

## 흰쥐 슬관절 고정 후 초음파 적용이 관절연골내 HSP70의 발현에 미치는 영향

대구대학교 재활과학대학 물리치료학과 신경재생실  
남 기 원

### The Effects of Ultrasound Irradiation on the Heat Shock Protein 70(HSP70) Expression in Rat Knee Articular Cartilage after Immobilization.

**Nam, Ki-won, P.T., Ph.D.**

*Lab. of Nerve Regeneration, Department of Physical Therapy, College of Rehabilitation, Daegu University*

#### <Abstract>

The purpose of the study was for investigating the effect of therapeutic ultrasound irradiation on HSP70 expression in knee of degraded rat articular cartilage.

Knee of ten Sprague-Dawley male rats were immobilized for 4 weeks and divided at random into the control and continuous ultrasound applied group. The continuous ultrasound applied group was irradiated with frequency 1MHz, intensity 1W/cm<sup>2</sup> for 5 minutes. The control group was sham sonication.

The immunoreactivity of HSP70 was increased in degraded articular cartilage after ultrasound irradiation. These results suggest that therapeutic ultrasound can enhance HSP70 expression in degraded articular cartilage.

Key word : HSP70, articular cartilage, ultrasound

## I. 서 론

관절연골은 관절에 가해지는 충격을 흡수하고 역학적으로 가해지는 스트레스를 분산시켜 관절 접촉면의 스트레스 감소 뿐만 아니라 마모와 마찰을 최소로 하여 관절 운동이 원활하게 일어나도록 해준다(Margareta 등, 2001). 또한 고유의 생역학적 특성을 유지하고 건강한 상태의 연골기능을 유지하기 위해서는 정상적인 부하나 관절가동운동과 같은 기계적 자극이 필요하다(Vanwanseele 등, 2002; LeRoux 등, 2001). 역학적 부하가 세포의기질을 통해 연골세포로 전달되면 연골세포는 생합성 활동을 증가시킨다(Heiner와 Martin, 2004). 하지만 역학적 부하가 정상보다 많이 증가하거나 지나치게 감소하게 되면 관절연골의 퇴행성 변화가 일어나게 되며(LeRoux 등, 2001), 통증을 유발하게 되고 관절의 약화를 가져오게 된다(Vanwanselle 등, 2002).

동물 실험에서, 관절 고정 시 프로테오글라이칸(proteoglycan)의 감소(Behrens 등, 1989), 당아미노글라이칸(glycosaminoglycan)의 감소(Haapala 등, 2000), 관절 연골내 교원섬유의 교차결합(cross-link) 감소(Haapala 등, 1999), 관절연골의 두께 감소(Jurvelin 등, 1986) 등이 밝혀졌다. 또한 장기간의 관절고정은 관절낭의 약화(Torelli 등, 2004), 골증식(Langenskiöld 등, 1979) 뿐만 아니라 골관절염을 초래하게 된다(Paukkonen 등, 1986).

연골세포는 전체 관절연골의 약 5%를 차지하는 세포의 기질에 산재해 있으며 관절연골의 구조적 형태를 유지하고(Archer 등, 2003), 세포의 기질의 구성요소를 합성하며 세포의 기질의 평형 상태를 유지하는 역할을 한다(Aigner 등, 2001). 연골세포의 세포사(cell death)는 골관절염의 진행과 밀접한 관계를 가지며(Mistry 등, 2004), 골관절염에서 연골세포의 세포사멸사(apoptosis)가 일어난다고 보고되었다(Lotz 등, 1999). 따라서 연골세포는 관절연골을 구조적, 생화학적으로 유지하는데 중요한 역할을 한다고 할 수 있다.

HSP(heat shock protein)는 다양한 스트레스 상황에서 발현되며 세포를 보호하고, 손상으로부터 세포를 회복시키는 역할을 한다(Jaattela 등, 1993). 여러 종류의 HSP 중 HSP70은 온도변화에 가장 민감하게 반응하며, 세포가 온도 상승의 조건에 처했을 때 수분 이내에 세포내에서 합성되며(Ellis 등, 1991) 세포에 스트레스가 주어졌을 때 세포를 보호하고(Laudry 등, 1982), 과

도한 외부 자극 등의 부적절한 조건 하에서 세포의 생존력을 증가시켜 주는 물질이다(Li 등, 1982).

또한 HSP의 발현은 골관절염 연골세포에서 증가됨이 밝혀졌고(Takahashi 등, 1997), 실험적으로 발현시킨 HSP70은 연골세포 내의 산화질소(nitric oxide, NO)나 세포사멸사를 억제하고(Terauchi 등, 2003), 단백질 분해효소인 proteasome을 억제해 연골세포의 손상을 방지한다고 알려졌다(Grossin 등, 2004).

따라서 본 연구는 흰쥐의 뒷다리 슬관절을 석고붕대로 고정하여 관절연골의 퇴행을 유발한 후 물리치료에서 사용하는 심부온열치료기구인 치료적 초음파를 조사하여 관절연골의 구성세포인 연골세포내 HSP70의 발현 양상을 관찰함으로써 초음파가 연골세포의 회복에 미치는 치료적 효과를 알아보고, 나아가 골관절염 환자에 대한 초음파 치료의 효과를 제시하고자 한다.

## II. 연구방법

### 1. 실험동물

본 연구에서는 체중 250-300g의 용성 Sprague-Dawley계 흰쥐 12마리를 사용해 실험기간 동안 20×15×45cm 크기의 표준사육장에서 사육하였다. 사육장 온도는 23±2℃, 습도는 40-60%로 유지하고 광주기 및 암주기는 12시간으로 조절하였다. 12마리의 실험동물 중 고정기간 동안 과도한 부종이 발생한 1마리와 비정상적인 호흡형태를 보인 1마리는 실험에서 제외하고, 10마리의 실험동물로 4주간 우측 뒷다리 슬관절을 석고 고정하여 관절퇴행을 유발시켰으며, 4주 후 고정 장치를 제거시키고 실험적 중재 동안 표준사육장에서 자유롭게 생활하도록 하였다. 실험동물은 초음파 적용군과 대조군으로 분류하여 초음파 적용군은 5일 동안 연속초음파를 적용하였고, 대조군은 위약 조사를 실시하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) 석고 고정

실험동물의 슬관절에 관절퇴행을 유발하기 위해 4주간 석고고정을 실시하였다. 석고 고정을 실시하기 전 염산케타민(Ketamine HCl, 유한양행)과 Xylazine hydrochloride(Rompun, 바이엘코리아)를 1:1 비율로

섞어 조제한 전신 마취제를 복강 주사하여 전신 마취를 유도하였다. 마취 후 우측 뒷다리를 발에서 대퇴부까지 스타킹으로 감싼 뒤 슬관절 신전, 족관절 90도로 유지시킨 상태에서 석고 붓대를 발에서 대퇴부까지 감싼 뒤 건조시켰다. 이때 발에서의 부종 발생 유무를 관찰하기 위해 발등의 절반부위까지만 석고붕대를 실시하였다. 고정 기간 동안 수시로 고정 상태를 관찰하여 이상이 생긴 경우 즉시 보정 처리하였으며, 비정상적인 호흡형태나 불편감, 부종, 피부색 변화 중 한 증상이라도 확인되면 실험에서 제외하였다.

## 2) 초음파의 적용

본 연구에서 사용한 저강도 치료용 초음파 기기는 Sonotens 501(Daeyang Medical Co. Ltd., Korea)이었다. 실험동물 슬관절에 적절한 초음파 조사가 되도록 하기 위해 수중도자법을 실시하였다. 소독된 투명 플라스틱 케이스에 28℃로 유지한 증류수를 담고 정확한 조사 거리를 유지하기 위해 흰귀의 슬관절과 초음파 도사 사이의 거리를 2.0cm가 되도록 고정하였다. 초음파 조사는 석고붕대 제거 후 1일부터 5일간 실시하였으며, 연속초음파 적용군은 주파수 1MHz, 강도 0.5W/cm<sup>2</sup>으로 5분간 1일 1회 적용하였고 대조군은 같은 조건을 유지하였으나 기기의 전원을 넣지 않았다.

## 3) 조직절편의 제작

실험적 처치가 완료된 실험동물들은 전신마취를 실시하고 0.9% NaCl로 심장관류를 실시하였으며 4% paraformaldehyde(pH 7.4)를 관류시켜 전고정을 실시하였다. 이후 대퇴골을 기준으로 슬관절에서 근위부 0.5cm 부위 까지 절취한 다음 근육과 인대, 관절낭을 제거하여 대퇴골과를 포함한 대퇴골의 관절연골과 대퇴골 일부를 채취하였으며, 4% paraformaldehyde(pH 7.4) 용액에 24시간 동안 후고정을 실시하였다.

후고정 실시 후 채취된 관절연골은 증류수 90ml에 40% 포르말린 10ml와 5.5g의 2Na EDTA가 함유된 탈회액에 4주간 침수시켜 탈회시켰다. 탈회액은 1일 1회 갈아주었으며 4주간 탈회를 마친 관절연골은 일반적인 과정에 따라 탈수와 청명과정을 거친 뒤 파라핀포매를 실시하였다.

제작된 파라핀 블록은 미세절단기(SM 2000R, LEICA, Germany)를 사용하여 5 $\mu$ m의 두께로 잘라서 슬라이드를 제작하여 건조기(C-SL SLIDE WARMER,

Chang Shin Scientific Co, Korea)에서 24시간 건조시켰다.

## 4) 면역조직화학법

퇴행을 유발시킨 관절연골에 초음파를 적용하여 연골세포내 HSP70의 발현 양상을 살펴보기 위해 면역조직화학법을 실시하였다. 제작된 관절연골 절편은 탈파라핀과 함수과정을 거친 후 증류수에 10분간 수세한 뒤 0.01M PB(pH 7.4)에 각각 10분씩 3회 세척한 뒤, 1:100으로 희석한 1차 항체(mouse monoclonal anti-heat shock protein 70, Sigma)를 실온에서 12시간 동안 처리하였다. 1차 항체 처리 후 0.01M PB로 10분씩 3회 수세 후 2차 항체(biotinylated anti-mouse IgG, Vector Lab., USA)를 실온에서 90분간 처리한 후 0.01M PB로 10분씩 3회 수세한 다음 3차 항체(Vectastatin Elite ABC Regent, Vector Lab., USA)를 실온에서 60분간 반응시켰다. 이후 0.01M PB로 10분씩 3회 수세 후 DAB 용액(3',5'-diaminobenzidine tetrahydrochloride containing 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)에 반응시켰다. DAB 반응 후 0.01M PB로 10분씩 3회 수세 후 대조염색을 실시하였으며, 탈수와 청명 과정을 거쳐 광학현미경적 관찰을 위해 봉입(mounting)을 실시하였다.

## Ⅲ. 연구결과

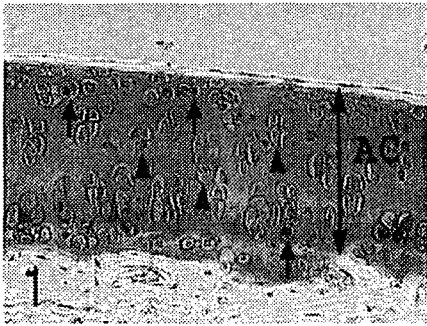
흰귀의 우측 뒷다리 슬관절을 4주간 고정하여 연골의 퇴행을 유발시킨 후 대조군과 초음파 적용군의 관절연골에서 발현된 HSP70의 발현 정도를 관찰하여 초음파가 연골세포내의 HSP70의 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과는 다음과 같다.

### 1. 대조군

흰귀의 우측 뒷다리를 4주간 고정하여 연골을 퇴행시킨 후 고정장치를 제거하고 5일이 경과된 대조군에서 연골세포들은 천층과 심층에서 주로 관찰되었으며, 중간층에서는 적은 숫자의 연골세포가 관찰되었고, HSP70에 대한 면역조직화학법을 실시한 결과 관절 연골의 천층과 심층의 일부 연골세포들에서 HSP70에 대한 면역반응이 관찰되었다(Fig. 1).

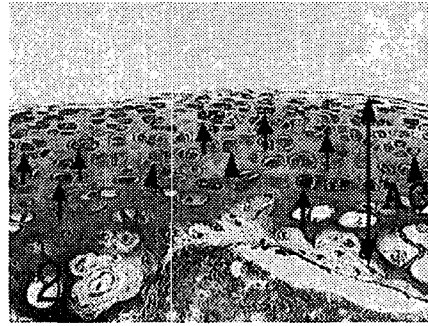
## 2 초음파 적용군

원위의 우측 뒷다리를 4주간 고정하여 연골을 퇴행시킨 후 고정장치를 제거하고 5일 동안 연속초음파를 적용한 실험군에서 연골세포들은 천층, 중간층 및 심층 모두



**Fig. 1. Immunoreactivity with the HSP70 antibody in ultrasound non-applied group( $\times 200$ ).**  
Immunostained chondrocytes were observed in the superficial and deep layer of articular cartilage.  
AC : articular cartilage  
arrow head : chondrocyte  
arrow : immunostained chondrocyte

에서 연골세포가 비교적 균등하게 분포해 있었으며, HSP70에 대한 면역조직화학법을 실시한 결과 관절 연골의 전층에 분포한 연골세포들에서 HSP70에 대한 강한 면역반응이 관찰되었다(Fig. 2).



**Fig. 2. Immunoreactivity with the HSP70 antibody in ultrasound applied group( $\times 200$ ).**  
Immunostained chondrocytes were observed in the all layer of articular cartilage.  
AC : articular cartilage  
arrow head : chondrocyte  
arrow : immunostained chondrocyte

## IV. 고 찰

본 연구는 물리치료 임상에서 흔하게 접하게 되는 관절 고정 환자들에게서 발생하는 관절연골의 퇴행에 대한 초음파 치료의 효과를 알아보기 위해 동물 모델을 이용하여 연골세포의 생존에 지대한 영향을 미치는 HSP70의 발현 양상을 관찰하였다.

관절연골은 일상 생활 중에 발생하는 충격을 흡수하고 분산시켜 관절 접촉면에서 발생하는 마모와 마찰을 최소화시키고 정상적인 관절운동이 일어나게 해준다(Nordin 등, 2001). 관절연골의 기능은 연골세포와 세포외기질의 상호작용을 통해 생합성활동을 조절하게 되나(Newman, 1998), 정상적인 역학적 부하가 감소되면 연골세포의 합성활동에 영향을 미쳐 퇴행성 변화가 일어나게 되고(Wong 등, 2003), 기능 장애의 원인이 된다(Vanwanselle 등, 2002).

관절고정을 통해 역학적 부하를 제거 시킨 후 발생되

는 관절연골의 조직학적, 생화학적 변화에 대한 연구는 동물모델을 통해 다양하게 연구되어 왔는데, Haapala 등(1999)에 의하면 실험동물의 관절고정 모델에서 관절 연골의 두께가 감소됨을 확인하였고, Trudel 등(2003)은 관절고정 실시 2주 후부터 관절연골 표면의 불규칙성이 증가함을 확인하였다. 또한 프로테오글라이칸의 합성 감소, 프로테오글라이칸의 함량 감소, 프로테오글라이칸의 구조 변화(Müller 등, 1994; Jortikka 등, 1999; Haapala 등, 1999), 활액 생산 감소(Michelsson 등, 1984), 연골 기질 내부로 활액의 확산 감소(Videman 등, 1981)이 보고 되었으며, Narmoneva 등(2002)은 4주 동안의 고정을 통해 관절연골의 세포외 기질에서 교원섬유가 감소함을 확인하였다.

뿐만 아니라 Sood(1971)는 고정에 의한 관절 퇴행 후 관절 연골내 연골세포 숫자의 변화를 보고하였고, Trudel 등(2005)은 실험용 원위의 슬관절을 135° 굴곡한 상태로 고정하여 관절 연골내 연골세포의 변화를 관찰

한 결과, 전체적으로 연골세포의 감소를 알 수 있었지만, 관절 압박이 일어난 부위에서는 관절 연골의 천층에서 연골세포들이 많이 관찰되었으며, 관절 압박이 일어나지 않은 반대쪽 관절면의 관절연골에서는 심층에서 연골세포들이 더 많이 관찰되었다고 보고하였다. 본 연구에서는 슬관절을 신전한 상태로 고정을 실시하였으며, 그 결과 관절연골에서 연골세포의 분포는 초음파를 적용하지 않은 대조군에서는 초음파 적용군에 비해 전반적으로 적은 양의 연골세포가 관찰되긴 했지만 관절연골의 중간층에 비해 천층과 심층에서 연골세포들이 더 많이 관찰되었고, 초음파를 적용한 실험군에서는 천층에 걸쳐 연골세포들이 균등하게 관찰되었다.

이러한 연구 결과들은 종합해보면 관절 부하나 관절운동의 제거 혹은 감소를 목적으로 실시하는 관절고정으로 인해 관절연골의 다양한 퇴행성 변화가 유발됨을 알 수 있으며, 이로 인해 관절연골의 고유 기능이 저하됨을 알 수 있다.

특정 조직에 열이 가해지거나 스트레스 상황에 노출되었을 때 세포내에서 일어나는 많은 변화들 중의 하나가 HSP라는 특정 단백질의 발현이다(Bienz와 Pelham, 1987; Bond와 Schlesinger, 1987). HSP의 종류는 분자량에 따라 104, 90, 70, 60, 20kDa 등이 있으며, HSP의 기능은 세포에 스트레스가 주어졌을 때 세포를 보호하고(Laudry 등, 1982), 과도한 외부 자극 등의 부적절한 조건하에서 세포의 생존력을 증가시켜주는 물질이다(Li 등, 1982). 다양한 HSP들 중 HSP70은 자극을 받았을 때에만 급격하고 민감하게 반응하여 상당한 양의 증가를 보이고(Welch와 Suhan, 1986), 변성된 다른 효소 단백질과 결합하여 단백질의 적절한 접힘(protein folding)을 유지시켜 세포의 손상을 최소화하며(Morimoto, 1993), 세포막을 통한 단백질 수출이나 단백질 합성과 같은 세포내 항상성 유지에 중요하게 작용하여 세포를 보호한다(Moseley, 1998).

Otsuka 등(1996)에 의하면 HSP70은 열 자극에 의해 연골세포의 분화 말기에 발현된다고 했으며, Kubo 등(2001)은 연골세포에 48℃의 열을 두 시간 동안 가해 HSP70의 증가와 더불어 연골세포의 대사활동과 생존능력이 향상됨을 확인하였다.

골관절염과 관련된 HSP에 대한 연구에서 Kubo 등(1985)은 정상인의 연골세포와 골관절염 환자의 연골세포를 다양한 온도에서 12분 동안 배양하여 HSP의 발현 양상을 살펴본 결과, 정상 세포에서는 39℃ 이상에서 배

양한 연골세포에서 HSP70의 발현이 증가됨을 확인하였고, 골관절염 환자의 연골세포에서는 37℃에서도 증가된 발현을 확인하였다. 이는 정상적인 연골세포에서는 생리학 온도(37℃)에서 HSP70의 발현이 관찰되지 않았으나 골관절염 환자의 연골세포에서는 연골세포의 생존을 위해 HSP70의 발현이 증가되었을 뿐만 아니라 42℃ 이상의 온도에서는 월등히 많은 HSP70의 발현 양상을 보임으로써 열자극이 HSP70의 발현에 영향을 미친다는 사실을 알 수 있다. 본 연구에서도 관절 퇴행 후 초음파를 적용하지 않은 대조군의 연골세포에서는 HSP70이 적게 발현되었고, 초음파를 적용한 실험군에서는 많은 양의 발현 양상을 보여주었다. 이는 대조군의 경우 퇴행성 변화에 따른 연골세포의 생존을 위해 필요한 최소한의 발현이라 추정할 수 있으며, 실험군의 경우는 초음파에 의한 열자극에 의해 조직온도가 상승되어 많은 발현 양상을 보였다고 볼 수 있다.

Madreperla 등(1985)은 생리적, 병적 상황에서 HSP70의 발현은 생체 조직의 항상성 유지와 밀접한 관련이 있지만, 병적 관절조직에서 HSP70의 발현 정도가 세포 손상을 방지할 수 있을 정도의 유익한 발현 양에는 미치지 못한다고 하여 관절염의 병적 진행 과정을 방지하기 위한 초기 단계의 적절한 치료적 적용을 제한하였다.

따라서 초음파는 관절염 환자들에게 임상에서 흔히 사용하는 치료 기구로 관절연골에서 HSP70의 발현을 증가시켜 연골세포의 생존에 도움을 주고, 나아가 세포의 기질들의 합성에도 긍정적인 영향을 주어 관절연골의 퇴행을 막아 준다고 할 수 있겠다. 하지만 치료적 유용성에 대한 생체 기전은 아직까지 명확하게 확인되지 않고 있으며 차후 더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

## V. 결 론

초음파가 퇴행성 관절연골내의 연골세포에서 HSP70의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 흰쥐의 우측 뒷다리 슬관절을 4주간 고정하여 연골의 퇴행을 유발시킨 후 대조군과 초음파 적용군의 관절연골에서 발현된 HSP70의 발현 정도를 관찰한 본 연구의 결론은 다음과 같다.

### 1. 대조군

원위의 우측 뒷다리를 4주간 고정하여 연골을 퇴행 시킨 후 고정장치를 제거하고 5일 동안 표준사육장에서 사육하며 위약 초음파를 적용한 대조군의 관절연골에 HSP70에 대한 면역조직화학법을 실시한 결과 관절 연골의 천층과 심층의 일부 연골세포들에서 HSP70에 대한 면역반응이 관찰되었다.

## 2 초음파 적용군

원위의 우측 뒷다리를 4주간 고정하여 연골을 퇴행 시킨 후 고정장치를 제거하고 5일 동안 표준사육장에서 사육하며 연속초음파를 주파수 1MHz, 강도 0.5W/cm<sup>2</sup>으로 1일 1회 5분간 적용한 실험군의 관절연골에 HSP70에 대한 면역조직화학법을 실시한 결과 관절 연골의 전층에 분포한 연골세포들에서 HSP70에 대한 강한 면역반응이 관찰되었다.

따라서 본 연구의 연구 결과를 통해 심부 조직의 온열 치료 목적으로 사용되는 초음파 치료시 조직내에서 세포를 보호하고, 손상을 방지하여 세포의 생존율을 증가시켜 주는 물질인 HSP70의 발현량이 연골세포내에서 증가함을 확인할 수 있었다. 이는 고정에 의한 퇴행성 관절연골에 대해 초음파 치료는 연골세포의 손상 방지와 더불어 세포의 기질의 대사 활동을 촉진하는 것으로 추정할 수 있으며, 초음파 치료의 생물학적, 생화학적 치료 기전을 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

## < 참고 문헌 >

- Aigner T, Ziem A, Gehrsitz A et al : Anabolic and catabolic gene expression pattern analysis in normal versus osteoarthritic cartilage using complementary DNA-array technology. *Arthritis Rheum*, 44, 2777-2789, 2001.
- Archer CW, Francis-West P : The chondrocytes. *Int J Biochem Cell Biol*, 35, 401-404, 2003.
- Behrens F, Draft E, Oegema T : Biochemical changes in articular cartilage after joint immobilization by casting or external fixation. *J Orthop Res*, 7, 335-343, 1989.
- Bienz M, Pelham HR : Mechanisms of heat-shock gene activation in higher eukaryotes. *Adv Genet*, 24, 31-72, 1987.
- Bond U, Schlesinger MJ : Heat-shock proteins and development. *Adv Genet*, 24, 1-29, 1987.
- Ellis RJ, van der Vies SM : The molecular chaperones. *Annu Rev Biochem*, 60, 321-347, 1991.
- Grossin L, Etienne S, Gaborit N et al : Induction of heat shock protein 70(Hsp70) by proteasome inhibitor MG 132 protects articular chondrocytes from cellular death in vitro and in vivo. *Biorheology*, 41, 521-534, 2004.
- Haapala J, Arokoski J, Hyttinen MM et al : Remobilization does not fully restore immobilization induced articular cartilage atrophy. *Clin Orthop*, 218-229, 1999.
- Haapala J, Arokoski J, Pirttimaki J et al : Incomplete restoration of immobilization induced softening of young beagle knee articular cartilage after 50-week remobilization. *Int J Sports Med*, 21, 76-81, 2000.
- Haapala J, Arokoski JP, Hyttinen MM et al : Remobilization does not fully restore immobilization induced articular cartilage atrophy. *Clin Orthop Relat Res*, 362, 218-229, 1999.
- Heiner AD, Martin JA : Cartilage responses to a novel triaxial mechanostimulatory culture system, *J Biomech*, 37, 689-695, 2004.
- Jaattela M, Wissing D : Heat-shock proteins protect cells from monocyte cytotoxicity: possible mechanism of self-protection. *J Exp Med*, 177, 231-236, 1993.
- Jortikka MO, Inkinen RI, Tammi MI et al : Remobilization does not fully restore immobilization induced articular cartilage atrophy. *Clin Orthop*, 362, 218-29, 1999.
- Jurvelin J, Kiviranta I, Tammi M, et al : Softening of canine articular cartilage after immobilization of the knee joint. *Clin Orthop*, 207, 246-52, 1986.
- Kubo T, Arai Y, Takahashi K et al : Expression of

- transduced HSP70 gene protects chondrocytes from stress. *J Rheumatol*, 28, 330-335, 2001.
- Kubo T, Towle CA, Mankin HJ et al : Stress-induced proteins in chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 28, 1140-1145, 1985.
- Landry J, Bernier D, Chretien P : Synthesis and degradation of heat shock proteins during development and decay of thermotolerance. *Cancer Res*, 42, 2457-2461, 1982.
- Langenskiöld A, Michelsson JE, Videman T : Osteoarthritis of the knee in the rabbit produced by immobilization. *Acta Orthop Scand*, 50, 1-14, 1979.
- LeRoux MA, Cheung HS, Bau JL et al : Altered mechanics and histomorphometry of canine tibial cartilage following joint immobilization. *Osteoarthritis Cartilage*, 9, 663-640, 2001.
- Li GC : Induced thermal tolerance and heat shock protein synthesis in Chinese hamster ovary cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phy*, 8, 63-67, 1982.
- Lotz M, Hadhimoto S, Kuhn K : Mechanism of apoptosis. *Osteoarthritis Cartilage*, 7, 389-391, 1999.
- Madreperla SA, Louwerenburg B, Mann RW et al : Induction of heat-shock protein synthesis in chondrocytes at physiological temperatures. *J Orthop Res*, 3, 30-35, 1985.
- Nordin M, Frankel VH: Basic biomechanics of the musculoskeletal system, 3th ed, Lippincott Williams and Wilkins, 2001.
- Michelsson JE, Junneyball IM : Inflammatory involvement in rabbit knee following immobilization and resulting in osteoarthritis. *Scand J Rheumatol*, 13, 273-281, 1984.
- Mistry D, Oue Y, Chambers MG et al : Chondrocyte death during murine osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 12, 131-141, 2004.
- Morimoto RI : Cell in stress: Transcriptional activation of heat shock genes. *Adv Sci*, 259, 1409-1410, 1993.
- Moseley PL : Heat shock proteins and the inflammatory response. *Ann N Y Acad Sci*, 856, 206-213, 1998.
- Muller FJ, Setton LA, Manicourt DH et al : Centrifugal and biochemical comparison of proteoglycan aggregates from articular cartilage in experimental joint disuse and instability. *J Orthop Res*, 12, 498-508, 1994.
- Narmoneva DA, Cheung HS, Wang JY et al : Altered swelling behavior of femoral cartilage following joint immobilization in a canine model. *J Orthop Res*, 20, 83-91, 2002.
- Newman AP : Articular cartilage repair. *Am J Sports Med*, 26, 309-324, 1998.
- Otsuka G, Kubo T, Imanishi J et al : Expression of heat-shock-proteins in the differentiation process of chondrocytes. *Nippon Geka Hokan*, 65, 39-48, 1996.
- Paukkonen K, Jurvelin J, Helminen HJ : Effects of immobilization on the articular cartilage in young rabbits—a quantitative light microscopic stereological study. *Clin Orthop Relat Re*, 206, 270-280, 1986.
- Sood SC : A study of the effects of experimental immobilisation on rabbit articular cartilage. *J Anat*, 108, 497-507, 1971.
- Takahashi K, Kubo T, Arai Y et al : Localization of heat shock protein in osteoarthritic cartilage. *Scand J Rheumatol*, 26, 368-375, 1997.
- Terauchi R, Takahashi KA, Arai Y et al : Hsp70 prevents nitric oxide-induced apoptosis in articular chondrocytes. *Arthritis and Rheumatism*, 48, 1562-1568, 2003.
- Torelli SR, Rahal SC, Volpi RS et al : Radiography, computed tomography and magnetic resonance imaging at 0.5 Tesla of mechanically induced osteoarthritis in rabbit knees. *Braz J Med Biol Res*, 37, 493-501, 2004.
- Trudel G, Himori K, Goudreau L et al : Measurement of articular cartilage surface

- irregularity in rat knee contracture. *J Rheumatol*, 30, 2218-2225, 2003.
- Trudel G, Uthoff H, Laneuville O : Knee joint immobility induces Mcl-4 gene expression in articular chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 333, 247-252, 2005.
- Vanwanseele B, Lucchinetti E, Stussi E : The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage : current concepts and future direction, *Osteoarthritis Cartilage*, 10, 408-419, 2002.
- Videman T, Eronen I, Friman C : Glycosaminoglycan metabolism in experimental osteoarthritis caused by immobilization. *Acta Orthop Scand*, 52, 11-21, 1981.
- Welch WJ, Suhan JP : Cellular and biochemical events in mammalian cells during and after recovery from physiological stress. *J Cell Biol*, 103, 2035-2053, 1986.
- Wong M, Carter DR : Articular cartilage function histomorphology and mechanobiology: a research perspective. *Bone*, 33, 1-13, 2003.