

# КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ В ЛЕЧЕНИИ ДЕФОРМИРУЮЩЕГО АРТРОЗА

*Найманн А.И.(1), Донченко С.В.(2), Якимов Л.А.(1), Блоков М.Ю.(2), Лычагин А.В.(1), Черепанов В.Г.(1),  
Терехин С.В.(1), Текеев И.А.(1)*

*(1) ГБОУ ВПО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова, кафедра травматологии, ортопедии и  
хирургии катастроф*

*(2) Городская клиническая больница имени С.П.Боткина, Москва*

*Статья представляет собой сравнительный анализ широко применяемых в клинической практике препаратов гиалуроновой кислоты, их эффективности в зависимости от величины молекулярной массы экзогенного гиалуроната. При этом в статье подробно рассматривается механизм действия препаратов этой группы, особое внимание уделяется протезу синовиальной жидкости *ViscoPlus*.*

**Ключевые слова:** *гиалуроновая кислота, остеоартроз, *ViscoPlus*.*

В клинической практике травматологов-ортопедов пациенты с деформирующим артрозом различных суставов занимают особое место в силу того, что существующие в наше время методы лечения данного заболевания зачастую не приводят к желаемым результатам.

Несмотря на широкое развитие методов оперативного лечения дефектов суставного хряща, начиная от малоинвазивных артроскопических операций и заканчивая тотальным эндопротезированием суставов, одной из важнейших задач современной медицины является улучшение качества жизни пациентов с этой тяжелой, хронической, постоянно прогрессирующей патологией консервативным путем. В настоящее время для решения данной задачи применяется достаточно широкий спектр медикаментозных средств.

Это препараты хондропротекторного ряда, имеющие в своем составе хондроитинсульфат и/или глюкозаминсульфат, назначаемые и перорально и в виде инъекционных растворов, однако требующие для достижения терапевтического эффекта длительного применения.

Это нестероидные противовоспалительные препараты, время работы которых ограничено несколькими часами, длительное же их применение влечет за собой повреждение слизистой оболочки желудка и нарушение функции почек.

Однако в последние годы одним из основных методов лечения деформирующего артроза суставов в ранних его проявлениях являются препараты гиалуроновой кислоты, одного из важнейших компонентов суставного хряща, которые

уменьшают симптомы заболевания уже в течении 1-й недели с начала терапии и сохраняют свой эффект в течении длительного времени.

Современная медицина в настоящий момент обладает достаточно большим спектром препаратов на основе гиалуроновой кислоты, имеющих различия по многим параметрам, таким как концентрация, молекулярный вес, методика производства. Отчасти из-за того, что внутрисуставные инъекции ГК относительно недавно появились на рынке лекарственных средств, отчасти из-за различающихся данных в отчетах производителей, у врачей сформировались различные представления о механизме действия и клинической значимости доступных препаратов. Для того, чтобы внести ясность в эти вопросы, мы сфокусировали свое внимание на характеристиках, которыми должен обладать идеальный продукт на основе гиалуроновой кислоты.

У пациентов с остеоартрозом в синовиальной жидкости снижены концентрация и средний молекулярный вес гиалуронатов. Этот факт послужил исходным обоснованием для применения внутрисуставных инъекций гиалуроновой кислоты в клинической практике. (2) Эта гипотеза предшествовала открытию как гиаладгеринов (отвечают за образование поперечных сшивок у гиалуронатов в синовиальной жидкости и внеклеточном хрящевом матриксе), так и рецепторов гиалуронатов на поверхности клеток. (3)

Сообщалось, что эластичность и способность поддерживать работоспособность сустава для экзогенных гиалуронатов тем выше, чем выше молекулярная масса. (4) Основываясь на этом факте, было высказано предположение, что длительность клинического эффекта от гиалуронатов также пропорциональна молекулярной массе в результате повышения вязкости (механические и смазочные функции), продолжительности нахождения в суставе, и стимуляции синтеза эндогенных гиалуронатов. Однако результаты клинических испытаний, в которых сравнивались гиалуронаты с различным молекулярным весом, показывают, что влияние на патогенез и прогрессию остеоартроза наблюдается для всего спектра протестированных молекулярных масс, при этом некоторые ученые обнаружили, что эффективность выше у соединений со средним молекулярным весом.

CD44, мембранный рецептор гликопротеиновой природы, способен связываться с гиалуронатами и участвует в регуляции синтеза эндогенной гиалуроновой кислоты. Регуляция экспрессии и функционирования гиалуронатов – сложный процесс. Три родственных гена, относящихся к семейству гиалуронат-синтетаз регулируются и осуществляют синтез гиалуронатов со средней молекулярной массой 200-2000 кДа (килодальтон). Новосинтезированные гиалуронаты находятся во внеклеточной жидкости и связаны друг с другом специальными белками гиаладгеринами (3), что увеличивает их итоговую молекулярную массу и вязкость. Каждая молекула гиалуроната может связывать

до 200 молекул гиаладрегина на одну цепь. Результаты преclinical испытаний, в которых оценивалась потенциальная возможность влиять на структуру суставов (проводились на животных моделях остеоартрита), показали, что гиалуронаты с низкой и средней молекулярной массой (500-2000 кДа) могут быть эффективнее в силу того, что им легче проникать в поврежденные ткани. (11, 18-20) Coleman et al. (19) показали, что, при введении гиалуронатов с разным молекулярным весом в коленный сустав кроликов под анестезией, эффективность гиалуронатов зависела от длины цепи молекулы, причем чем меньше длина цепи, тем слабее молекулярный ответ синовиального интерстиция. При использовании двух самых коротких молекул (90 и 300 кДа) отток жидкости при дренировании был снижен по сравнению с раствором Рингера, но резко возрастал при увеличении давления; при большой длине цепи (530-2200 кДа) уровень оттока жидкости не зависел от давления.

Обширные контролируемые сравнительные исследования не смогли подтвердить предположение, что повышение молекулярной массы или вязкости приводит к повышению клинической эффективности, на которую указывало снижение боли. Данные недавних клинических исследований на пациентах, получающих инъекции гиалуронатов со средней молекулярной массой, показали, что такая терапия влияет на развитие заболевания и может замедлять развитие остеоартроза. (21-25) Эти вопросы обсуждаются далее обсуждаются более подробно.

### **Механизм действия**

Гиалуронаты отвечают за упругость синовиальной жидкости в суставах, и она тем выше, чем больше молекулярный вес гиалуронатов. Упругость зависит от сдвига: механические свойства гиалуронатов изменяются в зависимости от приложенного усиления сдвига и скорости потока. Раствор гиалуронатов ведет себя как вязкая жидкость когда внешние силы действуют на низких скоростях, и как эластичное тело, когда подвергается действию повышенных сил или высоких скоростей. Таким образом гиалуронаты являются эффективным смазочным средством при медленных движениях и прекрасными амортизаторами при быстрых движениях. (4)

Очевидно, что такое упругое поведение в значительной степени влияет на клинические проявления, но фармакокинетический профиль гиалуронатов указывает, что роль этих субстанций не ограничивается чисто механической. В ходе движений гиалуронаты попадают в лимфатическую систему суставной капсулы, попадает в общий кровоток, и в итоге абсорбируются печенью, где деградируют до воды и углекислого газа. (26) Длительность терапевтического эффекта гиалуронатов, как показывают клинические испытания, также не

соотносятся с их чисто механической ролью, поскольку положительный эффект сохраняется в течении нескольких месяцев после проведения курса инъекций, хотя период полувыведения гиалуронатов из суставов составляет несколько часов или дней. (27, 28)

Другой предполагаемый механизм действия опосредован рецепторами. Этот механизм включает ингибирование медиаторов воспаления и фагоцитарной функции клеток, стимуляцию синтеза хряща и подавлением его деградации. (17, 30-39) Эти и другие возможные механизмы, и их связь с молекулярной массой, исследуемые преимущественно *in vitro*, представлены в Таблице I. (17, 30-39)

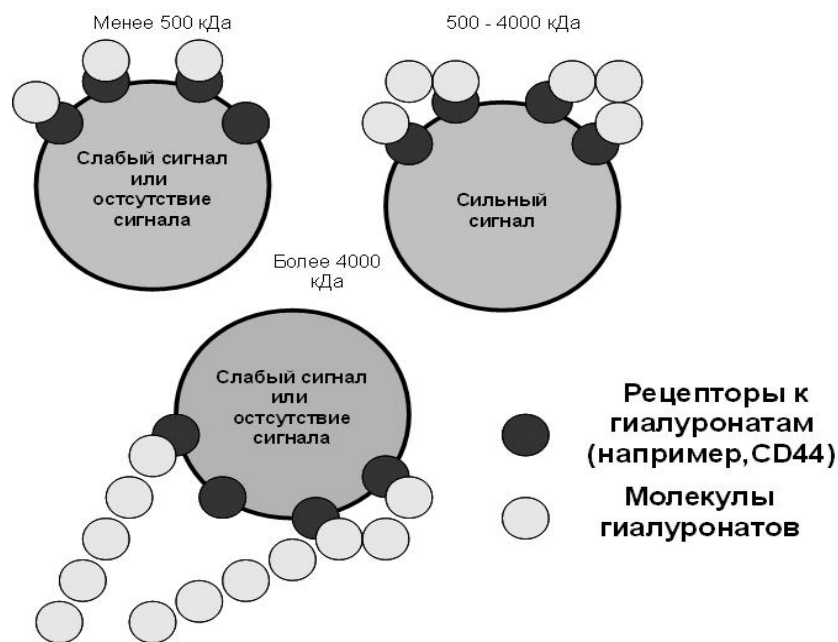
Таблица I

<b>Молекулярный вес и эффект* биологической активности гиалуронатов</b>			
Биологическая активность	Диапазон молекулярной массы		
	Низкая (менее 500 кДа)	Средняя (500-4000 кДа)	Высокая (более 4000 кДа)
<b>Данные <i>in vitro</i></b>			
Подавление хемотаксиса лейкоцитов (30)	-/+	+++	+
Подавление фагоцитоза (30)	-/+	+++	+
Подавление пролиферации лимфоцитов (31)	-	++	НТ
Удаление свободных радикалов кислорода (32)	+	+++	++
Подавление ферментативной деградации хряща (33,34)	-	++	-/+
Подавление апоптоза (35)	-	+	+
Стимуляция синтеза эндогенных гиалуронатов (36)	-	+++ (сноска <sup>1</sup> )	-/+
Подавление активации системы простагландина E2 и арахидоновой кислоты (37,38)	+	+++	+
<b>Данные <i>in vivo</i></b>			
Анелгизия (39)	-/+	+++	+
Защитный эффект при потере хряща <sup>2</sup> (7,17)	-/+	+++	-/+
Подавление пролиферации синовиальных клеток (11,17)	НТ	++	+
* Знак минуса (-) означает отсутствие заметного эффекта; плюс (+) означает наличие слабого эффекта; (++) средний по силе эффект; +++ заметный эффект; НТ – не тестировалось. <sup>1</sup> – Smith and Ghosh (36) обнаружили, что максимальная стимуляция синтеза гиалуронатов синовиальными клетками человека достигается при применении гиалуронатов с молекулярной массой 500 - 4000 кДа; при молекулярной массе меньше 500 кДа никакого эффекта не наблюдается; при молекулярной массе 4700 кДа и более эффект стимуляции снижается с повышением концентрации гиалуронатов. <sup>2</sup> – В исследовании Asari et al (11) было показано, что гиалуронаты с молекулярной массой 800 кДа слабо защищают от потери хряща, однако при использовании гиалуронатов с молекулярной массой 1900 кДа этот эффект выражен ярко.			

Считается, что концентрация гиалуронатов отслеживается синовиальными фибробластами, и гомеостаз поддерживается за счет специальных рецепторов на поверхности клеток. В опытах *in vitro* было показано, что эти рецепторы также активируются экзогенными гиалуронатами, причем максимальный ответ вызывается фрагментами определенного размера. (36) В одном из исследований ученым удалось показать, что наиболее заметный ответ наблюдается в синовиальных фибробластах, полученных из сустава, пораженного остеоартрозом, обработанного гиалуронатами с молекулярной массой более 500 кДа, в то время как клеточный ответ на молекулы меньшего размера был значительно меньше, либо вообще был нулевым. (36) Исследователи также обнаружили, что высокомолекулярные гиалуронаты (4700 кДа) слабее, чем фрагменты размером 3800 кДа, стимулировали синтез. Они считали, что эти данные доказывают, что синовиальные фибробласты не увеличивают синтез эндогенных гиалуронатов в присутствии функционально-активных (то есть высокомолекулярных или находящихся в высокой концентрации) гиалуронатов.

Исследование показало, что связывание гиалуронатов с клеточной поверхностью является комплексным взаимодействием многовариантных событий связывания, на которые влияют размер лиганда (гиалуроната), плотность рецепторов CD44 на поверхности клеток, и статусом CD44 (активный или неактивный рецептор). (49) Главным признаком, отличающим CD44 от всех других белков, связывающихся с гиалуронатами, называют тот факт, что связывание с CD44 происходит на поверхности клеток, где множество рядом расположенных молекул рецептора CD44 взаимодействуют с поливалентной цепью гиалуроната, представляющего собой повторяющуюся цепь дисахаридов. Прочность связи в одном сайте связывания между CD44 и гиалуронатом довольно мала. Таким образом, при связывании CD44-положительных клеток с молекулой гиалуроната в растворе должно образовываться множество слабых взаимодействий рецептор-лиганд, что зависит от исходной валентности молекулы гиалуроната. В высокомолекулярных полимерах гиалуроната каждая молекула взаимодействует с более чем одним рецептором, что повышает вероятность того, что молекула останется связанной с рецептром, что повышает аффинность молекулы. Однако, с определенного момента очень большие молекулы гиалуронатов будут менее эффективно связывать множественные рецепторы из-за стерических затруднений, что является одним из следствий двусторонней природы многих биологических активностей. На основании этого факта можно заключить, что максимальный ответ можно получить при действии гиалуронатов определенного размера (не слишком большого и не слишком маленького). Существование изформ рецепторов гиалуронатов также может быть причиной разных типов связывания. Однако эти идеи в настоящее время продолжают обсуждаться, и точный

механизм связывания с рецептором неизвестен. С одинаковой вероятностью ответ может быть пропорционален количеству связанных рецепторов, либо работать по принципу «всё или ничего», когда ответ возникает только при одновременном связывании 2 или более рецепторов. (18) Кроме того, биологическая активность зависит от «биодоступности», то есть от способности проникать в поврежденные ткани. И снова, более крупным молекулам гиалуронатов труднее проникать через синовиальную оболочку. (11)



### **Время полувыведения и проникновение в ткани.**

Экзогенные гиалуронаты начинают покидать сустав спустя 2 часа после инъекции, хотя некоторые способны находиться там до 3 дней (главным образом это относится к высокомолекулярным продуктам). Результаты исследования с использованием радиоактивно меченного изотопа йода ( $^{131}\text{I}$ ) показали, что гиалуронаты выводятся из суставов человека за три фазы (время полувыведения 1,5 часа, 1,5 дня и 4 недели) и соответствует графику экспоненты третьей степени (45). В этом исследовании использовались стабилизированные производные гиалуронової кислоты неживотного происхождения с высокой молекулярной массой (NASHA), было высказано предположение, что первая фаза быстрого выведения связана с удалением низкомолекулярных фрагментов, а во второй фазе выводятся высокомолекулярные меченые гиалуронаты. В течении третьей медленной фазы ежедневное снижение радиоактивности было сопоставимо с уровнем метки в моче, что свидетельствует о медленном выводе гиалуронатов или продуктов их деградации из геля в колене и последующем выделении их почками. Возможность поглощения NASHA и их производных синовиальным слоем и подколенными лимфатическими узлами также обговаривалась. (45)

По результатам другого исследования показали повышенный клиренс гиалуронатов при остеоартрите, чего не наблюдается у людей со здоровыми суставами. (46) Период полувыведения гиалуроната увеличивается до 23,5 часов при возникновении остеоартрита, но когда болезнь полностью развивается он падает до 17,4 часов.

Различие между временем нахождения в суставной сумке и длительностью клинического эффекта может быть обусловлено, хотя бы отчасти, усиленным проникновением гиалуронатов со средним молекулярным весом во внеклеточный матрикс синовиальных тканей и, возможно, в хрящ. В ходе экспериментов на модели остеоартрита у собак, в которых оценивался уровень экспрессии простагландинов E2, утолщение синовиального слоя, вакуолярные изменения в выстилающих клетках, а также флуоресцентное мечение гиалуронатов, были получены некоторые доказательства того, что гиалуронаты со средней молекулярной массой (около 2000 кДа) проникают в поврежденные ткани гораздо эффективнее, чем высокомолекулярные гиалуронаты. Патологические изменения обеспечивают повышенную доступность синовиальных тканей для молекул со средним молекулярным весом. (11)

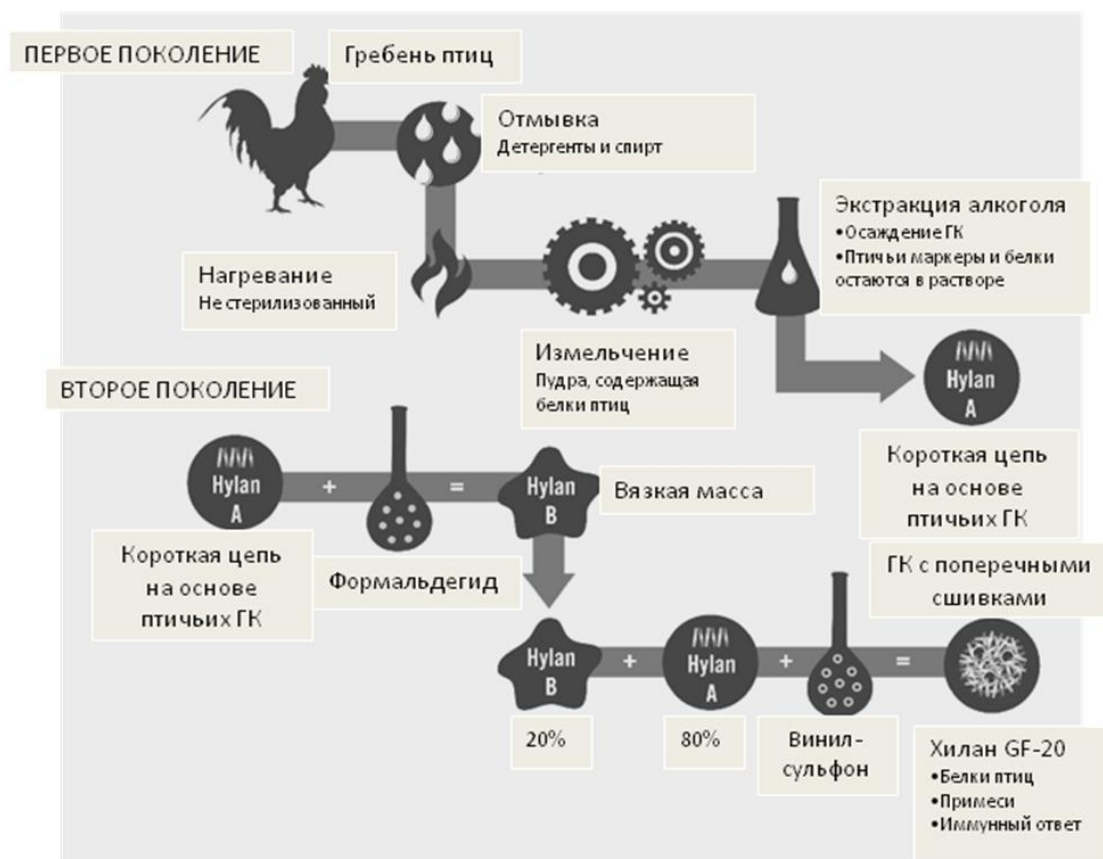
Повышение среднего молекулярного веса однозначно приводит к повышению упругих свойств раствора. (4) Этот факт имел бы решающее значение, если бы боль в суставах была бы чисто механическим свойством, однако здесь задействованы также биологические процессы. Из этого не следует, что активация гиалуронатов и других сопряженных биохимических путей в клетке происходит в ответ на увеличение концентрации и молекулярного веса гиалуронатов в коленном суставе. Структурные характеристики хрящевого матрикса определяются крупными комплексами гиалуронатов и протеогликанов, включающими агреканы и другие сшивочные белки. (47) Видимо, длина гиалуроната определяется связыванием удлиняющегося зарождающегося гиалуроната к рецептору. Насыщение этих рецепторов может остановить рост цепи новообразованного гиалуроната; этот сигнал передается внутрь клетки и влияет на синтез гиалуронатов и протеогликанов.

В настоящее время общепризнанной считается точка зрения, согласно которой гиалуронаты с молекулярной массой близкой к нормальной (наблюдающейся в здоровой синовиальной жидкости – около 2000 кДа) обеспечивают оптимальные упругие свойства внутрисуставной среды и как следствие максимальную механическую защиту суставного хряща.

### **Переносимость препарата**

Гиалуронаты хорошо переносятся, не имеют системных эффектов и совсем немного несовместимых с ними препаратов. (67) Самый распространенный побочный эффект от

гиалуронатов, который отмечался во многих исследованиях – это боль в месте укола. К воспалению может привести любая внутрисуставная инъекция, но после инъекций гиалуронатов наблюдается особый тип ответа – псевдосепсис или тяжелая острая воспалительная реакция (SAIR). На данный момент все описанные в литературе случае относятся к хилану G-F 20 (Синвиск). Производственные стандарты одинаковы по количественным характеристикам для всех типов гиалуронатов (количество белка в продукте, обычно не более 0,1 %), однако различие заключается в иммунологических характеристиках белков, содержащихся в хилане G-F 20 и подвергнутых обработке формальдегидом и винилсульфоном, отвечающих за образование поперечных сшивок. (67-69) Известно, что поперечные сшивки повышают иммуногенность антигенов, и исследования на кроликах показали, что воспалительный ответ наблюдается после инъекций хилана, но не развивается после введения гиалуроната натрия в суставную щель. (70) В литературе описано несколько случаев, когда у пациентов развивалась острая воспалительная реакция в ответ на введение хилана G-F 20, после чего их переводили на гиалуронат натрия. В результате удавалось добиться хороших клинических результатов, причем побочные явления повторно не развивались (71), что подтверждает теорию о том, что SAIR является специфической реакцией на хилан G-F 20.







У некоторых пациентов в сыворотке были обнаружены антитела к хилану. (71) Кроме того, иммунный ответ может прогрессировать и приводить к развитию более серьезных заболеваний типа гранулематоза. Случаи такой прогрессии описаны у пациентов с остеоартритом коленного сустава, которым проводились инъекции хилана G-F 20. Реакция принимает форму хронического воспаления перисиновиальной области и окружающих тканей, которую можно распознать гистологически по появлению чужеродных гигантских клеток. В недавнем исследовании это состояние также характеризуется как псевдосаркома. (72) Одно из последних исследований на животных, в котором сравнивалась биосовместимость гиалуроната натрия и физиологического раствора с хиланом G-F 20, также подтверждает это наблюдение. (73) После подкожных инъекций у морских свинок и внутримышечных у кроликов хилана G-F 20 защитные макроскопические изменения заметны на 14 день у морских свинок и на 28 у кроликов. Тяжелое гранулематозное воспаление у морских свинок и острое воспаление с минимальной инфильтрацией макрофагами и чужеродными гигантскими клетками у кроликов можно было выявить гистологически. Более того, специфические антитела против хилана G-F 20 у морских свинок была выявлена по пассивной кожной анафилактики и значительные отложения иммуноглобулина G на хилане G-F 20 определялись иммуногистохимически.

## Заключение

Таким образом, данные по терапии болевого синдрома при остеоартрозе с помощью инъекций гиалуронатов в суставную сумку, которые накапливались в течении 2 десятилетий, показали, что механизм действия гиалуронатов опосредован рецепторами и их эффектами и

выходит за рамки физических, механических и упругих свойств этого вещества. Очевидна взаимосвязь между молекулярной массой препаратов гиалуроновой кислоты и выраженностью терапевтического эффекта, оказываемого ими на пораженный остеоартрозом сустав. В настоящее время существует широкий спектр препаратов гиалуроновой кислоты, имеющих существенные различия как в технологии производства, так и в показателях молекулярной массы действующего вещества. Однако, основываясь на большой клинический опыт применения препаратов этой группы и приведенные выше данные литературы, очевидно, что выраженного и стойкого терапевтического эффекта представляется возможным добиться с помощью гиалуронатов, обладающих оптимальной молекулярной массой и не содержащих белков животного происхождения.

Препаратом, наиболее соответствующим вышеописанным характеристикам, является ViscoPlus – протез синовиальной жидкости нового поколения, представленный немецкой фирмой «БиоМедикал Б. Бауманн ГмбХ».

Активно-действующее вещество ViscoPlus – натуральная гиалуроновая кислота высокой степени очистки, аналог синовиальной жидкости, представляющий собой 1,0% – вязко-эластичный стерильный раствор для инъекции в полость сустава. В отличие от других препаратов этой группы, молекулярная масса ViscoPlus максимально приближена к значениям средней молекулярной массы полимера, содержащегося в синовиальной жидкости у человека и составляет 2000000 Дальтон. Такие уникальные характеристики данного препарата достигнуты благодаря инновационным технологиям бактериальной ферментации непатогенных штаммов.

ViscoPlus предназначен для внутрисуставного применения, причем возможно его введение практически в любой сустав тела человека – коленный, тазобедренный, плечевой, голеностопный, межпозвонковый, височно-нижнечелюстной. ViscoPlus выпускается готовым к применению – в стерильном шприце для однократного введения. Вводят его путем инъекции в пораженный сустав один раз в неделю. Для достижения терапевтически значимого эффекта необходим минимальный курс – 3 инъекции, для более длительного и выраженного действия препарата необходимо 5 инъекций. Возможно одновременное введение препарата в несколько суставов. Препарат обеспечивает продолжительный лечебный эффект от применения до одного года. ViscoPlus не содержит птичьего белка, обладает отличным профилем безопасности. Эти характеристики позволяют рекомендовать препарат ViscoPlus для широкого клинического применения в современной травматологии и ортопедии.

## Список литературы

1. Altman RD. Status of hyaluronan supplementation therapy in osteoarthritis, *Curr Rheumatol Rep.* 2003; 5:7-14.
2. Balazs EA, Denlinger JL. Clinical uses of hyaluronan. *Ciba Found Symp.* 1989;143:265-275.
3. Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Md.* 1997; 242:27-33.
4. Balazs EA, Denlinger JL. Viscosupplementation: a new concept in the treatment of osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl* 1993; 39:3-9.
5. Shimizu C, Yoshioka M, Coutts RD, et al. Long-term effects of hyaluronan on experimental osteoarthritis in the rabbit knee. *Osteoarthritis Cartilage.* 1998;6:1-9.
6. Yoshioka M, Shimizu C, Harwood FL, Coutts RD, Amiel D. The effects of hyaluronan during the development of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 1997; 5:251-260.
7. Kikuchi T, Yamada H, Shimmei M. Effect of high molecular weight hyaluronan on cartilage degeneration in a rabbit model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 1996; 4:99-110.
8. Armstrong S, Read R, Ghosh P. The effects of intraarticular hyaluronan on cartilage and subchondral bone changes in an ovine model of early osteoarthritis. *J Rheumatol* 1994;21 :680-688.
9. Schiavinato A, Lini E, Guidolin D, et al. Intraarticular sodium hyaluronate injections in the Pond-Nuki experimental model of osteoarthritis in dogs. II. Morphological findings. *Clin Orthop.* 1989;241:286-299.
10. Wenz W, Craff J, Brocai DR, et al. Wirksamkeit von intraartikular applizierter Hyaluronsäure auf Frühformen der Femoropatellararthrose -Eine experimentelle Untersuchung an Hunden. *Orthop Ihre Grenzgeb.* 1998;136:298-303.
11. Asari A, Miyauchi S, Matsuzaka S, Ito I, Kominamia E, Uchiyama Y. Molecular weight-dependent effects of hyaluronate on the arthritic synovium. *Arch Histol Cytol.* 1998;61:125-135.
12. Ghosh P, Read R, Numata Y, Smith S, Armstrong S, Wilson D. The effects of intra-articular administration of hyaluronan in a model of early osteoarthritis in sheep. II. Cartilage composition and proteoglycan metabolism. *Semin Arthritis Rheum.* 1993;22(suppl 1):31-42.
13. Ghosh P, Read R, Numata Y, Smith S, Armstrong S, Wilson D. The effects of intra-articular administration of hyaluronan in a model of early osteoarthritis in sheep. I. Gait analysis, radiological and morphological studies. *Semin Arthritis Rheum.* 1993;22(suppl 1):18-30.
14. Adam N, Studies on Hyaluronan and Glycosaminoglycans of Normal and Pathological Synovial Fluid [Master's thesis]. Sydney, Australia: University of Sydney; 1999.
15. Ghosh P, Kipic B, Swain M, Smith MM, Cake M, Read R. Improvement in rheological

parameters of synovial fluids aspirated from OA joints of sheep administered intra-articular hyaluronan (MW = 0.5-0.73x 10<sup>6</sup> Da) but not a higher MW preparation. In press.

16. Yoshimi T, Kikuchi T, Obara T, Yamaguchi T, Sakakibara Y, Ito T. Effects of highmolecular- weight sodium hyaluronate on experimental osteoarthritis induced by the resection of rabbit anterior cruciate ligament. *Clin Orthop*. 1994;298:296-304.

17. Shimizu C, Kubo T, Hirasawa Y, Coutts RD, Amiel D. Histomorphometric and biochemical effect of various hyaluronans on early osteoarthritis. *J Rheumatol*. 1998;25:1813-1819.

18. Ghosh P, Guidolin D, Potential mechanism of action of intra-articular hyaluronan therapy in osteoarthritis: are the effects molecular weight dependent? *Semin Arthritis Rheum*. 2002;32:10-37.

19. Coleman PJ, Scott D, Mason RM, Levick JR. Role of hyaluronan chain length in buffering interstitial flow across synovium in rabbits. *J Physiol*. 2000;526(pt 2):425-434.

20. Scott D, Coleman PJ, Mason RM, Levick JR. Concentration dependence of Interstitial flow buffering by hyaluronan in synovial joints. *Microvasc Res*, 2000;59:345-353.

21. Jubb R, Piva S, Beinart I, Dacre J, Gishen P Structure modifying study of hyaluronan (500-730 kDa, Hyalgan) on osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum*. 2001;44 (suppl):155.

22. Pasquali Ronchetti I , Guerra D, Taparelli F, et al. Morphological analysis of knee synovial membrane biopsies from a randomized controlled clinical study comparing the effects of sodium hyaluronate (Hyalgan) and methylprednisolone acetate (Depomedrol) osteoarthritis. *Rheumatology*. 2001;40:158-169.

23. Guidolin DD, Ronchetti IP, Lin E , Guena D , Franziero 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;9:371-381

24. Frizziero L , Govoni E, Bacchini P, Intra-articular hyaluronic acid in the treatment of osteoarthrosis of the knee: clinical and morphological study. *Clin exp Rheumatol* 1998;16 :441-449.

25. Listrat V, Ayrat X, Patarnello F, et al. Arthroscopic evaluation of potential structure modifying activity of hyaluronan (Hyalgan) in osteoarthritis of the knee. *Osteoarthritis Cartilage*. 1997;5:153-160.

26. Weiss C, Band P Musculoskeletal applications of hyaluronan and hylan. Potential uses in the foot and ankle. *Clin Podiatr Med Surg*. 1995;12:497- 517.

27. Wobig M, Dickhut A , Maier R , Vetter G . Viscosupplementation with hylan G –F 20: a 26-week controlled trial of efficacy and safety in the osteoarthritic knee. *Clin Ther*. 1998;20:410-423.

28. Altman RD, Moskowitz R. Intraarticular sodium hyaluronate (Hyalgan) in the treatment of patients with osteoarthritis of the knee: a randomized clinical trial. Hyalgan Study Group [published correction appears in *J Rheumatol.* 1999;26:12-16]. *J Rheumatol.* 1998;25:2203-2212.
29. Mensitieri ML, Ambrosio L. Viscoelastic evaluation for different knee Osteoarthritis therapies. *J Material Sci.* 1995;6:130-137.
30. Tamoto K, Nochi H, Tada M, et al. High-molecular-weight hyaluronic acids inhibit chemotaxis and phagocytosis but not lysosomal enzyme release induced by receptor-mediated stimulations in guinea pig phagocytes. *Microbiol Immunol.* 1994;38:73-80.
31. Peluso GF, Perbellini A, Tajana F. The effect of high and low molecular weight hyaluronic acid on mitogen-induced lymphocyte proliferation. *Curr Ther Res.* 1990;47:437-443.
32. Presti D, Scott JE. Hyaluronan-mediated protective effect against cell damage caused by enzymatically produced hydroxyl (OH) radicals is dependent on hyaluronan molecular mass. *Cell. Biochem Funct.* 1994;12:281-288.
33. Tobetto K, Nakai K, Akatsuka M, Yasui T, Ando T, Hirano S. Inhibitory effects of hyaluronan on neutrophil-mediated cartilage degradation. *Connect Tissue Res.* 1993;29:181-190.
34. Yasui T, Akatsuka M, Tobetto K, Hayaishi M, Ando I. The effect of hyaluronan on interleukin-1 alpha-induced prostaglandin E2 production in human osteoarthritic synovial cells. *Agents Actions.* 1992;37:155-156.
35. Lisignoli G, Grassi F, Zini N, et al. Anti-Fas-induced apoptosis in chondrocytes reduced by hyaluronan: evidence for CD44 and CD54 (intercellular adhesion molecule 1) involvement. *Arthritis Rheum.* 2001;44:1800-1807.
36. Smith MM, Ghosh P. The synthesis of hyaluronic acid by human synovial fibroblasts is influenced by the nature of the hyaluronate in the extracellular environment. *Rheumatol Int.* 1987;7:113-122.
37. Akatsuka M, Yamamoto Y, Tobetto K, Yasui T, Ando T. In vitro effects of hyaluronan on prostaglandin E2 induction by interleukin-1 in rabbit articular chondrocytes. *Agents Actions.* 1993;38:122-125.
38. Tobetto K, Yasui T, Ando T et al. Inhibitory effects of hyaluronan on [<sup>14</sup>C] arachidonic acid release from labeled human synovial fibroblasts. *Jpn J Pharmacol.* 1992;60:79-84.
39. Gotoh S, Onaya J, Abe M, et al. Effects of the molecular weight of hyaluronic acid and its action mechanisms on experimental joint pain in rats. *Ann Rheum Dis.* 1993;52:817-822.
40. Synvisc [package insert]. Ridgefield NJ: Genzyme Biosurgery 2002.
41. Hyalgan [package insert]. New York, NY: Sanofi Pharmaceuticals Inc; 2000.
42. Supartz [package insert] Tokyo, Japan: Seikagaku Corporation; 2001.

43. Nimrod A, Greenman B, Kanner D, Landsberg M. BioTechnology General Corp. High molecular Weight sodium hyaluronate US Patent No, 4,784,990. Nov 15, 1988.
44. Orthovisc [package insert]. Woburn, Mass: Anika Therapeutics Inc; 2004.
45. Lindqvist U, Tolmachev V, Kairomo K, Astrom G, Jonsson E, Lundqvist H. Elimination of stabilised hyaluronan from the knee joint in healthy men. *Clin Pharmacokinet.* 2002;41:603-613.
46. Lindenhayn K, Heilmann HH, Niederhausen T, Walther HU, Pohlenz K. Elimination of tritium-label hyaluronic acid from normal and osteoarthritic rabbit knee joints. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1997;35:355-363.
47. Knudson CB, Knudson W. Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis and disease. *FASEB J.* 1993;7:1233-1241.
48. Aviad AD, Houpt JB. The molecular weight of therapeutic hyaluronan (sodium hyaluronate): how significant is it? *J Rheumatol.* 1994;21:297-301.
49. Lesley J, Hascall VC, Tammi M, Hyman B. Hyaluronan binding by cell surface CD44. *J Biol Chem.* 2000;275:26967-26975.
50. Maheu E, Ayrat X, Dougados MA. Hyaluronan preparation (500-730 kDa) in the treatment of osteoarthritis: a review of clinical trials with Hyalgan. *Int J Clin Pract.* 2002;56:804-813.
51. Kelly MA, Goldberg VM, Healy WL, Pagnano MW, Hamburger MI. Osteoarthritis and beyond: a consensus on the past, present, and future of hyaluronan in orthopedics. *Orthopedics.* 2003;26:1064-1079.
52. Espallargues M, Pons JM. Efficacy and safety of viscosupplementation with hylan G-F 20 for the treatment of knee osteoarthritis: a systematic review. *Int J Technol Assess Health Care.* 2003;19:41-56.
53. Wang CT, Lin J, Chang CJ, Lin YT, Hou SM. Therapeutic effects of hyaluronic acid on osteoarthritis of the knee. A meta-analysis of randomized controlled trials. *J Bone Joint Surg Am.* 2004;86:538-545.
54. Lo GH, Lavalley M, McAlindon T, Felson DT. Intra-articular hyaluronic acid in treatment of knee osteoarthritis: a meta-analysis. *JAMA.* 2003;290:3115-3121.
55. Bellamy N, Campbell J, Robinson V, Gee T, Bourne R, Wells G. Viscosupplementation for the treatment of osteoarthritis of the knee. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005;Apr 18:CD005321.
56. Wobig M, Bach G, Beks P, et al. The role of elastoviscosity in the efficacy of viscosupplementation for osteoarthritis of the knee: a comparison of hylan G-F 20 and a low molecular-weight hyaluronan. *Clin Ther.* 1999;21:1549-1562.

57. Allard S, O'Regan M. The role of elastoviscosity in the efficacy of viscosupplementation for osteoarthritis of the knee: a comparison of hylan G-F 20 and a lower-molecular-weight hyaluronan. *Clin Ther* 2000;22:792-975 .
58. Pritchard CH, Sripada P, Bankes P, Smith D, Schneider D. A retrospective Comparison of the efficacy and tolerability of sodium hyaluronate and hylan G-F 20 in the treatment of osteoarthritis of the knee. *J Musculoskelet Res.* 2002;6:197-205.
59. Moskowitz R. Commentary on Pritchard et al comparative retrospective study of hylan G-F 20 and sodium hyaluronate. *J Musculoskeletal Res.* 2004;7:V-VII.
60. Brown DJ, Wood EV, Hannah HM, Rao VS, Teanby D. Prospective comparison of sodium hyaluronate and hylan G-F 20 in a clinical practice: comment on the concise communication by Martens [letter]. *Arthritis Reum.* 2004;50:1697-1698.
61. Garcia B. A comparative study: pseudoseptic reactions to Synvisc and not Hyalgan injections. Presented at: Annual Meeting of the American Academy of Orthopaedic Surgeons; March 10-14, 2004: San Francisco, Calif.
62. Richardson M, Larsen KM, Moore KD, Droege L, Head DC. Randomized safety and efficacy comparison of hylan G -F 20 and sodium hyaluronate in knee osteoarthritis: a safety distinction [letter]. *J Bone Joint Surg Am.* June 30,2004. Available at: <http://www.ejbs.org/eleletters/84/9/1619>. Accessed March 10,2005.
63. Hamburger M, Brandt L , Bennett R , et al. Retrospective comparative analysis of the safety and efficacy of intraarticular hyaluronan therapies in clinical practice. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004;12:S146.
64. Karlsson J, Sjogren LS, Lohmander LS. Comparison of two hyaluronan drugs and placebo in patients with knee osteoarthritis. A controlled, randomized, double-blind, parallel-design multicentre study. *Rheumatology.* 2002;41:1240-1248.
65. Kirschner M, Marshall D.A., double-blind randomized controlled trial comparing alternate forms of high molecular weight hyaluronan for the treatment of osteoarthritis of the knee. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2006;14:154-162.
66. ACR Subcommittee on Osteoarthritis Guidelines. Recommendations for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee: 2000 update. *Arthritis Rheum.* 2000;43:1905-1915.
67. Hamburger MI, Lakhanpal S, Moar PA, Osler D. Intra-articular hyaluronans: a review of product-specific safety profiles. *Semin' Arthritis Rheum.* 2003;32:296-309.
68. Bucher W, Otto I, Hamburger MI. Differentiation of hyaluronate products by qualitative difference in their immunogenicity in rabbits; possible mechanism for product-specific severe adverse reactions? *Arthritis Rheum.* 2002;46:2543-2544.

69. Balazs E, Leschiner A, Larsen N, Band P, inventors; Biomatrix Inc, assignee. Hylan preparation and method of recovery thereof from animal tissues. US patent 5,099,013. 1992.
70. Schiavinato A, Finesso M, Cortivo R, Abatangelo G. Comparison of the effects of intra-articular injections of hyaluronan and its chemically cross-linked derivative (hylan G-F20) in normal rabbit knee joints. *Clin Exp Rheumatol*. 2002;20:445-454.
71. Goldberg VM, Coutts RD. Pseudoseptic reactions to hylan viscosupplementation: diagnosis and treatment. *Clin Orthop*. 2004;419:130-137.
72. Jones KB, Patel PP, Deyoung BR, Buckwalter JA. Viscosupplementation pseudotumor. A case report. *J Bone Joint Surg Am*. 2005;87:11131-1119.
73. Sasaki M, Miyazaki Y, Takahashi T. Hylan G-F 20 induces delayed foreign body inflammation in pigs and rabbits. *Toxicol Pathol*. 2003;31:321-325.
74. Jubb RW, Piva S, Beinat L, Dacre J, Gishen P. A one-year, randomised, placebo (saline) controlled clinical trial of 500-730 kDa sodium hyaluronate (Hyalgan) on the radiological change in osteoarthritis of the knee. *Int J Clin Pract*. 2002;57:467-474.
75. Frizziero L, Pasquali Ronchetti I. Intra-articular treatment of osteoarthritis-of the knee: an arthroscopic and clinical comparison between sodium hyaluronate (500-730 kDa) and methylprednisone acetate. *J Orthop Traumatol*. 2002;3:89-96.