

Efecto de condroitín sulfato y ácido hialurónico (500-730 kDa) sobre la síntesis de estromelisin (MMP-3) y MMP-1 en cultivo de condrocitos humanos

J. Monfort^a, M. Nacher^b, E. Montell^c, E. Tomàs^c, J. Vergés^c y P. Benito^a

^aServicio de Reumatología. Hospital del Mar. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona. España.

^bInstitut Municipal d'Investigació Mèdica. Universitat Pompeu Fabra. Barcelona. España.

^cUnidad de Investigación Farmacológica. Departamento Médico y Científico. Bioibérica Farma. Barcelona. España.

Introducción: El condroitín sulfato (CS) y el ácido hialurónico (AH) son fármacos que se utilizan para el tratamiento sintomático de la artrosis (AO). La colagenasa-1 (MMP-1) y la estromelisin-1 (MMP-3) son 2 enzimas proteolíticas encargadas de la degradación de la matriz extracelular en la AO. Pocos estudios han determinado el efecto *in vitro* de CS y AH sobre la síntesis de MMP-1 y de AH sobre la expresión de MMP-3 en cultivos de condrocitos humanos artrósicos, y en la bibliografía que se ha revisado no hay estudios que evalúen el efecto de CS sobre MMP-3.

Objetivos: Analizar el efecto de CS y AH (500-730 kDa) sobre la síntesis de MMP-3 y MMP-1 inducida por interleucina 1 β (IL-1 β) en condrocitos artrósicos.

Material y métodos: Los condrocitos se incubaron durante 48 h con IL-1 β (2,5 ng/ml) en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de AH (Hyalgan[®], Bioibérica Farma) o CS (Condrosan[®], Bioibérica Farma) (10, 50, 100, 150, 200 y 1.000 μ g/ml). La valoración funcional de los condrocitos se realizó mediante enzimoimmunoanálisis de los valores de MMP-1 y MMP-3.

Resultados: CS y AH inhiben la síntesis de MMP-3 inducida por IL-1 β , sin afectar de forma significativa a los valores de MMP-1. CS y AH redujeron los valores de expresión de la MMP-3 a todas las concentraciones estudiadas, sin que se encontraran diferencias estadísticamente significativas entre dichas concentraciones.

Conclusiones: Nuestro estudio demuestra por primera vez que CS inhibe la síntesis de MMP-3 en el cartílago.

artrosico y corrobora los escasos datos existentes sobre la capacidad de AH de inhibir dicha enzima.

Palabras clave: Condroitín sulfato. Ácido hialurónico. Metaloproteasas. Artrosis.

Effect of chondroitin sulfate and hyaluronic acid (500-730 kDa) on synthesis of stromelysin (MMP-3) and MMP-1 in human chondrocyte cultures

Introduction: Chondroitin sulfate (CS) and hyaluronic acid (HA) are used in the symptomatic treatment of osteoarthritis (OA). Chondrogenase-1 (MMP-1) and stromelysin-1 (MMP-3), are responsible for degradation of the extracellular matrix in OA. Few studies have determined the *in vitro* effect of CS and HA on MMP-1 synthesis and that of HA on MMP-3 expression in human OA chondrocyte culture. In the literature reviewed, there were no studies evaluating the effect of CS on MMP-3.

Objectives: To analyze the effect of CS and HA (500-730 kDa) on MMP-3 and MMP-1 synthesis induced by interleukin-1 β (IL-1 β) in OA chondrocytes.

Material and methods: Chondrocytes were incubated for 48 hours with IL-1 β (2.5 ng/ml) in the presence or absence of different HA concentrations (Hyalgan[®], Bioibérica Farma) (10, 50, 100, 150, 200 and 1000 μ g/ml). Functional evaluation of chondrocytes was performed by enzyme-immunoanalysis of MMP-1 and MMP-3 levels.

Results: CS and HA inhibited IL-1 β -induced MMP-3 synthesis, without significantly modifying MMP-1. CS and HA reduced levels of MMP-3 expression at all the studied concentrations, with no statistically significant differences among these concentrations.

Conclusions: The results of this study show for the first time that CS inhibits MMP-3 synthesis in OA cartilage.

Correspondencia: Dr. P. Benito.
Servicio Reumatología del IMAS.
Hospital del Mar.
Passeig Marítim, 25. 08003 Barcelona. España.
Correo electrónico: pbenito@imas.imim.es

Manuscrito recibido el 30-8-2004 y aceptado el 7-6-2005.

and corroborates the few existing data on the ability of HA to inhibit this enzyme.

Key words: Chondroitin sulfate. Hyaluronic acid. Metalloproteases. Osteoarthritis.

Introducción

La artrosis (AO) es la enfermedad articular más prevalente. Conlleva, por lo general, una pérdida importante de la capacidad funcional y de la calidad de vida de los pacientes y, desde un punto de vista fisiopatológico, se caracteriza por un desequilibrio entre el anabolismo y el catabolismo del cartílago articular que conduce a su disrupción.

Entre los mecanismos que originan la destrucción cartilaginosa cabe destacar el sistema de metaloproteasas (MMP), un conjunto de enzimas dependientes de cinc y calcio, capaces de degradar los componentes de la matriz extracelular.

Colagenasa-1 (MMP-1) fue el primer miembro de la familia de las MMP en ser caracterizado, se expresa en la mayor parte de células del tejido conectivo y es capaz de degradar el colágeno tipos I, II, III, VII, VIII y X, así como de activar las pro-MMP 2 y 9¹.

Estromelisin-1 (MMP-3) es una enzima proteolítica que desempeña un papel importante como mediadora de la respuesta inflamatoria en la articulación. Degrada por sí misma las fibras de colágeno tipos III, IV, IX y X y participa en la activación de diferentes pro-MMP, entre ellas pro-MMP-1, 7, 8, 9 y 13^{1,2}.

El condroitín sulfato (CS) por vía oral³ y las inyecciones intraarticulares de ácido hialurónico (AH) de bajo peso molecular (500-730 kDa)⁴ han demostrado su eficacia en el tratamiento sintomático de la AO⁵. Desde el punto de vista de su mecanismo de acción, se sabe que ambos fármacos son capaces de aumentar la síntesis de proteoglucanos y de colágeno tipo II, así como de disminuir la producción de óxido nítrico e inhibir la apoptosis⁶⁻⁸.

Sin embargo, hasta el momento, una parte importante de sus mecanismos de acción continúan sin esclarecerse. En particular, hay pocos estudios que determinen el efecto de CS y AH sobre la síntesis de MMP-1 y de AH sobre la expresión de MMP-3. Por otro lado, su escaso número y la heterogeneidad de la metodología empleada impiden extraer conclusiones. En la bibliografía que se ha revisado, no se han encontrado estudios que evalúen el efecto de CS sobre la síntesis de MMP-3.

El objetivo del presente estudio es analizar el efecto de CS y AH (500-730 kD) sobre la expresión de MMP-1 y MMP-3 inducida por interleucina 1 β (IL-1 β) en condrocitos humanos procedentes de pacientes afectados de coxartrosis sometidos a artroplastia de cadera.

Material y métodos

Como modelo celular *in vitro*, se utilizó el cultivo de condrocitos obtenidos de cartílago de pacientes con AO de cadera sometidos a artroplastia en el Hospital del Mar y el Hospital de la Esperanza (Barcelona, España). Las cabezas femorales se recogieron en condiciones de asepsia y se mantuvieron en HAM'S F-12/DMEM a 4 °C. Las muestras se procesaron durante las 12 h siguientes a su extracción. El estudio experimental se llevó a cabo en la Sección de Estudio de Cartílago de la Unidad de Investigación en Fisiopatología Ósea y Articular del Instituto Municipal de Investigación Médica (IMIM).

Criterios de inclusión y exclusión de pacientes

Criterios de inclusión

Pacientes de ambos sexos, mayores de 40 años, diagnosticados de AO de cadera que cumplían los criterios del American College of Rheumatology (ACR). Los pacientes presentaban grados III y IV de AO de acuerdo con la clasificación radiográfica de Kellgren y Lawrence.

Criterios de exclusión

Se excluyeron los pacientes afectados de AO secundaria (osteonecrosis, condrocalcinosis, gota, trastornos de alineación, displasias y AO postraumática), enfermedades inflamatorias del sistema osteomuscular, diabetes mellitus e hiperostosis vertebral anquilosante senil. Se excluyeron también los pacientes que se habían sometido a intervenciones previas de rodilla o cadera, incluyendo la artroscopia de ambas articulaciones durante el año previo al estudio. Finalmente, se excluyeron los pacientes que habían recibido corticoides intraarticulares en cualquiera de ambas caderas o rodillas en los 3 meses previos a la intervención o los que habían recibido cualquier fármaco de acción lenta para el tratamiento sintomático de la AO (*symptomatic slow acting drug for osteoarthritis*, SYSADOA), durante los 6 meses previos a la cirugía.

Cultivo de condrocitos

La técnica utilizada para la obtención de cultivos de condrocitos fue la descrita por Vignon et al⁹. Brevemente: el cartílago se recogió en condiciones estériles y se limpió de otros tejidos que pudieran estar adheridos, así como de las zonas calcificadas; a continuación, se troceó en finas láminas y se digirió a 37 °C durante 30

min en presencia de tripsina al 0,25%; posteriormente, se realizó una digestión *overnight* a 37 °C con colagenasa bacteriana al 0,05%, y como resultado se obtuvo una suspensión pura de condrocitos, que a continuación se depositó en frascos de cultivo de 75 cm² y se incubó a 37 °C y un 5% de CO₂. El medio de cultivo que se utilizó fue HAM'S F-12/DMEM suplementado con un 10% de suero de ternera fetal (FCS), penicilina/estrep-tomicina (100 U/ml y 100 µg/ml, respectivamente) y ácido ascórbico (50 µg/ml).

Valoración funcional de los condrocitos en presencia de ácido hialurónico (500-750 kDa) (HYALGAN®) y condroitín sulfato (CONDRO-SAN®)

La valoración funcional de los condrocitos se realizó mediante el estudio en el cultivo celular (n = 3) de los valores de MMP-1 y MMP-3. Para ello, los condrocitos obtenidos a partir del segundo subcultivo se distribuyeron en placas de 24 pocillos a una densidad de 1,5 × 10⁵ células/pocillo. Tras 24 h de incubación, se cambió el medio de cultivo y se añadió HAM'S F-12/DMEM suplementado con un 0,1% de albúmina de suero bovino (BSA). Los condrocitos se incubaron en estas condiciones durante 48 h. Transcurrido este período se cambió de nuevo el medio de cultivo y se añadió 1 ml de HAM'S F-12/DMEM suplementado con un 0,1% de BSA, 50 µg/ml de ácido ascórbico y las diferentes concentraciones de AH y CS (10, 50, 100, 150, 200 y 1.000 µg/ml), en presencia de 2,5 ng/ml de IL-1β. Transcurridas 48 h de incubación, se procedió a la recogida de los sobrenadantes de los cultivos y éstos se congelaron a -80 °C hasta su procesamiento por ELISA (Biotrak, Amersham), y se cuantificaron las formas inactivas (pro-MMP-1 y pro-MMP3) así como las formas activas de MMP-1 y MMP-3. Los resultados se normalizaron respecto al número de células obtenidas en cada condición experimental, por lo cual los valores de MMP se expresaron como ng/10⁵ células. Cada condición experimental se testó por duplicado.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño de análisis experimental que analizaba los resultados obtenidos con las diferentes concentraciones de AH y CS respecto a las muestras control tras eliminar la variabilidad debido a las réplicas y al *pool* del experimento. Las variables se expresan como media y desviación estándar. Los datos se analizaron con el paquete estadístico SPSS versión 11.5. La asunción de normalidad de las variables cuantitativas se analizó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnoff con

TABLA 1. Síntesis de MMP-3 en condrocitos incubados con diferentes concentraciones de IL-1β a lo largo de diferentes tiempos de incubación

IL-1β (ng/ml)	Tiempo de incubación					
	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
0	6	10	50	188	321	1.963
1,25	30	151	742	3.585	7.836	12.000
2,5	29	231	711	3.899	7.922	12.000
5	26	122	827	3.539	7.819	12.000
10	28	159	765	3.442	8.462	11.489
20	29	140	920	4.259	8.213	12.000

Los valores de MMP-3 se expresan en ng/ml. IL: interleucina.

la corrección Lilliefors. El análisis de los datos se realizó mediante un modelo lineal generalizado en el que los valores de MMP-1 y MMP-3 se trataron como variable dependiente, la población como factor aleatorio y el resto de variables como factores fijos. Se testaron todas las interacciones y se corrigió por el método de Tukey para comparaciones múltiples.

Resultados

Ensayos preliminares

En una población de condrocitos se realizó una curva de síntesis de MMP-3 en respuesta a diferentes concentraciones de IL-1β durante diferentes tiempos de incubación. Las concentraciones de IL-1β testadas fueron 1,25, 2,5, 5, 10 y 20 ng/ml y los tiempos de incubación fueron 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h.

Los resultados se muestran en la tabla 1. La síntesis de MMP-3 se vio altamente estimulada por la presencia de IL-1β. El porcentaje de estimulación de MMP-3 en presencia de las diferentes concentraciones de IL-1β fue aproximadamente lineal desde las 6 hasta las 48 h de incubación, con valores de entre el 470 y el 680%; entre las 48 y las 96 h de incubación el porcentaje de estimulación fue del 200-250%, y entre las 72 y las 96 h de incubación, la síntesis de MMP-3 solamente aumentó un 150%. Se obtuvo, pues, un pico a las 48 h de incubación, en cuanto a porcentaje de estimulación se refiere, y en consecuencia se decidió escoger 48 h como tiempo de incubación de los condrocitos con las diferentes concentraciones de AH y CS. Dado que no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones testadas de IL-1β para un mismo tiempo de incubación, se eligió la concentración de 2,5 ng/ml para la realización de los experimentos.

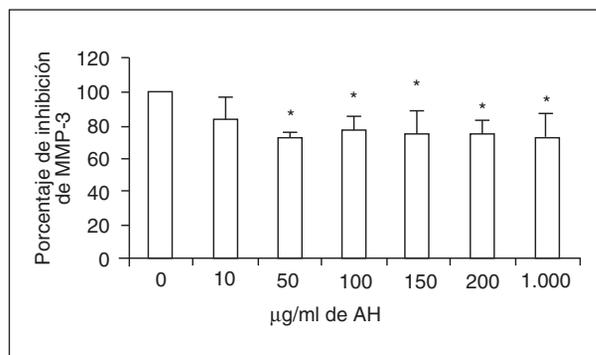


Figura 1. Porcentaje de inhibición de MMP-3 en condrocitos incubados con diferentes concentraciones de ácido hialurónico (AH). El porcentaje de inhibición de MMP-3 respecto al control basal (100% a 0 µg/ml) se calculó como la media aritmética de los porcentajes que se obtuvieron en cada una de las 3 poblaciones de condrocitos que se incubaron con las diferentes concentraciones de AH durante 48 h de incubación. * $p < 0,05$. (Análisis estadístico descrito en "Material y métodos".)

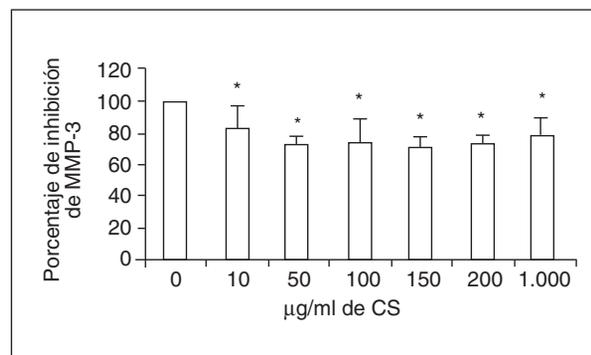


Figura 2. Porcentaje de inhibición de MMP-3 en condrocitos incubados con diferentes concentraciones de condroitín sulfato (CS). El porcentaje de inhibición de MMP-3 respecto al control basal (100% a 0 µg/ml) se calculó como la media aritmética de los porcentajes que se obtuvieron en cada una de las 3 poblaciones de condrocitos que se incubaron con las diferentes concentraciones de CS durante 48 h de incubación. * $p < 0,05$. (Análisis estadístico descrito en "Material y métodos".)

Inhibición de la secreción de MMP-3 en condrocitos estimulados con IL-1 β en presencia de AH y CS

Tal y como se había observado en el ensayo preliminar, la síntesis de MMP-3 se ve altamente estimulada en presencia de IL-1 β .

Cuando se estudió el efecto de las distintas concentraciones de AH sobre la síntesis de MMP-3, se obtuvieron los siguientes resultados: 2.092 \pm 546 ng/10⁵ células en condrocitos incubados en ausencia de AH, 1.526 \pm 339 ng/10⁵ células (50 µg/ml de AH), 1.602 \pm 365 ng/10⁵ células (100 µg/ml de AH), 1.601 \pm 668 ng/10⁵ células (150 µg/ml de AH), 1.560 \pm 349 ng/10⁵ células (200 µg/ml de AH) y 1.490 \pm 145 ng/10⁵ células (1.000 µg/ml de AH). Cuando los resultados se normalizaron y se expresaron en porcentaje de inhibición, y se compararon las diferentes concentraciones de AH en relación con el control basal (100% de expresión de MMP-3), se obtuvieron los resultados expresados en la figura 1. Se alcanzó significación estadística a concentraciones de 50 µg/ml ($p = 0,004$), 100 µg/ml ($p = 0,011$), 150 µg/ml ($p = 0,006$), 200 µg/ml ($p = 0,007$) y 1.000 µg/ml ($p = 0,004$).

Por otro lado, se estudió el efecto CS sobre la síntesis de MMP-3. Los resultados obtenidos a las diferentes concentraciones de CS fueron: 2.092 \pm 546 ng/10⁵ células en condrocitos incubados en ausencia de CS, 1.686 \pm 89 ng/10⁵ células (10 µg/ml de CS), 1.544 \pm 420 ng/10⁵ células (50 µg/ml de CS), 1.511 \pm 314 ng/10⁵ células (100 µg/ml de CS), 1.492 \pm 392 ng/10⁵ células (150 µg/ml de CS), 1.535 \pm 314 ng/10⁵ células (200 µg/ml de CS) y 1.611 \pm 209 ng/10⁵ células (1.000 µg/ml de CS). Al igual que en el caso de AH, la normalización de resultados (porcentaje de inhibición de MMP-3) al comparar las distintas concentraciones de

CS en relación con el control basal mostró los resultados indicados en la figura 2. Las diferencias fueron significativas a las concentraciones de 10 µg/ml ($p = 0,042$), 50 µg/ml ($p = 0,004$), 100 µg/ml ($p = 0,004$), 150 µg/ml ($p = 0,002$), 200 µg/ml ($p = 0,004$) y 1.000 µg/ml ($p = 0,014$). Las distintas concentraciones testadas para AH y CS no presentaron diferencias significativas entre sí.

Inhibición de la secreción de MMP-1 en condrocitos estimulados con IL-1 β en presencia de AH y CS

En cuanto a la síntesis de MMP-1 en condrocitos incubados en presencia de IL-1 β , no se encontraron diferencias significativas a distintas concentraciones de AH y CS. Sin embargo, en ambos fármacos se observa una ligera tendencia a la disminución de los valores de MMP-1 a concentraciones entre 10-100 µg/ml, concentraciones parecidas a aquellas en las que ambas moléculas obtuvieron un efecto máximo sobre MMP-3 (resultados no mostrados).

Discusión

A pesar de haber numerosos estudios que demuestran la eficacia de CS y AH en el tratamiento sintomático de la AO, los mecanismos de acción propuestos para ambos fármacos siguen siendo objeto de controversia en la comunidad científica.

En la bibliografía del AH revisada destaca el trabajo de Homandberg et al¹⁰ publicado en 1997, donde se demostraba que el AH de 800 kDa bloqueaba la actividad de MMP-3 *in vitro* en un sistema de condrolisis gene-

rada por fragmentos de fibronectina. Del mismo modo, similares resultados se obtuvieron al utilizar un modelo clásico de menisectomía parcial en rodillas de conejo¹¹, donde inyecciones intraarticulares de AH inhibían MMP-3 y aumentaban los valores de TIMP-1 en cartílago y membrana sinovial, sin afectar a los de MMP-1. Finalmente, un estudio reciente realizado en cartílago humano¹² mostró que la utilización de AH de 800 kDa suprimía la producción de MMP-1, MMP-3 y MMP-13 estimuladas por IL-1 β , y daba soporte al uso clínico del AH de bajo peso molecular en el tratamiento de la AO. Estos autores hipotetizaban que dicho efecto se debía a la interacción entre AH y el receptor CD44 en la superficie de los condrocitos.

En cuanto al CS, Wang et al evaluaron su influencia sobre el anabolismo de la matriz extracelular de condrocitos tratados con IL-1 β cultivados en gel de agarosa¹³, y mostraron que podía estimular la producción de agregano, AH y colágeno tipo II. Aunque los autores postulaban que este efecto se debía, en parte, a la disminución de MMP, el estudio no demostró ninguna acción de CS sobre MMP-3. Por otro lado, el efecto de CS sobre la actividad de MMP-1 en hueso y cartílago se analizó en otro estudio sin que se encontrara efecto de CS sobre esta enzima proteolítica¹⁴.

Con referencia al AH, los datos presentados en nuestro trabajo para MMP-3, con respuestas significativas respecto a los controles basales, máximas a 50 y 1.000 $\mu\text{g/ml}$, son congruentes con los obtenidos por otros equipos. La existencia de AH de diferente peso molecular, con diferencias remarcables en su comportamiento *in vitro*⁸, obliga a precisar que el peso molecular del AH utilizado en este estudio se hallaba comprendido entre 500 y 730 kDa.

Por lo que respecta a CS y MMP-3, se obtuvieron resultados similares, en cuanto a comportamiento y dosis, al AH.

La ausencia de una relación dosis-respuesta en ambos fármacos queda explicada al obtenerse una respuesta notable a dosis de 50 $\mu\text{g/ml}$ sin que el resto de dosis presenten diferencias significativas entre sí.

La elevada desviación estándar obedece, sin duda, a la variabilidad que se obtiene al trabajar con condrocitos humanos, aumentada si cabe, por la ya de por sí variable respuesta a IL-1 β , ampliamente comentada en la bibliografía¹⁵.

A las dosis testadas CS no demostró disminución de los valores de MMP-1, dato que también se halla de acuerdo con la bibliografía consultada. Respecto al AH, sí hay bibliografía, aunque escasa, que demuestra su capacidad para disminuir MMP-1 en cultivos de condrocitos. En nuestro estudio AH sólo mostró una ligera tendencia a disminuir los valores de MMP-1 a las dosis

comentadas. El escaso número de muestras empleadas y la diferencia de peso molecular entre nuestro AH y el utilizado en algunos de los estudios comentados, impiden extraer conclusiones.

Así pues, los resultados que se aportan en el presente estudio demuestran por primera vez que CS inhibe la síntesis de MMP-3 en el cartílago artrósico humano. Dichos datos corroboran, a su vez, los ya existentes sobre la capacidad de AH de inhibir dicha enzima. En última instancia, nuestro estudio pretende explicar parte del mecanismo de acción de ambos fármacos en la patología artrósica. Sin embargo, son necesarios posteriores estudios para confirmar y completar nuestros resultados.

Bibliografía

- Murphy G, Knäuper V, Atkinson S, Butler G, English W, Hutton M, et al. Matrix metalloproteinases in arthritic disease. *Arthritis Res.* 2002; 4:S39-9.
- Fuchs S, Skwara A, Bloch M, Dankbar B. Differential induction and regulation of matrix metalloproteinases in osteoarthritic tissue and fluid synovial fibroblasts. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004;12:409-18.
- Morreale P, Manopulo R, Galati M, Boccanera L, Saponati G, Bocchi L. Comparison of the antiinflammatory efficacy of chondroitin sulfate and diclofenac sodium in patients with knee osteoarthritis. *J Rheumatol.* 1996;23:1385-91.
- Altman R, Moskowitz R. Intraarticular sodium hyaluronate (Hyalgan®) in the treatment of patients with osteoarthritis of the knee: a randomized clinical trial. Hyalgan Study Group. *J Rheumatol.* 1998;25:2203-12.
- Jordan KM, Arden NK, Doherty M, Bannwarth B, Bijlsma JW, Dieppe P, et al. Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials ESCISIT. EULAR Recommendations 2003: an evidenced based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). *Ann Rheum Dis.* 2003; 62:1145-55.
- Ronca F, Palmieri L, Panicucci P, Ronca G. Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate. *Osteoarthritis Cartilage.* 1998;6 Suppl A:14-21.
- Bali JP, Cousse H, Neuzil E. Biochemical basis of the pharmacologic action of chondroitin sulfates on the osteoarticular system. *Semin Arthritis Rheum.* 2001;31:58-68.
- Maneiro E, De Andrés MC, Fernández-Sueiro JL, Galdo F, Blanco FJ. The biological action of hyaluronan on human OA articular chondrocytes: the importance of molecular weight. *Clin Exp Rheumatol.* 2004;22:307-12.
- Vignon E, Mazieres B, Richard M, Anfeld M. In vitro evaluation of a chondroprotector. *Rev Rhum Mal Osteoartic.* 1990;57:15S-18S.
- Homandberg GA, Hui F, Wen C, Kuettner KE, Williams JM. Hyaluronic acid suppresses fibronectin fragment mediated cartilage chondrolysis in vitro. *Osteoarthritis Cartilage.* 1997;5:309-19.
- Han F, Ishiguro N, Ito T, Sakai T, Iwata H. Effects of sodium hyaluronate on experimental osteoarthritis in rabbit knee joints. *Nagoya J Med Sci.* 1999;62:115-26.
- Julovi SM, Yasuda T, Shimizu M, Hiramitsu T, Nakamura T. Inhibition of interleukin-1 β -stimulated production of matrix metalloproteinases hyaluronan via CD44 in human articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 2004;50:516-25.
- Wang L, Wang J, Almqvist KF, Veys EM, Verbruggen G. Influence of polysulphated polysaccharides and hydrocortisone on the extracellular matrix metabolism of human articular chondrocytes in vitro. *Clin Exp Rheumatol.* 2002;20:669-76.
- Li Z, Hou WS, Bromme D. Collagenolytic activity of cathepsin K is specifically modulated by cartilage-resident chondroitin sulfates. *Biochemistry.* 2000;39:529-36.
- Tardif G, Pelletier JP, Dupuis M, Geng C, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. Collagenase 3 production by human osteoarthritic chondrocytes in response to growth factors and cytokines is a function of the physiologic state of the cells. *Arthritis Rheum.* 1999;42:1147-69.