

골관절증이 유발된 토끼에서 Sodium Hyaluronate의 효과

이진원 · 김창환 · 박종환 · 최은실 · 홍정주 · 박재섭¹ · 박재학*

서울대학교 수의과대학 실험동물의학교실

¹연세 클리닉, 영월군

Effect of Sodium Hyaluronate on Osteoarthritis in Rabbit Model

Jin-won LEE, Changhwan KIM, Jonghwan PARK, Eunsil CHOI, Jungju HONG,
Jae-Sup PARK¹ and Jae-Hak PARK*

Department of Laboratory Animal Medicine, College of Veterinary Medicine,

Seoul National University, Suwon, 441-744, Korea

¹Yeunsei Clinic, Young-Wol, Kangwon, Korea

(Received November 3, 1999; accepted December 10, 1999)

Abstract – Osteoarthritis was induced in rabbit knees through resection of anterior cruciate ligament. Sodium hyaluronate (1%) was administered into articular space at the dose levels of 0.1 mg/kg once a week using 1ml syringe and 26G needle for test groups. Saline was administered for control groups. After 6 and 12 weeks, animals were sacrificed to conduct macroscopic observation and histopathologic examination. The articular lesions were evaluated and test groups were compared with control groups. No significant differences were showed between test groups and control groups at macroscopic observation in both 6- and 12- week groups. In histopathologic examination, control groups showed higher osteoarthritis than test groups. The articular surfaces of control groups showed fibrillation, denudation, pannus formation and hypocellularity. The articular surfaces of test groups showed fibrillation and hypercellularity. These results indicate that sodium hyaluronate has inhibitory effects on osteoarthritis at least in rabbit and could be used for treatment of osteoarthritis.

Key words □ Sodium hyaluronate, HA, Osteoarthritis, OA, Rabbit

Sodium hyaluronate (HA)은 자연계에 널리 존재하는 생체 고분자 물질로 1934년 Meyer와 Palmer에 의해 눈의 유리액에서 처음으로 분리되었다. HA는 눈의 유리액 외에도 동물의 관절, 태반 등의 결합조직 내에 널리 존재한다 (Kendall 등, 1937). 관절액에 존재하는 HA는 관절의 운동 및 기계적 충격의 흡수에 관여하며, 관절연골의 손상시 glycosaminoglycan (GAG)의 분비를 억제하여 연골의 변성을 막는 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

골관절증 (osteoarthritis; OA)은 관절의 비염증성 변성으로 인한 만성질환으로, 현재 HA를 관절낭에 주입하면 그 치료에 효과가 있다는 사실이 보고되어 있다 (Iwata, 1993; Namiki 등, 1982). OA의 연구를 위해서 개, 토끼, 양 등 다양한 동물에서 OA를 유발시키는 방법이 개발되어 왔다 (Schwartz, 1987). OA의 유발에는 석고나 부목 또는 철사를 이용하여 다리를 고정시키는 방법 (Roy, 1970; Akesson 등, 1967), synovial membrane을 절제하는 방법,

관절낭에 papain을 주입하는 방법 (Kitoh 등, 1992) 및 앞쪽 십자인대를 절제하는 방법 (Abatangelo 등, 1989; Shiavinato 등, 1989) 등이 이용되고 있다.

본 연구에서는 앞쪽 십자인대를 절제하여 인위적으로 골관절증을 유발시킨 토끼 OA 모델을 사용하여 국내에서 개발된 sodium hyaluronate 제제의 골관절증에 대한 치료 효과를 검증해 보았다.

실험방법

시험물질

LG화학에서 공급한 1% sodium hyaluronate을 사용하였다. 본 물질은 분자량 3,500 kDa의 점조성 있는 액체로 무색이며 1 ml 일회용 주사기에 들어 있는 상태로 공급되었다. 사용 전까지 4°C에 보관하였다.

시험동물 및 사육환경

시험군과 대조군 각 8마리씩 모두 16마리의 New Zealand white rabbit (3.5~4.5 kg)이 시험에 사용되었다.

*To whom correspondence should be addressed.

시험동물은 각 분리된 철제 케이지에 사육되었다. 사료는 토끼용 고형사료를 자유 급여하였으며, 물은 상수도수를 물병에 담아 자유급여하였다.

골관절증의 유발

골관절증의 유발에는 우측 후지의 앞쪽 십자인대를 수술적으로 절개하는 방법 (Yoshimi 등, 1994)이 이용되었다. Xylazine hydrochloride (1.9 mg/kg)와 ketamine hydrochloride (46 mg/kg)를 이용하여 동물을 전신 마취시키고 무릎 관절 주위의 털을 제거하였다. 무릎 관절의 앞쪽 피부를 알콜솜으로 소독하고 수술용 칼로 피부 및 그 안의 관절막을 최소한의 길이로 절개하였다. 육안적으로 앞쪽 십자인대를 확인하여 절개하였다. Anterior drawer test를 하여 제대로 절제되었는지 확인을 하고 생리 식염수로 세척을 해준 후 수술 부위를 봉합하였다. 봉합 후에는 스프레이 타입의 항생제를 수술부위에 뿌려주고 일주일간 하루 한번씩 penicillin 제재를 근육주사하였다 (2 mg/kg).

투여

수술 후 일주일 뒤부터 매주 1회씩 투여를 실시하였다. 시험군에는 관절강 내로 시험물질 0.1 ml/kg 를 투여 하였고 대조군에는 시험물질 대신 0.9% normal saline(생리식염수)을 동량 투여하였다. 첫 투여후 6주째에 시험군과 대조군에서 각각 4마리를 부검하고 12주 후에 남은 동물을 모두 부검하여 관절의 육안 및 조직병리학적 관찰을 실시하였다. 시험과 관계 없이 정상 관절면을 보기 위하여 수술을 하지 않은 좌측 관절의 육안 및 조직학적 관찰도 실시하였다.

육안적 관찰

동물을 부검하여 무릎 관절을 조심스럽게 절개하였다. 관절액의 양 및 상태, 대퇴골과 경골의 내측 및 외측 condyle 그리고 synovia를 관찰하여 변화를 기록하였다. 대퇴골과 경골의 연골표면 변화를 Table I의 평가 기준에 따라 평가하였다.

조직병리학적 관찰

조직병리학적 평가를 위하여 일반적인 조직처리 과정을 실시하였다. 대퇴골과 경골의 내측 및 외측 condyle 그리고 관절낭을 10% formalin에 1주일간 고정하였다. 고정된 조직을 탈회액 (formic acid-sodium citrate solution)에 10일간 담구어 탈회시키고 paraffin에 포매하였다. 포매된

조직으로 절편을 만들어 Hematoxylin and Eosin으로 염색하였다. 염색된 조직 절편을 광학현미경하에서 관찰하였으며, Table II, III의 평가 기준에 따라 평가하였다.

Table II. Histopathologic Grading of Articular Cartilage Lesion

Grade	
I. Structure	
Normal	0
Slight surface irregularities	1
Moderate surface irregularities	2
Severe surface irregularities	3
Cleft in transitional zone	4
Cleft in radial zone	5
Cleft in calcified zone	6
Loss of transitional zone	7
Loss of radiate zone	8
Loss of calcified zone	9
Complete disorganization	10
II. Cell	
1. Tangential zone	
Normal	0
Swelling of cells	1
Disappearance of cells	2
2. Transitional and radiate zone	
Normal	0
Slight hypercellularity	1
Moderate hypercellularity	2
Severe hypercellularity	3
Slight cloning	4
Moderate cloning	5
Severe cloning	6
Slight hypocellularity	7
Moderate hypocellularity	8
Severe hypocellularity	9
Disappearance of cells	10
III. Tidemark	
Intact	0
Multilayered	1
Indistinct	2
Crossed by blood vessels	3
IV. Pannus formation	
None	0
Slight	1
Moderate	2
Marked	3

Table I. Grading of Cartilage Surface at Femoral and Tibial Plateau for Gross Observation

	Grade
Normal	0
Cartilage softening	1
Cartilage fibrillation	2
Cartilage erosion	3
Cartilage ulceration	4
Loss of cartilage	5

Table III. Histologic Grading of Synovial Tissue Change

	Grade
I. Synovial lining layer	
1. Hyperplasia of synovial lining cells	
Normal	0
Slight	1
Moderate	2
Severe	3
2. Hypertrophy of synovial lining layer	
Normal	0
Slight	1
Moderate	2
Severe	3
3. Identification of inflammatory cells	
Normal	0
Slight	1
Moderate	2
Severe	3
II. Subsynovial Tissue	
1. Proliferation of granulation tissue	
Normal	0
Slight	1
Moderate	2
Severe	3
2. Vascularization	
Normal	0
Slight	1
Moderate	2
Severe	3
3. Infiltration of inflammatory cells	
Normal	0
Slight	1
Moderate	2
Severe	3

통계

육안 및 조직병리학적 관찰로 얻어진 data를 통계처리 하였다. 측정된 data는 mean±SD로 나타내었으며, 각 관찰 부위별로 유의수준 0.05에서 Mann-Whitney 검정법으로 유의성을 검정하였다.

결 과

수술 후 감염에 의한 병변은 관찰되지 않았다. Saline이 나 HA 투여 후 시간이 경과함에 따라 관절부의 정도 중 차이가 관찰되었으나 열감이나 발적은 관찰되지 않았다. 부

검시 관절액은 수술을 받은 쪽에서 소량 증가되어 있었고 관절액은 황백색의 투명한 점조성이었다. Saline 투여군과 HA 투여군을 비교하여 봤을 때 관절액의 양 및 성상에서는 유의할 만한 차이를 나타내지 않았다. 활막조직은 수술 한 부위에서 정도로 비후되었으나 saline 투여군과 HA 투여군에서의 차이는 육안적으로 관찰되지 않았다.

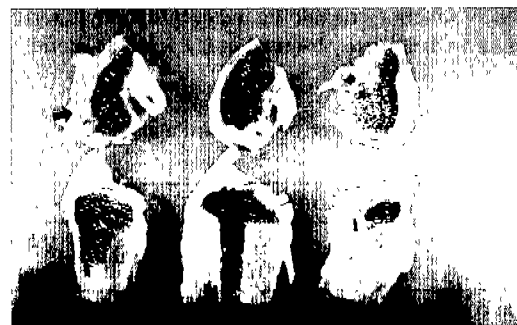
대퇴골과 경골 골두의 관절면을 변성의 정도에 따라 육안적으로 평가하였다. 6주째 부검한 예에서는 saline 투여군과 HA 투여군 모두 관절면의 연화, fibrillation, erosion 이 관찰되었으며, saline 투여군 및 HA 투여군 각 1례에



(a)



(b)



(c)

Fig. 1. Femurs (upper) and tibias (lower) of rabbits at 6 weeks after resection of anterior cruciate ligament. a. Normal cartilage surface. b. Saline administrated groups: Denudation and pannus are seen in the lateral plateau (arrow, left). Pannus is also seen in the medial plateau (arrow, right). c. HA administrated groups : Pannus is seen in the lateral plateau (arrow).

서는 ulceration이 부분적으로 관찰되었다 (Fig. 1a, b, c). 12주째 관찰한 예에서는 관절면의 연화, fibrillation, erosion이 saline 투여군 및 HA 투여군 각 1례에서 관찰되었으며 lateral의 활막과 연골의 이행부 쪽에서 osteophyte의 형성이 전례에서 모두 관찰되었다 (Fig. 2). Scoring한 결과 HA 투여군이 saline 투여군에 비해 유의한 병변의 감소를 보이지는 않았으나 변성의 정도는 경도로 완화된 것으로 보여졌다 (Table IV).

대퇴골 및 경골 골두의 외측 및 내측을 박절하여 광학현미경으로 관찰 하였다. 수술을 하지 않은 정상 관절면은 tangential, transitional, radiate and mineralized zone으로 구분되었고 radiate zone과 mineralized zone은 단일선의 tidemark로 구분되었다. Tangential zone의 세포는 난원형 또는 elongate형을 하고 있었으며 관절면과 평행하게 배열되어 있었다. Transitional zone의 세포는 소형의 난원형 또는 구형의 세포로 구성되어 있었다. Radiate zone의 세포는 대형의 구형세포로 physal plate에서와 같이 짧은 column을 이루어 증식하고 있었다. Mineralized zone은



Fig. 2. Femurs of a rabbit of saline groups at 12 weeks after resection of anterior cruciate ligament. Osteophyte (arrow) and erosion (arrowhead) are observed in the femoral lateral condyle.

Table IV. Gross Evaluation of the Cartilage Surface at Femoral and Tibial Plateau

	6 Weeks		12 Weeks	
	Saline	Sodium hyaluronate	Saline	Sodium hyaluronate
Femoral condyle				
Medial	1.25±1.26	0.75±0.50	2.50±1.73	2.25±1.89
Lateral	2.5 ±1.29	2.25±2.06	3.00±1.63	2.50±1.73
Tibial plateau				
Medial	2.25±0.63	1.25±0.50	2.0±1.15	1.75±0.96
Lateral	2.00±0.82	1.25±0.50	2.25±0.96	1.75±0.96

Each value represents the mean±SD for four animals.

subarticular bone와 연결되어 있었다(Fig. 3).

인대를 절제한 관절에서 연골의 변성은 시간이 경과함에

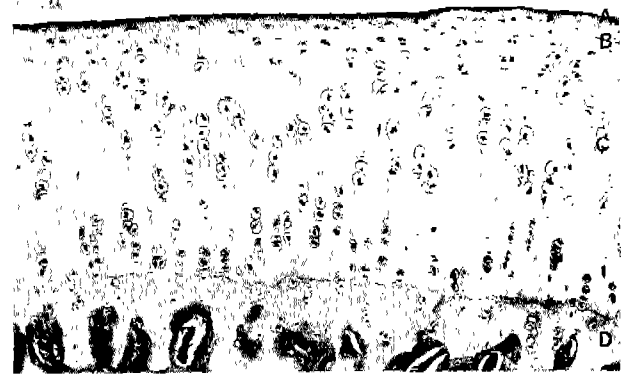


Fig. 3. Micrograph of normal cartilage of femur. A. Tangential zone B. Transitional zone C. Radiate zone D. Mineralized zone



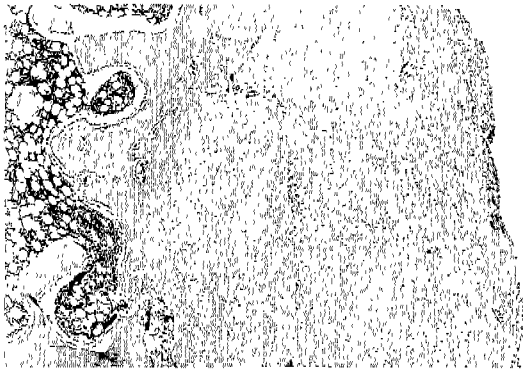
(a)



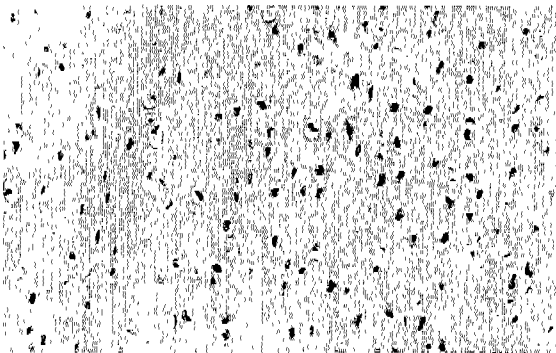
(b)

Fig. 4. Micrographs of cartilage lesions of 6-week groups. a. Saline administrated groups: The loss of cartilage extends to transitional zone. Necrosis of chondrocytes and subsequent hypocellularity are seen in the transitional and radiate zones. cells in transitional and radiate zones exhibit mild cloning (arrow). b. HA administrated groups: The cartilage surface is moderately irregular and show fibrillation. Hypercellularity is seen in the transitional and radiate zone.

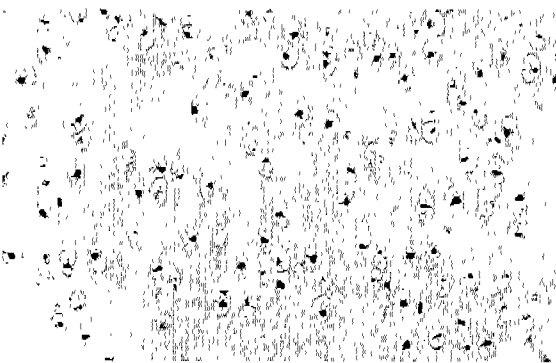
따라 진행되었다. 6주에서는 saline 투여군에서 관절면의 fibrillation, tangential layer의 swelling, cleft, transitional zone의 소실 및 tidemark의 multilayer 형성 등이 관찰되었다 (Fig. 4 a). HA 투여군에서는 경도의 fibrillation, tidemark의 multilayer 등이 관찰되었다 (Fig. 4b). 두 군의 특징적인 차이로서 saline 투여군에서는 4대 모두에서



(a)



(b)



(c)

Fig. 5. Micrographs of cartilage lesions of 12-week groups. a. Saline administrated groups: Normal cartilage was replaced with fibrotic tissues. Blood vessels were seen in the proliferated fibrotic tissues. b. Saline administrated groups.: Hypocellularity in the radiate zone result from degeneration of chondrocytes c. HA administrated groups : Degenerated chondrocytes are rarely seen in the radiate zone.

Table V. Histopathologic Evaluation of Articular Cartilage and Synovial Tissue with Microscopy

	6 Weeks		12 Weeks	
	Saline	Sodium hyaluronate	Saline	Sodium hyaluronate
Femoral condyle				
Medial	12.25±3.30	6.5±1.00*	16.25±3.86	7.50±4.04*
Lateral	14.25±2.22	6.00±1.63*	17.00±3.92	9.25±3.40*
Tibial plateau				
Medial	12.25±3.59	5.25±1.26*	15.75±3.86	7.25±3.59*
Lateral	9.00±1.41	5.25±1.70*	13.50±1.91	8.00±4.24*
Synovial tissue	36.00±9.90	16.00±7.12*	28.25±2.22	16.00±7.35*

Each value represents the mean±SD for four animals.
*p<0.05: significantly different from saline value.

radiate zone의 연골세포의 괴사, hypocellularity 및 연골세포의 cloning이 대퇴골 및 경골의 골두 관절면에서 관찰되었으나 HA 투여군에서는 hypercellularity가 관찰되었다.

12주째에서는 saline 투여군에서 관절면의 cleft, radiate zone의 소실, pannus 등이 관찰되었으며 연골세포의 괴사 및 hypocellularity가 고도로 관찰되었다 (Fig. 5a, b). HA 투여군에서는 transitional zone에서는 경도로, radiate zone에서는 고도로 cellularity가 증가하여 연골의 구조가 잘 유지되었다 (Fig. 5c). 광학현미경으로 검사한 결과를 scoring 하였을 때, 대퇴골 및 경골의 관절면 모두 6주보다 12주에서 변성이 심하게 나타났다. 그러나 HA 투여군의 병변은 6주 및 12주 모두에서 saline 투여군에 비해 병변의 유의한 감소를 보였다 (Table V).

한편, 활막조직의 변화는 HA투여군보다 saline 투여군에서 더 심하게 나타났다. 활막세포의 증생과 비대가 경도에서 중등도로 관찰되었으며, 활막에 림프구의 침윤, 활막하 조직에 혈관의 발달 및 림프구의 침윤이 관찰되었다 (Fig. 6a, b, c). Scoring하여 병리학적 변화를 관찰 하였을 때 6주 및 12주째 모두 saline 투여군에 비해 HA 투여군에서 병변의 유의한 감소가 관찰되었다.

고 찰

골관절증 모델은 그 병리현상에 대한 이해, 예방 및 치료를 포함한 여러 연구를 목적으로 개발되어 왔다. 이러한 골관절증 모델이 실제 치료제의 효과 검증 등에 사용되기 위해서는 그 기전과 병리학적 변화가 사람의 골관절증과 유사해야 하고 또한 초기 병변의 진행이 비교적 서서히 일어나야 한다. 이러한 요건들을 갖춘 모델을 찾기 위해 지금까지 다양한 동물과 방법으로 모델이 작제되어 왔다.

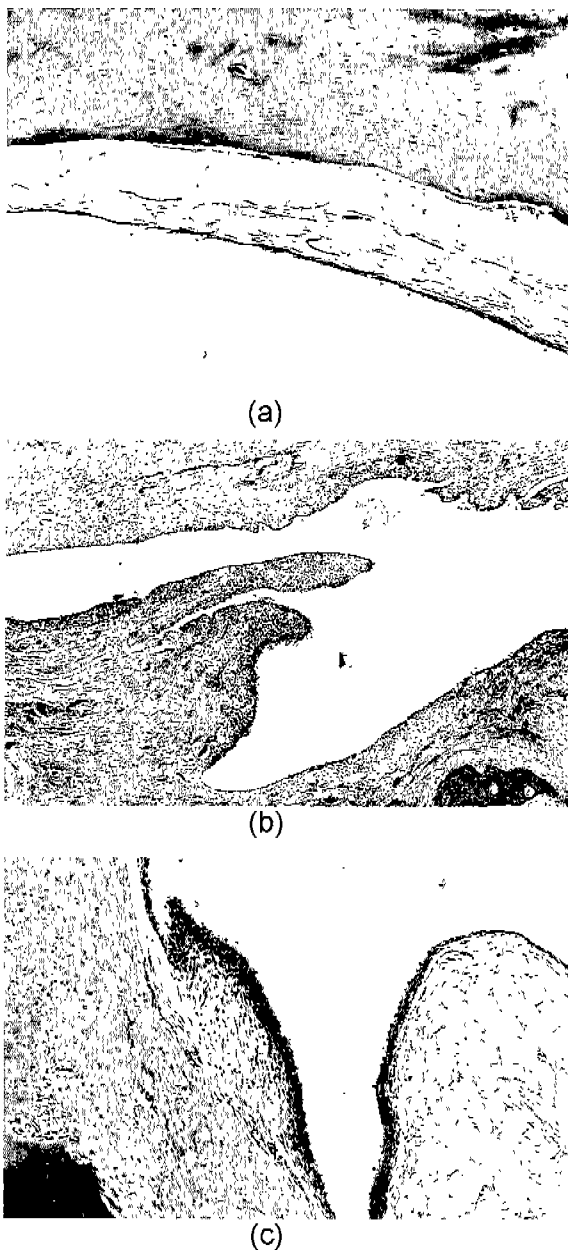


Fig. 6. Micrographs of synovial membranes. a. Normal synovial membrane. a. Synovial membrane is thin and a few of lymphocytes are seen in the connective tissues. b. Saline administrated groups: Synovial membrane is proliferated. Lymphocytes and macrophages are heavily infiltrated in connective tissues. Many blood vessels are also seen in connective tissues. HA administrated groups: Synovial membrane show hyperplastic change but lymphocytes are not significantly infiltrated.

1973년에 Pond와 Nuki는 개의 앞쪽 십자 인대를 끊어 관절면을 불안정하게 함으로써 골관절증을 유발하였다. 이렇게 만들어진 OA 모델은 관절면의 변화에 있어서 사람의 OA와 유사하여 많은 연구에 사용되었다. 본 연구에서 사

용된 모델 제작 방법은 1994년 Yoshimi 등에 의해 처음 제시된 것으로 토끼 후지의 앞쪽 십자 인대를 끊어 관절면을 불안정하게 함으로써 골관절증을 유발하는 방법이다. 이 방법에 의해 제작된 토끼 OA 모델은 Pond와 Nuki가 개를 이용해 만든 모델에 비하여 관절의 변화가 서서히 일어나며 또한 토끼의 관절이 개에 비해 사람과 더 유사하기 때문에 관절변성의 병가에 보다 적합한 모델이 될 수 있다 (Yoshimi 등, 1994). 본 연구에서 토끼의 십자인대를 절제하여 유발된 골관절증의 주요 병리학적 변화는 cleft, pannus 및 osteophyte 형성과 관절 면의 fibrillation 등으로 사람의 골관절증에서 보이는 변화들과 유사하였다.

관절면이 변성되었을 때 나타나는 일련의 변화는 다른 질병에서와 유사하다. 최초의 변화는 chondromalacia인데 관절연골내 수분의 증가와 GAG의 부족으로 연골이 연화된다. GAG의 부족은 tidemarks 위쪽으로 손상을 받았을 때 병변부에서 관절연골 세포들이 세포분열과 함께 protein과 GAG의 분비를 활성화하여 일어난다. 연화가 일어난 다음 육안적으로 관찰할 수 있는 변화는 연골의 fibrillation으로 관절면이 평활함과 윤택을 잃게 되고 간유리처럼 변하며 표면은 velvet처럼 변하게 된다. 이때 광학현미경으로 관찰해보면 관절면의 superficial zone의 수직상 cleft가 보이며 때로는 cleft가 mineralized zone에 까지 미치는 경우도 있다. Cleft는 transitional 또는 radiate zone의 collagen fiber가 파열되는 것이다. 초기에 fibrillation과 GAG의 손실이 일어나면 연골세포의 피사가 수반된다. 손상된 연골에서는 type I과 type II collagen 등이 생성된다. Chondrocytes의 증생은 조직학적으로는 cell clusters (clone cell)의 출현으로 알 수 있다. 광범위하게 fibrillation이 발생되면 연골세포의 피사, GAG의 감소, 관절판의 비박화 등으로 이어진다. Cleft가 radiate 또는 mineralized zone까지 침입하였을 때 관절판이 완전히 소실하기도 한다. 때로 mineralized zone이 radiate zone으로 확장될 때 tidemarks가 다중선으로 관찰되기도 한다. Fibrillation이 발생한 다음 관절면이 움직이는 방향 쪽으로 groove가 생기면서 활막과 관절면 이행부에 osteophyte가 생기기도 한다. 실험동물에서 cruciate ligament를 절제하면 3일 정도 후에 osteophyte가 생기게 되며, 관절이 비정상적인 운동을 하게 되고 관절면에 비정상적인 부하가 걸려 증식성변화를 일으키게 된다. 이때의 변화는 정상적인 골화과정인 endochondral ossification 과정이 아닌 직접적인 골화과정에 속한다. 결국 cartilage의 ulceration, bone의 eburnation, periarticular osteophytes, synovial villi의 proliferaton, joint capsules의 distension과 thickening등은 관절변성의 end-stage로 생각된다.

본 연구에서 조직병리학적 평가를 위해 이용한 평가기준은 Yoshimi 등이 제시한 criteria에서 safranin O staining

의 염색성에 대한 항목을 제외한 것이다. 이 criteria는 처음 Mankin 등에 의해 제시되어 이용되어 왔던 것을 Yoshimi 등이 더욱 상세하게 평가 항목을 늘려 만든 것이다. Yoshimi 등에 의하면 Mankin 등이 제시한 criteria는 사람의 hip에 생긴 상당히 진행된 골관절증의 평가에 이용되었던 것으로, 본 시험에 사용한 모델에서와 같이 점진적으로 증상이 진행되며 병변이 심하게 나타나지 않는 비교적 초기 골관절증의 병변을 평가하기에는 적합하지 못하다 (Mankin 등, 1971; Yoshimi 등, 1994). 이러한 이유로 본 연구에서는 Yoshimi 등이 제시한 criteria를 이용하여 평가하였다.

HA의 골관절증에 대한 효과는 이미 여러 연구자들을 통해 확인이 되었다. Abatangelo, Kikuchi, Schiavinato 등은 앞쪽십자인대를 절개한 개를 사용한 실험에서 HA가 골관절증을 억제한다는 보고를 하였고, Yoshimi 등은 토끼를 사용한 실험을 통해 HA가 연골의 변성을 방지하여 골관절증과 같은 관절 질환의 치료에 응용될 수 있음을 보고하였다. Kitoh 등은 토끼를 사용한 실험에서 HA가 연골의 변성 방지와 더불어 연골로부터의 GAG의 분비를 억제한다고 보고하였다. 이에 덧붙여 Kitoh 등은 이러한 HA의 효과가 분자량이 클수록 명확히 보여진다고 보고하였다. 이러한 HA의 관절 질환에 대한 효과는 아직 기전이 명확히 밝혀져 있지 않다. 류마티스성 관절염 또는 골관절증을 앓고 있는 환자의 관절액 내의 TNF 및 IL-1은 관절연골로부터의 GAG 분비를 촉진함으로써 관절연골의 파괴를 가져온다는 것이 보고되었다. 이러한 사실들을 종합해 볼 때, HA의 작용기전이 현재까지 명확하지는 않으나 아마도 관절 연골의 표면을 덮어 GAG의 분비를 억제하고 관절면을 destructive outside factor로부터 보호하는 것이 주요 작용인 것으로 생각된다.

본 실험 결과 HA를 투여한 실험군은 saline을 투여한 대조군에 비해 조직병리학적으로 증상이 완화된 것을 볼 수 있었다. 이러한 HA의 억제 효과는 6주, 12주 모두에서 여실히 나타났다. 본 실험의 결과로 이번 시험에 사용된 HA 제제는 관절연골의 변성을 방지하는 효과가 있음을 알 수 있었다. 이러한 HA 제제는 앞으로 골관절증과 같은 여러 관절질환의 치료에 응용될 수 있을 것이다.

참고문헌

Abatangelo, G., Botti, P., Del Bue, M., Gei, G., Samson, J. C., Cortivo, R., DeGalateo, A. and Marteli, M. (1989).

- Intraarticular sodium hyaluronate injections in the Pond-Nuki experimental model of osteoarthritis in dogs. I. Biochemical results. *Clin. Orthop.* **241**, 278-285.
- Akeson, W. H., Amiel, D. and Laviolette, D. (1967). The connective-tissue response to immobility: A study of the chondroitin-4 and 6-sulfate and dermatan sulfate changes in periarticular connective tissue of control and immobilized knee of dogs. *Clin. Orthop.* **51**, 183-197.
- Iwata, H. (1993). Pharmacologic and clinical aspects of intraarticular injection of hyaluronate. *Clin. Orthop.* **289**, 285-291.
- Jubb, K. V. F. and Kennedy, N. C. (1993). Pathology of domestic animals (forth editon), Academic Press., California.
- Kendall, F. E., Heidelberger, M. and Dawson, M. H. (1937). A serologically inactive polysaccharide elaborated by mucoid strains of Group A hemolytic streptococcus. *J. Biol. Chem.* **118**, 61-69.
- Kitoh, Y., Katsuramaki, T., Tanaka, H., Tanaka, M., Kitabayashi, M., Kataoka, M., Fuhimori, S., Umemoto, J., and Nanba, K. (1992). Effect of SL-1010 (Sodium hyaluronate with high molecular weight) on experimental osteoarthritis induced by intra-articulary applied papain in rabbits. *Folia Pharmacol. Japon* **100**, 67-76.
- Mankin, H. J., Dorfman, H., Lippiello, L. and Zarins, A., (1971). Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. *J. Bone joint surg.* **53**(3), 523-537.
- Namiki, O., Toyoshima, H. and Morisaki, N. (1982). Therapeutic effect of intra-articular injection of high molecular weight hyaluronic acid on osteoarthritis of the knee. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* **20**(11), 501-507.
- Pond, M. J. and Nuki, G. (1973). Experimentally-induced osteoarthritis in the dog. *Ann. Rheum. Dis.* **32**, 387-388.
- Roy, S. (1970). Ultrastructure of articular cartilage in experimental immobilization. *Ann. Rheum. Dis.* **29**(6), 634-642.
- Schwartz, E. R. (1987). Animal models: A means to study the pathogenesis of osteoarthritis. *J. Rheumatol. Suppl.* **14**, 101-103.
- Shiavinato, A., Lini, E., Guidolin, D. and Pezzoli, G., (1989). Intraarticular sodium hyaluroate injections in the Pond-Nuki experimental model of osteoarthritis in dogs. II. Morphological findings. *Clin. Ortho.* **241**, 286-299.
- Yoshimi, T., Kikuchi, T., Obara, T., Yamaguchi, T., Sakakibara, Y., Itoh, H., Iwata, H. and Miura, T. (1994). Effects of high-molecular-weight sodium hyaluronate on experimental osteoarthritis induced by the resection of rabbit anterior cruciate ligament. *Clin. Orthop.* **298**, 296-304.