



**UNIVERSITATEA TEHNICĂ
"GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI**



**UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
GRIGORE T. POPA
IAȘI**

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE "GRIGORE T. POPA" IAȘI**



CONTRIBUȚII LA STUDIUL INFLUENȚEI FACTORILOR FIZICO-CHIMICI ASUPRA CONDROLIZEI

- Rezumatul tezei de doctorat -

Ilie Onu

Conducător de doctorat: Prof. Univ. Dr. Ing. Anca-Irina Galaction

Conducător de doctorat: Prof. Univ. Dr. Ionela Lăcrămioara Șerban

IAȘI, 2023

UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI
RECTORATUL

Către _____

Vă facem cunoscut că, în ziua de _____ la ora _____
în _____*, va
avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată:

**"CONTRIBUȚII LA STUDIUL INFLUENȚEI FACTORILOR FIZICO-CHIMICI
ASUPRA CONDROLIZEI"**

elaborate de domnul **ILIE ONU** în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat este alcătuită din:

1. Prof. Univ. Dr. Ing. Nicolae Hurduc, Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași – președinte
2. Prof. Univ. Dr. Ing. Anca Irina Galaction, Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași - conducător de doctorat
3. Prof. Univ. Dr. Ionela Lăcrămioara Șerban, Universitatea de Medicină și Farmacie „Grigore T. Popa” din Iași - conducător de doctorat
4. Dr. Ing. Cazacu Maria, Cercetător științific gr. I, Institutul de Chimie Macromoleculară "Petru Poni" Iași - referent oficial
5. Conf. Univ. Dr. Daniela Viorelia Matei, Universitatea de Medicină și Farmacie „Grigore T. Popa” din Iași - referent oficial
6. Prof. Univ. Dr. Dan Cașcaval, Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași - referent oficial

Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.

RECTOR, /



Prof. Univ. Dr. Ing. **Dan Cașcaval**

Secretar universitate,

Ing. **Cristina Nagiț**

CAPITOLUL 1

Obiectivele tezei de doctorat	3
-------------------------------------	---

CAPITOLUL 2

Stadiul actual al cercetărilor în studiul utilizării factorilor fizico-chimici în limitarea procesului de condroliză în Osteoartrita genunchiului	5
2.1 Articulația sinovială	5
2.1.2 Lichidul sinovial	6
2.1.2.1 Funcțiile lichidului sinovial	7
2.1.2.2 Proprietățile fizice ale lichidului sinovial	8
2.1.2.3 Proprietățile chimice ale lichidului sinovial	9
2.1.2.4 Proprietățile reologice ale lichidului sinovial	10
2.2 Condroliza	11
2.3 Osteoartrita genunchiului.....	12
2.4 Tratamente actuale	12
2.5 Tratamentul Osteoartritei genunchiului cu preparat vâscoelastic pe bază de acid hialuronic	13
2.6 Terapii fizical-instrumentale în Osteoartrita genunchiului	14

CAPITOLUL 3

3. Contribuții originale în studiul utilizării factorilor fizico-chimici în limitarea procesului de condroliză în osteoartrita genunchiului	15
3.1 Studiu clinic	15
3.1.1 Materiale și metode studiu clinic	15
3.1.2 Pacienți și date demografice	16
3.1.3 Vâsco-suplimentarea cu acid hialuronic	17
3.1.4 Tratamentul de fizioterapie	18
3.1.5 Evaluare clinică funcțională	19
3.1.6 Rezultate studiu clinic	20
3.2 Studiu reologic	24
3.2.1 Materiale și metode studiu reologic	24

3.2.1.1 Depunerea picăturilor de lichid sinovial și spectroscopia în IR cu transformată Fourier cu reflexie totală atenuată (ATR-FTIR)	26
3.2.1.2 Caracterizarea reologică a lichidului sinovial	26
3.2.1.3 Proprietăți de bioadeziune	28
3.2.2 Rezultate studiu reologic.....	29
3.2.2.1 Efectul acidului hialuronic asupra caracteristicilor lichidului sinovial	29
3.2.2.2 Date în domeniul IR cu transformată Fourier (FTIR)	30
3.2.2.3 Proprietăți reologice	33
3.2.2.4 Caracteristicile filmogene și proprietățile bioadezive	39

CAPITOLUL 5

Concluzii generale	42
Bibliografie	45
Diseminarea rezultatelor	49

CAPITOLUL 1

OBIECTIVELE TEZEI DE DOCTORAT

Lucrarea de doctorat abordează Osteoartrita Genunchiului (OAG) din perspectiva modificărilor fizico-chimice și biologice ale procesului de condroliză și își dorește în acest sens să realizeze o punte de legătură între terapia farmacologică și fizioterapia (FT). În această lucrare este dezbătută condroliza ca efect distructiv prezentă în OAG, practic, procesul lent de degradare al cartilajului articular, urmărit din prisma fenomenelor biochimice și biofizice.

Ca urmare a faptului că nu există o direcție clară și acceptată de specialiștii în sănătate, prin care să se ofere soluții reale pentru limitarea progresiei OAG dată de condroliză, această lucrare își propune să găsească o soluție la rezolvarea acestei probleme, asociind mijloace deja folosite în terapia de recuperare, precum vâcosuplimentarea cu acid hialuronic (AH) și terapiile fizicale care protejează, țin sub control durerea, reduc inflamația și stimulează țesuturile articulare.

Obiectivul principal este înțelegerea fenomenelor patogenice ale declanșării și întreținerii fenomenului de condroliză din prisma modificărilor reologice ale lichidului sinovial (LS) din OAG moderată.

Contribuțiile originale care vor duce la dezvoltarea acestui domeniu constau în:

- Studiul mecanismului producerii fenomenului de condroliză,
- Studiul limitării progresiei condrolizei utilizând factori chimici și fizici,
- Stabilirea eficienței fiecărei terapii și a nivelului de intervenție în parte, în funcție de factorii predispozanți ai OAG în raport cu proprietățile reologice ale LS,
- Corelarea datelor obținute din examinările clinico-funcțională și reologică, pentru a înțelege fenomenele de alterare a biomecanicii articulare a genunchiului,
- Prelucrarea datelor de input și output prin colectarea, analiza și generarea de rezultate obținute din măsurători clinico-funcționale și reologice în mai mulți pași și compararea acestora din perspectiva clinică și reologică,
- Generarea de concluzii și discuții critice obiective, care să îmbunătățească cunoașterea fenomenelor de condroliză, cu implicațiile clinice și reologice,
- Pe baza informațiilor relevante obținute, se dorește optimizarea protocoalelor actuale de tratament recuperator prin mijloacele combinate fizicale și farmacologice ale OAG.

Din perspectiva rezultatelor așteptate, studiile întreprinse aduc o contribuție originală și semnificativă la cunoașterea aprofundată a fenomenelor de condroliză în OAG și a eficienței limitării progresiei prin folosirea în mod țințit a terapiilor farmacologice și fizicale, combinate în diferite stadii și necesități. Scăderea consumului de analgezice și antiinflamatorii sistemice, care se prescriu de către medicii de specialitate, cu efecte nocive asupra sistemului digestiv, ale aparatului excretor și sistemului cardiovascular este absolut necesară în practica medicală.

OAG este o afecțiune progresivă și invalidantă, cu strategii oarecum ineficiente de tratament. Creșterea nivelului de înțelegere al factorilor predispozanți, a apariției fenomenului acut inflamator și perpetuarea mecanismelor care întrețin în mod latent inflamația cronică, care dezvoltă în timp un efect distructiv asupra cartilajului articular, duce la limitarea efectelor negative ale OA, temporizarea evoluției și combaterea optimă a fenomenelor care întrețin cercul vicios: inflamație → producție de enzime → condroliză → inflamație.

Înțelegerea comportamentului reologic al LS din OAG deschide noi orizonturi pentru îmbunătățirea preparatelor pe bază de AH, momentul administrării acestuia, protejarea soluției injectate pe o perioadă mai mare de un an cu ajutorul terapiilor care utilizează agenți fizici aplicați extraarticular.

Finalitatea temei o constituie îmbunătățirea eficienței terapiei combinate vâcosuplimentare cu AH → FT în OAG pentru a crește rata de câștig în terapia durerii, controlul eficient al inflamației și reducerea dizabilității fizice, ținând cont de modificările reologice ale LS.

Astfel, principalele rezultate așteptate în urma atingerii obiectivelor propuse constau în obținerea unor strategii eficiente de a limita apariția și progresia condrolizei din OAG, folosind compuși chimici siguri și terapii fizicale cu eficiență maximă și efecte secundare minime, disponibile pe piață în acest moment.

Pentru a se îndeplini obiectivele propuse au fost realizate două studii în paralel, cu nouă etape procedurale.

Primul studiu a fost clinic și a constat în recuperarea pacienților cu OAG moderată, utilizând vâcosuplimentare cu AH versus combinația AH și FT.

Al doilea studiu a fost de reologie și spectrometrie, în care au fost evaluate efectele FT asupra caracteristicilor reologice ale LS la pacienții cu OAG moderată care au fost vâcosuplimentați cu AH.

CAPITOLUL 2

2. STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRILOR ÎN STUDIUL UTILIZĂRII FACTORILOR FIZICO-CHIMICI ÎN LIMITAREA PROCESULUI DE CONDROLIZĂ ÎN OSTEOARTRITA GENUNCHIULUI

2.1 Articulația sinovială

Articulația este acea structură anatomică care permite mișcarea în corpul uman, fiind constituită din elemente care leagă între ele două sau mai multe oase. Astfel, în corpul uman se delimitează două grupe de articulații: articulațiile sinoviale (diartroze), în care oasele participante rămân separate, cu posibilitatea de a executa mișcări cu amplitudine ridicată, și sinartrozele în care mișcarea este extrem de limitată sau chiar nulă [1].

Articulația sinovială este compusă din mai multe elemente: capete osoase acoperite cu un strat gros (între 2 și 4 mm) și alunecos fibrocartilagos numit cartilaj articular, elemente de stabilizare pasivă (ligamente), capsula articulară care ermetizează articulația, (fiind căptușită la interior cu membrana sinovială), lichid sinovial (cu rol trofic și lubrifiant), vase de sânge, nervi, mușchi și tendoane (elemente de stabilizare active).

Pentru a rezista forțelor de frecare și distribuirii sarcinilor mecanice externe, articulațiile sinoviale prezintă un țesut vâscoelastic specializat neted, rezistent, flexibil și alunecos, de origine mezenchimală, denumit cartilaj articular sau hialin. Acesta are un comportament mecanic unic, dar cu capacități limitate de refacere. Cartilajul hialin este compus din condrocite care produc și mențin matricea extracelulară a cartilajului. În compoziția acestui țesut intră 65 - 80% apă, condrocite, condroblaste, colagen de tip II și proteoglicani [2].

2.1.1 Cartilajul articular

Cartilajul articular este un țesut moale, alcătuit din colagen și proteoglicani, organizat în formă de matrice, care găzduiește celule specializate numite condrocite. Proprietățile mecanice și biologice ale cartilajului sunt complexe, făcând ca această structură anatomică să aibă proprietăți biomecanice deosebite, precum rezistența la șocuri mecanice și la uzură, asigurând o cursă mecanică lină. O proprietate deosebită a cartilajului articular este capacitatea lui de a

absorbi șocurile mecanice de până la opt ori greutatea corporală. Când integritatea lui este afectată, această proprietate este și ea afectată [3,4,5].

Leziuni condrale și OA afectează atât cartilajul articular, cât și structurile înconjurătoare, generând durere, disconfort articular, limitarea mișcării și modificări osoase, inclusiv de biomecanică articulară. OA este o boală degenerativă a întregii articulații, care este provocată de o eroziune degenerativă și progresivă a cartilajului articular. Radio-imagistic OA, se prezintă prin îngustarea radiografică a spațiului articular, iar clinic aceasta se manifestă prin durere și rigiditate. Îngustarea radiografică a spațiului articular este direct proporțională cu pierderea grosimii cartilajului articular, putând astfel să fie evaluat stadiul de degenerare al articulației [6,7].

2.1.2 Lichidul sinovial

Lichidul sinovial (LS), este un fluid vâscos, non-newtonian, care se găsește în interiorul articulațiilor sinoviale. LS este un fluid vâscoelastic care are un comportament nelinier, deoarece coeficientul de vâscozitate nu este o constantă. LS este un dializat al plasmei sanguine, fiind suplimentat cu molecule mari, bogate în zaharide (hialuronan și proteoglicanul-4). LS prezintă caracteristici tixotropice în care vâscozitatea scade și fluidul își pierde calitățile, pe o perioadă de stres continuă. LS normal (sănătos) conține 3-4 mg / ml acid hialuronic (hialuronan), polimer compus din acidul D-glucuronic și D-N-acetilglucozamina, îmbinate prin legături alternante de beta-1,4 și beta-1,3 glicozidice. AH este sintetizat de membrana sinovială, având rolul de a mări vâscozitatea și elasticitatea cartilajelor articulare, dar și pentru o lubrifiere a suprafețelor dintre sinoviu și cartilaj [8,9].

LS este implicat în asigurarea funcțiilor articulare și include componente moleculare mici și macromoleculare, în general secretate de celule. Lubrifierea în articulația sinovială naturală este posibilă sub acțiunea LS. O articulație sinovială cu compoziție LS este prezentată în Figura 1. Principalele componente ale LS sunt AH, lubricina, proteinele și fosfolipidele active la suprafață (în special fosfatidilcolina). Acești lubrifianți sunt secretați de celule (condrocite în cartilajul articular și sinoviocite în membrana sinovială) și concentrați în cavitatea articulară, iar deficiențele în această compoziție sau structură lubrifiantă contribuie la deteriorarea suprafețelor cartilajului articular [10]. Componenta principală a LS este AH, o polizaharidă

liniară formată din unități disacaridice repetate de acid D-glucuronic și N-acetilglucozamină legate prin legături β (1, 4) și β (1, 3) glicozidice (Figura 1).

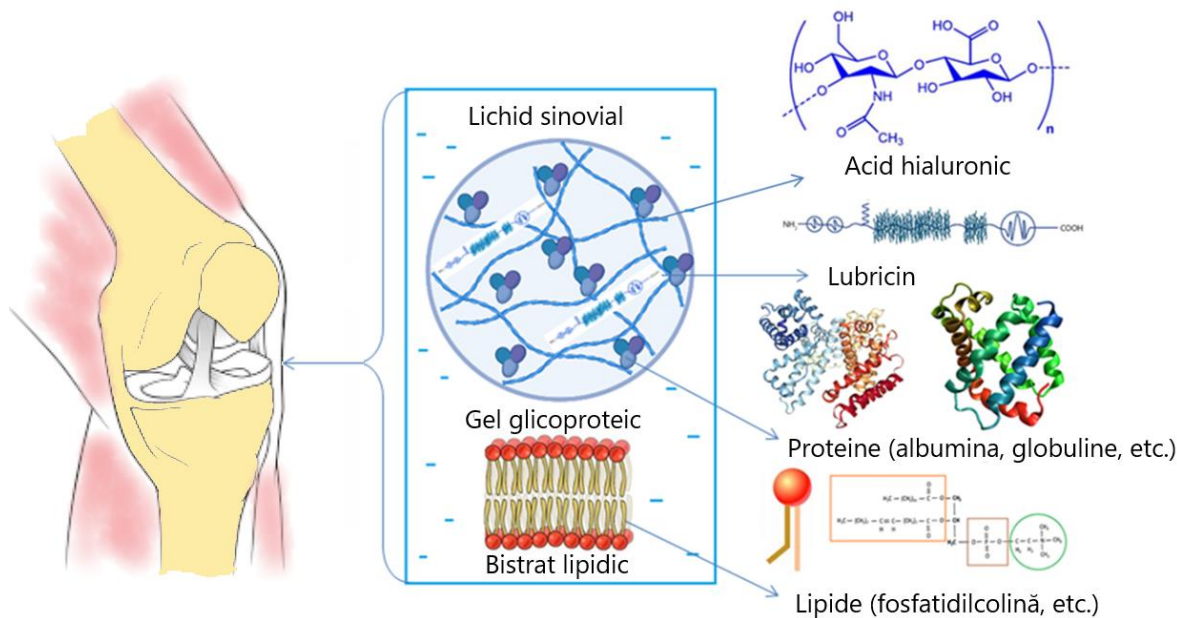


Figura 1. Compoziția lichidului sinovial (LS)

2.1.2.1 Funcțiile lichidului sinovial

LS are proprietăți biomecanice și fiziologice complexe, datorită comportamentului reologic unic, dar și a compoziției sale chimice. Trei funcții importante ale LS se deosebesc în articulația sinovială sănătoasă:

Reducerea frecării. LS se comportă ca un lubrifiant, pentru a asigura ungerea optimă și îndelungată a tuturor structurilor articulare, protejând astfel cartilajul articular supus uzurii mecanice constante și ritmice. În timpul mișcării, LS este reținut în cartilaj, și ulterior stors pentru a menține o peliculă de fluid pe suprafața cartilajului articular.

Absorbția șocurilor mecanice. Ca fluid dilatant, LS are capacitatea, de a deveni mai vâscos sub o presiune aplicată. LS devine mai vâscos în momentul aplicării forței de forfecare pentru a proteja articulația, și ulterior revine la vâscozitatea inițială pentru a-și relua funcția de lubrifiere dintre șocuri.

Transportul nutrienților și al deșeurilor. Având în vedere particularitățile articulației, LS acționează ca mediu de transport pentru substanțele nutriționale, cum ar fi glucoza. Glucoza

este esențială pentru a genera energia metabolică necesară cartilajului articular, aceasta fiind transportată de la exterior spre interior către cartilaj cu ajutorul LS prin vascularizarea periarticulară. LS furnizează oxigen și substanțe nutritive dar asigură și eliminarea dioxidului de carbon și a deșeurilor metabolice de la condrocitele din cartilajul articular [9,11,12].

2.1.2.2 Proprietățile fizice ale lichidului sinovial

Vâscozitatea LS este, cu siguranță, unul dintre cei mai urmăriți parametri în evaluarea stării de sănătate a structurilor articulare, fiind folosită ca reper în diferite patologii inflamatorii, degenerative și infecțioase din articulațiile umane. Vâscozitatea LS normal este foarte ridicată (1 Pa·s) datorită concentrației înalte de hialuronat polimerizat [13,14].

Cantitatea de LS conținută în articulații este de 1-5 ml. Volumul LS în articulația genunchiului sănătos conține până la 4 ml de lichid, și orice depășire a volumului acestuia indică o inflamație articulară.

Temperatura LS normal în repaus este de 32°C, acest lucru datorându-se faptului că articulațiile periferice sunt mai reci decât temperatura corpului, cu o valoare a pH-ului de 7,4 [15]. LS joacă un rol important în reglarea temperaturii cartilajului articular în timpul încărcării dinamice, influențând temperatura articulației. În dinamică, temperatura cartilajului articular și al LS va crește în funcție de tipul de activitate și timpul de lucru.

Culoare: LS sănătos este galben pal și orice modificare de culoare indică potențialul patologic. În stări posttraumatice, LS este portocaliu sau roșu, în artrită septică poate fi colorat de cromogeni bacterieni, iar în cazul infecțiilor sau artropatiilor inflamatorii este crem sau alb.

Claritate: LS sănătos este limpede, iar pe măsură ce este contaminat cu diferite particule, trece printr-o fază de opalescență către opacitate. Nivelul de opacitate oferă informații despre celularitatea și/sau conținutul de cristale din LS.

Vâscozitatea: LS sănătos are o consistență mucoidă groasă, iar pierderea acestei proprietăți este o consecință a digestiei enzimaticice și a sintezei alterate a moleculelor. Consistența mucoidă este rezultatul interacțiunilor complexe dintre proteoglicani și proteine, iar scăderea acestei consistențe este o urmare a bolilor inflamatorii [12,16].

2.1.2.3 Proprietățile chimice ale lichidului sinovial

LS este un lubrifiant biologic, care are o rată de degradare redusă deoarece poate fi privit ca un depozit biochimic, prin care trec nutrienții necesari întreținerii cartilajului și citokinele cu proprietăți reglatorii. LS are în compoziție molecule care reduc fenomenele de frecare și de uzură de la nivelul cartilajelor împiedicând degradarea precoce a articulațiilor sinoviale [17,18].

LS sănătos este compus dintr-o serie de molecule care joacă un rol cheie în lubrifiere:

- hialuronanul (AH) 1-4 mg/ml
 - proteoglicanul 4 (PRG4) 0,05-0,35 mg/ml
 - fosfolipidele tensioactive de suprafață 0,1 mg/ml (SAPL, în special fosfatidilcolina)
- [17].

Acidul Hialuronic

AH ($C_{33}H_{54}N_2O_{23}$) este un carbohidrat natural care se găsește în corpul uman și are masă molară de 846,786 g/mol. AH este compus din unități repetitive de N-acetil-d-glucosamină și acidul d-glucuronic cu masa moleculară cuprinsă între 6500 și 10900 kDa (Figura 2). Cele două zaharuri sunt legate spațial de glucoză în configurația β . Structura dizaharidului este foarte stabilă din punct de vedere energetic, deoarece permite tuturor grupurilor sale voluminoase de hidroxili (fracțiunea carboxilat) și carbonul anomic (de pe zahărul adiacent) să se afle în poziții ecuatoriale favorabile din punct de vedere steric. Poziția ecuatorială favorabilă a grupurilor voluminoase de hidroxilii face ca toți atomii de hidrogen să ocupe poziții axiale mai puțin favorabile din punct de vedere steric. Structura AH este unică prin dimensiunea sa, catena ajungând până la câteva milioane de Daltoni. AH este sintetizată la nivelul membranei plasmatică unde glicozaminoglicanii sulfatați sunt adăugați la nucleele proteice, cu efect de umplere a spațiilor extracelulare dintre fibrele de colagen [18,19].

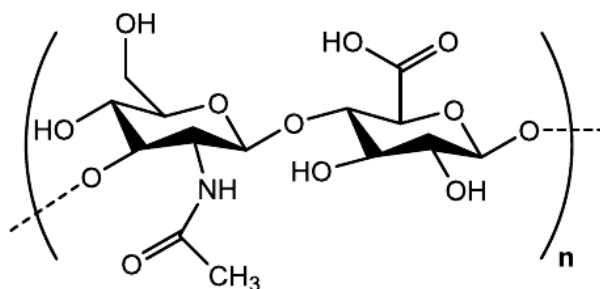


Figura 2. Acidul hialuronic (AH)

AH este prezent în majoritatea țesuturilor conjunctive și în special în LS. Funcțiile AH în articulație sunt: lubrifierea, reglarea activităților celulare, cum ar fi legarea proteinelor și mai servește ca agent de curățare pentru radicalii liberi.

Comportamentul AH în structurile biologice este de a fixa apa, de a lubrifia structurile intracelulare și de a da "volum", formând o matrice gelatinoasă cu care fibrele de elastină și collagen sunt coagulate și aliniat între ele. Degradarea AH este un proces etapizat care poate avea loc prin reacții enzimatice sau non-enzimatice. O reducere a greutatei moleculare a AH prin degradare sau încetinirea sintezei afectează proprietățile fizice și chimice, cum ar fi volumul, vâscozitatea și elasticitatea țesuturilor [20].

2.1.2.4 Proprietățile reologice ale lichidului sinovial

LS este un fluid vâscoelastic, acest lucru datorându-se prezenței AH care este un dizaharat polimerizat, cu lanțuri lineare de 2500 de unități, compus la rândul său din acid glicuronic și glicozamină. AH se găsește în concentrație de 3,5mg/mL în LS normal și este dovedit că scade în afecțiuni diverse și în procesul normal de îmbătrânire. LS este un fluid polimeric, cu un comportament non-newtonian, având proprietăți elastice, iar în interiorul acestuia se dezvoltă tensiuni de forfecare, normale și tangențiale. Comportamentul vâscoelastic face ca LS să se adapteze la diferitele solicitări variabile de la nivelul articulației sinoviale, atât în mișcare liberă, cât și în sarcină [21].

LS normal (sănătos) este un fluid non-newtonian, vâscozitatea acestuia depinzând de viteza de forfecare, LS subțindu-se în condiții de presiune și forfecare. Proprietățile reologice ale LS din articulațiile normale, cu OA și artritice, au fost investigate în mai multe studii de-a lungul timpului și s-a demonstrat că vâscozitatea LS va scădea de la normal către mai puțin

vâscos în LS degenerativ din OA, urmat de LS la bolile inflamatorii, care tinde să-și piardă proprietățile non-newtoniene [22,23,24,25,26].

2.2 Condroliza

Condroliza este un proces complex de distrugere progresivă a țesutului cartilajinos și este întâlnită fiziologic în procesele de formare și remodelare osoasă sau patologic în fenomenele de degradare a cartilajului articular pe suprafețe osoase mari în OA. Condrocitele sunt celulele implicate în procesul de condroliză, dar și în reabsorbția cartilajului [27].

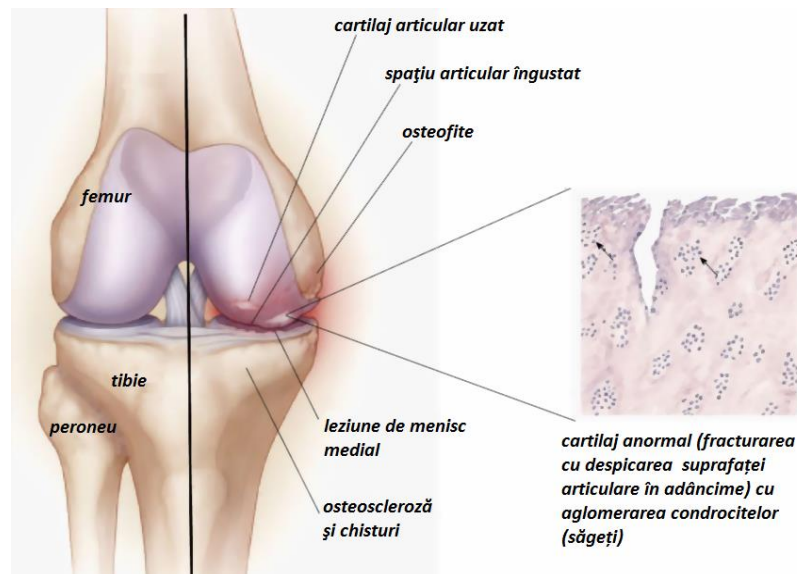


Figura 3. Articulația genunchiului sănătos în partea stângă; în partea dreaptă se observă modificările fiziopatologice prezente în Osteoartrita Genunchiului (OAG) [90]

Degradarea articulară în OA este un fenomen complex, datorat concursului a trei mari procese distructive: condroliza, producția de osteofite marginale și inflamația nespecifică intermitentă a sinovialei. Ca fenomen patologic în OA, condroliza este produsă de condrocitul modificat fenotipic pe baza unor cantități ridicate de enzime metaloproteaze și citokine pro-inflamatorii de tipul interleukinelor de tip 1 (IL-1) și TNF- α (casetina). Pierderea progresivă a cartilajului articular se realizează printr-un fenomen complex de abraziune și deteriorare al acestuia în zonele de sprijin, urmat de o un proces de reparație precară a leziunilor

cartilaginoase prin modificări sclerozante ale osului subcondral, apariția de chisturi și formarea de osteofite marginale (Figura 3) [17,25,28]

2.3 Osteoartrita genunchiului

OAG a fost în mod tradițional clasificată ca o artrită neinflamatorie și totuși granița dintre artrita inflamatorie și cea degenerativă devine mai puțin clară odată cu recunoașterea unei multitudini de procese imune în curs de desfășurare prezente în condroliză. În patogeneza OAG primare joacă un rol covârșitor inflamația membranei sinoviale și a întregii articulații, alături de prezența sinoviților [29].

Din punct de vedere biochimic, produsele de distrugere a cartilajului sunt eliberate în LS și ulterior fagocitozate (proces de înglobare și de digerare a bacteriilor și a altor corpuri străine din organism) de către celulele sinoviale, aceasta ducând la supra-inflamarea sinovialei [30]. Patogenic, OAG este practic o tulburare a echilibrului de sinteză - degradare a cartilajului și osului subcondral prin care apar leziunii cartilaginoase, scleroză subcondrală, osteofitoză și chisturi osoase [29,31].

Din punct de vedere clinic, OAG nu este o simplă afecțiune, ci mai degrabă este o cale comună secundară finală a cumulului de factori predispozanți, precum: vârsta, biomecanica modificată, obezitatea, traumatisme și microtraumatisme. În tabloul clinic sunt prezente limitarea mobilității, deformarea și mărirea în volum a articulației alături de durerea persistentă. Modul în care astfel de procese biochimice și biofizice contribuie la progresia OAG este strâns legat de interacțiunea leziunilor articulare, răspunsul imun la deteriorările articulare și la menținerea inflamației cronice, care are ca rezultat propagarea și progresia spre fenotipul recunoscut ca fiind clinic al OA [32].

2.4 Tratamente actuale ale Osteoartritei Genunchiului

Tratamentul pentru OAG poate fi împărțit în nechirurgical (conservator) și chirurgical. Tratamentul inițial al OAG începe cu modalitățile nechirurgicale și trece la tratamentul chirurgical odată ce acestea nu mai sunt eficiente. O gamă largă de modalități nechirurgicale este disponibilă pentru tratamentul OAG. În prezent, aceste intervenții nu modifică foarte mult procesul bolii de bază, dar pot diminua substanțial durerea și dizabilitatea [32,33,34].

Terapia farmacologică este tratamentul de primă linie pentru pacienții cu OAG simptomatică. Sunt disponibile multiple variante de AINS, iar durata tratamentului cu AINS trebuie să se bazeze pe eficiență, raport beneficii-efecte adverse și istoricul medical anterior al pacientului cu OAG. AAOS recomandă utilizarea AINS și de suplimente alimentare, precum glucozamina și sulfatul de condroitină. Acestea sunt denumite condroprotectoare, deoarece sunt componente structurale ale cartilajului articular [35].

Injecțiile intraarticulare de corticosteroizi pot fi utile pentru OAG simptomatică, în special atunci când există o componentă inflamatorie considerabilă iar medicația clasică nu își face efectul dorit. Administrarea corticosteroidului direct în genunchi poate reduce inflamația locală asociată cu Sinovita și minimiza efectele sistemice ale steroidului [33,36].

2.5 Tratamentul Osteoartritei genunchiului cu preparat vâscoelastic pe bază de acid hialuronic

Injecțiile intraarticulare cu AH reprezintă o altă opțiune de tratament a OAG pe lângă corticosteroizi. Administrarea locală de AH în articulație acționează ca un lubrifiant și poate contribui la creșterea producției naturale de AH în articulație. [33].

S-a constatat că injectarea intraarticulară de AH restabilește vâscoelasticitatea LS la pacienții cu OAG și scade valoarea citokinelor cu efect proinflamator și numărul de celule de căptușeală, limfocite și macrofage, și crește numărul de fibroblaste și cantitatea de collagen după suplimentarea cu geluri de AH [37,38].

În timpul progresiei OA, AH endogen din articulație este depolimerizat, ceea ce diminuează în consecință proprietățile mecanice și vâscoelastice ale LS din articulația afectată. AH are un efect de umplere a spațiilor extracelulare dintre fibrele de collagen. AH, prin proprietățile sale biomecanice, realizează un sistem de dispersie mobil din care rezultă gelul sinovial. Sistemul de dispersie mobil interconectează macromoleculele de AH, formând o rețea tridimensională din care apa rămâne captivă în acel mediu. Macromoleculele AH formează o rețea spațială într-o soluție de apă, iar lanțurile de polimeri din noduri sau zonele cu noduri sunt interconectate între ele, dând naștere unei plase fizice. Comportamentul AH în structurile biologice este de a atrage apa, de a lubrifia structurile intracelulare și de a da "volum", formând o matrice gelatinoasă cu care fibrele de elastină și collagen sunt coagulate și aliniat. [33,39,40].

2.6 Terapii fizical-instrumentale în Osteoartrita genunchiului

Fizioterapie (FT) este cea mai importantă componentă a recuperării medicale, care este utilizată pentru dezvoltarea, menținerea și restabilirea capacității de mișcare și a capacității funcționale la nivelul maxim posibil, pe tot parcursul vieții. FT este o formă de tratament a tulburărilor musculo-scheletice cu ajutorul agenților fizici precum: electroterapia, laserterapia, masajul terapeutic, fototerapia, câmpuri magnetice pulsate, diametria, kinetoterapia, termoterapia, terapia manuală etc. [41].

TENS (stimularea electrică nervoasă transcutanată) este o metodă de electroterapie larg răspândită cu efect principal antialgic. TENS sunt curenți rectangulari monfazici sau bifazici, pulsați și distribuiți pe suprafața intactă a pielii, pentru a activa nervii subiacenți. TENS activează selectiv aferențele non-nociceptive cu diametru mare (A- β) pentru a reduce sensibilitatea și activitatea nociceptorilor la un nivel segmentar. Curentul pulsat TENS poate fi modulat în frecvență, timp și amplitudine, acest lucru limitând adaptarea la curent. [42,43,44].

În tratamentul OAG este folosit Laserul de mica putere cu efecte analgezice, biostimulante și antiinflamatorii. Efectul antiinflamator al laserului este datorat vasodilatației locale care este asociată cu ruperea barierei ischemice, fapt ce va influența echilibrul ionic la nivel membranar [45].

Tratamentul cu ultrasunete reprezintă o formă de fizioterapie de înaltă frecvență, în care vibrațiile mecanice ating frecvențe cuprinse între 1 și 3 MHz. La nivel celular, ultrasunetele acționează ca o serie de condensări și rarefieri repetate ale particulelor materiale, pe direcția de propagare a undelor mecanice oscilante. Tratamentul cu ultrasunete poate avea efecte de reparare ale cartilajului articular [46,47].

Crioterapia este o formă de intervenție non-farmacologică, care este utilizată pe scară largă în controlul inflamației, al edemului și al gestionării durerii [48]. Crioterapia aplicată pe un model animal cu OAG indusă, reduce inflamația sinovială datorită migrației scăzute a leucocitelor, dar și a concentrației de citokine inflamatorii de la nivelul cavității articulare a genunchiului [49]. În acest studiu am introdus crioterapia ca procedură la sfârșitul programului de fizioterapie, pentru a reduce temperatura de la nivelul genunchiului, care poate crește în timpul exercițiilor de kinetoterapie și pentru protejarea biopolimerului pe bază de acid hialuronic, injectat anterior programului recuperator fizioterapeutic.

Exercițiile de kinetoterapie sunt utilizate pentru a limita pierderea funcției articulare cauzată de OAG. Kinetoterapia este utilizată pentru a gestiona simptomele OAG și pentru a optimiza calitatea vieții. Exercițiile fizice regulate previn degradarea articulațiilor și mențin mobilitatea articulară și tonusul muscular, crescând astfel stabilitatea și coordonarea articulară la pacienții cu OAG. Majoritatea ghidurilor clinice recomandă exercițiile de kinetoterapie, alături de educarea pacientului și pierderea în greutate [50,51].

CAPITOLUL 3

3. CONTRIBUȚII ORIGINALE ÎN STUDIUL UTILIZĂRII FACTORILOR FIZICO-CHIMICI ÎN LIMITAREA PROCESULUI DE CONDROLIZĂ ÎN OSTEOARTRITA GENUNCHIULUI

3.1 Studiu clinic

3.1.1 Materiale și metode studiu clinic

În perioada ianuarie 2020 - ianuarie 2022 a fost realizat un studiu observațional monocentric în secțiile de ortopedie și fizioterapie ale Clinicii Micromedica din Piatra Neamț. Studiul a fost aprobat de către Comitetul de Etică pentru Cercetare Științifică al Clinicii Micromedica cu nr.32 din 28.01.2020 și s-a desfășurat în conformitate cu declarația de principii etice de la Helsinki (anexa 1). Toți pacienții incluși în studiu au semnat consimțământul informat (anexa 2). Studiul a fost realizat pe un grup de 52 de pacienți diagnosticați cu OAG în stadiul KL 2, pe baza examinării radiologice antero-posterioare a genunchiului bilateral cu subiectul în poziție ortostatică.

Raportul studiului respectă diagrama de flux CONSORT (Consolidated Standards of Reporting Trials), utilizând lista de verificare CONSORT (Figura 4) [52].

Produsul de vâscosuplimentare a fost administrat intra-articular de către medicul ortoped, iar toate documentele medicale și cele care privesc activitatea de cercetare științifică au fost asumate. Diagnosticul clinic, infiltrațiile intraarticulare cu Kombihylan[®], prelevarea de LS și prescripția programului de recuperare prin mijloace fizioterapeutice a fost realizată de către medicul ortoped. Evaluarea VAS, AM, WOMAC, a Forței musculare (F), aplicarea programului de FT și evaluarea reologică a LS sunt studii proprii, incluse în lucrarea de doctorat.

3.1.2 Pacienți și date demografice

Grupul Pilot (GP) a fost alcătuit din 37 de pacienți ($n = 37$) care au beneficiat de vâscosuplimentare intraarticulară cu un produs vâscoelastic steril pe bază de AH (Kombihylan®) și de 10 ședințe consecutive de FT. Grupul de Control (GC) a fost format din 15 pacienți ($n = 15$) care au fost tratați cu Kombihylan®, fără ședințe de fizioterapie. Pacienții au avut o distribuție egală în funcție de gen, 26 au fost bărbați și 26 femei cu vârste cuprinse între 47 și 61 de ani, cu o greutate între 65 și 110 kg și cu înălțimi între 154 și 186 cm.

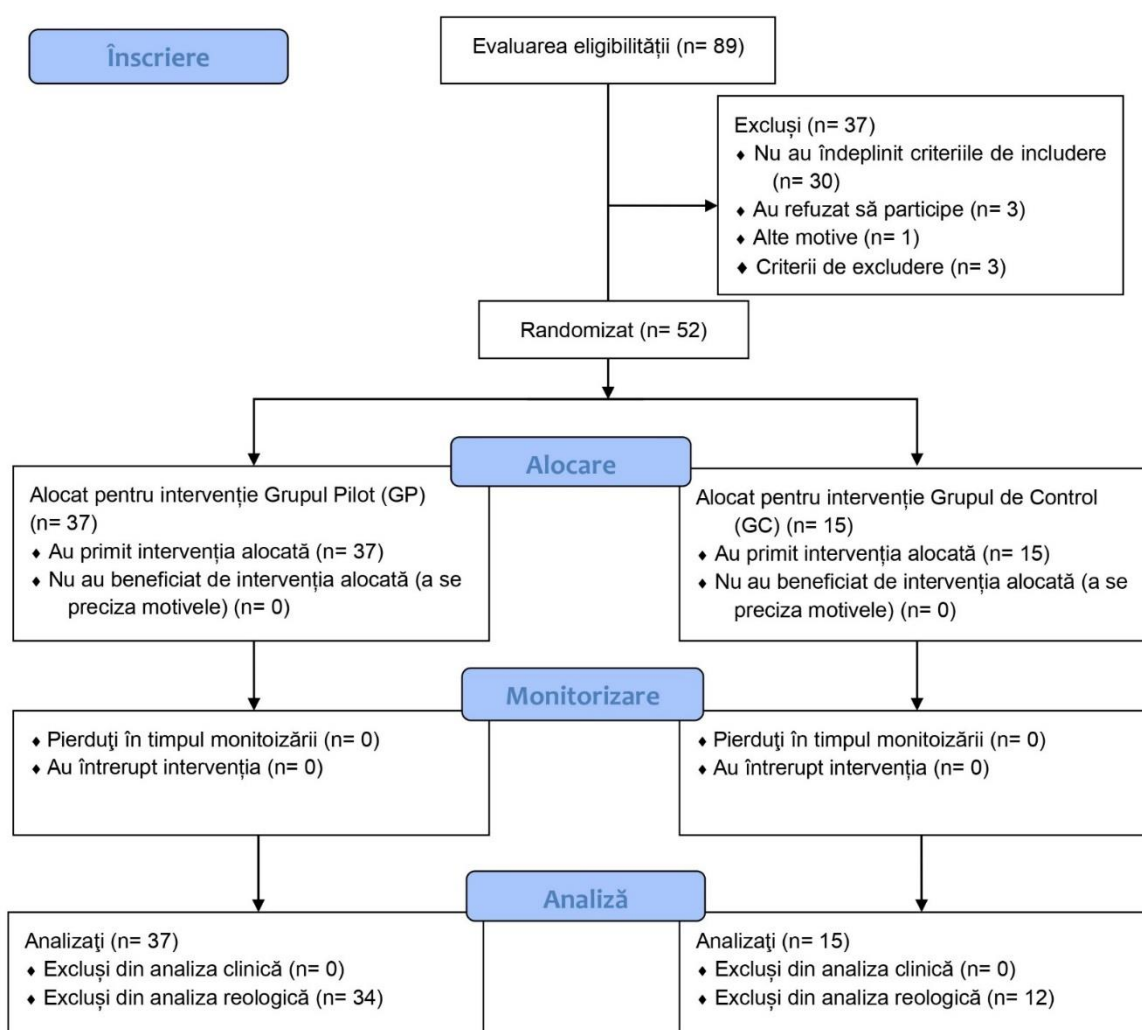


Figura 4. Diagrama de flux CONSORT a progresului prin fazele unui studiu randomizat pe două grupuri

3.1.3 Vâscosuplimentarea cu acid hialuronic

Dispozitivul medical cu denumirea comercială Kombihylan[®] a fost folosit ca produs de vâscosuplimentare pentru toți pacienții înrolați în acest studiu. Kombihylan[®] a fost achiziționat de la Ropharm[®] România, obținând și acordul pentru folosirea produsului în scop de cercetare științifică (anexa 3).

Kombihylan[®] este o matrice biologică cu o greutate moleculară de 3 MDa sub forma unei soluții sterile, vâscoelastice conținând AH și condroitină sulfat de sodiu, doi polimeri biologici reticulați fizic, înalt purificați și N-acetilglucozamină, un aminozahăr natural (tabelul 2). AH este obținut prin fermentație bacteriană a unei tulpini de *Streptococcus*. Condroitina sulfat de sodiu este obținută din cartilaj de trahee de bovină (nu-și schimbă parametrii reologici). N-acetilglucozamina este obținută din chitină, un polimer natural cu catenă lungă, extras din creveți (Figura 5).



Figura 5. Prezentarea comercială a produsului Kombihylan[®]

Kombihylan[®] este o soluție vâscoasă compusă din AH, condroitină sulfat de sodiu întrepătrunsă fizic și asociată sinergic cu N-acetilglucosamină (tabelul 1 și 2). Prin adăugarea de condroitină sulfat de sodiu, a fost realizată o reticulare fizică naturală, oferind o întărire mecanică și o reologie îmbunătățită, cu păstrarea biocompatibilității și biodegradabilității produsului inițial. În același timp, se obține o rezistență mai bună la degradarea enzimatică. Proprietățile mecanice ale produsului sunt mult îmbunătățite prin reticulare cu agenții fizici sau chimici.

Tabelul 1. Kombihylan[®], compoziție și cantități (din date provenite de la producător)

Calitativ	mg/2,25 ml
Hialuronat de sodiu	36,0
Condroitină sulfat de sodiu	67,5
N-acetilglucozamină	67,5
Clorură de sodiu	9,675
Dihidrogen fosfat dihidrat de sodiu	1,163
Fosfat disodic dodecahidrat	11,340
Hidroxid de sodiu sau acid fosforic	pH = 7,4 ± 0,2
Apă pentru preparate injectabile	până la 2,25 ml

Tabelul 2. Formula produsului Kombihylan[®], materii prime, cantități și calități (din date provenite de la producător)

Caracteristici	Limite acceptate
Aspect	Soluție clară și vâscoasă
Culoare	Soluție incoloră → maro-gălbuie
Particule vizibile	fără particule vizibile
pH	pH = 6,5-7,6
Osmolalitate, mOsmoli / kg	440 - 540
Densitate relativă g/cm ³	1,022-1,062
Analiza hialuronatului de sodiu, mg/2.25 ml	34,2 - 37,8
Analiza condroitină sulfat de sodiu, mg/2.25 ml	64,1 – 70,9
Analiza N-acetilglucozamina, mg/2.25 ml	60,7-70,9

3.1.4 Tratamentul de fizioterapie

Tratamentul cu fizioterapie (FT) a fost identic pentru toți pacienții din GP cu aceiași parametri fizici pentru terapia fizicală-instrumentală și de încărcare, tipuri de exerciții pentru programul de kinetoterapie.

FT1: Electroterapie - TENS convențional bifazic: 30-40 min. folosind două canale încrucișate (4 electrozi) și o frecvență 100 Hz și 100 μ s lățimea pulsului. Electrozii au fost aplicați pe partea medială și laterală, încadrând genunchiul. Nu a fost accesată zona poplitee.

FT2: Laser - LLLT, cu frecvență de 3 kHz cu o sondă GaAlAs de 904 nm, 108 mW de putere la 5 Joule/punct și maximum 40 Joule/aplicație. Aplicația a fost punctiformă, fiecare punct a durat 120 sec, din care 4 puncte au fost aplicate pe spațiul interarticular medial și 4 au fost aplicate pe spațiul interarticular lateral. Nu a fost accesată zona poplitee.

FT3: Ultrasunete: 8 min. de 0,2-0,3 W/cm² la 1 MHz cu un ciclu de funcționare de 10%. Aplicația a cuprins tot genunchiul, inclusiv zona poplitee.

FT4: Exerciții de kinetoterapie: peste 40 min. pe sesiune cu exerciții de intensitate moderată

FT5: La sfârșitul programului de FT a fost aplicată o procedură de crioterapie cu manșon de tip Cryopush pentru genunchi, timp 15 min, la 10°C. Cryopush este o tehnologie care combină compresia și crioterapia, facilitând astfel procesul de recuperare rapidă.

3.1.5 Evaluare clinică funcțională

Toate rezultatele clinice au fost analizate din perspectiva mai multor indicatori; Scala Analog vizuală (VAS), scala WOMAC (The Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis), testarea forței musculare (F) și goniometria genunchiului, și anume amplitudinea de mișcare (AM).

VAS este un instrument de evaluare a durerii utilizat la nivel mondial de către clinicieni și fizioterapeuți. VAS este notat pe o scară de la 0 la 10, 0 reprezentând absența durerii și 10 reprezentând durere extremă [53,54].

Scorul maxim WOMAC este de 96 și reprezintă o evaluare făcută de pacient care se referă la activitățile zilnice, mobilitatea funcțională, mersul, sănătatea generală și calitatea vieții. WOMAC măsoară trei subscale pe o scară 0-4. Negativ - 0, ușoară - 1, moderată - 2, severă - 3, extremă - 4. WOMAC constă într-un chestionar care are ca scop evaluarea a trei subscale:

- Severitatea durerii în diferite poziții sau mișcări - 5 itemi
- Severitatea rigidității articulațiilor - 2 itemi
- Dificultate în efectuarea activităților funcționale zilnice - 17 itemi

În total sunt însumați 24 de itemi, obținându-se astfel un scor maxim posibil de 96. Scorul final este exprimat în procente și calculat prin împărțirea scorului unei persoane la scorul total și înmulțirea acestuia cu 100. Un scor WOMAC ridicat se corelează cu o scădere a calității vieții [55].

Testarea forței musculare este un sistem care constă în tehnici de examinare manuală care evaluează forța fiecărui mușchi sau grup muscular. În acest studiu a fost evaluat mușchiul cvadriceps, deoarece acesta este extensorul genunchiului care ajută la menținerea poziției bipede.

Mișcarea de flexie a genunchiului se execută în planul sagital în jurul unui ax medio-lateral. AM normal al flexiei pentru adulți variază între 130 la 140°. Valoarea funcțională a genunchiului este de 90° și se calculează de la extensia care este de 0° și apoi mai departe prin 45°, 90°, 125° și 135°. Unghiul larg al genunchiului reprezintă o flexie mai mare, astfel încât piciorul se apropie pe partea posterioară a coapsei [56].

3.1.6 Rezultate studiu clinic

Toți pacienții au fost evaluați prin VAS, WOMAC, testarea forței musculare (F) și goniometrie, adică AM a genunchiului de la momentul inițial (Tabelul 3) și după 3, 6, 9 și 12 luni cu aceleași teste. În plus, mărimea efectului în cadrul grupului a fost evaluată pentru fiecare test ca $\Omega = \text{inițial final (12 luni)}$.

În luna a 3-a a programului de tratament, durerea evaluată prin scorurile VAS a scăzut considerabil față de valoarea inițială la ambele grupuri, cu un efect mai mare și mai accentuat observat în GP de la 5.730 ± 0.450 la 2.108 ± 0.614 ($p = 0.5$). O îmbunătățire mai moderată a fost observată din luna 3 până în luna 6. După 6 luni, scorurile VAS au început să se stabilizeze în ambele grupuri, dar au rămas mai bune la pacienții cu GP care au primit tratamentul combinat (Figura 6).

Din punct de vedere clinic, pacienții din GP care au fost supuși abordării combinate (vâscosuplimentare cu AH + FT) nu au mai prezentat dureri notabile sau rigiditate matinală încă de la 3 luni de la începerea perioadei de tratament. În schimb, în timp ce la pacienții din GC a fost evidentă o scădere a durerii, așa cum s-a observat prin îmbunătățirea scorurilor VAS, rigiditatea matinală intermitentă a fost încă resimțită pe toată perioada studiului. Mărimea efectului în cadrul grupului pentru scorul VAS Ω_{VAS} între cele două grupuri a fost semnificativă

din punct de vedere statistic significant ($p < 0.001$), cu a Ω_{VA} of 3.757 ± 0.683 în GP în comparație cu Ω_{VAS} of 2.750 ± 0.683 în GC.

Tabelul 3. Caracteristicile de bază ale pacienților *

Caracteristici	Cohorta totală ($n = 52$)	Grupul Pilot (GP) (AH + FT) ($n = 37$)	Grupul de Control (GC) (AH) ($n = 15$)
Vârsta	$55,9 \pm 4,1$	$55,8 \pm 4,2$	$56,1 \pm 4,0$
Gen feminin — no. (%)	26 (13,5)	16 (5,9)	10 (1,6)
Indice de Masă Corporală	$30,0 \pm 7,8$	$29,0 \pm 3,5$	$32,3 \pm 13,3$
Genunchiul simptomatic — no. (%)			
Genunchiul drept	19 (9,9)	17 (6,3)	2 (0,3)
Genunchiul stâng	24 (12,5)	13 (4,8)	11 (1,8)
Ambii genunchi	10 (5,2)	7 (2,6)	3 (0,5)
Măsurile de referință			
WOMAC	$64,5 \pm 3,3$	$64,5 \pm 2,99$	$64,6 \pm 4,1$
VAS	$5,7 \pm 0,5$	$5,7 \pm 0,5$	$5,6 \pm 0,5$
AM (grade)	$98,4 \pm 11,4$	$98,1 \pm 12,5$	$99,1 \pm 8,6$
Testarea Forței Musculare	$3,8 \pm 0,5$	$3,8 \pm 0,5$	$3,8 \pm 0,4$

Valorile plus și minus reprezintă medii \pm SD. Este posibil ca totalul procentelor să nu ajungă la 100 din cauza rotunjirilor

La momentul inițial, scorurile WOMAC medii (\pm SD) raportate au fost de $64,6 \pm 4,08$ la GC și $64,5 \pm 2,99$ la GP. În mod special, la numai 3 luni de studiu, scorurile medii s-au îmbunătățit semnificativ la $56,7 \pm 5$ la GC și $48,27 \pm 2,13$ la GP (diferența medie între grupuri: 16,19 puncte; interval de încredere de 95%), constatare în favoarea combinației de vâcosuplimentării cu AH și FT. La finalul studiului, la 12 luni, scorurile s-au îmbunătățit în ambele grupuri, diferența medie între grupuri rămânând semnificativă (7,08 puncte; interval de încredere de 95%) (Figura 7). Acest lucru s-a tradus printr-o îmbunătățire semnificativă a durerii și a disconfortului atunci când ședințele de FT au fost adăugate la tratamentul farmacologic, subliniind importanța unei abordări combinate, multimodale pentru gestionarea durerii la pacienții cu OAG.

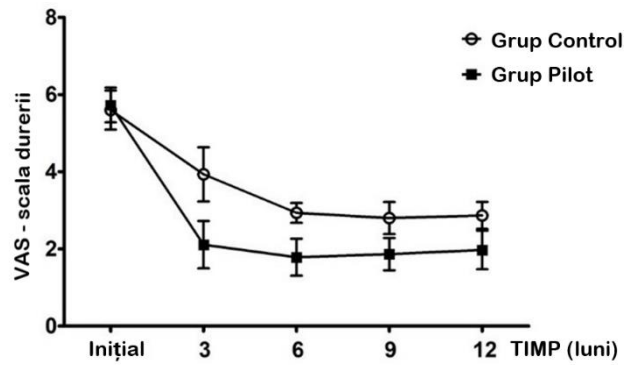


Figura 6. Evoluția durerii în timp la grupul pilot GP ($n = 37$) și la grupul de control GC ($n = 15$) măsurată pe o scala durerii (VAS) de la includere (punctul inițial) și la fiecare 3 luni până la 12 luni.

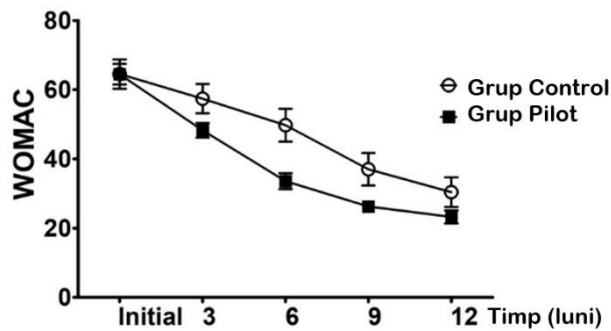


Figura 7. Scorurile totale ale indicelui WOMAC pe parcursul perioadei de urmărire de 12 luni. Scorurile totale WOMAC variază de la 0 la 96, scorurile mai mari indicând o durere și o rigiditate mai ridicată. Toți cei 52 de participanți au fost incluși în analiză în GC ($n = 15$) și GP ($n = 37$).

Din punct de vedere clinic, ambele grupuri de pacienți au obținut rezultate foarte bune din perspectiva clasificării WOMAC. Ambele grupuri au înregistrat în prima etapă (primele 3 luni) o îmbunătățire a mobilității funcționale și a mersului, urmată de o îmbunătățire semnificativă a calității vieții în punctul final la 12 luni. Aceste rezultate demonstrează eficiența infiltrației cu Kombihylan® la pacienții cu OAG în general, dar GP a înregistrat rezultate superioare încă din primele 3 luni, separând astfel cele două grupuri de pacienți până la finalul studiului. La calcularea mărimii efectului în cadrul grupului, Ω_{WOMAC} la GP a fost de $41,22 \pm 3,65$, iar la GC, a fost de $34,75 \pm 3,36$, cu o diferență statistică semnificativă între grupuri ca $p < 0,001$.

Figura 8 descrie scara de testare a forței musculare unde, în special GP a raportat o creștere rapidă și bruscă de la o valoare de $3,81 \pm 0,52$ la momentul inițial la $4,76 \pm 0,44$ la 3 luni, care a rămas stabilă până la 1 an. Un efect de dimensiuni mai mici a fost înregistrat la GP, care nu a beneficiat de programul de 10 ședințe de FT. Astfel, GC a rămas în jurul valorii de F4, pe parcursul celor 12 luni de screening (Figura 8). Valorile forței musculare (F), adică F4 și F5 sunt acceptabile din punct de vedere clinic. Din punctul de vedere al pacienților, pe baza interviurilor de feedback, nu au existat diferențe notabile între grupuri, deoarece o valoare de patru este considerată bună, iar cinci este normală. Cu toate acestea, din perspectiva inhibiției artrogene, pentru menținerea pe termen lung, o valoare cât mai apropiată de F5 înseamnă limitarea acestui fenomen de buclă negativă care contribuie la accelerarea OAG.

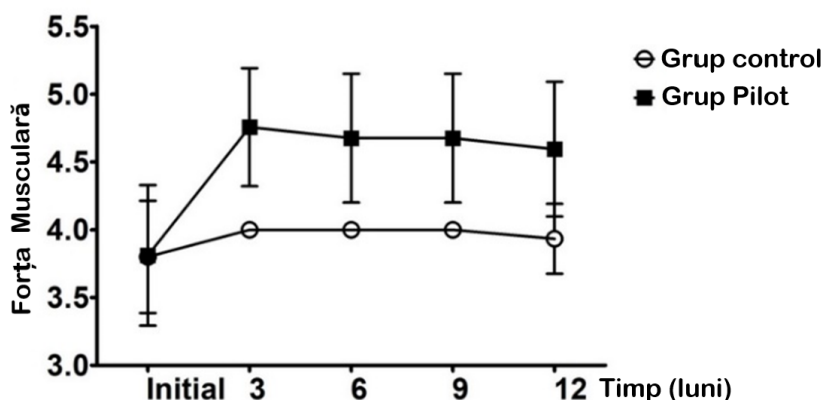


Figura 8. Evaluarea forței mușchiului cvadriceps în timp la grupul de control GC ($n = 15$) și la grupul pilot GP ($n = 37$), măsurată pe o scală de la 0 la 5 la includere (punctul inițial) și la fiecare 3 luni până la 12 luni. Forța Ω de $0,78 \pm 0,58$ pentru GP a fost în contrast cu Forța Ω de $0,19 \pm 0,40$ obținută pentru GC, cu semnificație statistică la $p < 0,001$.

În timp ce vâscosuplimentarea cu Kombihylan® pentru pacienții cu OAG nu a modificat parametrii de forță musculară a cvadricepsului pentru intervalul de studiu de 12 luni, antrenamentul prin exerciții de kinetoterapie a tonificat cvadricepsul și a obținut un efect general mare în cadrul grupului, cu o valoare a testului de forță musculară $\Omega_{\text{Forță}}$ de $0,78 \pm 0,58$ pentru GP, în contrast cu $\Omega_{\text{Forță}}$ de $0,19 \pm 0,40$ obținută pentru GC (semnificație statistică: $p < 0,001$).

Rezultate similare au fost obținute pentru testul de evaluare a flexiei genunchiului (AM genunchiului), așa cum se arată în figura 9, unde se observă că GP a pornit de la o valoare medie de 98° la momentul inițial, urmată de o creștere bruscă până la 115° în primele 3 luni și atingerea unui platou între 6 și 12 luni, așa cum s-a observat anterior pentru toate celelalte teste

efectuate. În cazul GP, valoarea la momentul inițial a fost de 100° de flexie, cu o creștere lentă până la 112° în luna 9, urmată de o scădere semnificativă până la 105° la punctul final (12 luni).

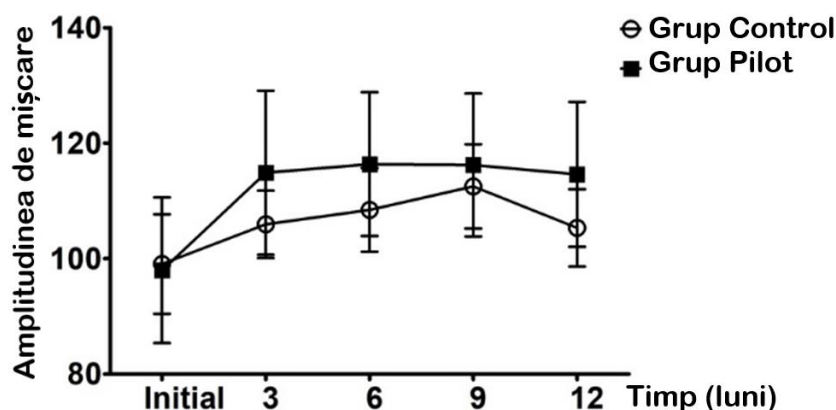


Figura 9. Evaluarea amplitudinii de mișcare (AM) a flexiei genunchiului la GP ($n = 37$) și GC ($n = 15$). Din punct de vedere statistic, mărimea efectului AM în cadrul grupului Ω_{AM} a fost de $16,62 \pm 6,24$ în GP, față de $8,75 \pm 8,27$ în GC, cu $p < 0,004$.

3.2 Studiu reologic

3.2.1 Materiale și metode studiu reologic

LS a fost recoltat de la nouă pacienți împărțiți în 3 grupuri care au provenit din gupul de pacienți de la studiul clinic și care au fost de acord să li se preleveze LS (tabelul 4). Primul grup a fost al pacienților fără proceduri de FT și vâscosuplimentare ($n=3$), la care li s-au aspirat 2-3 ml de LS de la genunchi, fiind considerat grup de control: Control 1, Control 2 și Control 3. Al doilea grup a fost al pacienților care au primit vâscosuplimentare cu AH (3 Mda) și FT ($n=3$): P1, P2 și P3. Al treilea grup de pacienți ($n=3$) au primit doar vâscosuplimentare cu AH: P4, P5 și P6. Pacienții P1, P2 și P3 au fost supuși la 10 zile consecutive de FT în condițiile descrise anterior în studiul clinic și aici enumerăm: curenți TENS, biostimulare LASER, ultrasunete, exerciții de kinetoterapie și crioterapie. La toți pacienții s-au prelevat probe de LS imediat după vâscosuplimentarea genunchiului și după 6 săptămâni, în care a fost evaluat comportamentul reologic și spectroscopic al probelor de LS extrase.

Pentru criteriile de includere, pacienții eligibili au fost cei care au fost diagnosticați cu OAG moderată, care nu au prezentat semne de inflamație locală și care nu au avut infiltrații cu

alte substanțe vâscoelastice sau glucocorticoizi în ultimele 12 luni. Criteriile de includere în extenso au fost descrise anterior în studiul clinic. Criteriile de excludere au fost: alergie sau hipersensibilitate cunoscută la hialuronatul de sodiu sau la oricare dintre ingredientele Kombihylan® și pacienții cu semne de inflamație locală sau hidrartroză. Criteriile de excludere în extenso au fost descrise anterior în studiul clinic.

Acest studiu a fost realizat în paralel cu studiul clinic și a urmat nouă etape. Diferența dintre cele două studii au fost etapele 5, 6 și 9 care sunt specifice studiului reologic și spectroscopic. Toate etapele au fost descrise anterior la subcapitolul 4.1.5 Designul studiului clinic. Toate LS testate sunt prezentate în tabelul 4.

Tabelul 4. Lichidul sinovial (LS) testat și procedura aplicată

Nr.	Codare	Caracteristici	Solid (mg/ml)	pH	Culoare	Claritate	Glucoză (mg/dL)
1.	AH	Kombihylan® brut	76	7.22	Clar	Transparent	0
2.	Control 1	Pacient fără procedură	0.88	7.14	Galben-portocaliu	Transparent	144 ± 4
3.	Control 2	Pacient fără procedură	0.86	7.18	Galben-portocaliu	Transparent	143 ± 1
4.	Control 3	Pacient fără procedură	0.83	6.89	Galben	Transparent	101 ± 2
5.	P1 Initial S MV	Pacientul 1 inițial (suplimentat) 5-10 min de mișcare	0.40	7.03	Gelben	Transparent	110 ± 3
6.	P2 Initial S MV	Pacientul 2 inițial (suplimentat) 5-10 min de mișcare	0.68	6.88	Galben-portocaliu	Transparent	61 ± 2
7.	P3 Initial S MV	Pacientul 3 inițial (suplimentat) 5-10 min de mișcare	0.88	7.14	Galben-portocaliu	Transparent	53 ± 1
8.	P1 Final	Pacientul 1 după FT (2 săptămâni de FT + 4 de odihnă)	0.66	7.32	Galben-portocaliu	Transparent	99 ± 5
9.	P2 Final	Pacientul 2 după FT (2 săptămâni de FT + 4 de odihnă)	0.68	7.28	Galben-portocaliu	Transparent	67 ± 1
10.	P3 Final	Pacientul 3 după FT (2 săptămâni de FT + 4 de odihnă)	0.64	7.42	Galben-portocaliu	Transparent	69 ± 2
11.	P4 Initial S MV	Pacientul 4 inițial (suplimentat) 5-10 min de mișcare	0.72	7.19	Galben-portocaliu	Transparent	104 ± 2
12.	P5 Initial S MV	Pacientul 5 inițial (suplimentat) 5-10 min de mișcare	0.76	6.87	Galben-portocaliu	Transparent	120 ± 4
13.	P6 Initial S MV	Pacientul 6 inițial (suplimentat) 5-10 min de mișcare	0.76	7.24	Galben-portocaliu	Transparent	59 ± 2
14.	P 4 final	Pacientul 4 final (6 săptămâni odihnă)	0.74	7.32	Galben-portocaliu	Transparent	113 ± 3
15.	P 5 final	Pacientul 5 final (6 săptămâni odihnă)	0.62	7.51	Galben-portocaliu	Transparent	128 ± 3
16.	P 6 final	Pacientul 6 final (6 săptămâni odihnă)	0.70	7.37	Galben-portocaliu	Transparent	70 ± 2

3.2.1.1 Depunerea picăturilor de lichid sinovial și spectroscopia în IR cu transformată Fourier cu reflexie totală atenuată (ATR-FTIR)

Picături de LS la volum mic de 15 μ l au fost depuse în plăci cu 24 de godeuri pentru cultivarea celulelor, la 37°C, și au fost lăsate să se usuce câteva ore, semiacoperite, apoi examinate a doua zi cu ajutorul microscopiei optice (microscop cu contrast de fază inversat, Leica, Wetzlar, Germania) și stereomicroscopiei (Stereomicroscop, Optika, Italia) și spectroscopiei în infraroșu. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier cu reflexie totală atenuată – ATR-FTIR (Nicolet Summit Pro FTIR Spectrometer with Everest ATR accessory, Thermo ScientificTM, Waltham, MA, USA) a fost utilizată pentru a evalua modificările de compoziție în LS. Toate probele au fost achiziționate utilizând un cristal de diamant cu element de focalizare la temperatura camerei. Măsurătorile au fost efectuate într-un interval de 400-4000 cm^{-1} , cu o rezoluție spectrală de 2 cm^{-1} , cu 64 de scanări repetate, cu o medie de 64 de scanări repetate pentru fiecare spectru. Înainte de măsurare, materialele au fost condiționate la 25°C și 65% umiditate relativă timp de 24 ore.

3.2.1.2 Caracterizarea reologică a lichidului sinovial

Măsurătorile reometrice din prezenta lucrare au fost efectuate cu reometrul rotațional Kinexus Pro+ (Malvern Instruments Ltd. Worcestershire din Marea Britanie). Sistemul de măsurare utilizat pe reometru a fost unul cu geometrie de plăci paralele cu un diametru de 40 mm (Figura 10). Temperatura probelor a fost controlată cu o precizie de $\pm 0,1^\circ\text{C}$, asigurată de sistemul Peltier. Toate testele au fost efectuate la $37,00 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Înainte de testare a fost prestabilită distanța dintre plăcile reometrului la 0.0250 mm.

Cantitatea de probă necesară pentru evaluarea reologică a LS a fost de 0,6 ml, iar excesul de probă a fost îndepărtat de pe placă. Înainte de fiecare testare, plăcile au fost atent curățate și montate în reometrul rotațional Kinexus Pro+, după care acesta a trecut printr-un proces de calibrare automată a plăcilor, iar fluxul de aer comprimat necesar operării reometrului a fost setat la presiunea constantă de 2 bar. Aerul comprimat a fost prefiltrat printr-

un filtru fin și superfin, permițând astfel atingerea presiunii capabile să efectueze precis analiza reologică.

Pentru înregistrarea și procesarea datelor reometrice s-a utilizat software-ul rSpace versiunea 1.60 de la Malvern Instruments. rSpace care este un sistem complet integrat și intuitiv cu o interfață flexibilă configurată în funcție de cerințele specifice determinărilor din această lucrare.

Eșantioanele de LS au fost încărcate pe placa de măsurare a reometrului, iar geometria de măsurare a fost coborâtă la o viteză foarte mică, pentru a preveni alterarea structurii eșantionului de LS. Toate probele de LS și AH au fost lăsate în repaus timp de 30 minute înainte de fiecare analiză, iar timpul de lucru pentru fiecare probă a fost de 70 de minute.

Caracterizarea reologică a implicat studiul curbelor de vâscozitate și teste de oscilație. Curbele de vâscozitate au fost obținute etapizat, trecând la viteze de forfecare începând de la $0,05 \text{ s}^{-1}$ și terminând cu 40 s^{-1} . Valorile vâscozității dinamice care au fost utilizate pentru a caracteriza probele de LS au trecut prin următoarele valori: 0,05, 2, 10 și 40 s^{-1} . Testul oscilator a fost efectuat la o tensiune controlată (1 Pa) cu o frecvență de baleiaj cuprinsă între 0,5 Hz și 2,5 Hz, frecvențe similare mersului normal și alergatului raportat la articulația genunchiului sănătos. Proprietățile reologice dinamice ale LS au fost evaluate în ceea ce privește modulul de stocare G' (componenta elastică), modulul de pierdere G'' (componenta vâscoasă) și modulul de forfecare complex (G^*).

Pentru determinarea vâscozității și a proprietăților vâscoelastice ale fluidelor sinoviale, s-au folosit testul de forfecare stabilă și testul de forfecare oscilatorie. Testul de tensiune a fost efectuat în principal pentru a stabili limitele intervalului vâscoelastic liniar. Acest test oferă informații valoroase cu privire la stabilitatea mecanică și structurală a LS. Pentru testul de deformare, frecvența unghiulară a fost menținută constantă, 10 rad/s, în timp ce amplitudinea deformațiilor a variat între 0,01 și 100%. Testele de baleiaj de frecvență au fost efectuate la o amplitudine constantă de 1% (în cadrul intervalului vâscoelastic liniar), într-un domeniu de frecvență cuprins între 0,01 și 200 rad/s.

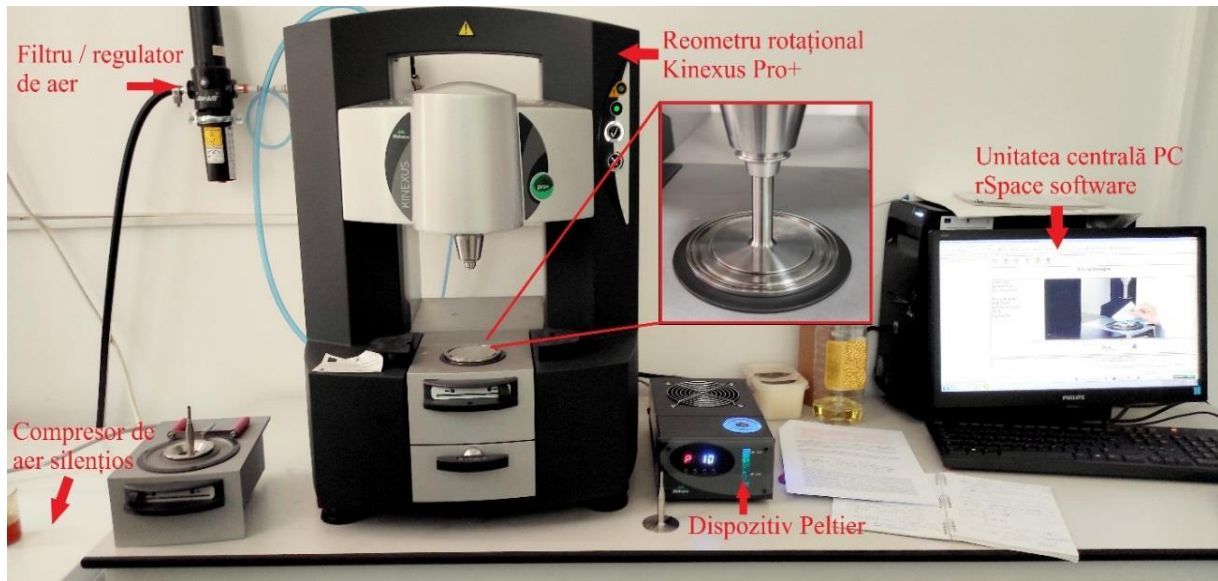


Figura 10. Instalația reometrului rotațional Kinexus Pro+ formată din: reometru rotațional, compresor de aer, filtru / regulator cu decantor și robinet de aer comprimat prurificat, dispozitivul Peltier, plăcile reometrului, unitatea centrală PC cu softul integrat rSpace și conectica (tubulatură și cabluri).

3.2.1.3 Proprietăți de bioadeziune

Testele de bioaderență au fost efectuate pe un analizor de textură TA.XT Plus® (Stable Micro Systems, Godalming, Marea Britanie) echipat cu un modul pentru teste de bioaderență pe două tipuri de suprafețe: membrană biologică simulatoare și cartilaj de pui. Pentru experimentele in vitro a fost pregătită o membrană de celuloză dintr-un tub de dializă de 12.000 Da, prefierată și răcită la temperatura camerei. Cartilajul proaspăt a fost obținut din condilii de femur de pui și pregătit special pentru experiment. Bucățile de cartilaj au fost recoltate de la picioarele de pui la cel puțin o săptămână de la sacrificarea acestora și au fost conservate hidratate în soluție fiziologică, împreună cu membrana sinovială, fără a fi congelate.

Membrana de celuloză/ bucățile de cartilaj au fost fixate în dispozitivul de menținere și s-au adăugat 200 μ L de soluție tamponată cu fosfat (pH 7,2, 0,01M) pentru a simula mediul fiziologic; întregul sistem a fost introdus într-un mediu cu temperatură controlată (apă distilată încălzită la 37°C, sub agitare, 200 rpm). Probele de LS uscat au fost atașate la partea inferioară a sondei în mișcare (sondă cilindrică din grafit - 8 mm diametru), care a fost coborâtă pe membrana de celuloză și menținută pentru timpul prestabilit (30 s) la o forță de contact de 9,80665 mN. Colectarea și analiza datelor au fost efectuate cu ajutorul software-ului Texture

Exponent, iar forța maximă de detașare și lucrul de aderență au fost calculate pe baza graficelor forță-timp. Au fost măsurate patru probe pentru fiecare film pe bază de LS.

3.2.2 Rezultate studiu reologic

3.2.2.1 Efectul acidului hialuronic asupra caracteristicilor lichidului sinovial

Analizele de laborator pentru toate LS testate au arătat o culoare galben-portocalie sau galbenă și lichide transparente (tabelul 4), ceea ce indică faptul că OA este o boală articulară. LS normal are un pH de 7,31-7,64, cu o medie de 7,43, ca în prezența inflamației pH-ul scade în medie la 7,22. În literatura de specialitate au fost raportate valori cuprinse între 6,85 și 7,41 (media 7,19) ale pH-ului la bolile articulare. Valorile pH-ului în LS testate sunt prezentate în figura 11.

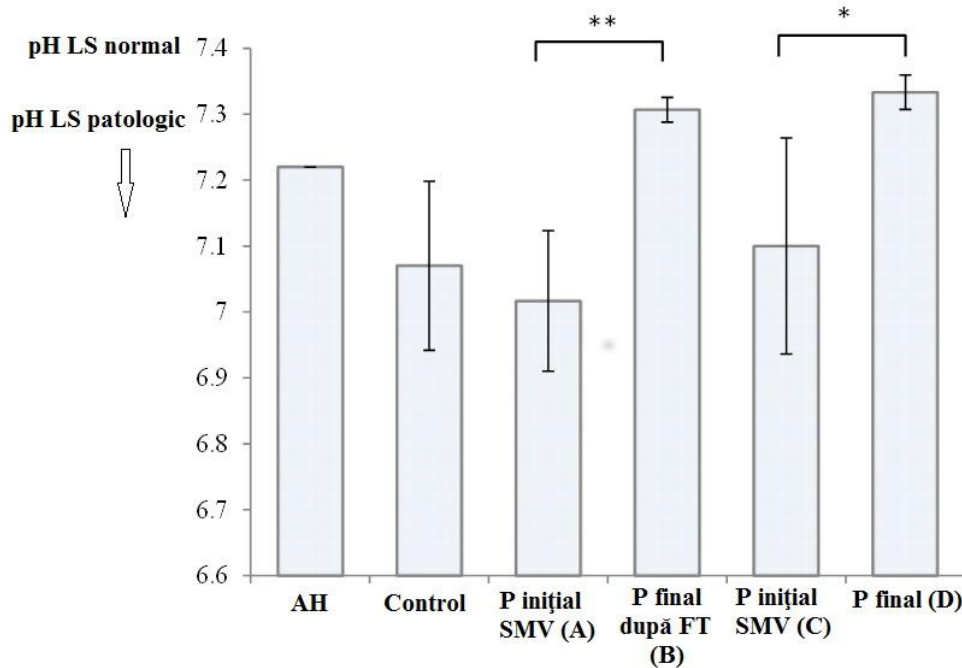


Figura 11. Valoarea pH-ului pentru Kombihylan® și fluidele sinoviale (LS) din grupul de control, grupul A (suplimentat, 5-10 min de mișcare), grupul B - după FT (2 săptămâni de FT + 4 săptămâni de repaus), grupul C (suplimentat, 5-10 min de mișcare) și grupul D (suplimentat, 5-10 min de mișcare, 6 săptămâni de repaus). Fiecare valoare reprezintă media \pm media erorilor standard ($n = 3$) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

LS din grupul de control prezintă o distribuție largă a valorilor pH-ului, cu o medie de 7,07, în concordanță cu constatările altor autori privind rolul pH-ului în dezvoltarea OA. Valorile pH-ului între 7 și 7,2 au fost măsurate, de asemenea, pentru LS din Grupul A (suplimentat, 5-10 min de mișcare) și Grupul C (suplimentat, 5-10 min de mișcare). Acidificarea LS în OAG este explicată de unii autori prin inflamarea inițială a articulației și activarea catepsinei K, o endoprotează acidă cu cisteină care degradează colagenul din cartilaj, influențând și LS. Această enzimă supraexprimată în articulațiile cu OA este produsă de condrocitele modificate fenotipic, care pot iniția sau accelera degenerarea cartilajului. Catepsina K activată subliniază relația intimă dintre micro-mediul LS și cartilaj, contribuind la degenerarea progresivă a cartilajului. În Grupul B - după FT (2 săptămâni de FT + 4 săptămâni de repaus), și Grupul D (suplimentat, 5-10 min de mișcare, 6 săptămâni de repaus), pH-ul LS s-a apropiat de valorile normale, ca urmare a efectului de omogenizare și lubrifiere indus de Kombihylan[®], cu o mare contribuție a FT.

S-a observat o variabilitate ridicată a concentrației de glucoză în LS testate. Cele mai ridicate valori au fost măsurate în grupul de control. Concentrațiile ridicate de glucoză au fost asociate cu OA. În condiții de cantități limitate de oxigen, glucoza este transformată în lactat sau piruvat, care intră apoi în ciclul Krebs. Glicoliza anaerobă are loc la o rată crescută în condrocitele afectate de OA, iar glucoza este eliberată în lichidul sinovial. În general, suplimentarea cu AH și FT a condus la reducerea concentrației de glucoză.

3.2.2.2 Date în domeniul IR cu transformată Fourier (FTIR)

Au fost testate diverse metode pentru a caracteriza LS sănătos sau patologic, de la analiza biochimică și evaluarea structurală a componentelor macro și micromoleculare, până la evaluarea mecanică. S-a demonstrat că spectroscopia în infraroșu (IR) cu transformată Fourier (FTIR) este capabilă să facă distincția între eșantioanele de LS sănătoase și cele serice cu OA și a fost considerată ca o abordare de screening pentru diagnostic. Profilul sulfatului de condroitină în LS de la un pacient reprezentativ cu leziuni ale genunchiului și pe aggrecanul purificat din aceeași probă de LS au fost comparate și au fost identificate modificări în glicominoglicanul sulfat. În spectrele FTIR au fost observate diferențe în vibrațiile de întindere C=O (regiunea amidei I, 1584-1720 cm⁻¹) și în vibrațiile de întindere C-O ale fracțiunilor de carbohidrați (AH, 984-1140 cm⁻¹) în comparație cu cele de control, sugerând că spectroscopia

FTIR ar putea fi o metodă analitică alternativă pentru a detecta modificările legate de OA în AH din LS, în comparație cu metodele actuale de imun dozare și cromatografice care necesită adesea instrumente mai sofisticate și procesarea probelor.

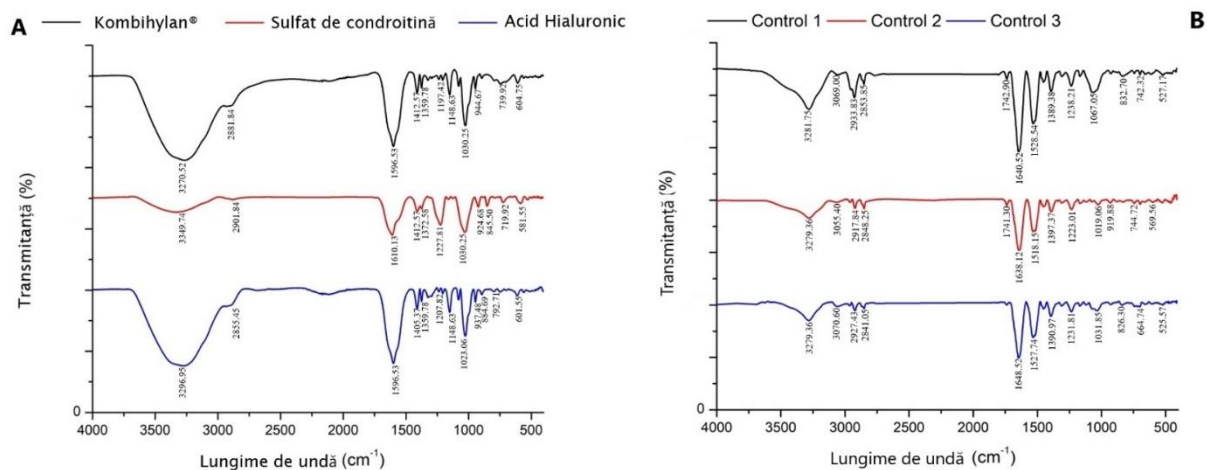


Figura 12. Spectrele FT-IR pentru acidul hialuronic (AH), sulfatul de condroitină, Kombihylan® și lichidul sinovial (LS) colectate de la grupul de control

Pentru a evalua efectul vâcosuplimentării și al FT asupra caracteristicilor LS, acesta a fost aspirat din articulația osteoartritică a genunchiului și a fost analizat spectrofotometric și comparat cu grupul de control, cu AH vâscoelastic Kombihylan® brut, AH și sulfatul de condroitină. Spectrul FT-IR al AH pur (figura 12.A) prezintă vârfuri caracteristice: vârful situat la 3296,95 cm⁻¹ este asociat cu vibrația de întindere intra- și intermoleculară a grupului -OH, respectiv cu vibrația de întindere a legăturii de hidrogen din grupul -NH-; vibrația de întindere simetrică de la 2855.45 cm⁻¹ corespund grupului -CH₂; benzile de la 1596,53 cm⁻¹ și 1405,37 cm⁻¹ sunt corelate cu vibrația simetrică și asimetrică a grupului ionizat COO-, în timp ce vârful de la 1023,26 cm⁻¹ este legat de unitățile de zaharide din sistemul hemiacetalic C-O-C.

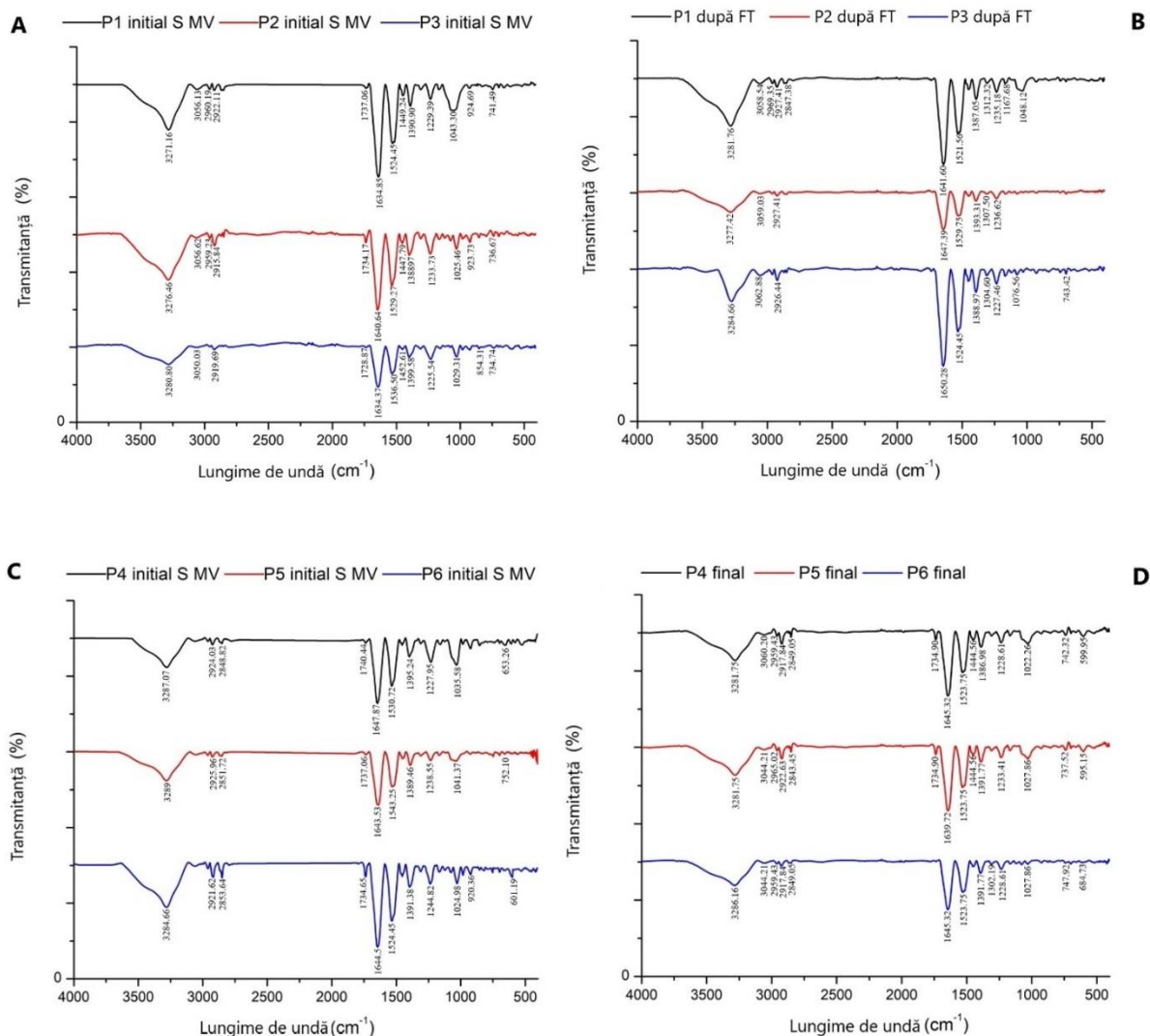


Figura 13. Spectre FT-IR pentru lichidul sinovial (LS) colectat de la pacienții din: Grupul A (vâscosuplimentat, 5-10 min de mișcare), Grupul B - după FT (2 săptămâni de FT + 4 săptămâni de repaus), Grupul C (suplimentat, 5-10 min de mișcare) și Grupul D (suplimentat, 5-10 min de mișcare și 6 săptămâni de repaus).

În spectrele sulfatului de condroitină, regiunea de peste 3000 cm^{-1} este dominată de vibrația de întindere OH. Banda de la $1372,58\text{ cm}^{-1}$ se datorează sulfatului, iar cea de la $1227,81\text{ cm}^{-1}$ este atribuită grupului S=O. Picul de la 850 cm^{-1} corespunde vibrației C-O-S. Produsul Kombihylan® prezintă ambele grupe de polimeri cu o evidențiere mai puternică a vârfurilor atribuite AH. Se poate observa pentru toate fluidele analizate o scădere a benzilor de absorbție în domeniul $980 - 1140\text{ cm}^{-1}$, corespunzătoare conținutului de carbohidrați (benzile de zahăr)

și o supraexprimare a regiunii amidelor I ($1584-1720\text{ cm}^{-1}$), indicând un conținut crescut de proteine totale, pe baza compoziției LS (Figura 13.B). Datele FT-IR pentru LS colectate de la pacienții cu proceduri suplimentate și FT sunt prezentate în figura 13.

Benzile de zahăr din domeniul $980 - 1140\text{ cm}^{-1}$ sunt mai puțin intense pentru pacienții suplimentați, cu mișcare 5-10 min, cu tratament FT (FT, 2 săptămâni) și, în final, prelevarea LS după 4 săptămâni de repaus, în comparație cu cei fără tratament FT (figura 113 A și B). Aceste rezultate au indicat un rol important al FT asupra interacțiunilor dintre produsul Kombihylan® suplimentat și LS: gelul de suplinire, bogat în AH, interacționează cu fluidele sinoviale și formează un sistem omogen, fără separare și aglomerare, funcționând ca un fluid sinovial asemănător unei singure faze. Benzile de absorbție ale zahărului nu se modifică la fel de intens în cazul menținerii pacientului în repaus după suplimentarea cu Kombihylan® și 5-10 min de mișcare (Figura 13 C și D) sugerând că spectroscopia FT-IR ar putea fi utilizată ca metodă primară de screening pentru evaluarea evoluției tratamentului în cazul pacienților cu OAG moderată.

3.2.2.3 Proprietăți reologice

În cercetarea de față au fost investigate proprietățile reologice pentru LS extrase de la pacienți cu OAG moderată, după aplicarea diferitelor tratamente: suplimentat, 5-10 min de mișcare și după FT (2 săptămâni FT + 4 săptămâni de repaus); pacienți suplimentați 5-10 min de mișcare și suplimentați, 5-10 min de mișcare, 6 săptămâni de repaus.

Cercetarea a inclus caracterizarea reologică a soluțiilor de Kombihylan®, precum și caracterizarea reologică completă a LS, adică măsurători de vâscozitate, măsurători ale raportului G' , G'' și δ the dintre modulul vâscos și modulul elastic, și indică tendința unui fluid de a disipa energie (adică mai vâscos) sau de a stoca energie (adică mai elastic). Toate experimentele au fost efectuate în condiții care simulează mediul biologic (37°C).

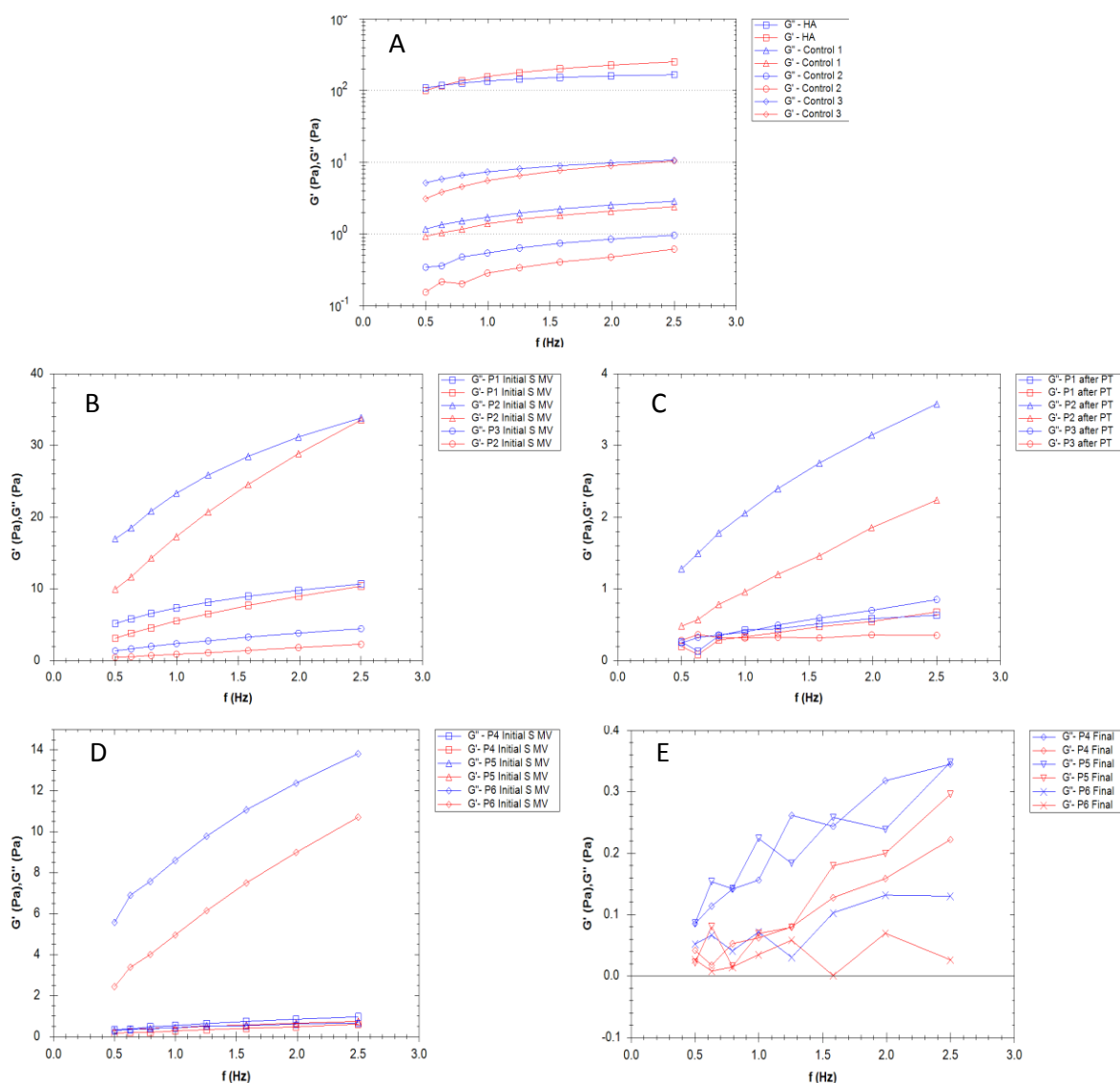


Figura 14: Modulele de elasticitate (G') și vâscozitate (G'') pentru lichidul sinovial (LS) recoltat de la: (A) grupul de control și produsul Kombihylan[®]; (B și C) pacienții vâscosuplimentați, care au făcut 5-10 min de mișcare și după FT (2 săptămâni FT + 4 săptămâni de repaus); (D și E); pacienți vâscosuplimentați, care au făcut 5-10 min de mișcare și pacienți vâscosuplimentați, care au făcut 5-10 min de mișcare + 6 săptămâni de repaus (D și E)

Produsul Kombihylan[®], prezentat în figura 14 A, are comportamentul reologic asemănător cu al unui amestec polimeric bazat pe o soluție de polimeri cu greutate moleculară

mică și mare. Kombihylan® în întreaga gamă de frecvențe demonstrează un comportament vâscoelastic cu un răspuns elastic la frecvențe joase ($G' > G''$, bazat pe contribuția sulfatului de condroitină și AH la răspunsul elastic) și un răspuns vâscos la frecvențe înalte ($G'' > G'$, bazat pe răspunsul vâscos al AH). LS din grupul de control (OAG moderat, fără suplimentarea sau FT) nu prezintă un model substanțial diferit în ceea ce privește proprietățile lor vâscoelastice. Cu toate acestea, valorile G' și G'' au variat de la un pacient la altul, ceea ce indică faptul că în OAG mulți factori contribuie la variabilitatea proprietăților reologice ale LS, inclusiv modificarea componentelor inflamatorii, geometria articulației și istoricul patologiei. Modificările din interiorul articulației determină proprietățile LS într-o măsură mai mare. Valorile au variat de la 0,1 Pa la 10 Pa, de zece ori mai puțin decât lichidul de suplimentare pe bază de AH și sulfat de condroitină.

În figura 14 B și C sunt prezentate modulele G' și G'' ale LS de la pacienții vâscosuplimentați, care au făcut mișcare 5-10 min, după care au urmat un program de FT (2 săptămâni FT + 4 săptămâni de repaus). Pentru toate cazurile analizate, modulele $G'' > G'$, ca rezultat al interacțiunilor dintre polizaharidele din Kombihylan® și componentele din LS biologic, care contribuie la răspunsul vâscos. Valorile pentru modulul de elasticitate au crescut, în unele cazuri dublându-se, ceea ce indică o distribuție uniformă a hidrogelului AH între componentele LS, proces stimulat în condițiile de mișcare. Comportamentul elastic mai scăzut al LS, la ratele de forfecare fiziologice, este o dovadă a unei interacțiuni a hialuronatului cu proteinele, în special cu lubricina, aceasta scăzând gradul de entropie al unei molecule altfel mai rigide. O creștere a lungimii de persistență datorată acestor interacțiuni ar stabiliza molecula de AH care este susceptibilă de a forma încurcături. Tratamentul cu FT a contribuit la o distribuție omogenă și la o nouă organizare a proteinelor și polizaharidelor în LS, stimulând interacțiuni mai puternice, iar G' și G'' au scăzut ușor (figura 14 C); la care s-a observat o contribuție mai mare a modulului de vâscozitate. Prezența lubricinei și a altor glicoproteine ajută LS să stocheze și să disipeze energia de impact în timpul mersului normal și să asigure lubrifierea, împreună cu alte proteine de legare a AH. În absența FT (Figura 14 D și E), profilele G' și G'' sunt neuniforme în testele de baleiaj de frecvență, sugerând un suplimentat neorganizat, cu unele fenomene de grupare, agregate polimerice multiproteice și un nivel scăzut de încurcătură între AH și componentele macromoleculare din LS

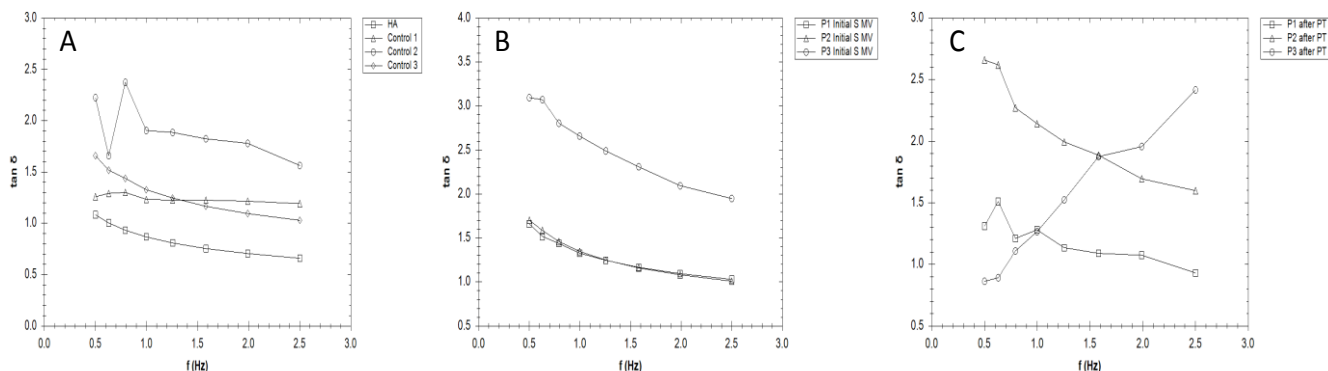


Figura 15. Variația $\tan \delta$ cu frecvența (Hz) pentru lichidule sinoviale (LS) colectate de la: (A) grupul de control și produsul Kombihylan®; (B și C) pacienții suplimentați, care au făcut 5-10 min de mișcare și după care au făcut FT (2 săptămâni de FT + 4 săptămâni de repaus)

Efectul FT este evidențiat în valorile factorului de disipare $\tan \delta = G''/G'$, o măsură a modului în care este elastic ($\tan \delta < 1$) sau plastic ($\tan \delta > 1$) comportamentul LS testat (Figura 15). $\tan \delta$ reprezintă raportul dintre răspunsul vâcos și cel elastic al unui gel vâscoelastic sau potențialul de disipare a energiei materialului.

Valorile pentru $\tan \delta$ sunt pozitive pentru toate LS testate, indicând un fluid mai elastic decât unul plastic. Aplicând o sarcină pe gelul sinovial, o parte din sarcina aplicată este disipată prin mecanismele de disipare a energiei (cum ar fi mișcările segmentare) în grosimea rețelei polimerice sinoviale, iar o altă parte a sarcinii este stocată în componenta polimerică din LS și va fi eliberată la îndepărtarea sarcinii. Scăderea $\tan \delta$ indică faptul că gelul biologic acționează mai elastic și, prin aplicarea unei sarcini, are mai mult potențial de a stoca sarcina decât de a disipa; efectul este mai pronunțat la LS după FT (figura 15 C). Creșterea $\tan \delta$ este asociată cu un potențial mai mare de disipare a energiei în LS vâcosuplimentat la un pacient, care a beneficiat de FT. Un astfel de comportament este atribuit prezenței unor procese inflamatorii intense care modifică interacțiunile proteinelor sinoviale cu AH.

Aplicarea unei tensiuni de forfecare constante asupra probelor a fost efectuată pentru a evalua timpul necesar pentru ca LS (control și suplimentat) să își adapteze răspunsul la condițiile de stres (figura 16). În general, vâscozitatea LS OA este diminuată în comparație cu

LS sănătos, atribuită unei rearanjări structurale a lanțurilor AH, iar proteinele cu greutate moleculară mică (de exemplu, albumina) contribuie semnificativ la această distribuție.

Suplimentarea cu Kombihylan® contribuie la creșterea vâscozității (Figura 16 B), dar este prezentă o mare variabilitate bazată pe specificul pacientului. Hialuronanul din gelul de suplimentare ar putea, prin contribuțiile sale osmotice și formarea de bariere de curgere în straturile limitative, să fie un regulator al LS. Dependența de timp scade după FT când, în condiția de testare a ratei de partaj, vâscozitatea a devenit constantă (Figura 16 C, P1, P3).

Vâscosuplimentarea fără procedeu de mobilizare a determinat o scădere bruscă a vâscozității în primele momente de aplicare a sarcinii mecanice (figura 16 E). În alegerea unei combinații de tratamente care implică lubrifianți, vâscozitatea trebuie să fie suficient de mare pentru a asigura o peliculă fluidă continuă în zona de contact, dar nu prea mare astfel încât să creeze frecare datorită forfecării vâscoase. Genunchiul funcționează la viteze mici și sarcini mari, iar LS ar trebui să aibă o vâscozitate mai mare. Mai mult, membrana sinovială care separă LS de plasmă permite proteinelor globulare mici (albumină și globuline) să se schimbe liber între sânge și LS, iar procesul este mai intens în artrita reumatoidă.

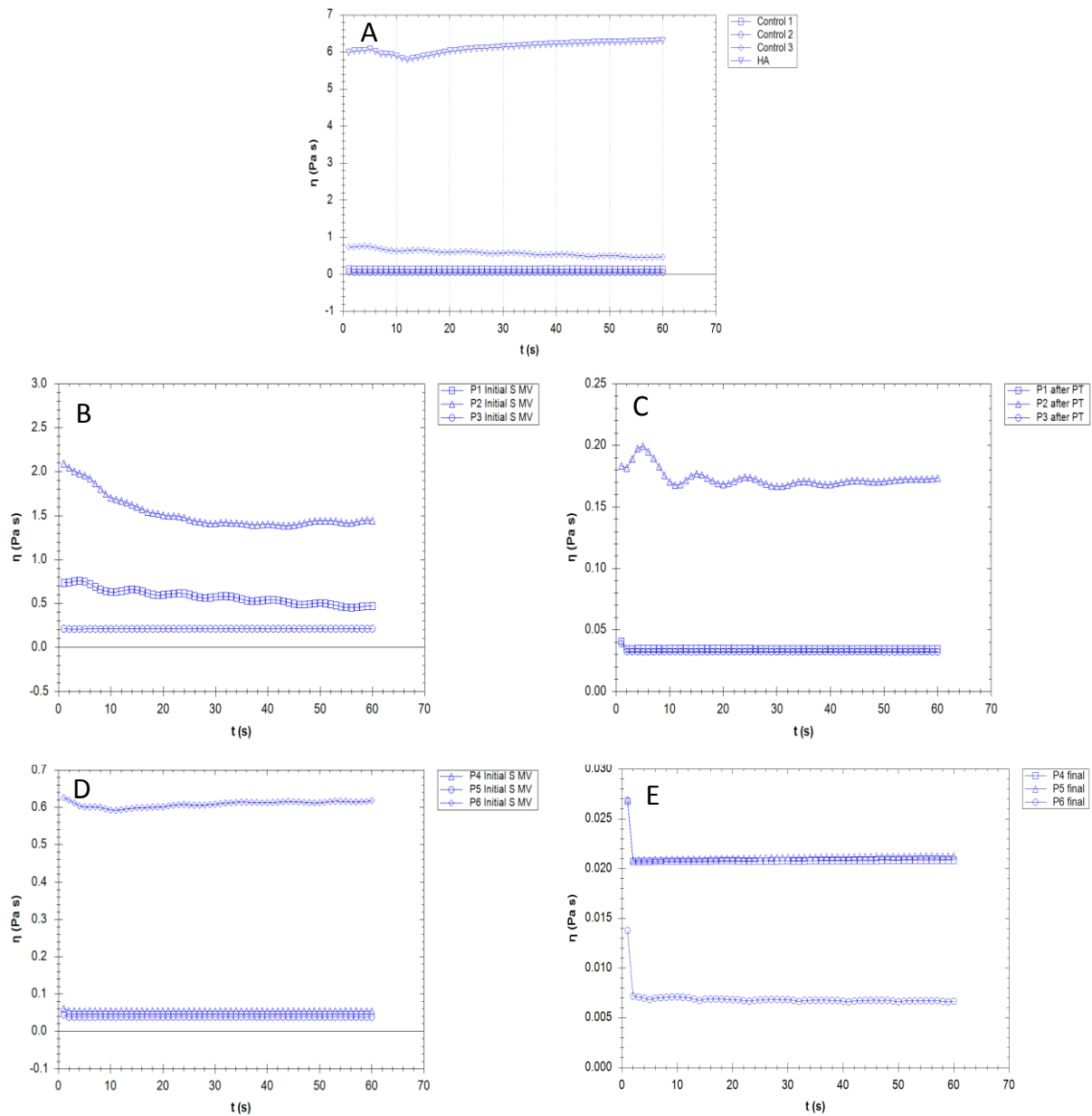


Figura 16. Variația vâscozității pentru lichidul sinovial (LS) recoltat de la: (A) grupul de control (GC) și produsul Kombihylan®; (B și C) pacienții vâscosuplimentați, care au făcut 5-10 min de mișcare și apoi au făcut FT (2 săptămâni de FT + 4 săptămâni de repaus); (D și E) pacienții vâscosuplimentați, care au făcut 5-10 min de mișcare și pacienți vâscosuplimentați, care au făcut 5-10 min de mișcare + 6 săptămâni de repaus.

3.2.2.4 Caracteristicile filmogene și proprietățile bioadezive

Imaginile la microscop ale picăturilor uscate de LS uman arată un depozit eterogen (Figura 17).

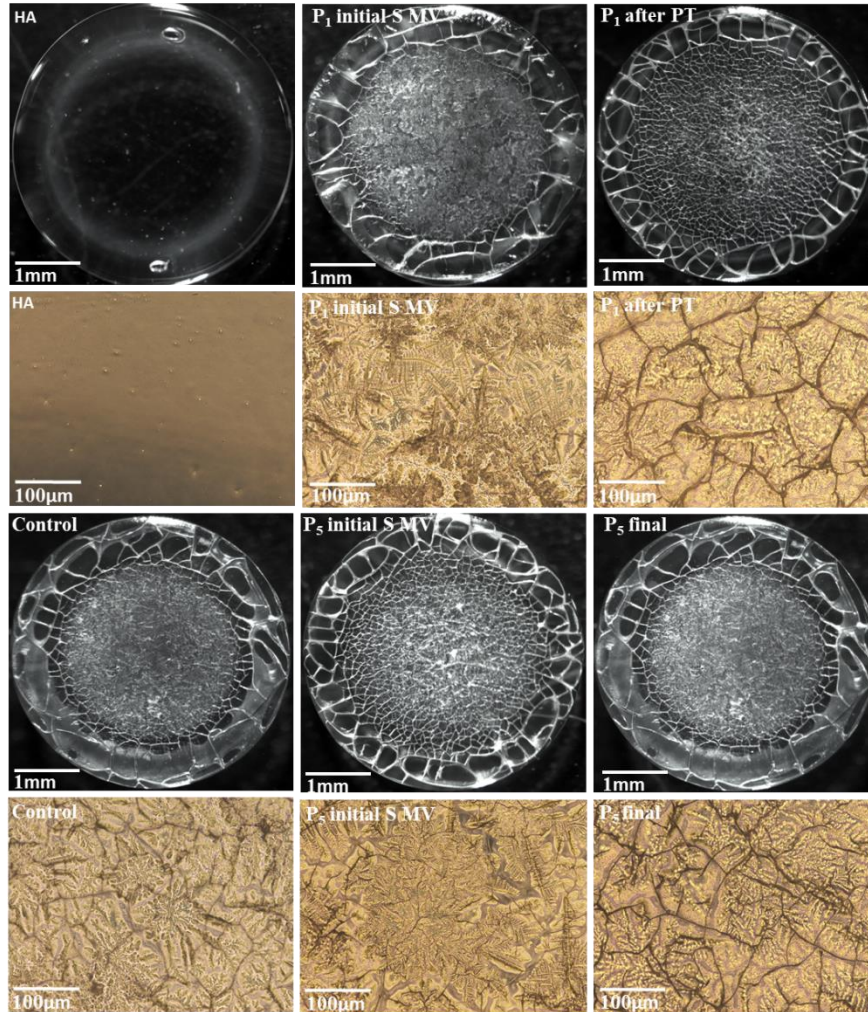


Figura 17. Imagini la microscop ale lichidelor sinoviale umane (LS) și ale Kombihylan®

Pelicula de Kombihylan® prezintă un aspect uniform, fără fisuri și separări. În mod contrar, peliculele pe bază de LS prezintă două regiuni principale: pelicula sticloasă cu unele zone de separare la marginea picăturii și depozit cristalin în formă de ferigă în centrul picăturii (Figura 17). Zona cristalină este mai pronunțată în LS provenit de la pacientul suplimentat, la mișcarea de 5-10 minute (P1 și P5) și este corelată cu interacțiunile primare ale componentei de suplimentație cu proteinele și glicoproteinele din LS. Aplicarea procedurilor de FT a diminuat tendința de grupare, a rezultat un centru uniform și o graniță difuză între partea

sticloasă și zona centrală. Astfel de rezultate indică o distribuție integrală a fluidului de suplinire după tratamentul FT.

Studiile de bioaderență in vitro asupra filmelor pe bază de LS au fost efectuate folosind o membrană de simulare (membrană de celuloză) și un analizor de textură TA.XT Plus. A fost înregistrată forța necesară pentru desprinderea filmului de membrana biologică, iar valorile ridicate ale forțelor de desprindere indică interacțiuni puternice. Forța maximă de detașare și de aderență sunt prezentate în Figura 18 și Figura 19.

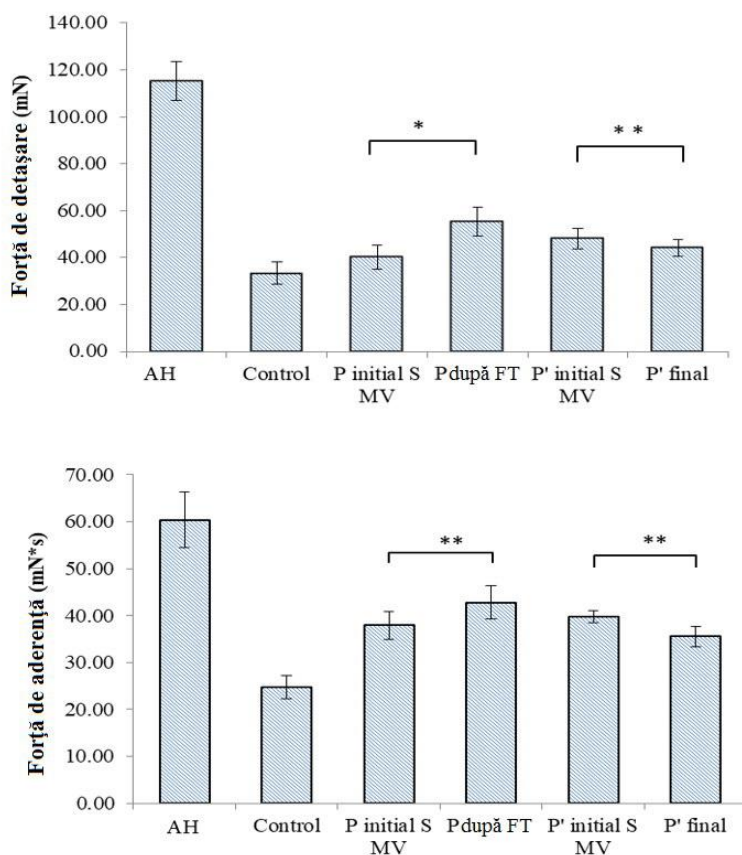


Figura 18. Proprietățile de bioaderență ale peliculelor pe bază de lichid sinovial, testate pe o membrană simulatoare, ca forță de detașare și de aderență. Valorile au fost exprimate ca medie a șase experimente independente. Fiecare valoare reprezintă media \pm media erorilor standard ($n = 6$) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Testele de bioaderență exprimă compoziția și interacțiunile din LS, în special în ceea ce privește rețelele polimerice și modificările acestora în condiții patologice, compoziția gelurilor de suplimentație administrate și procedurile suplimentare care contribuie la interfuzarea proteinelor, polizaharidelor și glicoproteinelor. Proteinele și polizaharidele, care conțin rețele

hidrofile cu numeroase grupe polare funcționale (cum ar fi -COOH, -OH, -NH₂ și -SO₄), care sunt inductoare de bioadeziune. Trebuie luat în considerare faptul că forțele electrostatice, și anume interacțiunea ionică, forțele lui van der Waal și legăturile de hidrogen contribuie, de asemenea, la procesul de aderență. Grupurile funcționale, lungimea lanțului, gradul de hidratare, concentrația, sarcina sunt caracteristici care pot influența natura bioadezivă a proteinelor și polizaharidelor. Lubricina este compusă dintr-un domeniu central de mucină flancat de terminațiile N- și C globulare, un domeniu asemănător somatomedinei B și un domeniu asemănător hemopexinei. Mucina este o zonă de atracție pentru proteinele bioadezive (albumina) sau polizaharidele (AH, sulfatul de condroitină), iar interacțiunile acestora contribuie în comun la procesul de lubrifiere.

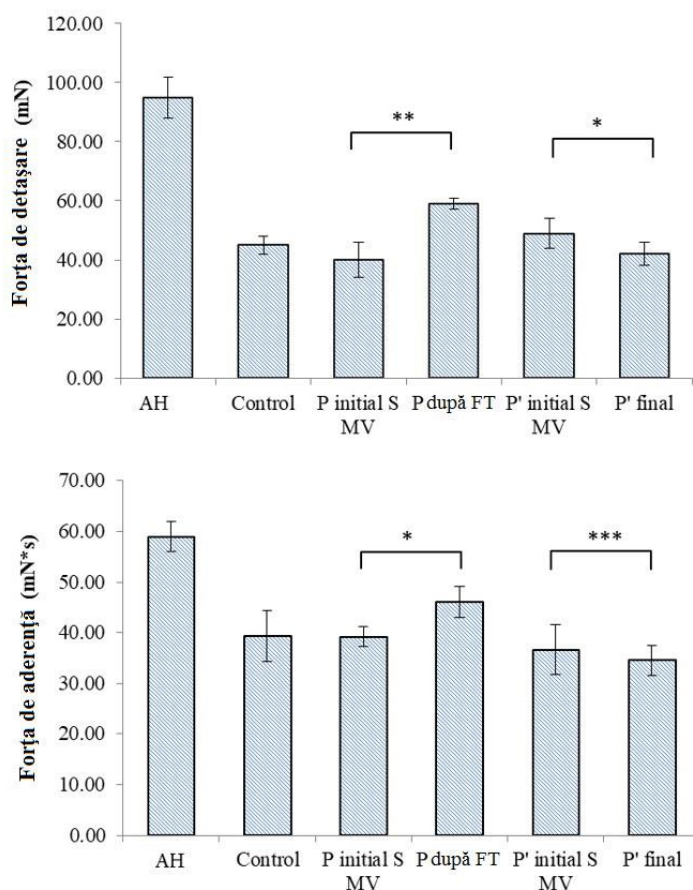


Figura 22. Proprietățile bioadezive ale peliculelor pe bază de lichid sinovial testate pe cartilajul de pui, ca forță de detașare și de aderență. Valorile au fost exprimate ca medie a șase experimente independente. Fiecare valoare reprezintă media \pm media erorilor standard ($n = 6$) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

În testele efectuate pe membrane și cartilaje simulate s-au înregistrat valori ridicate ale forței maxime de detașare și ale forței de aderență pentru produsul de suplimentare Kombihylan®. Polimerii componenți, AH și sulfat de condroitină, sunt bioadezivi și au capacitatea de a se lega pe suprafața cartilajului și de a contribui la procesul de lubrifiere. LS din grupul de control prezintă valori mai mici pentru parametrii de bioaderență înregistrați, sugerând o varietate de interacțiuni între componentele polimerice cu posibilități mai reduse de distribuție pe cartilajul articular. Suplimentarea cu Kombihylan® îmbunătățește proprietățile de bioaderență ale LS și FT este favorabilă pentru distribuția macromoleculilor și bioaderență, cu potențial în creșterea caracteristicilor de lubrifiere. În timpul mișcării, în articulația OA, LS intră și converge în golurile de pe cartilaj, iar presiunea crește pe măsură ce golul converge; se creează o ridicare hidrodinamică și forțează suprafețele să se depărteze ca o pană. Grosimea filmului format de fluid trebuie să fie puțin mai mare decât rugozitatea suprafeței pentru a minimiza contactul dintre asperități. Kombihylan® funcționează în sinergie cu lubricina, în timp ce FT contribuie la distribuirea fluidului de suplețe și, în final, îmbunătățește răspândirea LS pe suprafața cartilajului texturat.

CAPITOLUL 5

CONCLUZII GENERALE

OAG moderată este o afecțiune progresivă și invalidantă care presupune strategii de tratament cu rezultate discutabile, bazate în principal pe controlul simptomelor. Creșterea nivelului de înțelegere a factorilor predispozanți ai OA, a apariției fenomenului acut inflamator și perpetuarea mecanismelor care întrețin în mod latent inflamația cronică care dezvoltă în timp un efect distructiv asupra cartilajului articular, duce la limitarea efectelor negative ale OA, temporizarea evoluției și combaterea optimă a fenomenelor care întrețin cercul vicios: inflamație → producție de enzime → condroliză → inflamație.

Lucrarea de doctorat dezbate procesul de condroliză din perspectiva modificărilor fizico-chimice și biologice, ca principal efect distructiv în OAG și își dorește în acest sens să realizeze o punte de legătură între terapia farmacologică și FT.

Obiectivul principal al acestui studiu este înțelegerea fenomenelor patogenice ale declanșării și întreținerii fenomenului de condroliză din prisma modificărilor reologice ale LS din OAG moderată.

Un alt obiectiv a fost de a evalua in vivo capacitatea terapiei combinate FT și suplimentare intraarticulară cu Kombihylan[®], pentru de a menține proprietățile fizico-chimice ale LS care a fost colectat de la genunchi cu OAG moderată.

Prezenta lucrare de doctorat cuprinde două studii în paralel, cu nouă etape procedurale.

Primul studiu a fost clinic și a constat în recuperarea pacienților cu OAG moderată, utilizând vâscosuplimentare cu AH versus terapia combinată AH și FT.

Pentru studiul clinic s-a utilizat un design de studiu randomizat paralel cu două grupuri pentru a evalua eficacitatea Kombihylan[®] în combinație cu FT pe o perioadă de 1 an, urmărind mai mulți parametri clinici.

Primul parametru clinic pentru durere și rigiditate a fost scorul WOMAC, care a scăzut pentru ambele grupuri de pacienți (64.5 ± 3.3), cu rezultate remarcabile obținute la 3 luni la GP, urmat de GC. GP a înregistrat rezultate superioare încă din primele 3 luni ($41,22 \pm 3,65$), față de GC ($34,75 \pm 3,36$) separând astfel cele două grupuri de pacienți până la finalul studiului. Acest lucru s-a tradus printr-o scădere semnificativă a durerii și a rigidității articulare atunci când ședințele de FT au fost adăugate la tratamentul cu Kombihylan[®].

Durerea de genunchi este cel mai frecvent simptom al OAG care alterează calitatea vieții, iar severitatea simptomelor sunt asociate cu pierderea funcției la acest nivel. VAS 6 reprezintă o valoare ridicată a intensității durerii, greu de tolerat de către pacienți, în timp ce VAS 2 este asociată cu o durere ușoară. Inițial, cohorta totală a înregistrat valoarea $VAS 5.7 \pm 0.5$, din care GP a înregistrat valoarea 5.7 ± 0.5 , iar GC a înregistrat valoarea de 5.6 ± 0.5 . Atingerea valorii 2 pe scala VAS pentru GP și menținerea ei constantă timp de 9 luni reprezintă o confirmare a faptului că terapia combinată Kombihylan[®] și FT este eficientă în controlul durerii și inflamației cronice. GC în primele 3 luni scade la VAS 4, rămânând pe un platou, timp de 6 luni, cu valoarea 3 pe scala VAS.

Forța musculară a cvadricepsului în GP a crescut de la o valoare de 3.8 ± 0.5 , la o valoare de cinci în primele 3 luni, care corespunde unui răspuns normal al forței musculare. Faptul că în trei luni forța a crescut și apoi s-a menținut până în luna a 12-a, ne-a arătat că exercițiile de kinetoterapie au făcut o diferență semnificativă în obținerea unei bune funcții a extensorului genunchiului în comparație cu GC.

Valoarea inițială pentru cohorta a AM a flexiei genunchiului a fost de $98.4^\circ \pm 11.4^\circ$. Deși valorile AM pentru flexia genunchiului au fost relativ mici, acestea s-au încadrat în ultimul cadran și, în general, ultimele grade de la 110° la 135° sunt cele mai dificil de recuperat. Cu

toate acestea, AM la GP a fost îmbunătățită în medie cu 16,6° în primele 3 luni, iar valorile la GC au marcat o îmbunătățire medie doare de 8,7°.

Rezultatele au fost satisfăcătoare din punct de vedere clinic și se observă modificări semnificative ale valorilor celor patru teste în intervalul 0-3 luni la GP, care s-a separat simțitor de GC. Acest fapt sugerează că vâscosuplimentarea cu Kombihylan® este eficientă, dar terapia multimodală combinată Kombihylan® și FT depășește cu mult doar terapia pe bază de AH.

Al doilea studiu a fost de reologie și spectrometrie în care au fost evaluate efectele FT asupra caracteristicilor reologice ale LS la pacienții cu OAG moderată care au fost vâscosuplimentați anterior cu AH.

Studiul reologic a fost derulat în paralel cu studiul clinic. Au fost recoltate fluidele sinoviale de la genunchii cu OA moderată și au fost analizate pentru a evalua terapia combinată cu vâscosuplimentare cu AH (Kombihylan®) și FT. Au fost punționați evacuatoriu trei genunchi cu OA și au constituit grupul de control ($n=3$). Al doilea grup a fost al pacienților care au primit vâscosuplimentare cu Kombihylan® și FT ($n=3$), iar al treilea grup de pacienți ($n=3$) au primit doar vâscosuplimentare cu Kombihylan®. Pacienții din grupul al doilea au fost supuși la 10 zile consecutive de FT, reprezentând practic pacienții din GP clinic. La toți pacienții din studiul reologic s-au prelevat probe de LS imediat după vâscosuplimentarea genunchiului și după 6 săptămâni, în care a fost evaluat comportamentul reologic și spectroscopic al probelor de LS extrase.

Au fost identificate mai multe modificări în compoziția proteinelor și polizaharidelor din LS și a fost evidențiat rolul FT asupra interacțiunilor dintre produsul Kombihylan® vâscosuplimentat și LS. Tratamentul cu FT a contribuit la o distribuție omogenă și la o nouă organizare a proteinelor și polizaharidelor în LS, ceea ce s-a tradus printr-o contribuție mai mare a modulului vâscos la comportamentul reologic vâscoelastic. LS prezintă o vâscozitate dependentă de timp cu un comportament de fluid tixotrop, iar dependența scade după FT când, în condițiile testului de viteză de acțiune, vâscozitatea a devenit constantă. AH și sulfatul de controțină din Kombihylan® îmbunătățesc proprietățile bioadezive, iar FT este favorabilă pentru distribuția macromoleculor și bioaderența, contribuind la procesul de lubrifiere.

FT joacă un rol-cheie în tratamentul nechirurgical al OAG, controlând în mod eficient compoziția LS, bioreologia, distribuția glicoproteinor și procesul de lubrifiere, cu efect pozitiv asupra pacienților. Acest lucru explică îmbunătățirile clinice pe care pacienții din GP

din studiul clinic au obținut valori mai scăzute la valorilor WOMAC și VAS și valori mai ridicate la forța musculară și la AM a flexiei genunchiului.

Bibliografie

1. J.A. Buckwalter, *Orthopaedic Basic Science: Biology and Biomechanics of the Musculoskeletal System, 2nd ed.*, American Academy of Orthopaedic Surgeons: Rosemont, IL, USA, 2000, ISBN : 9780892031771.
2. H. Muir, *The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules*. Bioessays. 1995, 17(12),1039-48.
3. JF. Weber, R. Perez, SD. Waldman, *Mechanobioreactors for Cartilage Tissue Engineering*, Methods Mol. Biol, 2015, 1340, 203–219.
4. JA. Buckwalter, HJ Mankin, AJ Grodzinsky, *Articular cartilage and osteoarthritis*. Instr. Course Lect. Am. Acad. Orthop. Surg, 2005, 54, 465.
5. XL., Lu, C. van Mow, *Biomechanics of articular cartilage and determination of material properties*, Med. Sci. Sports Exerc, 2008, 40, 193–199.
6. S. Glyn-Jones, AJR. Palmer, R. Agricola, AJ. Price, TL. Vincent, H. Weinans, AJ. Carr, *Osteoarthritis*, Lancet, 2015, 386, 376–387.
7. CJ. Little, NK. Bawolin, X. Chen, *Mechanical Properties of Natural Cartilage and Tissue-Engineered Constructs*, Tissue Eng. Part B Rev, 2011, 17, 213–227.
8. LA. Mundt, K. Shanahan, *Graff's Textbook of Routine Urinalysis and Body Fluids*, Chapter 11. Synovial Fluid. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, 2011, 254-262.
9. *Synovial fluid*, OrthopaedicsOne Articles. In: OrthopaedicsOne - The Orthopaedic Knowledge Network, Created Mar 13, 2012, Last modified Mar 22, 2012, <https://www.orthopaedicsone.com/display/Main/Synovial+fluid> (accesat în mai 2020).
10. AJS. Fox, A. Bedi, SA. Rodeo, *The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function*. Sports Health A Multidiscip, Approach, 2009, 1, 461–468
11. S. Goldring, M. Goldring, *Biology of the Normal Joint*, Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology, 2017, 10.1016/B978-0-323-31696-5.00001-2.
12. AJ. Freemont, E. Abdellatif. *Rheumatology (Sixth Edition)*. 31 - Synovial fluid analysis. Volume 1. Elsevier Health Science, 2015, 237-241, ISBN: 9780702063039

13. WJ. McCarty, A. Luan, M. Siddiqui, HC. Bradley, K Masuda, and RL. Sah, *The Biomechanical Properties of Mixtures of Blood and Synovial Fluid*, J Orthop Res, J Orthop Res, 2011, 29, 2, 240–246.
14. AÖ. Bingöl, D. Lohmann, K. Püschelband, W.-M. Kulicke, *Characterization and comparison of shear and extensional flow of sodium hyaluronate and human synovial fluid*, Biorheology, 2010, 47, 205–224.
15. A. Faryna, K. Goldenberg. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. 3rd edition, Chapter 166 Joint Fluid*, Boston: Butterworths, 1990, ISBN-10: 0-409-90077-X.
16. AJ. Freemont, J. Denton, *Diagnostic Cytopathology (Third Edition), (CHAPTER 30 - Synovial fluid)*, Churchill Livingstone, 2010, 809-817, ISBN: 9780702031540.
17. TM. Tamer, *Hyaluronan and synovial joint: function, distribution and healing*, Interdiscip Toxicol, 2013, 6, 3, 111-25.
18. G. Kogan, L. Soltes, R. Stern, R. Mendichi, *Hyaluronic acid: A biopolymer with versatile physico-chemical and biological properties. Chapter 31*, Handbook of Polymer Research: Monomers, Oligomers, Polymers and Composites, New York: Nova Science Publishers, 2007, 393–439, ISBN: 978-1-60021-652-0.
19. N. Itano, K. Kimata, *Mammalian hyaluronan synthases*. IUBMB Life, 2002, 54, 195–199.
20. I. Onu, D. Matei, AI. Galaction, *Efficacy of intra-articular hyaluronic acid injections in the rehabilitation programme of Knee Osteoarthritis*, Balneo Research Journal, 2019, 3, 225– 230.
21. F. Munteanu, P. Botez. *Biomechanica aparatului locomotor*, Venus, 2006, 1, ISBN 973-756-023-X.
22. Wright, D. Dowson, *Lubrication and cartilage*, J Anat, 1976, 121, 1, 107-18.
23. WH. Jr. Davis, SL. Lee, L. Sokoloff, *Boundary lubricating ability of synovial fluid in degenerative joint disease*, Arthritis Rheum, 1978, 21, 7, 754-6.
24. J. Schurz, V. Ribitsch, *Rheology of synovial fluid*, Biorheology, 1987, 24, 4, 385-99.
25. JC. Caygill, GH. West, *The rheological behavior of synovial fluid and its possible relation to joint lubrication*, Med Biol Eng, 1969, 7,5, 507-16.
26. I. Reimann, *Pathological human synovial fluids. Viscosity and boundary lubricating properties*, Clin Orthop, 1976, 119, 237-41.
27. BP. Conrad, SO. Canapp, AR. Cross, CE. Levy, B. Galecki, M. Horodyski, R. Tran-Son-

- Tay, *Can Synovial Fluid Viscosity be Used as a Physical Marker for Osteoarthritis Severity?* In: Conference Bioengineering. Proceedings of a conference on: 2003 Summer Bioengineering Conference, Key Biscayne, Florida, 2003, 1157-1158.
28. B. Petcharatana. *Rheology of synovial fluid with and without viscosupplements in patients with osteoarthritis : a pilot study.* University of British Columbia, 2009, <https://dx.doi.org/10.14288/1.0069367>.
29. J. Sokolove, CM. Lepus, *Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations,* Ther Adv Musculoskelet Dis, 2013, 5, 2, 77-94.
30. P. Mathieu, T. Conrozier, E. Vignon, Y. Rozand, M. Rinaudo, *Rheologic behavior of osteoarthritic synovial fluid after addition of hyaluronic acid: a pilot study,* Clin Orthop Relat Res, 2009, 467,11, 3002-9.
31. A. Mathiessen, PG. Conaghan, *Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications,* Arthritis Res Ther, 2017, 19, 1, 18.
32. R. Gherghel, DA. Jordan, MD. Mocanu, A. Onu, I. Onu. *Osteoarthritis is not a disease, but rather an accumulation of predisposing factors, A systematic review,* Balneo and PRM Research Journal, 2021, 12, 3, 218–226.
33. T. Afzali, MV. Fangel, AS. Vestergaard, MS. Rathleff, LH. Ehlers, MB. Jensen, *Cost-effectiveness of treatments for non-osteoarthritic knee pain conditions: A systematic review,* PLoS One, 2018, 13, 12, :e0209240.
34. AS. Alrushud, AB. Rushton, G. Bhogal, F. Pressdee, CA. Greig, *Effect of a combined programme of dietary restriction and physical activity on the physical function and body composition of obese middle-aged and older adults with knee OA (DRPA): protocol for a feasibility study,* BMJ Open, 2018, 14,8, 12, e021051.
35. J. Martel-Pelletier, E. Maheu, JP. Pelletier, L. Alekseeva, O. Mkinsi, J. Branco, P. Monod, F. Planta, JY. Reginster, F. Rannou, *A new decision tree for diagnosis of osteoarthritis in primary care: international consensus of experts,* Aging Clin Exp Res, 2019, 31, 1, 19-30.
36. O. Aweid, Z. Haider, A. Saed, Y. Kalairajah, *Treatment modalities for hip and knee osteoarthritis: A systematic review of safety,* J Orthop Surg (Hong Kong), 2018, 26, 3.
37. HK. Vincent, SS. Percival, BP. Conrad, AN. Seay, C. Montero, KR. Vincent, *Hyaluronic Acid (HA) Viscosupplementation on Synovial Fluid Inflammation in Knee Osteoarthritis: A Pilot Study,* Open Orthop J, 2013, 20, 7, 378-84.

38. HR. Schumacher, C. Paul, CA. Hitchon, H. El-Gabalawy, L. Zonay, G. Clayburne, M. Sieck, E. Schwab, *Hyaluronate effects on synovium and synovial fluid. A prospective blinded study in patients with osteoarthritis of the knee*, Osteoarthritis Cartilage, 2006, 14, 5, 501-3.
39. Y. Li, Z. Yuan, H. Yang, H. Zhong, W. Peng, R. Xie, *Recent Advances in Understanding the Role of Cartilage Lubrication in Osteoarthritis*, Molecules, 2021, 26, 6122.
40. R. Ucm, M. Aem. Z. Lhb, V. Kumar, MJ. Taherzadeh, VK. Garlapati, AK. Chandel, *Comprehensive review on biotechnological production of hyaluronic acid: status, innovation, market and applications*, Bioengineered, 2022, 13, 4, 9645-9661.
41. <https://colegiulfizioterapeutilor.ro/ce-este-fizioterapia> (accesat în ianuarie 2020)
42. T. Watson, *Electrotherapy, 12th Edition*. Churchill Livingstone, 2019, ISBN: 9780443101793.
43. M. Johnson, *Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation: Mechanisms, Clinical Application and Evidence*, Rev Pain, 2007, 1, 1, 7-11.
44. TCDC. Almeida, FWDS. Figueiredo, VC. Barbosa Filho, LC. de Abreu, FLA. Fonseca, F. Adami, *Effects of transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) on proinflammatory cytokines: protocol for systematic review*, Syst Rev, 2017, 6, 1, 139.
45. EL. Sidenco. *Electroterapia: aplicații în medicina sportivă și kinetoterapie*, Editura Fundației "România de Mâine", 2005, ISBN: 9737252322
46. JB. Rothenberg, P. Jayaram, U. Naqvi, J. Gober, GA. Malanga, *The Role of Low-Intensity Pulsed Ultrasound on Cartilage Healing in Knee Osteoarthritis: A Review*. PM&R, 2017, 9, 1268–1277.
47. S. Paliwal, S. Mitragotri, *Therapeutic Opportunities in Biological Responses of Ultrasound*, Ultrasonics 2008, 48, 271–278.
48. LO. Dantas, RDFC Moreira, FM. Norde, PR. Serrão, F. Albuquerque-Sendín, TF. Salvini, *The Effects of Cryotherapy on Pain and Function in Individuals with Knee Osteoarthritis: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials*, Clin. Rehabil. 2019, 33, 1310–1319.
49. GM. Barbosa, JE. Cunha, TM. Cunha, LB. Martinho, PATS. Castro, FFB. Oliveira, FQ. Cunha, FS. Ramalho, TF. Salvini, *Clinical-like Cryotherapy Improves Footprint Patterns and Reduces Synovial Inflammation in a Rat Model of Post-Traumatic Knee Osteoarthritis*, Sci. Rep, 2019, 9, 14518.

50. Y. Hou, Z. Yang, J. Lin, Y. Chen, D. Xing, B. Wang, *Systematic Review of Clinical Practice Guidelines on Exercise Therapy for Knee Osteoarthritis and Critical Appraisal Using AGREEII Instrument*. *Osteoarthr. Cartil*, 2018, 26, S324–S325.
51. Q. Song, P. Shen, M. Mao, W. Sun, C. Zhang, L. Li, *Proprioceptive neuromuscular facilitation improves pain and descending mechanics among elderly with knee osteoarthritis*. *Scand. J. Med. Sci. Sport*, 2020, 30, 1655–1663.
52. K.F. Schulz, D.G. Altman, D. Moher, *CONSORT 2010 statement: Updated guidelines for reporting parallel group randomized trials*. *BMC Med*, 2010, 8, 18.
53. K.W. Faiz, *VAS—Visual Analog Scale*, *Tidsskr. Nor. Laegeforen*, 2014, 134, 323.
54. A.H. Alghadir, S. Anwer, A. Iqbal, Z.A. Iqbal, *Test-Retest Reliability, Validity, and Minimum Detectable Change of Visual Analog, Numerical Rating, and Verbal Rating Scales for Measurement of Osteoarthritic Knee Pain*, *J. Pain Res*, 2018, 11, 851–856.
55. A. Silman, J. Smolen, M. Weinblatt, M. Weisman, M. Hochberg, E. Gravallese, *Rheumatology, 2-Volume Set, 7th ed.*; Elsevier: Amsterdam, 2018, ISBN 978-0-7020-7306-9.
56. D.P. Sardaru, I. Onu, D.V. Matei, *Evaluarea amplitudinilor articulare* Editura Gr.T. Popa Iași, 2021, ISBN 978-606-544-745

Diseminarea rezultatelor

Articole publicate in reviste cu factor de impact

1. D. Matei, D. Trofin, D.A. Iordan, I. Onu, I. Condurache, C. Ionite, I. Buculei. *The Endocannabinoid System and Physical Exercise*. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 1989. <https://doi.org/10.3390/ijms24031989>
2. I. Onu, D. Matei, D-P. Sardaru, D. Cascaval, A. Onu, R. Gherghel, I.L. Serban, G.D. Mocanu, D.A. Iordan, G. Murariu, A-I. Galaction, *Rehabilitation of Patients with Moderate Knee Osteoarthritis Using Hyaluronic Acid Viscosupplementation and Physiotherapy*, *Appl. Sci*, 2022, 12, 3165, <https://doi.org/10.3390/app12063165>
3. D. Matei D, C. Luca, I. Onu, P. Matei, D.A. Iordan, I. Buculei, *Effects of Exercise Training on the Autonomic Nervous System with a Focus on Anti-Inflammatory*

and Antioxidants Effects, *Antioxidants* 2022, 11, 2, 350, DOI: 10.3390/antiox11020350

Articole publicate in reviste BDI

4. D-P. Sardaru, I. Onu, D. Matei, *Evaluarea amplitudinilor articulare*, Iași: Editura "Gr.T. Popa", 2021, ISBN 978-606-544-745-5
5. I. Onu, DA. Iordan, CM. Codreanu, D. Matei, AI. Galaction, *Anti-inflammatory effects of exercise training. A systematic review* *Balneo and PRM Research Journal*, 2021, 12, 4, 418–425, DOI 10.12680/balneo.2021.473
6. R. Gherghel, DA. Iordan, M-D. Mocanu, A. Onu, I. Onu, *Osteoarthritis is not a disease, but rather an accumulation of predisposing factors. A systematic review. Balneo and PRM Research Journal. 2021, 12, 3, 218–226, DOI:10.12680/balneo.2021.441*
7. F. Cristea, R. Gherghel, I. Onu. *Rehabilitation of unstable knee in osteoarthritis. Balneo Research Journal*, 2019, 10, 4, 445-449, DOI:10.12680/balneo.2019.279
8. I. Onu, D. Matei, AI. Galaction, *Efficacy of intra-articular hyaluronic acid injections in the rehabilitation programme of Knee Osteoarthritis*, *Balneo Research Journal*, 2019,10, 3, 225– 230, DOI: 10.12680/balneo.2019.261

Lucrari prezentate la Congrese si conferinte internationale si nationale

1. I. Onu. Medical Rehabilitation Evaluation using Image Processing of Patients' Gait. Conference: 2023 13th International Symposium on Advanced Topics in Electrical Engineering (ATEE) March 2023 DOI: 10.1109/ATEE58038.2023.10108215
2. I. Onu. Medical Rehabilitation Assessment using Gait Analysis in Video Sequences. The 10th IEEE International Conference on E-Health and Bioengineering - EHB 2022. Grigore T. Popa University of Medicine and Pharmacy, Iasi, Romania, November 17-18, 2022. 978-1-6654-8557-9/22/\$31.00 ©2022 IEEE

3. I. Onu, Innovative Materials and Processes for a Sustainable Development. 6th International Conference on Chemical Engineering Romania, Iași, October 5 – 7, 2022. *Changes of synovial fluid rheological parameters in knee joint degenerative disease*. Prezentare poster în calitate de autor,
4. I. Onu, The 6th Edition of the International Conference SEC – IASR 2022 “Sports, Education, Culture - Interdisciplinary Approaches in Scientific Research” 27th – 29th MAY, 2022, Galați. *Advanced physiotherapy techniques for pain reduction in Knee Osteoarthritis via the endocannabinoid system*. Lucrare susținută în calitate de autor,
5. I. Onu, Conferința Zilele Spitalului Clinic de Recuperare Iași, 22- 26 Martie 2022, Sâmbătă, 26 MARTIE 2022, Ortopedie, Fizioterapie. *Beneficiile tratamentului combinat în osteoartrită suplimente alimentare + kinetoterapie*. Realitate sau iluzie?, lucrare susținută în calitate de invited speaker, eveniment online
6. I. Onu, Congresul Național al Colegiului Fizioterapeuților din România, Sibiu, 8-10 octombrie 2021 “*Pot curenții tens reduce nivelul de citokinele proinflamatorii din sânge? Revizuire sistematică și meta-analiză*” lucrare susținută în calitate de invited speaker,
7. I. Onu, Congresul Național de Medicină Fizică, de Recuperare și Balneologie Covasna 1-5 Septembrie 2021, “*Development a system for joint rehabilitation and estimation of body segment parameters*”, coautor, eveniment online
8. I. Onu, 10th edition To the Romanian-Jordanian Congress of Medicine and Pharmacy, 10 - 17 septembrie 2019, în UMF Iași "*Combined therapy in limiting the evolution of the knee osteoarthritis with quadriceps muscle training and intra-articular infiltration of the knee with hyaluronic acid*" lucrare susținută în calitate de autor,
9. I. Onu, "Novelty in the treatment of knee osteoarthritis by injection of hyaluronic acid combined with muscle electrostimulation" Euroinvent 11 edition European Exhibition of creativity and innovation 16-18 mai 2019. Iasi, Romania Affiliation: "Grigore T. Popa" University of Medicine and Pharmacy of Iasi, Faculty of Medical Bioengineering, Dept. of Biomedical Sciences, prezentare poster,
10. I. Onu, "Increasing the effectiveness of treatment of knee osteoarthritis by combining physiotherapy with glucosamine and chondroitin sulfate" Conferința Națională de Recuperare, Medicină Fizică și Balneologie cu participare

internațională, 22-25 mai 2018 Cluj-Napoca, lucrare susținută în calitate de chairman,

11. I. Onu, *"Este un suport real glucozamina în tratamentul recuperator al osteoartritei genunchiului?"* Conferința "Pășește drept în viață" 11 mai 2018, Universitatea Vasile Alecsandri din Bacău, lucrare susținută în calitate de invited speaker,

12. I. Onu, *"Beneficiile tratamentului combinat: glucozamină - fizioterapie în osteoartrita genunchiului"*, Conferința Zilele Spitalului Clinic de Recuperare Iași 2018: Trecut, prezent și viitor în recuperare, a XVI-a ediție, 12-17 martie la Iași, lucrare susținută în calitate de invited speaker,

Medalia de argint Euroinvent 2019, pentru lucrarea *"Novelty in the treatment of knee osteoarthritis by injection of hyaluronic acid combined with muscle electrostimulation"* Euroinvent 11 edition European Exhibition of creativity and inovation 16-18 mai 2019.



Medalia de aur Euroinvent 2023, pentru lucrarea ”Impact of physiotherapeutic procedures on synovial fluid rheological parameters in knee osteoarthritis” Euroinvent 15 edition European Exhibition of creativity and inovation 13 mai 2023.

