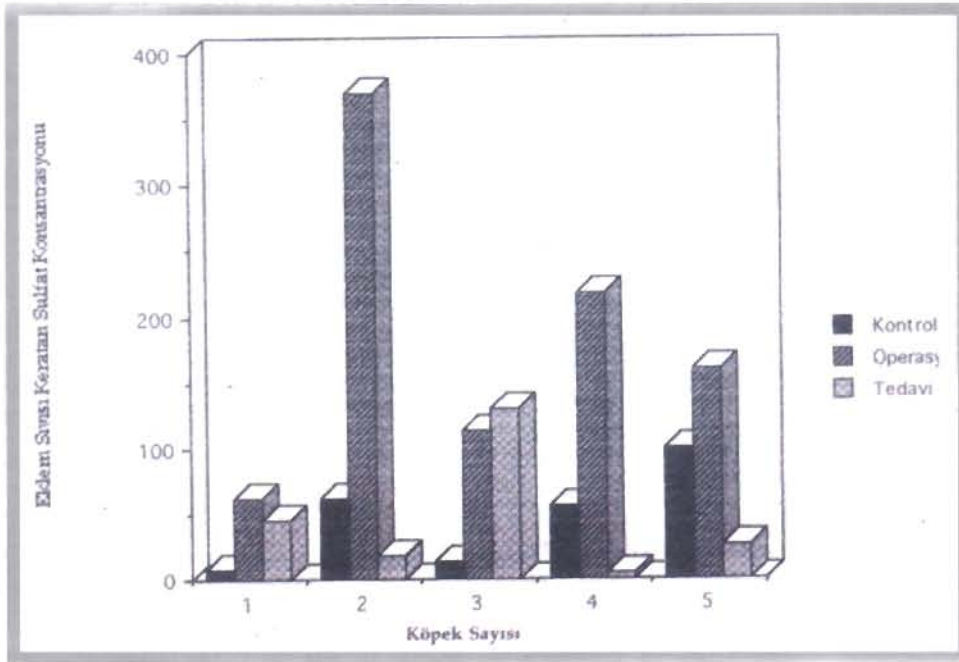
Keratan sulfat seviyeleri : Hyalovet® 20 ile sa-



Şekil 1 : Deneysel osteoarthritis oluşturmak için ligamentum cruciata anterior'un kesilmesi.



Şekil 2 : 1, 2 ve 3 no'lu köpeklerden toplanan eklem sıvılarında kontrol grubu (a), deneysel osteoarthritis oluşturulduktan sonra (b) ve Hyalovet® 20 sağaltımından sonra (c) jelatin enzim düzeylerinin gösterilmesi. 232 kDa ve 90 kDa moleküler ağırlıkları metalloproteinaz-9 (MMP-9) göstermektedir. 76 kDa MMP-9'un aktif formunu göstermektedir. 66 kDa ise MMP-2'yi göstermektedir.



Şekil 3 : Kontrol, operatif işlem ve sağaltımdan sonra eklem sıvılarındaki Keratan sulfat düzeyinde meydana gelen değişiklikler.

ğaltım sonucunda eklem sıvısında ve serumdaki KS miktarı istatistiki olarak düştü (Şekil 3). Eklem sıvısındaki KS seviyesi serumdakinden fazla olduğu bulundu. Sağaltımdan 7 gün sonraki KS miktarları Tablo 1 de gösterildi.

Baskılanma çalışmaları

Üç enzim bandı da (66, 90 ve 232 kDa) 100mM EDTA ile tamamen baskılandı. 50mM PMSF (özel serine proteinase baskılayıcılarında) değişiklik görülmedi. Bu sonuçlar bu enzimlerin metalloproteinaz olduğunu gösterdi.

Tartışma ve Sonuç

Osteoartrit sağaltımının hedef noktası, eklem kıkırdağındaki yıkılmayı başlatan metalloproteinaz enzimlerini durdurma. Metalloproteinaz enzimleri ekstraselular matriksdeki fizyolojik fonksiyonları ile birlikte, özellikle kollajen fibrillerinin ve proteoglikan molekülünün yıkılmasında önemlidir. Metalloproteinazlar, jelatin enzim grafi analizi ile molekül ağırlıklarına göre gösterilmiştir (Birkedal-Hansen ve Taylor, 1982 ; Davies ve ark. 1993). Bu çalışmada öncelikle eklem sıvılarındaki aktif ve inaktif metalloproteinazlar ELISA ve enzim grafi yöntemleri

ile gösterildi.

Kontrol ve OA' li hayvanlardan toplanan eklem sıvılarında MMP-2 ortaya kondu. MMP-2 lerin sinovyal fibroblastlardan ve kondrositlerden üretildiği belirtilmiştir (Hough ve Spokoloff, 1989; Clegg ve ark. 1997). Hastalıklı eklemden toplanan eklem sıvılarında MMP-2 lerdeki artış sinovyal fibroblast ve kondrosit metabolizmalarının artışına bağlandı. Fakat, MMP-9 lar sadece OA 'li eklem sıvılarında görüldü. MMP-9 lar kondrosit, kan monositleri ve nötrofil lökositler tarafından sentezlenirler (Vartio ve Baumann, 1989 ; Matrisian, 1992; Fox ve Kang, 1993 ; Clegg ve ark. 1997; Arıcan ve ark. 1998). Çeşitli araştırmacıların yaptığı çalışmalarda MMP-9 lar ile nötrofil lökosit miktarları arasında paralellik bulunmuştur (Hirose ve ark. 1992; Clegg ve ark. 1997). Bu sonuçlar enzim miktarı ile nötrofil lökositler arasındaki ilişkiyi göstermiştir. Bu çalışmada MMP-9 daki artışlar yangısel reaksiyonlara ve buna bağlı olarak nötrofil lökositlerin artışına bağlandı.

Çalışmada, eklem sıvısında GAG ve KS miktarları operatif işlemden önce ve sağaltımdan sonra ölçüldü. GAG miktarlarının operasyonu takiben OA'li gruptaki artışı, hastalığın akut döneminde GAG da meydana gelen yıkılmaya bağlandı. Fakat, sağaltım sonucunda GAG konsantrasyonunun sabit kalışı osteoartritli eklemdeki

Tablo 1 : Operasyon öncesi, operasyondan 1 hafta sonra ve HA asit sağaltımından sonra eklem sıvısı ve serumdaki GAG ve KS miktarlarında meydana gelen değişiklikler

		Operasyon Öncesi (Kontrol)	Operasyondan 1 hafta sonra	Hyaluronik asit sağaltımından sonra
Glikozaminoglikan µg/ml	serum	77.7±23.0	58.6±6.0	88.7±42.5
	eklem sıvısı	194.6±191.2	270.6±115.3	276.6±266.5
Keratan Sülfat µg/ml	serum	0.8±0.5	3.6±2.3	1.0±0.8
	eklem sıvısı	47.8±37.9	184.5±118.3	44.8±49.8

sıvı volümünün artışına bağlandı. OA 'li olgularda yapılan çalışmalarda (Arican ve ark. 1994; Arican, 1995) eklem sıvı volümünün arttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada OA'li eklemde toplanan eklem sıvılarının analizinde KS konsantrasyonundaki artış metalloproteinaz enzimlerinin KS moleküllerini proteoglikana bağlanma yerlerinde yıkımına bağlandı. İnsan, köpek ve deneysel menüsküsektör uygulanan koyunlarda yapılan çalışmalar da bu sonucu destekleyici bulunmuştur (Witter ve ark. 1987 ; Brandt ve Thonar, 1989 ; Arican 1995). Sağaltım sonucunda, KS miktarındaki azalış ise, metalloproteinazların, hyaluronik asit tarafından baskılanması sonucu, kırıkta metabolizmasındaki KS yıkımını engelleyerek fazla oranda KS artışını durdurduğu kanısına varıldı. Yapılan bir çalışma da bu görüşü desteklemiştir (Ghosh ve ark. 1995).

OA olgularında, non-steroidal anti-inflamatuar ve steroid ilaçların kullanılması yaygındır. Fakat, ciddi gastrointestinal problemler oluşturduğu, karaciğer ve böbrekler olmak üzere birçok organa zarar verdiği bildirilmiştir. Terapötik uygulamalarındaki amaç ilaçların vücuda zarar vermesine engel olmaktır. Yapılan çalışmalarda hyaluronik asit uygulamalarında herhangi bir yan etkiye rastlanmamıştır (Adams, 1993). Bu çalışmada HA uyguladığımız köpeklerde klinik olarak herhangi bir problem gözlenmedi.

Sağaltım amacıyla kullanılan HA eklemdeki etkisini proteoglikanı koruyarak ve sinovyal hücrede proliferasyonu azaltarak yapar. HA polimorf nükleer hücreleri ve lökositlerin makrofaj göçünü baskılayarak yangıyı azaltır. Bağ dokusunda iyileştirme yapar, fibroblast ve endotelial hücrelerde proliferasyonu kontrol ettiği bildirilmiştir (Aviad ve Houpt, 1994). Yapılan çalışmada HA enjeksiyonlarının, kortikosteroid uygulamaları ile ki-

yaslandığında daha yararlı olduğu ve eklemde daha uzun süre kaldığı gösterilmiştir (Peyron ve Balazs, 1974). İnsanlardaki OA olgularında başarı ile kullanıldığı bildirilmiştir (Peyron ve Balazs, 1974)

Sonuç olarak metalloproteinaz enzimlerinin eklem sıvılarında gösterilmesi teşhiste yardımcıdır (Clark ve ark. 1993). Hyaluronik asit lökositleri baskılayarak, nötrofil lökositlerden salgılanan MMP-9 ların kollajen fibriller ile PG'in yıkımının önüne geçtiği kanısına varıldı. Hyaluronik asit' in köpeklerdeki dejeneratif artritlerin sağaltımında kısa sürede sonuç alınması açısından başarılı ile kullanılabileceği vurgulandı.

Teşekkür : Laboratuvar analizlerindeki katkılarından dolayı Dr. S.D. Carter'a teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Adams, M.E. (1993). An analysis of clinical studies of the use of crosslinked hyaluronan, hylan in the treatment of osteoarthritis. *J. Rheumatol.*, 20, 16-18.
- Arican, M., Carter, S.D., Alkan, F. (1998). Treatment of bovine traumatic kerato-conjunctivitis with hyaluronic acid. *Vet.Cer.Der.*, 4, 15-18.
- Arican, M (1995). Bone and cartilage metabolism in canine arthropathies. PhD thesis, University of Liverpool.
- Arican, M., Carter, S.D., Bennett, D., May, C. (1994). Measurement of glycosaminoglycans and keratan sulphate in canine arthropathies. *Res. Vet. Sci.*, 56, 290-297.
- Aviad, A.D., Houpt, J.B. (1994). The Molecular Weight of therapeutic hyaluronan (sodium hyaluronate): How significant is it? *J. Rheumatol.*, 21, 297-301.
- Balazs E.A., Denlinger J.L (1993). Viscosupplementation : A new concept in the treatment of osteoarthritis. *J Rheumatol* 20, 3-9.
- Bennett, D. (1980). "The naturally occurring inflammatory

- arthropathies of the dog". PhD thesis, University of Glasgow.
- Bennett, D. (1991). Joint disease in "Canine Medicine and therapeutics". Chapter 7 167-205 (Chandler et al ed.) Blackwell, London.
- Birkedal-Hansen, H., Taylor, R.E (1982). Detergent-activation of latent collagenase and resolution of its component molecules. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 107, 1173-1178.
- Brandt, K.D., Thonar, E. J-M. A (1989). Lack of association between serum keratan sulfate concentrations and cartilage changes of osteoarthritis after transection of the anterior cruciate ligament in the dog. *Arth. Rheum.* 32, 647-651
- Brandt, K.D., Mankin, H.J. (1986). Workshop on the etiopathogenesis of osteoarthritis. *J. Rheumatol.* 13, 1126-1160.
- Cawston, T.E., Weaver, L., Couglan, R.J., Kyle, M.V., Hazelman, B.L. (1989). Synovial fluids from infected joints contain active metalloproteinase and no inhibitory activity. *Br.J.Rheum.* 28, 386-392
- Clark, I.M., Powell, L.K., Ramsey, S., Hazelman, B.L., Cawston, T.E. (1993). The measurement of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) and collagenase-TIMP complex in synovial fluids from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arth. Rheum.* 36, 372-379
- Clegg, P.D., Burke, R.M., Coughlan, A.R., Riggs, C.M. Carter, S.D. (1997). Characterisation of equine matrix metalloproteinase 2 & 9 and identification of the cellular sources of these enzymes in joints. *Equine Vet. J.* 29, 343-348.
- Coughlan, A.R. (1997) Matrix metalloproteinases 2. and 9 in canine arthritis. PhD thesis, Liverpool University, Liverpool.
- Davies, B., Miles, D.W., Happerfield, L.C., Naylor, M.S., Bobrow, L.G., Rubens, R.D., Balkwill, F.R. (1993). Activity of type IV collagenases in benign and malignant breast disease. *Br. J. Cancer*, 67, 1126-1131
- Farndale, R.W., Buttle, D.J., Barrett, A.J. (1986). Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Bio. Bioph. Acta.* 883, 173-177
- Fox, R.I., Kang, H. (1993). Structure and function of synoviocytes. In: *Arthritis and allied conditions*, ed: McCarty, D.J., and Koopman, W.J., Lea & Febiger, Philadelphia 263-278.
- Ghosh, P., Holbert, C., Read, R., Armstrong, S. (1995). Hyaluronic acid (hyaluronan) in experimental osteoarthritis. *J. Rheumatol* 22, 155- 157.
- Gruber, B.L., Sobri, D., French, D.L. Marchese, M.J., Nuovo, G.J., Kew, R.R., Arbeit, L.A. (1996). Markedly elevated serum MMP-9 (gelatinase B) levels in rheumatoid arthritis: A potentially useful laboratory marker. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 78, 161-171
- Heinegard, D., Paulsson, M. (1984). Structure and metabolism of proteoglycans, *Extracellular Matrix Biochemistry*. Edited by KA Piez, AH Reddi, New York, Elsevier 277-328
- Hirose, T., Reife, R.A., Smith, G.N., Stevens, R.M., Marinardi, C.L., Hasty, K.A. (1992). Characterisation of type V collagenase (gelatinase) in synovial fluid of patients with inflammatory arthritis. *J. Rheumatol*, 19, 593-599.
- Hough, A.J., Spokoloff, L. (1989). Pathology of osteoarthritis. In: *Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology*. ed. McCarty, D.J. Lea & Febiger, Philadelphia, 1571-1591
- Koolwijk, P., Miltenburg, A.M.M., van Erck, M.G.M., Oudshoorn, M., Niedbala, M.J., Breedveld, F.C., van Hinsbergh, V.W.M. (1995). Activated gelatinase-B (MMP-9) and urokinase-type plasminogen activator in synovial fluids of patients with arthritis. Correlation with clinical and experimental variables of inflammation. *J. Rheumatol.* 22, 385-393.
- Lohmander, L.S., Hoerrner, L.A., Lark, M.W. (1993). Metalloproteinases, tissue inhibitor and proteoglycan fragments in knee synovial fluid in human osteoarthritis. *Arth. Rheumatol* 36, 181-189.
- Lussier, A., Cividino, A.A., McFarlane, C.A., Olszynski, W.P., Potashner, W.J. Medicis, R. De. (1995). Viscosupplementation with hylan for treatment of osteoarthritis : Findings from Clinical Practice in Canada. *J. Rheumatol.* 23, 1579-1585.
- Matrisian, L.M. (1992). The matrix-degrading metalloproteinases. *BioEssays*, 14, 455-463.
- McDevitt C. A., Muir, H. (1976). Biochemical changes in the cartilage of the knee in experimental and natural osteoarthritis in the dog. *J. Bone Joint Sur.* 58-B, 94-101.
- Peyron, J.G., Balazs, E.A. (1974). Preliminary clinical assessment of Na-hyaluronate injection into human arthritic joints. *Pathol. Biol.* 22, 731-736.
- Pond, M.J., Nuki, G. (1973). Experimentally induced osteoarthritis in the dog. *Ann. Rheum. Dis.* 32, 387-388.
- Saxne, T., Heinegard, D., Wollheim, F. A. (1987). Cartilage proteoglycans in synovial fluid and serum in patients with inflammatory joint disease, relation to systemic treatment. *Arth. Rheum.* 30, 972-979.
- Spiers, S., May, S.A., Harrison, L.J., Bennett, D., Edwards, G.B. (1994). Proteolytic enzymes in equine joints with infectious arthritis. *Equine Vet. J.* 26, 48-50.
- Taylor, K. B., Jeffree, G. M. (1969). A new basic metachromatic dye 1: 9 dimethylmethylene blue. *Histo. Journal* 1, 199-204.
- Tew, WP (1984). Sodium hyaluronate and the treatment of equine joint disorders. In: Milne FJ, ed. *Proceedings of the 30th Annual Meeting of the American Association of Equine Practitioners*. Dallas, 67-86.

Thonar, E.J-M.A, Lenz, M.E, Klintworth, G.K, Caterson, B., Pachman, L.M., Glickman, P., Katz, R., Huff, J., Kuttner K. E. (1985). Quantification of keratan sulphate in blood as a marker of cartilage metabolism. *Arth. Rheum.* 28, 1367-1376.

Vartio, T., Baumann, M. (1989). Human gelatinase/type IV procollagenase is a regular plasma component. *FEBS Lett.* 225, 285-289.

Weiss, C., Balazs, E.A St. Onge, R, Denlinger J.L (1981). Clinical studies of the intraarticular injection of

Healon (sodium hyaluronate) in the treatment of osteoarthritis of human knees. *Semin. Arth. Rheum.* 11, 143-144.

Witter, J., Roghley, P. J., Webber, C., Roberts N., Keystone E., Poole, R. (1987). The immunologic detection and characterization of cartilage proteoglycan degradation products in synovial fluids of patients with arthritis. *Arth. Rheum.* 30, 519-529

Wollheim, F.A. (1996). Current Pharmacological treatment of osteoarthritis. *Drugs*, 52, 27-38.