

PRACA ORYGINALNA

Kończyna dolna i obręcz biodrowa

Rola kwasu hialuronowego w terapii wczesnych zmian zwyrodnieniowych stawu kolanowego

The role of hyaluronic acid in the treatment of early knee osteoarthritis

Łukasz Czarnocki, Robert Jopowicz, Jarosław Michał Deszczyński, Jarosław Deszczyński

Katedra Ortopedii i Rehabilitacji II Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Streszczenie

Choroba zwyrodnieniowa stawów jest przewlekłym procesem degeneracyjnym, obejmującym niszczenie chrząstki stawowej. Postępujący charakter choroby upośledza funkcję motoryczną kończyny, co w połączeniu z dolegliwościami bólowymi prowadzi do znacznego pogorszenia jakości życia chorego. Obecne metody terapii osteoartrozy obejmują szerokie spektrum, począwszy od edukacji chorego i eliminacji czynników ryzyka, poprzez farmakoterapię, fizjoterapię i leczenie inwazyjne. Wśród metod leczenia zachowawczego choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego znajduje zastosowanie wiskosuplementacja. Liczne badania dowodzą, że dostawowe iniekcje kwasu hialuronowego prowadzą do zmniejszenia natężenia bólu i poprawy czynności chorego stawu. Niniejsza praca omawia rolę egzogenego kwasu hialuronowego w procesie leczenia wczesnych zmian zwyrodnieniowych stawu kolanowego, jego aktywność biologiczną oraz skuteczność w oparciu o właściwości fizykochemiczne poszczególnych preparatów. W oparciu o aktualną wiedzę dotyczącą skuteczności kwasu hialuronowego w leczeniu choroby zwyrodnieniowej wskazano ponadto istotne w praktyce klinicznej aspekty wiskosuplementacji, podkreślając właściwą kwalifikację pacjenta i sposób podania leku.

Słowa kluczowe: kwas hialuronowy, wiskosuplementacja, choroba zwyrodnieniowa stawu kolanowego, gonartroza

Abstract

Osteoarthritis is a chronic degenerative process, including the destruction of articular cartilage. The progressive nature of the disease impairs motor function, which in combination with the pains leading to a significant deterioration in the quality of life. Current methods of treatment of osteoarthritis cover a wide spectrum, ranging from patient education and elimination of risk factors, through drug therapy, physical therapy and surgical treatment. Among the methods of conservative treatment of osteoarthritis of the knee is the use of viscosupplementation. Many studies show that intra-articular injections of hyaluronic acid leads to a reduction in the intensity of pain and improve joint function of the patient.

This paper discusses the role of exogenous hyaluronic acid in the treatment of early knee osteoarthritis, its biological activity and efficacy based on the physicochemical properties of different products. Based on the current knowledge about the effectiveness of hyaluronic acid in the treatment of osteoarthritis it is further indicated significant clinical aspects of viscosupplementation, emphasizing the proper classification of the patient and method applications of the drug.

Key words: hyaluronic acid, viscosupplementation, knee osteoarthritis, gonarthrits

Author's address: lek. med. Łukasz Czarnocki, Katedra Ortopedii i Rehabilitacji II Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, ul. Kondratowicza 8, 03-242 Warszawa, tel.: +48 600 279 362, e-mail: lukasz.czarnocki@gmail.com

Received: **20.06.2016**
Accepted: **24.06.2016**
Published: **30.06.2016**



Wstęp

Choroba zwyrodnieniowa stawów obwodowych jest najczęstszą artropatią i stanowi jedną z głównych przyczyn dysfunkcji ruchowej u człowieka [1,2]. Towarzyszący chorobie ból i ograniczenie ruchomości stawów w znacznym stopniu pogarszają jakość życia chorych oraz funkcjonowanie w życiu codziennym. Artroza stanowi zatem istotny problem zarówno społeczny jak i ekonomiczny. Analizy statystyczne podają, że aż 30% współczesnego społeczeństwa odczuwa dolegliwości bólowe i ograniczenie motoryki z powodu zmian zwyrodnieniowych, co czyni tą jednostkę chorobową najczęstszym schorzeniem narządu ruchu.

Istotą choroby zwyrodnieniowej jest postępujące zaburzenie homeostazy chrząstki stawowej wyrażone przewagą aktywności procesów degeneracyjnych nad chondroprotekcjami. Chrząstka szklista nie posiada zdolności do samostannej regeneracji, zatem wycofanie zmian w zmienionym chorobowo stawie nie jest możliwe. Leczenie choroby zwyrodnieniowej polega zatem na zahamowaniu lub spowolnieniu procesów destrukcyjnych działających na chrząstkę stawową, zachowaniu możliwie pełnego zakresu ruchu w stawie oraz działaniu przeciwbólowym.

Leczenie choroby zwyrodnieniowej powinno mieć charakter wielokierunkowy, uwzględniający wiele dróg prowadzących do uszkodzenia chrząstki i struktur miękkich stawu [3-5]. Profilaktyka osteoartrozy obejmuje edukację chorego, utrzymywanie właściwej wagi ciała, sprawności fizycznej oraz prawidłowej osi i długości kończyn dolnych. Leczenie chondroprotekcje obejmuje utrzymywanie właściwej jakości i ilości płynu stawowego odżywiającego chondrocyty, a więc przyjmowanie leków zawierających siarczan chondroityny i siarczan glukozaminy oraz wiskosuplementację kwasem hialuronowym [6-8]. Leczenie przeciwbólowe powinno uwzględniać eliminację procesu zapalnego biorącego istotny udział w patogenezie artrozy. Poprawa motoryki stawu możliwa jest poprzez dobór odpowiednich ćwiczeń oraz zabiegów fizykoterapeutycznych.

Wiskosuplementacja

Suplementacja kwasem hialuronowym (wiskosuplementacja) ma na celu przywrócenie jakości płynu stawowego, protekcję uszkodzonej i zdrowej chrząstki stawowej oraz zredukowanie dolegliwości bólowych. Obecnie na rynku dostępnych jest wiele preparatów hialuronianu, przeznaczonych do iniekcji dostawowych, różniących się tak naprawdę właściwościami fizykochemicznymi (masą cząsteczkową, stężeniem) oraz mechanicznymi (lepkością, elastycznością). Należy zaznaczyć, że rolą wiskosuplementacji nie jest odbudowa zniszczonej chrząstki stawowej, a jedynie poprawienie reologicznych właściwości stawu.

Wiskosuplementacja polega na podaniu do wnętrza stawu maziówkowego preparatu kwasu hialuronowego w postaci soli sodowej drogą iniekcji. Pierwotnie zastosowanie kwasu hialuronowego ograniczało się do stawu kolanowego, obecnie znajduje użycie również w innych stawach: biodrowym, ramiennym, skokowym, nadgarstku czy stawie skroniowo-żuchwowym.

Właściwości kwasu hialuronowego

Kwas hialuronowy posiada istotne dla homeostazy stawu właściwości fizyczne jak i aktywność biologiczną. Przegląd wielu badań uwidacznia wpływ na polepszenie efektu klinicznego oraz zmniejszenie dolegliwości bólowych u pacjentów z chorobą zwyrodnieniową.

Kwas hialuronowy (HA) z chemicznego punktu widzenia jest polisacharydem należącym do grupy glikozaminoglikanów. Łańcuchowe molekuly tego związku zbudowane są z powtarzających się jednostek disacharydów, z których każda składa się z cząsteczki kwasu D-glukuronowego i cząsteczki N-acetyloglukozaminy połączonych naprzemiennie wiązaniami β -(1-4) i β -(1-3) glikozydowymi [13].

Specyficzne właściwości wiskoelastyczne kwasu hialuronowego wynikają z dwóch składowych: lepkości oraz elastyczności [25, 26]. Właściwości lepkie zależą od siły ścinającej działającej na staw, przez co płyn stawowy wykazuje właściwości płynu nienewtonowskiego. Zapewnia to odpowiednie nawilżanie powierzchni i odżywianie chrząstki w trakcie obciążeń np. podczas chodu. Elastyczność z kolei odgrywa znaczącą rolę w trakcie wystąpienia nagłych sił nacisku np. w trakcie biegu, działając poprzez odkształcanie się łańcuchów polimerowych kwasu hialuronowego [27]. U osób w wieku 18-27 lat elastyczność i lepkość płynu maziówkowego stawu kolanowego, mierzone porównywalną metodą przy 2,5Hz wynoszą odpowiednio $G' = 117 \pm 13$ Pa i $G'' = 45 \pm 8$ Pa.

Produkcja egzogennych preparatów z kwasem hialuronowym odbywa się na drodze biosyntezy przez bakterie z gatunku *Streptococcus equi* lub ekstrakcji z grzebieni kogucich. Zaletą biotechnologii bakteryjnej jest brak alergenicności wynikającej ze śladowych ilości białek pochodzenia zwierzęcego, natomiast wadą jest ryzyko mutacji w szczepach bakteryjnych, możliwość wytwarzania toksyn, pirogenów i immunogenów, co wymaga zaawansowanych metod oczyszczania [16,17,18].

Dostępne obecnie preparaty z kwasem hialuronowym różnią się między sobą m.in. masą cząsteczkową. Zależy ona od długości łańcucha i stopnia usieciowania (cross-linking) odbywającego się w procesie produkcji. Usieciowany kwas hialuronowy tworzy polimery hylanowe, co zwiększa jego masę cząsteczkową i potęguje działanie wiskoelastyczne. Wydłuża ponadto okres pozostawania kwasu hialuronowego

w przestrzeni stawowej [19,20]. Większość produktów stosowanych w pojedynczej iniekcji tzw. one-shot oraz niektóre produkty stosowane w trzech iniekcjach zawierają usieciany kwas hialuronowy.

Płyn stawowy i właściwości biologiczne hialuronianu

Płyn stawowy wypełnia całą przestrzeń jamy stawowej zapewniając gładkie i płynne ruchy powierzchni stawowych. Kwas hialuronowy w połączeniu z białkami pokrywa powierzchnię chrząstki stawowej pełniąc rolę protekcyjną na działające obciążenia i tarcie. Ponadto stanowi szkielet dla proteoglikanów, zapewniając właściwe nawodnienie chrząstki, pozwalając na migrację komórek [28].

Staw kolanowy dorosłego człowieka zawiera ok. 2 ml płynu stawowego [14]. W zdrowym kolanie masa cząsteczki kwasu hialuronowego wynosi średnio 10×10^6 Da, a stężenie ok. 3 mg/ml [12,15]. W chorobie zwyrodnieniowej i reumatoidalnym zapaleniu stawów masa cząsteczkowa tego związku może spadać do wartości 2×10^5 Da [12,14].

Hialuronian jest biologicznie aktywną cząsteczką, oddziałującą na szereg receptorów komórkowych i wpływającą na przebieg wielu procesów biochemicznych w komórce. Istotną kwestią wydaje się fakt, że kwas hialuronowy poprzez receptor CD44 hamuje produkcję metaloproteinaz (MMP) indukowanych przez IL-6, biorących istotny udział w procesach degradacyjnych w stawie [31]. Wykazano również, że kwas hialuronowy o większej masie cząsteczkowej ma silniejszy efekt hamujący aktywność MMP, jak również działa pobudzająco na syntezę endogennego hialuronianu [32,33]. Udowodniono, że syntezę endogenną kwasu hialuronowego najlepiej stymuluje cząsteczka o masie powyżej $0,88 \times 10^6$ Da i stężeniu 20mg/ml, a kolejne prace badające powinowactwo do receptorów doprecyzowały optymalny zakres masy cząsteczkowej pomiędzy $0,5 \times 10^6$ – $4,0 \times 10^6$ Da [34].

Kwas hialuronowy oddziałuje na metabolizm chrząstki stawowej [24]. Wpływa hamująco na degenerację struktury chrząstki, utrzymuje jej prawidłową morfologię poprzez stymulacyjne działanie na syntezę proteoglikanów i chondroityny [35,36]. Opisano także wpływ hialuronianu na różnicowanie się komórek mezenchymalnych w kierunku chondrocytów na drodze stymulacji ekspresji genów [30]. Kwas hialuronowy wpływa na metabolizm mitochondriów chondrocytów, zwiększając integralność mtDNA, poziom ATP i żywotność komórki [37]. Wpływa również na zapobieganie indukowanej tarciami apoptozie chondrocytów [38]. Chondrocyty w obecności kwasu hialuronowego wykazują znacznie zwiększony poziom proliferacji DNA i produkcji macierzy pozakomórkowej [39]. Badania wykazały, że kwas hialuronowy poprzez reakcję z mediatorami zapalnymi zmniejsza apoptozę chondrocytów. Zaliczono go zatem do tzw. wolno działających leków objawowych stosowanych w chorobie zwyrodnieniowej stawów (SYSADOA).

Działanie przeciwbólowe kwasu hialuronowego wynika ze złożonych mechanizmów. Związek ten wpływa na przewodnictwo impulsów nerwowych i czułość nerwową poprzez hamowanie substancji P w nocyceptorach oraz zmniejszeniu przekaźników hiperalgezji: PGE2 i bradykininy [40-42]. Ponadto, w zależności od stężenia, hialuronian aktywuje receptory k-opioidowe [43].

Parametry prawidłowego płynu stawowego

Wg Ropes i in. 1939, 1940, Perlmann i in. 1954, Ward 1980, Zimmermann-Gorska 1995, Brannan i Jerrard 2006 [22,23]

Parametr	Wartość
Objętość w stawie kolanowym	3 - 4 ml
Barwa	Bezbarwny lub słomkowy
Przejrzystość	Zupełna
pH	7,2 – 7,4
Lepkość	Duża (3-10 cPa)
Białko całkowite	4,3 g%
Glukoza	Podobna jak w surowicy
Liczba komórek	< 200 /1µl
Odsetek granulocytów	< 25%
Obecność bakterii	Brak
Odczyn Ropesa	Zbity strął

Kwalifikacja pacjentów do wiskosuplementacji

Kwalifikacja pacjenta z gonartrozą jest bardzo istotnym czynnikiem warunkującym przewidywalność skuteczności zastosowania kwasu hialuronowego. Czynniki wpływającymi na dobry wynik leczenia kwasem hialuronowym są: choroba zwyrodnieniowa o średnim stopniu zaawansowania, chondromalacja I-III stopnia (wg. Outerbridge'a), aktywność fizyczna i stopień edukacji pacjenta, a także wysięk w stawie < 30ml [44-47]. Niezwykle istotna jest również prawidłowa technika samej iniekcji dostawowej [48,49].

Terapia kwasem hialuronowym

Preparaty kwasu hialuronowego przeznaczone do podawania w formie iniekcji dostawowych produkowane są w gotowych ampułkostrzykawkach. W zależności od produktu stosowane są różne schematy dotyczące ilości iniekcji – od 1 do 5 w odstępach tygodniowych. Zalecane jest wykonanie wstępnej aspiracji płynu wysiękowego ze stawu a następnie podanie leku [50].

Opisano różne sposoby iniekcji do stawu kolanowego: poprzez dostęp przednio-boczny, przednio-przyśrodkowy, dostępy przyrzepkowe i nadrzepkowe [49]. Jednym z zalecanych dostępów jest podanie od strony przednio-bocznej –

dostęp opisany przez Wadella przy zgięciu stawu kolanowego 30-40 stopni [51]. Wysoką skuteczność ma również dostęp boczny nadrzepkowy, oraz zmodyfikowany dostęp przednio-boczny [52].

Zalecane jest jednak podanie iniekcji pod kontrolą ultrasonografii, aby uzyskać 100% pewność podania leku do wnętrza stawu [48,53,54]. Najczęstszymi błędami jest zdeponowanie preparatu w ciele tłuszczowym Hoffy i mięśniu czworogłowym. Znaczenie ma również grubość igły. Ze względu na gęstą konsystencję preparatów hialuronianu zaleca się używanie igieł o średnicy powyżej 18G. Właściwa technika podania kwasu hialuronowego zwiększa korzyści, redukując ryzyko działań niepożądanych związanych z błędną lokalizacją podania leku i zapobiega narażeniu pacjenta na ból oraz niepotrzebne koszty. Po podaniu kwasu hialuronowego zalecane jest oszczędzanie kończyny przez 1-2 dni i schłodzenie miejsca wkucia [55].

Działania niepożądane

Reakcje niepożądane według różnych kryteriów uwzględnionych w badaniach pojawiają się z częstością 3-47 % [55-58]. Najczęściej występuje miejscowy ból i niewielki stan zapalny w miejscu podania ustępujący po 1-3 dniach. Opisano nieliczne przypadki ostrej reakcji zapalnej – pseudosepsis [59].

Wybór preparatu

Na polskim rynku dostępnych jest kilkadziesiąt preparatów kwasu hialuronowego różniących się parametrami dotyczącymi samej substancji czynnej tj. stężeniem hialuronianu sodu, masą cząsteczkową, stopniem lepkości i elastyczności, usieciowaniem oraz objętością. W większości produkty te przeznaczone są do leczenia wszystkich stawów maziówkowych, jednak w zależności od wielkości jamy stawowej różnice wynikają z ilości preparatu, jaki można podać. Stężenie kwasu hialuronowego w dostępnych preparatach waha się w przedziale od 1% do 2,2%.

Egzogenny kwas hialuronowy utrzymuje się w stawie kolanowym od kilku dni do miesiąca. Zależy to od jego masy cząsteczkowej, obecności i rodzaju sieciowania [29]. Preparaty o stężeniu 1% zazwyczaj charakteryzuje masa cząsteczkowa w przedziale 0,6-1,6 x10⁶ Da, zaś dla tych o wyższym stężeniu wynosi ona 1,5-2,1 x 10⁶ Da. Przewaga elastyczności nad lepkością kwasu hialuronowego ma szczególne znaczenie podczas większych obciążeń w stawie np. u osób przeciążających stawy.

Podsumowanie

Choroba zwyrodnieniowa stawów jest postępującym procesem niszczenia chrząstki stawowej i pozostałych struktur stawu, a jej tło ma charakter wieloczynnikowy. Leczenie osteoartrozy powinno obejmować kompleksową opiekę nad chorym zarówno w aspekcie farmakoterapii, rehabilitacji i leczenia zabiegowego. Znaczną rolę odgrywa protekcja chrząstki stawowej, zwłaszcza pod postacią wiskosuplementacji. Na podstawie dotychczas opublikowanych badań naukowych można stwierdzić, że zastosowanie kwasu hialuronowego we wczesnych i średniozaawansowanych zmianach zwyrodnieniowych stawów wydaje się być skuteczne i zasadne. Poprawienie reologicznych właściwości płynu stawowego korzystnie wpływa na jakość chrząstki oraz biomechanikę stawu, poprawiając tym samym jakość życia chorych.

Piśmiennictwo

- [1] Lawrence R.C., Felson D.T., Helmick C.G., Arnold L.M., Choi H., Deyo R.A., Gabriel S., Hirsch R., Hochberg M.C., Hunder G.G., Jordan J.M., Katz J.N., Kremers H.M., Wolfe F: Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis Rheum.*, 2008; 58: 26-35.
- [2] Felson, D. T. Clinical practice. Osteoarthritis of the knee. *The New England journal of medicine* 354, 841-8 (2006).
- [3] Hochberg, M., Altman, R. & Brandt, K. Guidelines for the medical management of osteoarthritis. *Arthritis* & (1995).
- [4] Zhang, W. et al. OARS recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis: part III: Changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 18, 476-99 (2010).
- [5] Hochberg, M. C. et al. American College of Rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee. *Arthritis care & research* 64, 465-74 (2012).
- [6] Stitik, T. P. & Levy, J. A. Viscosupplementation (biosupplementation) for osteoarthritis. *American journal of physical medicine & rehabilitation / Association of Academic Physiatrists* 85, S32-50 (2006).
- [7] Migliore, A., Giovannangeli, F., Granata, M. & Laganà, B. Hylan g-f 20: review of its safety and efficacy in the management of joint pain in osteoarthritis. *Clinical medicine insights. Arthritis and musculoskeletal disorders* 3, 55-68 (2010).
- [8] Colen, S., Haverkamp, D. & Mulier, M. Hyaluronic Acid for the Treatment of Osteoarthritis in all Joints Except the Knee. *BioDrugs* (2012).
- [9] Cohen, M. Hyaluronic acid treatment (viscosupplementation) for OA of the knee. *Bulletin on the rheumatic diseases* 47, 4-7 (1998).
- [10] Navarro-Sarabia, F. et al. A 40-month multicentre, randomised placebo-controlled study to assess the efficacy and carry-over effect of repeated intra-articular injections of hyaluronic acid in knee osteoarthritis: the AMELIA project. *Annals of the rheumatic diseases* 70, 1957-62 (2011).
- [11] Ghosh, P. & Guidolin, D. Potential mechanism of action of intra-articular hyaluronan therapy in osteoarthritis: are the effects molecular weight dependent? *Seminars in arthritis and rheumatism* (2002).
- [12] Kirwan, J. & Rankin, E. Intra-articular therapy in osteoarthritis. *Baillière's clinical rheumatology* (1997).
- [13] Olczyk, P., Komosińska-Vassev, K. & Winsz-Szczotka, K. Hialuronian – struktura, metabolizm, funkcje i rola w procesach gojenia ran Hyaluronan: Structure, metabolism, functions, and role in wound healing. *Journal cover* (2013).
- [14] Dahl, L. B., Dahl, I. M., Engström-Laurent, A. & Granath, K. Concentration and molecular weight of sodium hyaluronate in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other arthropathies. *Annals of the rheumatic diseases* 44, 817-22 (1985).



Lukasz Czarnocki et al., Rola kwasu hialuronowego w terapii wczesnych zmian zwyrodnieniowych stawu kolanowego

- [15] Weiss, C. & Band, P. Musculoskeletal applications of hyaluronan and hylan. Potential uses in the foot and ankle. *Clinics in podiatric medicine and surgery* 12, 497-517 (1995).
- [16] Czajkowska, D. & Milner-Krawczyk, M. Kwas hialuronowy – charakterystyka, otrzymywanie i zastosowanie. *Biochemical and Food* (2011).
- [17] Volpi, N., Schiller, J. & Stern, R. Role, metabolism, chemical modifications and applications of hyaluronan. *Current medicinal* (2009).
- [18] Kogan, G., Soltés, L., Stern, R. & Gemeiner, P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology letters* (2007).
- [19] Reichenbach, S. et al. Hylan versus hyaluronic acid for osteoarthritis of the knee: a systematic review and meta-analysis. *Arthritis and rheumatism* 57, 1410-8 (2007).
- [20] Jüni, P. et al. Efficacy and safety of intraarticular hylan or hyaluronic acids for osteoarthritis of the knee: a randomized controlled trial. *Arthritis and rheumatism* 56, 3610-9 (2007).
- [21] Scale, D., Wobig, M. & Wolpert, W. Viscosupplementation of osteoarthritic knees with hylan: a treatment schedule study. *Current therapeutic research* (1994).
- [22] Zimmermann-Gorska I. 1995. Atlas płynu stawowego. PZWL, Warszawa.
- [23] Lis K. Płyn stawowy w diagnostyce laboratoryjnej. *Ślupskie Prace Biologiczne* 5, 2008
- [24] Tammi, M. I. Hyaluronan and Homeostasis: A Balancing Act. *Journal of Biological Chemistry* 277, 4581-4584
- [25] O'Regan, M., Martini, L., Crescenzi, F. & Luca, C. Molecular mechanisms and genetics of hyaluronan biosynthesis. *International journal of* (1994).
- [26] Balazs, E. The Physical Properties of Synovial Fluid and the Special Role of Hyaluronic Acid. *Disorders of the Knee* pp 63-75 (1982).
- [27] Gibbs, D. A., Merrill, E. W., Smith, K. A. & Balazs, E. A. Rheology of hyaluronic acid. *Biopolymers* 6, 777-91 (1968).
- [28] Fraser, J. R., Laurent, T. C. & Laurent, U. B. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of internal medicine* 242, 27-33 (1997).
- [29] Antonas, K. N., Fraser, J. R. & Muirden, K. D. Distribution of biologically labelled radioactive hyaluronic acid injected into joints. *Annals of the rheumatic diseases* 32, 103-111 (1973).
- [30] Solis, M. A. et al. Hyaluronan regulates cell behavior: a potential niche matrix for stem cells. *Biochemistry research international* 2012, 346972 (2012).
- [31] Xu, H. et al. [Effect of various intervention factors on MMP-3 and TIMP-1 level in synovial fluid in knee joints with osteoarthritis]. *Zhong nan da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Central South University. Medical sciences* 33, 47-52 (2008).
- [32] Wang, C., Lin, Y., Chiang, B., Lin, Y. & Hou, S. High molecular weight hyaluronic acid down-regulates the gene expression of osteoarthritis-associated cytokines and enzymes in fibroblast-like synoviocytes from patients with early osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 14, 1237-47 (2006).
- [33] Kolomytkin, O. V. et al. IL-1beta-induced production of metalloproteinases by synovial cells depends on gap junction conductance. *American journal of physiology. Cell physiology* 282, C1254-60 (2002).
- [34] Smith, M. M. & Ghosh, P. The synthesis of hyaluronic acid by human synovial fibroblasts is influenced by the nature of the hyaluronate in the extracellular environment. *Rheumatology International* 7, 113-22 (1987).
- [35] Stöve, J. et al. Effects of hyaluronan on proteoglycan content of osteoarthritic chondrocytes in vitro. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 20, 551-5 (2002).
- [36] Kawasaki, K., Ochi, M., Uchio, Y., Adachi, N. & Matsusaki, M. Hyaluronic acid enhances proliferation and chondroitin sulfate synthesis in cultured chondrocytes embedded in collagen gels. *Journal of cellular physiology* 179, 142-8 (1999).
- [37] Grishko, V., Xu, M., Ho, R., Mates, A. & Watson, S. Effects of hyaluronic acid on mitochondrial function and mitochondria-driven apoptosis following oxidative stress in human chondrocytes. *Journal of Biological* (2009).
- [38] Waller, K. A., Zhang, L. X., Fleming, B. C. & Jay, G. D. Preventing friction-induced chondrocyte apoptosis: comparison of human synovial fluid and hylan G-F 20. *The Journal of rheumatology* 39, 1473-80 (2012).
- [39] Akmal, M. et al. The effects of hyaluronic acid on articular chondrocytes. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 87, 1143-9 (2005).
- [40] Pozo, M., Balazs, E. & Belmonte, C. Reduction of sensory responses to passive movements of inflamed knee joints by hylan, a hyaluronan derivative. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Expérimentation cérébrale* 116, 3-9 (1997).
- [41] La Peña, de, E., Sala, S., Rovira, J. C., Schmidt, R. F. & Belmonte, C. Elastoviscous substances with analgesic effects on joint pain reduce stretch-activated ion channel activity in vitro. *Pain* 99, 501-8 (2002).
- [42] Moore, A. R. & Willoughby, D. A. Hyaluronan as a drug delivery system for diclofenac: a hypothesis for mode of action. *International journal of tissue reactions* 17, 153-6 (1995).
- [43] Zavan, B. et al. Hyaluronic acid induces activation of the kappa-opioid receptor. *PloS one* 8, e55510 (2013).
- [44] Petrella, R. J., DiSilvestro, M. D. & Hildebrand, C. Effects of Hyaluronate Sodium on Pain and Physical Functioning in Osteoarthritis of the Knee. *Arch Intern Med* 162, 292 (2002).
- [45] Dagenais, S. Intra-articular hyaluronic acid (viscosupplementation) for knee osteoarthritis. *Issues in emerging health technologies* 1-4 (2006).
- [46] Trigkilidas, D. & Anand, A. The effectiveness of hyaluronic acid intra-articular injections in managing osteoarthritic knee pain. *Annals of the Royal College of Surgeons of England* 95, 545-51 (2013).
- [47] Lussier, A., Cividino, A. & McFarlane, C. Viscosupplementation with hylan for the treatment of osteoarthritis: findings from clinical practice in Canada. *The Journal of* (1996).
- [48] Berkoff, D., Miller & Block, J. Clinical utility of ultrasound guidance for intra-articular knee injections: a review. *Clinical Interventions in Aging* (2012).
- [49] Toda, Y. & Tsukimura, N. A comparison of intra-articular hyaluronan injection accuracy rates between three approaches based on radiographic severity of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 16, 980-985 (2008).
- [50] Vad, V. B., Bhat, A. L., Sculco, T. P. & Wickiewicz, T. L. Management of knee osteoarthritis: knee lavage combined with hylan versus hylan alone. *Archives of physical medicine and rehabilitation* 84, 634-7 (2003).
- [51] Jackson, D., Evans, N. & Thomas, B. Accuracy of needle placement into the intra-articular space of the knee. *The Journal of Bone & Joint Surgery* (2002).
- [52] Esenyel, C. et al. Comparison of four different intra-articular injection sites in the knee: a cadaver study. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 15, 573-577 (2007).
- [53] Curtiss, H. M. et al. Accuracy of Ultrasound-Guided and Palpation-Guided Knee Injections By an Experienced and Less-Experienced Injector Using a Superolateral Approach: A Cadaveric Study. *PM&R* 3, 507-515 (2011).
- [54] Park, Y. B., Choi, W. A., Kim, Y., Lee, S. C. & Lee, J. H. Accuracy of blind versus ultrasound-guided suprapatellar bursal injection. *Journal of Clinical Ultrasound* 40, 20-25 (2012).
- [55] Wen, D. Y. Intra-articular hyaluronic acid injections for knee osteoarthritis. *American family physician* 62, 565-70, 572 (2000).
- [56] Puttick, M. P., Wade, J. P., Chalmers, A., Connell, D. G. & Rangno, K. K. Acute local reactions after intraarticular hylan for osteoarthritis of the knee. *The Journal of rheumatology* 22, 1311-4 (1995).
- [57] Wobig, M., Dickhut, A., Maier, R. & Vetter, G. Viscosupplementation with hylan GF 20: a 26-week controlled trial of efficacy and safety in the osteoarthritic knee. *Clinical therapeutics* (1998).
- [58] Waddell, D. D. The tolerability of viscosupplementation: low incidence and clinical management of local adverse events. *Current medical research and opinion* 19, 575-80 (2003).
- [59] Bernardeau, C., Bucki, B. & Lioté, F. Acute arthritis after intra-articular hyaluronate injection: onset of effusions without crystal. *Annals of the rheumatic diseases* 60, 518-20 (2001).

