

La viscosupplementazione intra-articolare con polinucleotidi

La nuova opzione per migliorare la risposta clinica

Il corpo umano è sostenuto da un apparato scheletrico con oltre 350 articolazioni (fisse, semimobili e mobili) che garantiscono vari gradi di libertà sia a parti del tronco (bacino, collo, etc) sia soprattutto agli arti. Questa complessa struttura è, in conseguenza della postura eretta, sottoposta ad elevati carichi statici, le cui forze vengono dissipate su poche articolazioni (rachide lombare, bacino e ginocchio), determinando sovraccarico articolare. Questo articolo prenderà in esame le tre *articolazioni sinoviali mobili* di spalla, anca e ginocchio.

L'articolazione sinoviale: le strutture in gioco

L'articolazione sinoviale è una struttura complessa sotto l'aspetto biomeccanico poiché, oltre alle parti ossee, sono coinvolte strutture di protezione che devono garantire una corretta funzionalità articolare, con mo-

Key words:
osteoarthritis
cartilage
synovia(*)
viscosupplementation

Editorial. *The intra-articular viscosupplementation with polydeoxyribonucleotides. The new option to ameliorate clinical response. Trends Med 2010; 10 (4):183-190.*
©2010 Pharma Project Group srl. ISSN: 1594-2848

vimenti molto complessi, finemente controllabili e ripetibili migliaia di volte per decine di anni. Una così lunga durata dell'articolazione non potrebbe essere garantita se le superfici dei capi ossei coinvolti fossero a diretto contatto fra loro. I tessuti che consentono il corretto funzionamento dell'articolazione sinoviale sono due, la cartilagine ialina (CI) e la membrana sinoviale (MS); a questi due tessuti va aggiunto il liquido sinoviale (LS), la cui funzione è determinante ai fini della resistenza all'usura meccanica. Nelle patologie degenerative articolari nessuna di queste tre componenti è risparmiata da alterazioni morfologiche e metaboliche.

Cartilagine articolare

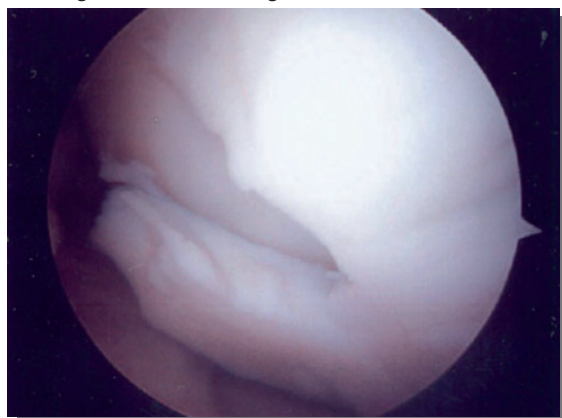
Le superfici ossee articolari sono ricoperte da una sottile "pellicola" di tessuto translucido, liscio, a bassissimo attrito, la cartilagine ialina^{1,2}. Ad ulteriore protezione, la zona di contatto fra i due capi articolari è separata da un film liquido dello spessore di 40-60µ, il liquido sinoviale³⁻⁵. La cartilagine agisce da cuscinetto e, insieme al liquido sinoviale, dissipa

le forze che si scaricano sull'articolazione durante il movimento, particolarmente quello ad elevato carico e frequenza di sollecitazione: si pensi alle articolazioni del ginocchio e dell'anca durante la corsa. Le alterazioni morfologiche e biochimiche della cartilagine, che esiteranno negli anni nell'artrosi senile, iniziano in realtà abbastanza precocemente, in relazione alla presenza di vari fattori di rischio (sovrappeso, attività usuranti, etc), sicché già a partire dalla terza decade possono comparire microlesioni cartilaginee caratterizzate da progressiva perdita della matrice extracellulare (ECM)^{6,7} (figura 1).

Membrana sinoviale

Si tratta di una struttura bifacciale che riveste la cavità interna dell'articolazione: lo strato esterno è costituito da un doppio strato di sinoviociti e non con-

Figura 1. Artroscopia del ginocchio: lesioni della cartilagine femorale in giovane adulto.



tiene vasi sanguigni; il versante interno è invece metabolicamente attivo, presenta vasi sanguigni e durante i processi infiammatori si ispessisce e forma il *panno sinoviale*. In condizioni normali sono presenti sullo strato interno fibroblasti, linfociti e macrofagi, che sotto opportuna stimolazione possono attivarsi e rilasciare sostanze infiammatorie, collagenolitiche e profibrotiche^{8,9}. Vari studi hanno evidenziato che la sinovia non ha solo funzioni meccaniche ma sintetizza numerose sostanze, fra cui varie citochine infiammatorie, in particolare interleuchina-1 (IL-1) e Tumor Necrosis Factor alfa (TNF- α)¹⁰. Sono queste sostanze che, rilasciate nel liquido sinoviale, partecipano alle fasi precoci di degenerazione della cartilagine: ciò è testimoniato dal fatto che pazienti giovani con infiammazione sinoviale comprovata dalla presenza di *panno sinoviale* ma clinicamente asintomatici e con reperti radiografici negativi per osteoartrosi, presentano già microlesioni cartilaginee rilevabili ad indagini sensibili, quali l'artrosopia o la risonanza magnetica¹¹.

Liquido sinoviale

Nelle cavità articolari è presente una piccola quantità (2-5 mL) di LS, una soluzione colloidale di acido ialuronico ad elevato peso molecolare (6-7 x10⁶ Da), iperdensa (2-4 mg/mL) ed iperviscosa (200-250 volte >H₂O)¹². In condizioni fisiologiche il LS può contenere anche fagociti e leucociti. La sua funzione primaria è quella di formare fra le superfici di contatto un *cuscinetto elastico* molto sottile, che consente alle parti in movimento di scorrere in virtuale assenza di attrito: la riduzione dell'attrito è garantita

dalla presenza nel LS di particolari macromolecole, *le lubrificine*¹³. L'elevata densità e viscosità conferiscono al LS due importanti proprietà: 1) capacità di assorbire e dissipare i treni di onde meccaniche che attraverso le ossa lunghe si scaricano sull'articolazione (elevata densità); 2) mantenere continuamente imbibite le due superfici articolari, in modo che le due sinovie non entrino in contatto meccanico (elevata viscosità). In sintesi, il LS si comporta esattamente come un olio minerale posto a lubrificazione di parti in movimento. La sua funzione tuttavia non è solo quella di "cuscinetto oleoso": il LS è infatti un tessuto vitale a tutti gli effetti, in quanto fornisce ossigeno, micronutrienti ed energia ai condrociti della cartilagine, permettendone la sopravvivenza ed il corretto metabolismo^{14,15}.

La degenerazione artrosica: quali interventi?

Nonostante i meccanismi di protezione summenzionati, la cartilagine articolare rimane comunque un tessuto soggetto ad usura fisiologica (età) e patologica (traumatismi acuti e croni-

ci), con il risultato che verso i 50 anni una quota importante di soggetti presenta artrosi delle articolazioni maggiormente sottoposte a carico, in particolare del ginocchio (240 casi/10.000 persone-anno) e dell'anca (88 casi/10.000 persone-anno)¹⁶⁻¹⁸. L'articolazione artrosica presenta varie peculiarità cliniche e radiologiche: dolore più o meno persistente e di grado variabile, rigidità articolare prevalentemente mattutina, riduzione della mobilità ed un certo grado di infiammazione locale^{19,20}. Quest'ultima sembra costituire il principale substrato patologico sotteso alla progressiva perdita di cartilagine che si osserva durante l'invecchiamento²¹. L'assottigliamento cartilagineo e la riduzione del contenuto di LS determinano riduzione della rima articolare, con conseguente avvicinamento dei capi ossei, un reperto radiografico ben evidente nell'artrosi del ginocchio. Purtroppo, il danno cartilagineo è in realtà più articolato sotto il profilo metabolico, poiché la flogosi determina progressivo sfibramento della cartilagine, con perdita della matrice extracellulare (ECM) e rilascio di frammenti di tessuto nel liquido sinoviale, che *perde non solo le*

Figura 2. Articolazione del ginocchio: strutture sane (pannello di sinistra) e strutture affette da osteoartrosi (pannello di destra).



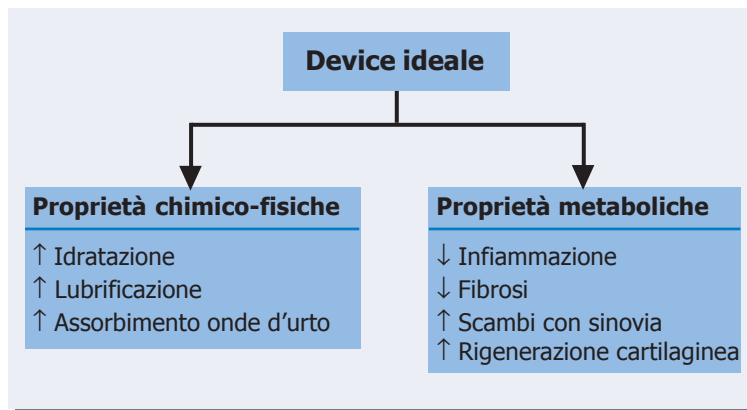
sue proprietà elastiche e nutritive ma diviene fonte di attrito (figura 2).

È interessante sottolineare che, benché l'OA non sia classificata fra le tipiche malattie infiammatorie articolari, numerosi studi hanno dimostrato che nella cavità articolare artrosica sono presenti varie citochine infiammatorie e che la presenza di una costante infiammazione subclinica possa essere il principale driver di progressione della malattia artrosica^{22,23}. L'infiammazione costituisce quindi un target terapeutico di primaria importanza.

La viscosupplementazione

Nei pazienti con osteoartrosi (OA) refrattari alle terapie conservative (riduzione del sovrappeso, correzione posturale, etc.) o che non abbiano risposto a terapie farmacologiche per ridurre il dolore e la flogosi (paracetamolo, FANS) è possibile prendere in considerazione, prima del trattamento chirurgico, la somministrazione intra-articolare di corticosteroidi o di *analoghi del liquido sinoviale*. La somministrazione di quest'ultima categoria di sostanze, definita viscosupplementazione in quanto trattasi di soluzioni colloidali ad alta viscosità, è stata sperimentata per la prima volta verso la metà degli anni '70 ed ha ricevuto validazione scientifica all'inizio degli anni '90 da parte del gruppo di Balazs^{24,25}. Fino ad oggi, la viscosupplementazione si è basata sulla somministrazione intra-articolare di soluzioni di acido ialuronico di diversi pesi molecolari^{26,27}. Molti di questi device presentano però caratteristiche chimico-fisiche assai diverse dal LS che dovrebbero sostituire o reintegrare.

Figura 3. Proprietà del dispositivo ideale per la viscosupplementazione intra-articolare.



I device convenzionali: aree di miglioramento

Benché numerosi studi abbiano dimostrato che l'uso di questi device migliori taluni parametri clinici (dolore, scrosci articolari, etc.) i risultati rimangono ambigui per quanto riguarda il controllo delle altre componenti dell'osteoartrosi, particolarmente l'infiammazione e la rigenerazione della cartilagine, sicché l'uso della viscosupplementazione convenzionale con ialuronani non sembra modificare la storia clinica della malattia o rallentare la progressione²⁸⁻³⁰. In realtà il dispositivo ideale dovrebbe agire su varie componenti del processo artrosico e non solo sulle proprietà biomeccaniche del liquido sinoviale (figura 3). Sulla base di queste osservazioni, sono state perseguite negli ultimi anni due diverse linee di ricerca: da una parte preparare dispositivi ad alta densità, in modo da creare un gel fra le superfici articolari metabolicamente poco attivo, con bassa clearance e lunga emivita; dall'altra, *sostituire l'acido ialuronico con macromolecole ugualmente dotate di elevata capacità di trattenere acqua e formare un gel ad elevata densità, ma al contempo in grado di rilasciare precursori metabolici capaci di fornire energia e micronutrienti alla cartilagine, stimo-*

lando così i condrociti a sintetizzare nuova matrice. Solo un device con queste caratteristiche potrebbe modificare la storia naturale della malattia.

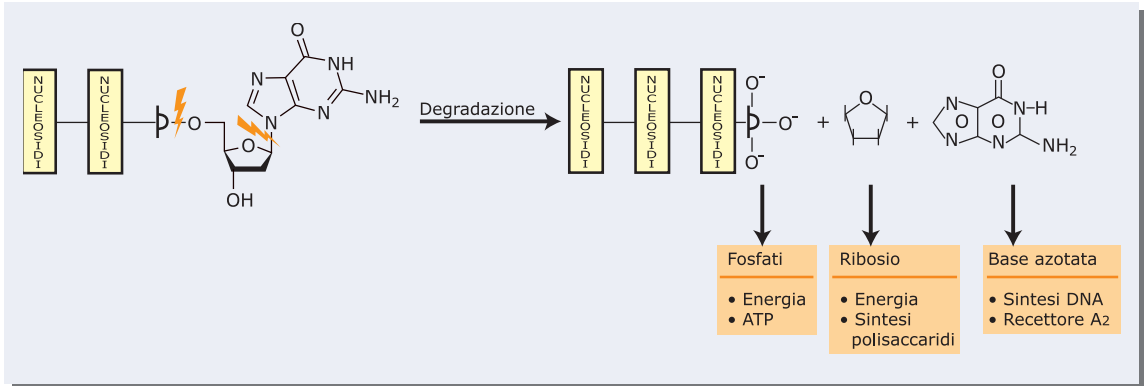
La viscosupplementazione con polinucleotidi

L'utilizzo di lunghe catene di polinucleotidi (PN) ottenute dalla frammentazione controllata del DNA è una procedura messa a punto a partire dalla fine degli anni '90: il primo studio con PN ottenuto da placenta umana è stato condotto da Muratore *et al.* nel 1997 con l'intento di verificare se una soluzione ad alta densità di PN inducesse viraggio metabolico in una coltura di fibroblasti cutanei³¹. In seguito ai positivi risultati di questo studio, i PN sono stati utilizzati per promuovere la crescita di fibroblasti di cornea ed iride, anche in questo caso con risultati positivi³².

Effetti dei PN su osteoblasti e condroblasti

Successivamente è stato possibile verificare che la somministrazione di PN promuoveva la proliferazione di osteoblasti umani in coltura, suggerendo la possibilità di utilizzare queste sostanze per riparare il tessuto osseo³³. In questo studio l'addi-

Figura 4. Degradazione enzimatica dei PN: dopo essere stato infiltrato in cavità articolare il gel va lentamente incontro a degradazione enzimatica, con rilascio delle basi azotate (purine e pirimidine), ribosio e fosfato. Si può ipotizzare che i vari componenti agiscano come substrati energetici e metabolici per la rigenerazione cartilaginea e la sintesi di nuova matrice extracellulare.



zione al mezzo di coltura di frammenti di polinucleotidi a diversa lunghezza ed alla concentrazione media di 100 µg/mL ha determinato dopo 6 giorni un incremento della crescita degli osteoblasti pari al 21% rispetto allo stesso terreno non addizionato. L'effetto metabolico dei PN sugli osteoblasti è stato confermato dal graduale e rapido incremento di attività della fosfatasi alcalina (sin dal giorno 1).

Gli Autori di questo studio suggeriscono che la crescita degli osteoblasti sia mediata dalla stimolazione del recettore A₂ per le purine, presente sugli osteoblasti, per quanto non possano essere esclusi anche altri meccanismi d'azione. Recettori purinici sono stati isolati anche su cellule della muscolatura liscia, suggerendo l'esistenza di un meccanismo di controllo relativamente ubiquitario³⁴. Ne consegue che un device a base di polinucleotidi può agire nella cavità articolare attraverso due diversi meccanismi, fra loro complementari e sequenziali nel tempo: in una fase precoce si comporta da cuscinetto lubrificante, mentre nella fase tardiva i residui della lisi enzimatica locale stimolano il metabolismo cartilagineo.

Innovativa terapia intrarticolare

Recentemente è stato commercializzato un nuovo dispositivo per il trattamento delle patologie degenerative della cartilagine (Condrotide™ - CDT-) contenente polinucleotidi ad elevata concentrazione (20 mg/mL).

Azione precoce: biomeccanica

Le lunghe catene polimeriche di DNA di origine animale dopo idonei processi di separazione, frammentazione, sterilizzazione e polimerizzazione, acquisiscono la capacità di trattenere grandi quantità di acqua al loro interno, formando un gel tridimensionale. L'infiltrazione intra-articolare di questo gel, analogamente all'acido ialuronico, è in grado di formare una densa e viscosa pellicola protettiva sulle superfici articolari. Prima della degradazione enzimatica la fornitura di un gel con le stesse proprietà viscoelastiche dell'acido ialuronico migliora le caratteristiche reologiche del LS, ripristinando le proprietà meccaniche dell'articolazione.

Successivamente i polinucleotidi vanno fisiologicamente in-

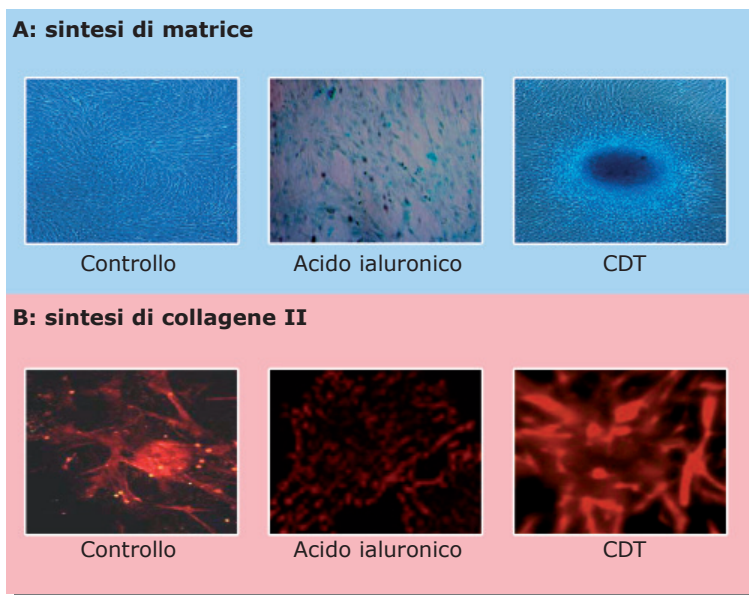
contro a degradazione enzimatica, con liberazione delle rispettive quattro basi azotate, del residuo zuccherino e dell'acido fosforico, secondo lo schema di figura 4.

Azione ritardata: metabolica

Dopo la lisi enzimatica, i PN forniscono il substrato metabolico alle cellule della cartilagine attivandole, con formazione di nuova matrice extracellulare e riparazione del danno tissutale. Infatti, la degradazione locale delle catene polinucleotidiche libera nell'ambiente articolare grandi quantità di *basi azotate, pirimidiniche e puriniche*, che rappresentano utili substrati per favorire la sintesi della matrice extracellulare da parte dei condrociti³⁵. Oltre alle basi azotate, sono rilasciate anche grandi quantità di residui glucidici (ribosio) e fosfati, tutti composti notoriamente coinvolti nei processi energetici della cellula: *ne consegue che dopo aver assolto alla sua funzione meccanica, il gel di Condrotide™ assolve ad una funzione metabolica, ovvero rifornire la cartilagine e l'osso di substrati energetici necessari ai processi rigenerativi.*

La capacità dei PN di stimolare i condrociti della cartilagine

Figura 5. Effetti dell'aggiunta di acido ialuronico 1% (HA) o Condrotide™ 0.01% (CDT) al mezzo di coltura "basale". La comparazione è stata fatta contro un medium ottimale per la crescita dei condrociti, utilizzato come controllo (primo riquadro a sinistra). Nel pannello A (colorazione con alcian blue) effetto sulla espressione di matrice extracellulare; nel pannello B (colorazione immunostochimica), effetto sulla sintesi di collagene II. (Data on file MEDEVIC³⁶).



a sintetizzare ECM è stata dimostrata sperimentalmente su colture di condrociti provenienti da biopsie e coltivati in tre diversi mezzi di coltura su piastra: uno era costituito da un medium standard addizionato da fattore di crescita per il tessuto cartilagineo (50% DMEM/50% F12+FCS 10% +desametasone, acido ascorbico e TGF-beta), mentre i terreni delle colture test erano "basali" (50% DMEM/50% F12+FCS 10%), addizionati o con acido ialuronico (1%) o con Condrotide™ 0.01%³⁶. Dopo incubazione per 15 giorni l'attività condrotrofica di Condrotide™ è stata valutata sia attraverso la produzione di matrice extracellulare (figura 5A) sia attraverso la produzione di collagene di tipo 2 (figura 5B). Come visibile in figura 5, l'aggiunta di PN al mezzo di "col-

tura basale" ha favorito sia una maggiore produzione di matrice che di collagene rispetto all'aggiunta di acido ialuronico, suggerendo che i PN esprimono effetti metabolici più intensi.

Risultati clinici della viscosupplementazione con PN

In uno studio clinico i benefici della viscosupplementazione con PN sono stati comparati a quelli ottenuti con acido ialuronico (AI) su una popolazione di 60 pazienti (18-80 anni) con diagnosi di gonartrosi posta secondo i criteri dell'American College of Rheumatology (ACR)³⁷. I pazienti sono stati trattati con un'infiltrazione a settimana di Condrotide™ (CDT) o AI (controlli) ai tempi T0,T1,T2, T3,T4, e successivamente monitorati per ulteriori 12 settime-

ne, con controlli di efficacia e sicurezza alle settimane 8 (T8) e 16 (T16), per una durata complessiva di 16 settimane di osservazione. Prima di ciascuna infiltrazione il paziente era sottoposto ad una valutazione funzionale relativa al dolore ed alla capacità di movimento, secondo gli end-point di seguito illustrati: obiettivo primario dello studio era la variazione del dolore misurato con scala visuale analogica (VAS) con punteggio da 0 (nessun dolore) a 10 (dolore massimo); il dolore è stato misurato sia a riposo che durante il carico articolare o il movimento.

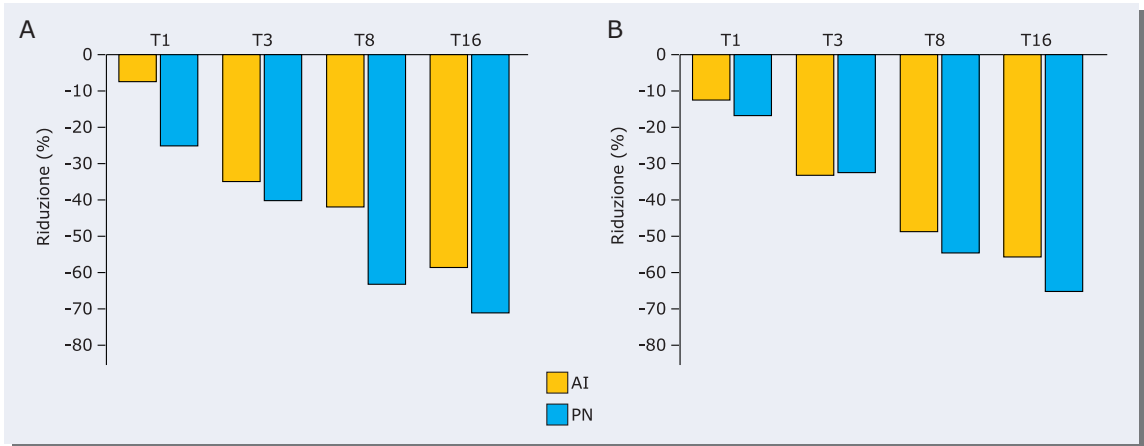
Obiettivi secondari erano: 1) le variazioni del punteggio KOOS (Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score), una scala sviluppata come estensione della WOMAC a 5 campi [dolore, sintomatologia generale, attività quotidiane (ADL), attività sportive e ricreative (Sport/Rec)]; 2) variazione della qualità di vita (QOL); 3) variazioni del crepitio articolare; 4) consumo di antinfiammatori non steroidei (FANS).

Il trattamento con Condrotide™ si è dimostrato più efficace e rapido del comparatore su tutti gli end-point oggetto di valutazione: particolarmente interessanti risultano i dati relativi alla riduzione del dolore ed al consumo di FANS.

Riduzione del dolore

Rispetto all'acido ialuronico la somministrazione intra-articolare di polinucleotidi ha dimostrato sia un'efficacia maggiore (maggiore riduzione del punteggio VAS), sia maggiore rapidità (riduzione del tempo necessario ad ottenere il medesimo effetto antalgico). Questi risultati sono stati ottenuti sia a riposo sia in movimento (figura 6).

Figura 6. Variazione del dolore rispetto al basale (T0) registrato ai tempi T1 (dopo la prima infiltrazione), T3 (dopo la terza infiltrazione), T8 (4 settimane dall'ultima infiltrazione) e T16 (fine studio). I dati del pannello (A) si riferiscono al dolore a riposo, quelli del pannello (B) al dolore in movimento (Dati da Vanelli R *et al* 2010³⁷).



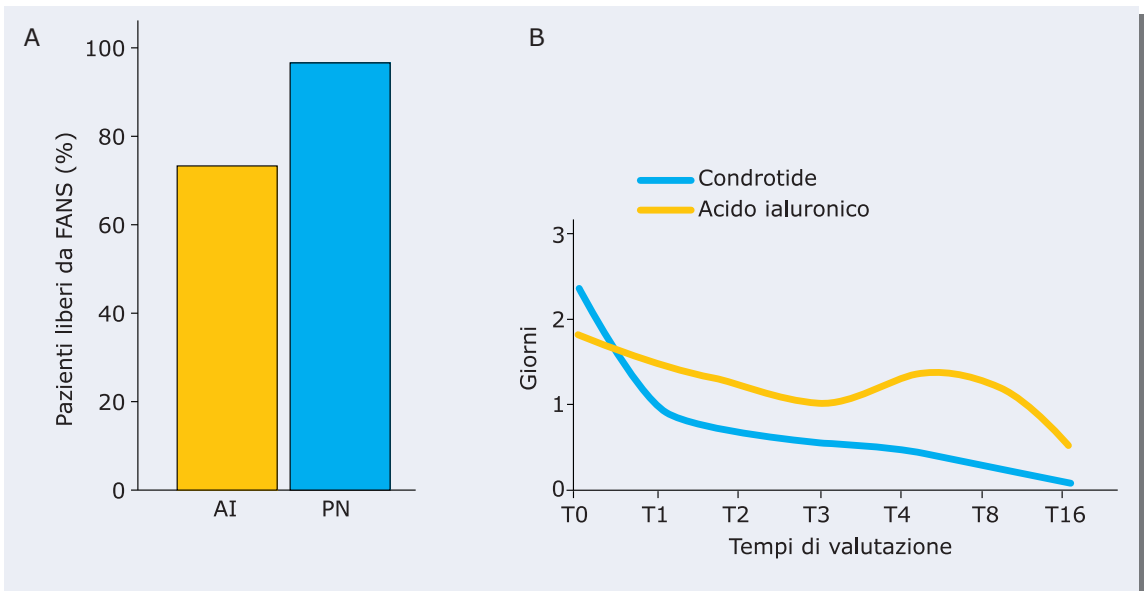
Consumo di antinfiammatori

Nei pazienti con artrosi l'uso di FANS è assai frequente e quasi sempre sfugge al controllo diretto del medico, poiché l'assunzione avviene al bisogno e/o con farmaci OTC, con rischio di eventi avversi (ulcere gastriche, sanguinamenti, ipertensione, etc)^{38,39}. Per tale ragione, l'uso

di questa classe di farmaci nell'OA è stato oggetto di varie linee guida che ne limitano l'uso soprattutto nell'anziano⁴⁰. Sulla base di questi dati, la riduzione del dolore è particolarmente auspicabile sia per migliorare la qualità di vita sia per ridurre l'uso dei FANS. Nello studio di Vanelli *et al.* l'assunzione di FANS si è sensibilmente ri-

dotta sin dalla settimana successiva alla prima infiltrazione di PN, ed al termine dello studio solo 1 paziente (3.4%) del braccio PN assumeva FANS contro 8 pazienti del braccio AI (26.6%) (figura 7A). Analogamente il numero di giorni durante i quali si è resa necessaria l'assunzione di FANS per controllare il dolore è risul-

Figura 7. Pazienti FANS free al termine dello studio (A) e numero di giorni della settimana prima di ciascuna visita di controllo durante i quali erano stati utilizzati FANS (B). (Dati da Vanelli R *et al* 2010³⁷).



tato significativamente maggiore nel gruppo in trattamento con acido ialuronico: in figura 7B la pendenza delle due curve dimostra come la riduzione sia stata più rapida e duratura per i pazienti del braccio PN, con miglioramento già alla prima settimana. Questi risultati sono coerenti con il doppio meccanismo d'azione ipotizzato per i polinucleotidi: la più rapida riduzione del dolore già dopo la prima infiltrazione è presumibilmente da associare alla elevata densità molecolare di Condrotide™ (20 mg/mL). A partire dalle infiltrazioni successive, all'effetto spugna si associa l'effetto metabolico derivante dalla lisi delle catene polinucleotidiche, con rilascio di ribosio, fosfati e nucleotidi utili per la sintesi di nuovi substrati cellulari.

Conclusioni

L'introduzione di una nuova classe di viscosupplementi a base di polinucleotidi potrebbe aprire prospettive inattese nel trattamento dell'artrosi di ginocchio, anca e spalla.

Gli aspetti più interessanti di questa classe sono associati sia alle proprietà biomeccaniche del gel, requisiti soddisfatti anche dai device a base di ialuronani, sia alle proprietà metaboliche dei singoli costituenti rilasciati successivamente alla lisi locale dei PN.

La disponibilità nel liquido sinoviale di ribosio come fonte di energia, e la possibilità di sintetizzare con abbondanza ATP (ribosio più trifosfato) a partire dai prodotti di degradazione dei PN, costituiscono un'ipotesi allettante che sembra giustificata

dai risultati clinici ma che necessita di ulteriori conferme sperimentali. Analogamente, la possibilità di stimolare la crescita di osteoblasti e condroblasti mediata dal recettore purinico A2 potrebbe rivelarsi un'opportunità tipizzante di questa nuova classe. Anche in questo caso l'ipotesi appare suffragata dalla maggior produzione di ECM dopo induzione dei condroblasti con polinucleotidi invece che con ialuronani. Ai positivi effetti sul dolore osservati negli studi preliminari, si potrebbero aggiungere miglioramenti della prognosi correlati alle proprietà metaboliche dei PN. Si tratta di un risultato particolarmente atteso dai clinici e che potrà derivare da una maggiore esperienza su ampi numeri di pazienti trattati nelle varie fasi di malattia. **TiM**

Bibliografia

1. Carrington JL. Aging bone and cartilage: cross-cutting issues. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 28:700-708.
2. Horton WE Jr, Yagi R, Laverty D. Overview of studies comparing human normal cartilage with minimal and advanced osteoarthritic cartilage. *Clin Exp Rheumatol* 2005; 23:103-112.
3. Samuels J, Krasnokutsky S, Abramson SB. Osteoarthritis. A tale of three tissues. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2008; 66:244-250.
4. McCutchen CW. Joint lubrication. *Bull Hosp Jt Dis Orthop Inst* 1983; 43:118-129.
5. Tandon PN, Bong NH, Kushwaha K. A new model for synovial joint lubrication. *Int J Biomed Comput* 1994; 35:125-140.
6. Caterson B, Flannery CR, Hughes CE, et al. Mechanisms involved in cartilage proteoglycan catabolism. *Matrix Biol* 2000; 19:333-344.
7. Ding C, Cicuttini F, Scott F, et al. Natural history of knee cartilage defects and factors affecting change. *Arch Intern Med* 2006; 166:651-658.
8. Bondeson J, Wainwright SD, Lauder S, et al. The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2006; 8:R187.
9. Fukui N, Purple CR, Sandell LJ. Cell biology of osteoarthritis: the chondrocyte's response to injury. *Curr Rheumatol Rep* 2001; 3:496-505.
10. Hashimoto M, Nakasa T, Hikota T, et al. Molecular network of cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Med Res Rev* 2008; 28:464-481.
11. Hunter DJ, Li J, LaValley M, et al. Cartilage markers and their association with cartilage loss on magnetic resonance imaging in knee osteoarthritis: the Boston Osteoarthritis Knee Study. *Arthritis Res Ther* 2007; 9:R108.
12. Pascual E, Jovaní V. Synovial fluid analysis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2005; 19:371-386.
13. Berumen-Nafarrate E, Leal-Berumen I, Luevano E, et al. Synovial tissue and synovial fluid. *J Knee Surg* 2002; 15:46-48.
14. Simkin PA. Synovial perfusion and synovial fluid solutes. *Ann Rheum Dis* 1995; 54:424-428.
15. Levick JR, McDonald JN. Fluid movement across synovium in healthy joints: role of synovial fluid macromolecules. *Ann Rheum Dis* 1995; 54:417-423.
16. Oliveria SA, Felson DT, Reed JI, et al. Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization. *Arthritis Rheum* 1995; 38:1134-1141.
17. Grotle M, Hagen KB, Natvig B, et al. Prevalence and burden of osteoarthritis: results from a population survey in Norway. *J Rheumatol* 2008; 35:677-684.
18. Andrianakos AA, Kontelis LK, Karamitsos DG, et al. ESORDIG Study Group. Prevalence of symptomatic knee, hand, and hip osteoarthritis in Greece. *J Rheumatol* 2006; 33:2507-2513.
19. Burr DB. Increased biological activity of subchondral mineralized tissues underlies the progressive

- deterioration of articular cartilage in osteoarthritis. *J Rheumatol* 2005; 32:1156-1158;
20. **Halliday DA, Clemente G, Rathjen DA.** Rapid degradation of articular cartilage proteoglycan by neutrophils: comparison with macrophages and synovial fibroblasts. *Inflamm Res* 2000; 49:441-444.
 21. **Kurz B, Lemke AK, Fay J, et al.** Pathomechanisms of cartilage destruction by mechanical injury. *Ann Anat* 2005; 187:473-485.
 22. **Brandt KD, Dieppe P, Radin EL.** Etiopathogenesis of osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2008; 34:531-559.
 23. **Fraser A, Fearon U, Billingham RC, et al.** Turnover of type II collagen and aggrecan in cartilage matrix at the onset of inflammatory arthritis in humans: relationship to mediators of systemic and local inflammation. *Arthritis Rheum* 2003; 48:3085-3095.
 24. **Peyron JG, Balazs EA.** Preliminary clinical assessment of N-hyaluronate injection into human arthritic joint. *Pathol Biol* 1974; 22:731-736.
 25. **Balazs EA, Denlinger JL.** Viscosupplementation: a new concept in the treatment of osteoarthritis. *J Rheumatol* 1993; 20 (suppl 39):3-9.
 26. **Kato Y, Nakamura S, Nishimura M.** Beneficial actions of hyaluronan (HA) on arthritic joints: effects of molecular weight of HA on elasticity of cartilage matrix. *Biorheology* 2006; 43:347-354.
 27. **Kawano T, Miura H, Mawatari T, et al.** Mechanical effects of the intraarticular administration of high molecular weight hyaluronic acid plus phospholipid on synovial joint lubrication and prevention of articular cartilage degeneration in experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48:1923-1929.
 28. **Divine JG, Zazulak BT, Hewett TE.** Viscosupplementation for knee osteoarthritis: a systematic review. *Clin Orthop Relat Res* 2007; 455:113-122.
 29. **Dagenais S.** Intra-articular hyaluronic acid (viscosupplementation) for knee osteoarthritis. *Issues Emerg Health Technol* 2006; 94:1-4.
 30. **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.
 31. **Muratore O, Pesce Schito A, Cattarini G, et al.** Evaluation of the trophic effect of human placental PDRN on human knee skin fibroblasts in primary cultures. *Cell Mol Life Sci* 1997; 53:279-285.
 32. **Muratore O, Cattarini G, Gianoglio S, et al.** A human placental polydeoxyribonucleotide (PDRN) may promote the growth of human corneal fibroblasts and iris pigment epithelial cells in primary cultures. *New Microbiol* 2003; 26:13-26.
 33. **Guizzardi S, Galli C, Govoni P, et al.** Polydeoxyribonucleotide (PDRN) promotes human osteoblast proliferation: a new proposal for bone tissue repair. *Life Sci* 2003; 73:1973-1983.
 34. **Hadjkaddour K, Michel A, Laurent F, et al.** Smooth muscle relaxant activity of A1- and A2-selective adenosine receptor agonists in guinea pig trachea: involvement of potassium channels. *Fundam Clin Pharmacol* 1996; 10:269-277.
 35. **Goldring SR.** The role of bone in osteoarthritis pathogenesis. *Rheum Dis Clin North Am* 2008; 34:561-71.
 36. **MEDEVICE.** Data on file.
 37. **Vanelli R, Costa P, Rossi SM, et al.** Efficacy of intra-articular polynucleotides in the treatment of knee osteoarthritis: a randomized, double-blind clinical trial. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2010; 18:901-907.
 38. **Hernández-Díaz S, Rodríguez LA.** Association between nonsteroidal anti-inflammatory drugs and upper gastrointestinal tract bleeding/perforation: an overview of epidemiologic studies published in the 1990s. *Arch Intern Med* 2000; 160:2093-2099.
 39. **Richardson CG, Chalmers A, Llewellyn-Thomas HA, et al.** Pain relief in osteoarthritis: patients' willingness to risk medication-induced gastrointestinal, cardiovascular, and cerebrovascular complications. *J Rheumatol* 2007; 34:1569-1575.
 40. **American College of Rheumatology.** Recommendations for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee: 2000 update. American College of Rheumatology Subcommittee on Osteoarthritis Guidelines. *Arthritis Rheum* 2000; 43:1905-1915.