

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ NAPOCA**

DRAGOMIR OVIDIU

**MONITORIZAREA
AFECȚIUNILOR
INFLAMATORII ARTICULARE
PRIN PARAMETRII DE
LABORATOR**

REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC:
PROF.DR. LUMINIȚA PLEȘCA MANEA**

-2010-

Cuprins

Introducere.....	4
I. STADIUL CUNOAȘTERII	
1. Definiție și clasificare.....	6
2. Epidemiologia osteoartritei.....	9
3. Etiopatogenia osteoartritei.....	10
4.1. Factori etiologici.....	11
4.1.1. Predispoziția genetică.....	11
4.1.2. Vârsta.....	14
4.1.3. Alterări primare la nivelul matricei cartilaginoase.....	16
4.1.4. Alterări ale activității metabolice condrocitare.....	17
4.1.5. Traumatismul.....	17
4.1.6. Alterarea mecanismelor de reglare ale metabolismului condrocitar.....	19
4.1.7. Boala inflamatorie articulară.....	21
4.1.8. Obezitatea.....	23
4.4. Consecințe biomecanice ale organizării macromoleculare a cartilajului articular.....	23
4.5. Modificări caracteristice osteoartritei.....	25
4.5.1. Modificări morfologice.....	25
4.5.2. Modificări biochimice.....	25
4.5.3. Modificări metabolice.....	26
4.5.4. Modificările matricei.....	30
4.5.5. Modificări biomecanice.....	32
4.5.6. Formarea osteofitelor.....	32
4.6. Biomecanica și mecanismele patogenetice ale osteoartritei.....	33
4.6.1. Răspunsul cartilajului la leziunea mecanică.....	33
4.6.2. Mecanotransducția și expresia genică.....	36
4.6.3. Rolul mediatorilor inflamatori în progresia osteoartritei.....	38
4.6.3.1. Molecule inflamatorii produse de cartilajul articular.....	39
4.6.3.2. Alterări la nivelul osului.....	44
4.6.3.3. Alterări sinoviale.....	45
4.6.3.4. Biomarkerii osteoartritei.....	48
II. CERCETARE PROPRIE	
5. Material și metodă.....	51
5.1. Material.....	51
5.1.1. Loturi de șobolani.....	51
5.1.2. Loturi umane.....	51
5.2. Metode de inducere a patologiei studiate.....	52
5.2.1. Procedeele de inducție al artritei experimentale cu carrageenan.....	52
5.2.2. Procedeele de inducție al dislipidemieii mixte asociate artritei experimentale.....	53
5.2.3. Procedeele de inducție al modificărilor statusului estrogenic asociate artritei experimentale.....	54
5.2.4. Procedeele de inducție al distiroidismului asociat artritei experimentale.....	55

5.3. Metode de apreciere a rezultatelor.....	55
5.3.1. Metode biochimice.....	55
5.3.2. Metode hematologice.....	60
5.3.3. Metode imunologice.....	63
5.3.4. Metode histologice.....	64
5.3.5. Metode funcționale.....	65
5.4. Prelucrarea statistică.....	66
6. Evaluarea influenței regimului hiperlipidic asupra evoluției osteoartritei experimentale la șobolan.....	67
6.1. Ipoteza.....	67
6.2. Rezultate.....	67
6.3. Discuții.....	94
6.4. Concluzii.....	103
7. Rolul modificărilor estrogenice în evoluția și prognosticul osteoartritei experimentale la șobolan.....	105
7.1. Ipoteza.....	105
7.2. Rezultate.....	107
7.3. Discuții.....	129
7.4. Concluzii.....	132
8. Influența modificărilor statusului tiroidian în evoluția osteoartritei experimentale la șobolan.....	134
8.1. Ipoteza.....	134
8.2. Rezultate.....	135
8.3. Discuții.....	159
8.4. Concluzii.....	160
9. Modificări ale parametrilor uzuali de laborator și clinici întâlnite în osteoartrita adultului.....	162
9.1. Ipoteza.....	162
9.2. Material și metodă.....	163
9.3. Rezultate.....	164
9.4. Discuții.....	173
9.5. Concluzii.....	174
10. Concluzii generale.....	175
11. Bibliografie.....	176

Lista de abrevieri

FT4 – tiroxina liberă

HDL – high density lipoprotein

IGF – insulin growth factor

IL-1 – interleukina 1

iNOS – sintetaza inductibilă a oxidului nitric

L-NAME – N -nitro-L- arginin-metil-ester

LDL – low density lipoprotein

MMP – metaloproteinaza matriceală

NO – oxid nitric

PCR – proteina C reactivă

TNF β – tumor necrosis factor β

TGF – tissue growth factor

WOMAC – Western Ontario and McMaster Universities

Introducere

Osteoartrita, subiectul acestei lucrări, este la ora actuală cea mai frecventă afecțiune articulară a umanității. În țările dezvoltate dovezi radiologice ale acestei afecțiuni sunt prezente la majoritatea persoanelor de 65 de ani și la un procentaj de aproximativ 80 % din persoanele de peste 75 de ani (1). Aproximativ 11% din persoanele cu vârsta peste 64 de ani suferă de osteoartrită simptomatică a genunchiului. (2)

Iată însă că, mai recent, au apărut voci în comunitatea științifică medicală care susțin o etiologie plurifactorială a osteoartritei. În afara factorilor favorizanți cunoscuți: vârsta peste 65 ani, obezitatea, traumatismele articulare, sexul feminin, statusul post-menopauzal, au fost incriminate și alte posibile cauze cum ar fi: dislipidemia(4), deficitul de estrogeni circulanți(5), hipocorticismul (6), hipotiroidismul (7), factori genetici(8), hipotonia musculară (9), cauze autoimune(10), deficite enzimaticice (11).

Alegerea temei a fost inspirată de patologia articulară întâlnită de mine în cadrul practicii medicale în asistența primară, patologie frecventă și care invadează grupe de vârstă necaracteristice până acum: adultul matur și chiar adultul tânăr. La cele trei

modelele experimentale am analizat evoluția osteoartritei în condițiile expunerii la modificări specifice ale homeostaziei sangvine.

1.Osteoartrita - definiție și patogeneză

Din punct de vedere patogenetic, apariția și progresia osteoartritei este atribuită clasic unui dezechilibru între procesele de degradare și regenerare ale matricei cartilajinoase (12). Forțe biomecanice dar și modificări biochimice sunt implicate în distrucția cartilajinoasă, care reprezintă evenimentul primordial al osteoartritei. Deși osteoartrita este privită ca o artropatie non inflamatorie se apreciază de dată mai recentă că citokinele și factorii de creștere joacă un rol în patogeneza afecțiunii. Astfel IL – 1 și TNF β ar putea acționa ca activatori ai enzimelor proteolitice implicate în distrucția cartilajinoasă (13). Factori de creștere cum ar fi TGF β și IGF – 1 joacă probabil un rol în procesele de regenerare cartilajinoasă prin sinteza de țesut cartilajinos nou (14).

2. Evaluarea influenței regimului hiperlipidic asupra evoluției osteoartritei experimentale la șobolan

Osteoartrita a fost indusă experimental prin injectarea intraarticulară la nivelul articulației tibio-femorale stângi a 7 doze de 0,02 ml soluție de carrageenan 1% pe o perioadă de 24 de zile (140). Dislipidemia a fost indusă prin administrare prin gavaj a unei soluții de grăsimi animale semisolide (untură de porc) suspendată în apa de băut (241).

Tabel I. Loturile de animale utilizate pentru studiu efectelor dislipidemiei asupra osteoartritei experimentale

Nr.	Caracteristici lot	Indicativ
1	Control negativ (Ser fiziologic 0,02 ml)	CONTROL
2	Carrageenan (0,02 ml soluție carrageenan)	CRG
3	CRG + dietă hiperlipidică 30 %	CRG + 30%
4	CRG + dietă hiperlipidică 45 %	CRG + 45%
5	CRG + dietă hiperlipidică 45 % +L-NAME	CRG45+L-NAME
6	CRG + dietă hiperlipidică 45 % +Anakinra	CRG45+IL-1RA

În ziua sacrificării s-a recoltat sânge venos prin puncție retrobulbară și s-au determinat: nitriții și nitrații, număr total de leucocite, formula leucocitară, proteine totale, proteina C reactivă, IL-1 β , MMP -3 (stromelizina), colesterol total, trigliceride, HDL colesterol. După fixare în parafină s-au preparat secțiuni tibiale colorate în hematoxilina-eozina și Tricrom-Masson varianta Goldner. Leziunile articulare au fost evaluate prin microscopie optică și înregistrate folosind scorul Mankin (150). S-au măsurat de asemenea diametrele antero-posterior și laterolateral maxim la nivelul fiecărei articulații precum și diferența dintre unghiul maxim de extensie și minim de flexie al articulației. Calculele statistice au fost efectuate cu aplicația IBM SPSS Statistics 18 pentru Windows (SPSS Inc, 2010, 233 S. Wacker Drive, 11th floor Chicago, IL, <http://www.spss.com/statistics/>).

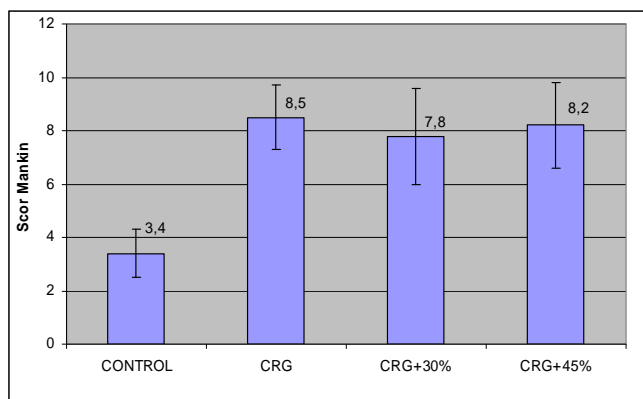


Fig. 1. Determinarea scorului Mankin la loturile control, osteoartrită indusă și osteoartrită hiperlipidică 30% și 45%

3. Rolul modificărilor estrogenice în evoluția și prognosticul osteoartritei experimentale la șobolan

Hiperestrogenismul a fost indus prin administrarea prin gavaj de 17 β -estradiol, sub forma produsului Estrofem produs de Novo Nordisk. Hipoestrogenismul a fost creat medicamentos prin administrare orală, prin gavaj, de tamoxifen sub forma produsului Tamoxifen 10 Hexal.

Tabel II. Loturile de animale utilizate pentru studiu efectelor modificărilor nivelurilor circulante de estrogeni asupra osteoartritei experimentale

Nr.	Caracteristici lot	Indicativ
1	Control negativ (Ser fiziologic 0,02 ml)	CONTROL
2	Carrageenan (0,02 ml soluție carrageenan)	CRG
3	CRG + estradiol 0,04 mg/kg/zi timp de 8 săptămâni	CRG + 0,04ES
4	CRG + estradiol 0,08 mg/kg/zi timp de 8 săptămâni	CRG + 0,08ES
5	CRG + estradiol 0,08 mg/kg/zi timp de 4 săptămâni	CRG + 0,08ES-4
6	CRG + tamoxifen 0,2mg/kg/zi timp de 8 săptămâni	CRG + 0,2TX
7	CRG + tamoxifen 0,4mg/kg/zi timp de 8 săptămâni	CRG + 0,4TX
8	CRG + tamoxifen 0,4 mg/kg/zi timp de 4 săptămâni	CRG + 0,4TX -4

În ziua sacrificării s-a recoltat sânge venos prin puncție retrobulbară și s-au determinat: nitriții și nitrații, număr total de leucocite, formula leucocitară, proteine totale, proteina C reactivă, IL-1 β , MMP -3 (stromelizina), colesterol total, trigliceride, HDL colesterol. Urmărirea evoluției diametrului articular s-a făcut prin măsurători seriate de –a lungul experimentului a diametrului articular al genunchiului injectat, în prima zi a fiecărei săptămâni de experiment.

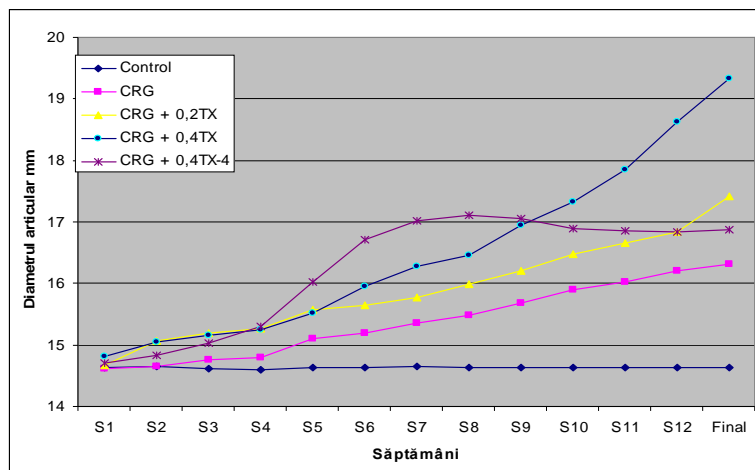


Fig. 2. Evoluția diametrului articular la lotul cu osteoartrită simplă și osteoartrita asociată unor diverse grade și perioade de deficit estrogenic

4. Influența modificărilor statusului tiroidian în evoluția osteoartritei experimentale la șobolan

Hipotiroidismul a fost indus prin administrarea prin gavaj de thiamazol, sub forma produsului Thyrozol produs de Merk KgaA iar hipertiroidismul a fost generat prin administrare orală, prin gavaj, de levotiroxină sub forma produsului L-Thyroxin 25.

Tabel II. Loturile de animale utilizate pentru studiu distiroidismului asupra evoluției osteoartritei experimentale

Nr.	Caracteristici lot	Indicativ
1	Control negativ (Ser fiziologic 0,02 ml)	CONTROL
2	Carrageenan (0,02 ml soluție carrageenan)	CRG
3	CRG + thiamazol 6,25 mg/kg/zi timp de 8 săptămâni	CRG + 6,25TY
4	CRG + thiamazol 12,5 mg/kg/zi timp de 8 săptămâni	CRG + 12,5TY
5	CRG + thiamazol 12,5 mg/kg/zi timp de 4 săptămâni	CRG + 12,5TY-4
6	CRG + levotiroxină 5 μg/kg corp/zi timp de 8 săptămâni	CRG + 5LT
7	CRG + levotiroxină 10 μg/kg corp/zi timp de 8 săptămâni	CRG + 10LT
8	CRG + levotiroxină 10 μg/kg corp/zi timp de 4 săptămâni	CRG + 10LT -4

În ziua sacrificării s-a recoltat sânge venos prin puncție retrobulbară și s-au determinat: nitriții și nitrații, număr total de leucocite, formula leucocitară, proteine totale, proteina C reactivă, IL-1β, MMP -3 (stromelizina), colesterol total, trigliceride, HDL colesterol.

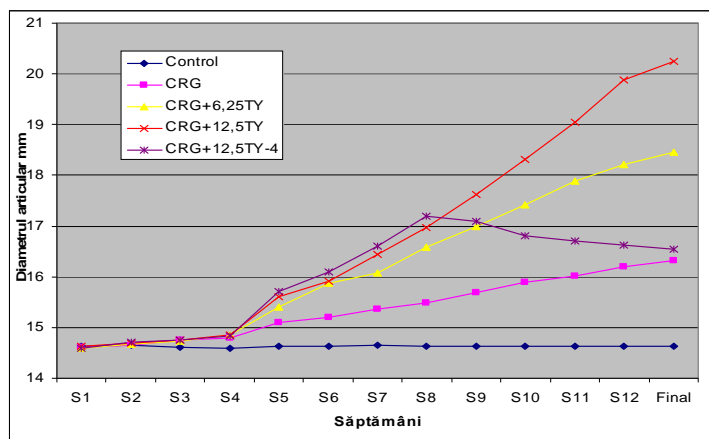


Fig. 5. Evoluția diametrului articular la grupurile control negativ, osteoartrită indusă și osteoartrită asociată unor diferite grade de hipotiroidism

5. Modificări ale parametrilor uzuali de laborator și clinici întâlnite în osteoartrita adultului

Un număr de 1020 subiecți au fost evaluați clinic prin intermediul chestionarului WOMAC în vederea decelării prezenței osteoartritei genunchiului. Acestor pacienți li s-au înregistrat nivelele a jeun de trigliceride, colesterol total, HDL colesterol și s-a estimat și nivelul LDL colesterolului. Totodată s-au dozat și nivelele serice ale glucozei, creatininei, alaninaminotransferazei și s-a măsurat tensiune arterială. Subiecților le-au fost înregistrate și sexul, vârsta și indicele de masă corporală.

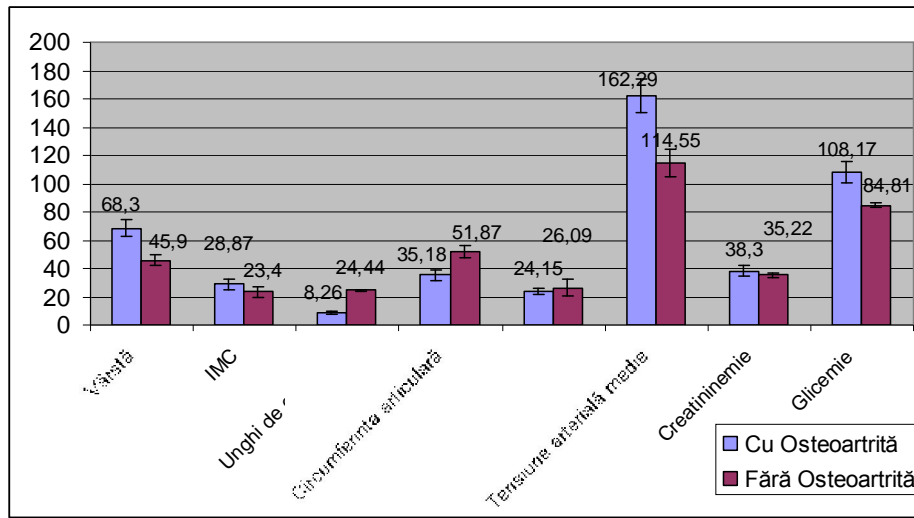


Figura 7. Comparația parametrilor de laborator, morfologici și funcționali luați în studiu la lotul sănătos față de cel cu suferință articulară

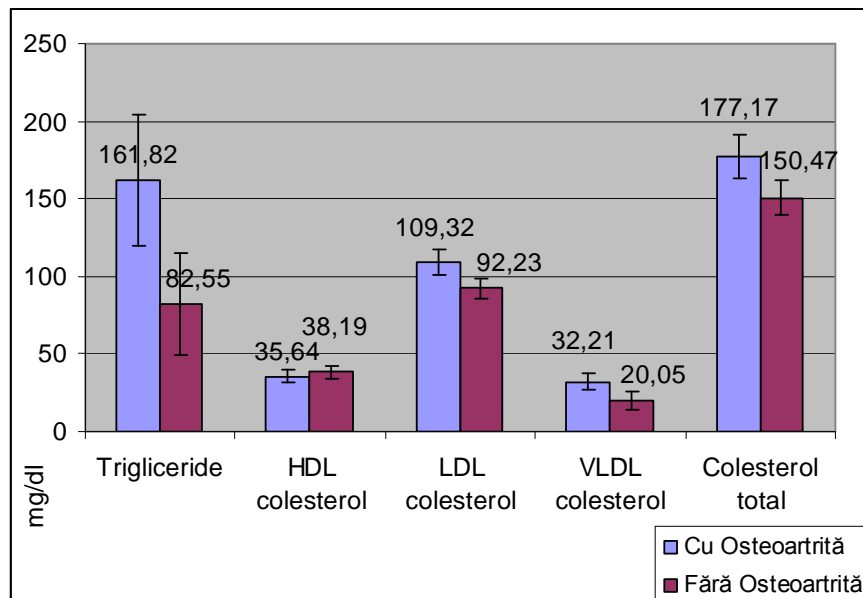


Figura 8. Comparația profilului lipemic la lotul sănătos față de cel cu suferință articulară

6. Concluzii generale

1. În osteoartrita experimentală are loc o creștere a expresiei iNOS, cu creșterea consecutivă a producției de NO, deoarece a crescut concentrația de nitriți și nitrați.
2. Producția crescută de NO în osteoartrita experimentală induce modificări ale unor parametri sanguini deoarece scăderea nivelelor de NO produce diminuarea proteinei C reactive plasmatică, și a IL – 1 β . Aceste rezultate indică utilitatea monitorizării sintezei de NO pentru evaluarea modificărilor sistemice din osteoartrită.
3. În prezența unui deficit estrogenic periferic dar și a hipotiroidismului producția de NO crește pe seama unei creșteri a expresiei iNOS, fapt confirmat prin evoluția ascendentă a nitriților și nitraților.
4. Dislipidemia mixtă indusă provoacă creșterea diametrului articular la șobolani cu osteoartrită indusă dar nu duce la agravarea osteoartritei din punct de vedere histologic și funcțional. Conchidem că profilul lipemic nu este indispensabil inclus în bateria de teste de laborator necesare explorării afecțiunilor articulare.
5. Deficitul estrogenic periferic și hipotiroidismul produc agravarea unei osteoartrite existente atât din punct de vedere morfologic – prin diametrul articular, funcțional – prin unghiul de extensie maxim, cât și histologic – prin scorul Mankin. Corectarea deficitului ameliorează evoluția osteoartritei din punct de vedere morfologic, funcțional și histologic. Considerăm, în consecință, că dozarea duetului de parametri de laborator reprezentați de FT4 și 17 β – estradiol, constituie o bază de evaluare prospectivă a evoluției osteoartritei.
6. Modificarea evoluției osteoartritei experimentale de către deficitul estrogenic indus terapeutic precum și de către hipotiroidism experimental se face pe calea creșterii nivelelor de PCR, IL-1 β și de stromelizină, markeri ai patogenezei osteoartritei și ai distrucției articulare.
7. Hipertiroidismul are efect protector din punct de vedere histologic asupra articulației osteoartrite accentuând în plus valoarea dozării hormonilor tiroidieni atât în evaluarea osteoartritei deja instalate cât și ca posibil test screening pentru evidențierea grupelor populaționale la risc de a dezvolta afecțiunea în viitor.
8. Extrapolând rezultatele experimentale de la această specie refractară la dislipidemie și disendocrinemii la om, deducem că există unele puncte de superpozabilitate dar și

importante deosebiri. Astfel am evidențiat la om că indicele de masă corporală, tensiunea arterială, glicemia, colesterolul total sunt semnificativ crescute la subiecții cu osteoartrită față de cei sănătoși.

9. Există corelații semnificative între nivelele crescute de colesterol total, glicemie, obezitate și tensiune arterială pe de-o parte și gradul afectării morfologice sau clinico-anamnestice în osteoartrită pe de altă parte.

Cuvinte cheie: osteoartrită, dislipidemie, hipotiroidism, deficit estrogenic, hipertensiune, obezitate, hipertiroidism, hiperestrogenism

Bibliografie selectivă

1. Lawrence RC, Hochberg MC, Kelsey JL, McDuffie FC, Medsger TA Jr, Felts WR, et al. Estimates of the prevalence of selected arthritic and musculoskeletal diseases in the United States. *J Rheumatol* 1989;16:427-41.
2. Felson DT, Zhang Y. An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis Rheum* 1998;41:1343-55.
4. Al-Arfaj AS., Radiographic osteoarthritis and serum cholesterol. *Saudi Med J.* 2003 Jul;24(7):745-7.)_Al-Arfaj AS. Radiographic osteoarthritis and serum triglycerides. *Bahrain Med Bull* 2003; 25(2):77-79.
5. Nevitt M C, Felson D T Sex hormones and the risk of osteoarthritis in women: epidemiological evidence. *Ann Rheum Dis.* 1996 September; 55(9): 673–676.
6. JAH Wass¹, KG White² & A Elliott² Osteoporosis, osteopaenia and osteoarthritis in autoimmune hypoadrenalism. *Endocrine Abstracts* (2006) 11 P207.
7. Turmukhambetova Bt, Bagirova Vv, Boguslavskaja Mi. Thyroid status and clinical features of osteoarthrosis in the region of goiter endemia. *Ter Arkh.* 2000;72(10):10-2.
8. Spector TD, Cicuttini F, Baker J, Loughlin J, Hart D. Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *BMJ.* 1996 Apr 13;312(7036):940-3.
9. M.Hurley The Role Of Muscle Weakness In The Pathogenesis Of Osteoarthritis *Rheumatic Disease Clinics of North America*, Volume 25, Issue 2, Pages 283-298.
10. M Doherty, M Patrick, and R Powell Nodal generalised osteoarthritis is an autoimmune disease. *Ann Rheum Dis.* 1990 December; 49(12): 1017–1020.
11. Martel-Pelletier J, Cloutier JM, Pelletier JP. Cathepsin B and cysteine protease inhibitors in human osteoarthritis. *J Orthop Res.* 1990 May;8(3):336-44.
12. E. Hedbom and H.J. Häuselmann Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role of inflammation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2002; 59 , 1: 45-53
13. Pelletier JP, DiBattista JA, Roughley P, McCollum R, Martel-Pelletier J. Cytokines and inflammation in cartilage degradation. *Rheum Dis Clin North Am* 1993;19:545-68.
14. Malesud CJ. The role of growth factors in cartilage metabolism. *Rheum Dis Clin North Am* 1993; 19:569-80.
140. Knauper V., Lopez-Otin C., Smith B., et al: Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* 1996; 271:1544-1550.
150. Mankin H.J., Mow V.C., Buckwalter J.A., et al: *Form and function of articular cartilage.* In: Simon S., ed. *Orthopaedic Basic Science*, Chicago: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 1994:1-44.
241. Xiao Y, Cui J, Li YX, Shi YH, Wang B, Le GW, Wang ZP. Dyslipidemic high-fat diet affects adversely bone metabolism in mice associated with impaired antioxidant capacity. *Nutrition.* 2010 Apr 12., Rui-li Yang, Wu Li, Yong-Hui Shi, Guo-Wei Le, Lipoic acid prevents high-fat diet-induced dyslipidemia and oxidative stress: A microarray analysis, *Nutrition - June 2008 Vol. 24, Issue 6, Pages 582-588.*

CURRICULUM VITAE

Nume și prenume: DRAGOMIR OVIDIU

Locul și data nașterii: Cluj – Napoca, August 12, 1977

Stare civilă: căsătorit, 1 copil

Educație:

Liceu: CLUJ-NAPOCA, 1992-1996 Liceul de Informatică “Tiberiu Popoviciu”

Universitate: CLUJ-NAPOCA, 1996-2002 Universitatea de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu”, Facultatea de Medicină Generală

Licența: CLUJ-NAPOCA, 2002, Universitatea de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu”, Facultatea de Medicină Generală; Lucrare de diplomă: “Corelații morfopatologice, clinice și imagistice în bulbita copilului”, coordonator științific: Prof. Dr. Nicolae Miu – Clinca Pediatrie II – CLUJ NAPOCA

Master: CLUJ-NAPOCA, 2002-2004 Universitatea de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu”, Bioinformatică

Licența: CLUJ-NAPOCA, 2002, Universitatea de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu”; Lucrare de diplomă: “Rolul software-ului pentru dispozitive mobile în monitorizarea parametrilor vitali”, coordonator științific: Prof. Dr. Andrei Achimaș-Cadariu Catedra de Informatică Medicală.

Studii Doctorale: Noiembrie 1, 2002 – prezent, Fiziologie normală și patologică, coordonator științific: Prof. Dr. Luminița Pleșca-Manea: “Monitorizarea afecțiunilor inflamatorii articulare prin parametrii de laborator”

Carieră medicală :

Stagiatură: Ianuarie 01, 2003 – Decembrie 31, 2003 Cluj-Napoca Spitalul Clinic de Județean

Rezidențiat : Februarie 01, 2005 – Octombrie 15, 2008 Medicină de Familie Spitalul Clinic de Județean Cluj

Mai, 2004 – Octombrie, 2005 Medic al vasului, M.V. Sapphire, Louis Cruise Lines – Insulele Marshall

Mai 01, 2008 – prezent Medic șef echipaj – consultații la domiciliu ,Serviciul de Ambulanță al Județului Cluj

Februarie 01, 2009 – prezent Medic de unitate al Inspectoratului pentru Situații de Urgență, Centrul Medical Județean al Ministerului Administrației și Internelor

Mai 01, 2009 – prezent Medic șef echipaj / Medic coordonator Serviciul de Ambulanță Prompturg

Interese științifice: patologie și fiziopatologie articulară, informatică medicală aplicată

Limbi străine: Engleză, franceză

Memoriu de activitate științifică

Publicații în reviste de specialitate:

- Dragomir O., Pleșca Manea L. Modificările profilului lipemic în osteoartrita adultului – studiu clinic în asistența medicală primară Clujul Medical 2009, 82-3:407-10.
- Dragomir O., Pleșca Manea L. Importanța hipotiroidismului în evoluția și prognosticul osteoartritei experimentale la șobolan. Clujul Medical 2010, 83-2:250-5.

**UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ NAPOCA**

DRAGOMIR OVIDIU

**MONITORING OF
INFLAMMATORY ARTICULAR
DISORDERS TROUGH
LABORATORY PARAMETERS**

**ABSTRACT OF THE DOCTORAL
THESIS**

**RESEARCH COORDINATOR:
PROF.DR. LUMINIȚA PLEȘCA MANEA**

-2010-

Table of contents

Introduction.....	4
I. CURRENT KNOWLEDGE	
4. Definition and classification.....	6
5. Epidemiology of osteoarthritis.....	9
6. Etiopathogenesis of osteoarthritis.....	10
4.1. Etiological factors.....	11
4.1.1. Genetic predisposition.....	11
4.1.2. Age.....	14
4.1.3. Primary alterations in the cartilaginous matrix.....	16
4.1.4. Alterations in chondrocyte metabolic activity.....	17
4.1.5. Trauma.....	17
4.1.6. Alterations in regulators of chondrocyte metabolism.....	19
4.1.7. Inflammatory joint disease.....	21
4.1.8. Obesity.....	23
4.4. Biomechanical consequences of the macromolecular organization of normal articular cartilage.....	23
4.5. Changes in osteoarthritic cartilage.....	25
4.5.1. Morphologic changes.....	25
4.5.2. Biochemical changes.....	25
4.5.3. Metabolic changes.....	26
4.5.4. Matrix changes.....	30
4.5.5. Biomechanical changes.....	32
4.5.6. Osteophytes genesis.....	32
4.6. Biomechanics and pathogenic mechanisms in osteoarthritis.....	33
4.6.1. Cartilage response to mechanical injury.....	33
4.6.2. Mechanotransduction and gene expression.....	36
4.6.3. Role of inflammatory mediators in disease progression.....	38
4.6.3.1. Inflammatory molecules produced by articular cartilage.....	39
4.6.3.2. Alterations in bone.....	44
4.6.3.3. Alteration in synovial tissue.....	45
4.6.3.4. Biomarkers of osteoarthritis.....	48
II. PERSONAL CONTRIBUTION	
12. Material and methods.....	51
12.1. Material.....	51
12.1.1. Rat groups.....	51
12.1.2. Human groups.....	51
5.2. Methods for inducing projected pathological changes.....	52
5.2.1. The procedure for induction of carragenan experimental osteoarthritis.....	52
5.2.2. The procedure for induction of dyslipidemia associated with experimental arthritis	53
5.2.3. The procedure for induction of oestrogen deficiency and excess associated with experimental arthritis.....	54

5.2.4. The procedure for induction of thyroid deficiency and excess associated with experimental arthritis.....	55
5.3. Methods for evaluation of the results.....	55
5.3.1. Biochemical methods.....	55
5.3.2. Haematological methods.....	60
5.3.3. Immunological methods.....	63
5.3.4. Histological methods.....	64
5.3.5. Functional methods.....	65
5.4. Statistical evaluation.....	66
13. The evaluation of the influence of hyperlipidic diet on the evolution of experimental osteoarthritis in rats.....	67
13.1. Hypothesis.....	67
13.2. Results.....	67
13.3. Discussions.....	94
13.4. Conclusions.....	103
14. The role of estrogen levels alterations in the evolution and prognostic of experimental osteoarthritis in rats.....	105
14.1. Hypothesis.....	105
14.2. Results.....	107
14.3. Discussions.....	129
14.4. Conclusions.....	132
15. The influence of thyroid status alterations on the evolution of experimental osteoarthritis in rats.....	134
15.1. Hypothesis.....	134
15.2. Results.....	135
15.3. Discussions.....	159
15.4. Conclusions.....	160
16. Alterations of usual laboratory and clinical parameters found in osteoarthritis of the adult.....	162
16.1. Hypothesis.....	162
16.2. Material and methods.....	163
16.3. Results.....	164
16.4. Discussions.....	173
16.5. Conclusions.....	174
17. General conclusions.....	175
18. Bibliography.....	176

Abbreviation List

FT4 – free thyroxine

HDL – high density lipoprotein

IGF – insulin growth factor

IL-1 – interleukin 1

iNOS – Inducible nitric oxide synthase

L-NAME – N-nitro-L- arginine methyl ester

LDL – low density lipoprotein

MMP – matrix metalloproteinase

NO – nitric oxide

PCR – C reactive protein

TNF β – tumor necrosis factor β

TGF – tissue growth factor

WOMAC – Western Ontario and McMaster Universities

Introduction

Osteoarthritis, the subject of this thesis, is at this time the most frequent joint disease of the human kind. In the developed countries radiological evidence of this affliction is found in most people over 65 years old and in about 80% of the people over 75 years old (1). About 11% of the population over 64 years old suffers from symptomatic knee osteoarthritis (2).

In the medical scientific community there are voices asserting a multifactorial etiology of osteoarthritis. Besides the already established predisposing factors: age over 65 years old, obesity, joint trauma, feminine gender, post-menopausal status, there have been defined new possible culprits like dyslipidemia(4), estrogen deficiency(5), hypocorticism (6), hypothyroidism (7), genetic factors(8) muscle weakness(9), autoimmune causes (10), enzymatic deficiencies(11).

The choosing of this subject was inspired by the articular pathology that I came into contact with in primary healthcare, pathology of unprecedented frequency and that invades age groups uncharacteristic until now: the mature adult and the young adult. In

these three experimental models we analyzed the evolution of osteoarthritis during exposure to multiple and divers alternations of blood homeostasis.

1.Osteoarthritis – definition and pathogenesis

From a pathogenetic perspective, the onset and progression of osteoarthritis is classically regarded as a unbalance between degradation and renewal of cartilaginous matrix (12). Biomechanical forces but also biochemical changes are both involved in the destruction of cartilage which is the primordial event of osteoarthritis. Although osteoarthritis is regarded mainly as a non-inflammatory artropathy, recent research has involved cytokines and growth factors in the pathogenesis of osteoarthritis. Therefore it is believed that IL-1 and TNF β may act as activators of the proteolytic enzymes involved in the destruction of cartilage (13). Growth factors as TGF β (tissue growth factor) and IGF – 1 (insulin growth factor) have a possible role in the regeneration process of the cartilage trough synthesis of new cartilaginous tissue(14).

2. The evaluation of the influence of hyperlipidic diet on the evolution of osteoarthritis in rats

Osteoarthritis has been experimentally induced by intraarticular administration in the left knee of 7 doses of 0,02 ml of carrageenan solution 1% over a 24 days period of time (140). Dyslipidemia was provoked by administering orally a solution of animal fat (pig lard) suspended in drinking water(241).

Table I. Animal groups used in the study of the consequences of dyslipidemia on experimental osteoarthritis

No.	Animal group properties	Callsign
1	Negative control (Saline solution 0,02 ml)	CONTROL
2	Carrageenan (0,02 ml carrageenan solution)	CRG
3	CRG + hyperlipidic diet 30 %	CRG + 30%
4	CRG + hyperlipidic diet 45 %	CRG + 45%
5	CRG + hyperlipidic diet % +L-NAME	CRG45+L-NAME
6	CRG + hyperlipidic diet 45 % +Anakinra	CRG45+IL-1RA

In the day of the animals were euthanized we obtained venous blood trough retrobulbar puncture and we determined the following laboratory parameters: plasmatic nitrites and nitrates, white blood cell count, leukocyte percentage breakdown, total plasmatic protein levels, C reactive protein, IL-1 β , MMP-3 (stromelysin), total cholesterol, triglycerides, HDL cholesterol. After paraffin fixation we prepared tibial sections stained in hematoxylin – eosin stain, and Tricrom-Masson stain, Goldner variant for bone. Articular lesions were evaluated by optic microscopy using the Mankin score (150). We have also measured the anteroposterior and lateral diameters of the joint and the difference between the maximal extension and minimal flexion angle of the joint. Statistical analysis was performed with SPSS Statistics 18 application by IBM. (SPSS Inc, 2010, 233 S. Wacker Drive, 11th floor Chicago, IL, <http://www.spss.com/statistics/>).

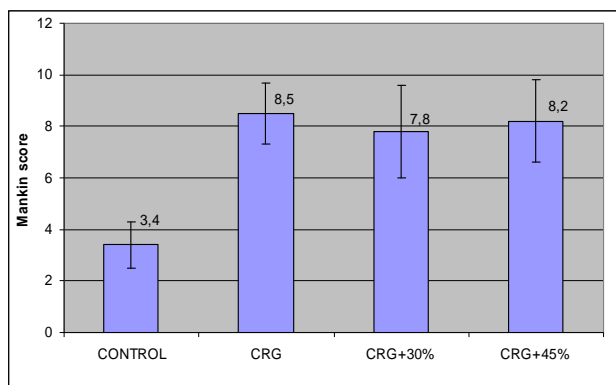


Fig. 1. Ascertainment of Mankin score in control, induced osteoarthritis and hyperlipidic 30% and 45% osteoarthritis groups

3. The role of estrogen levels alterations in the evolution and prognostics of experimental osteoarthritis in rat

Hyperestrogenism was induced by oral administration of 17 β -estradiol, as Estrofem produced by Novo Nordisk. Hypoestrogenism was created by oral administration of Tamoxifen as Tamoxifen 10 Hexal product.

Tabel II. Animal groups used for studying the effects of estrogen levels alterations on experimental osteoarthritis

No.	Animal group properties	Callsign
1	Negative control (Saline solution 0,02 ml)	CONTROL
2	Carrageenan (0,02 ml carrageenan solution)	CRG

3	CRG + estradiol 0,04 mg/kg/day for 8 weeks	CRG + 0,04ES
4	CRG + estradiol 0,08 mg/kg/day for 8 weeks	CRG + 0,08ES
5	CRG + estradiol 0,08 mg/kg/day for 4 weeks	CRG + 0,08ES-4
6	CRG + tamoxifen 0,2 mg/kg/day for 8 weeks	CRG + 0,2TX
7	CRG + tamoxifen 0,4 mg/kg/day for 8 weeks	CRG + 0,4TX
8	CRG + tamoxifen 0,4 mg/kg/day for 4 weeks	CRG + 0,4TX -4

In the day of the animals were euthanized we obtained venous blood trough retrobulbar punction and we determined the following laboratory parameters: plasmatic nitrites and nitrates, white blood cell count, leukocyte percentage breakdown, total plasmatic protein levels, C reactive protein, IL-1 β , MMP-3 (stromelysin), total cholesterol, triglycerides, HDL cholesterol. The study of the evolution of the articular diameter was done by serial measurements of the joint diameter of the injected joint in the first day of each week of the experiment.

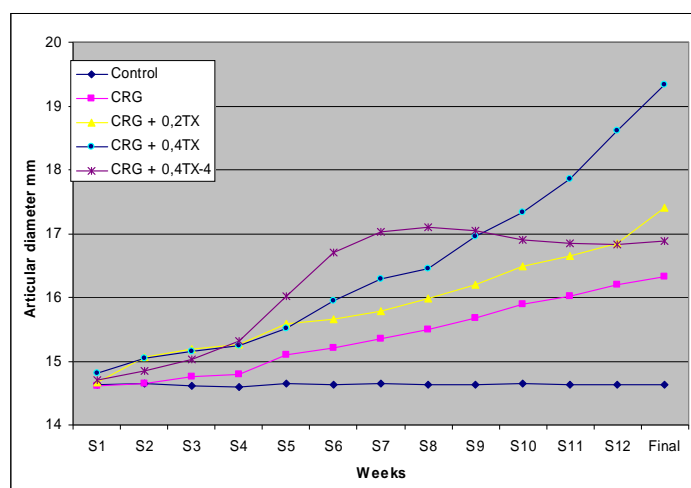


Fig. 2. The evolution of the articular diameter in the group with plain osteoarthritis and osteoarthritis associated with various degrees and time periods of estrogenic deficiency

4. The influence of thyroid status modifications on the evolution of experimental osteoarthritis in rat

Hypothyroidism was provoked by oral administration of thyamazol in the form of the commercial product Thyrozol produced by Merk KgaA and hyperthyroidism was generated by oral administration of levothyroxin in the form of the commercial product L-Thyroxin.

No.	Animal group properties	Callsign
-----	-------------------------	----------

1	Negative control (Saline solution 0,02 ml)	CONTROL
2	Carrageenan (0,02 ml carrageenan solution)	CRG
3	CRG + thiamazol 6,25 mg/kg/day for 8 weeks	CRG + 6,25TY
4	CRG + thiamazol 12,5 mg/kg/day for 8 weeks	CRG + 12,5TY
5	CRG + thiamazol 12,5 mg/kg/day for 4 weeks	CRG + 12,5TY-4
6	CRG + levotiroxină 5 µg/kg/day for 8 weeks	CRG + 5LT
7	CRG + levotiroxină 10 µg/kg/day for 8 weeks	CRG + 10LT
8	CRG + levotiroxină 10 µg/kg/day for 4 weeks	CRG + 10LT -4

In the day of the animals were euthanized we obtained venous blood trough retrobulbar punction and we determined the following laboratory parameters: plasmatic nitrites and nitrates, white blood cell count, leukocyte percentage breakdown, total plasmatic protein levels, C reactive protein, IL-1 β , MMP-3 (stromelysin), total cholesterol, triglycerides, HDL cholesterol.

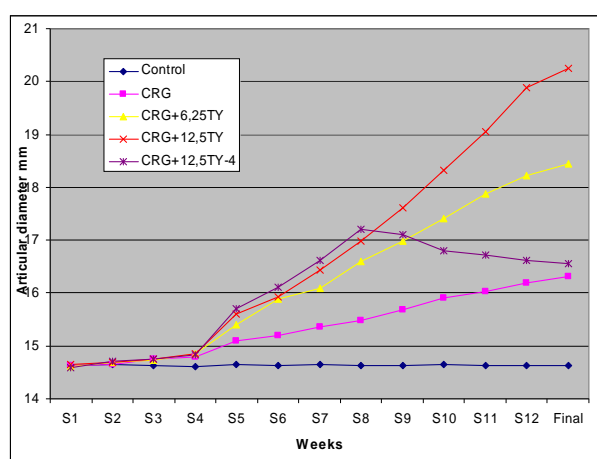


Fig. 5. The evolution of the articular diameter in the group with plain osteoarthritis and osteoarthritis associated with various degrees and time periods of hypothyroidism

7. Alterations in usual laboratory and clinical findings found in human adult osteoarthritis

A number of 1020 subjects were clinically evaluated trough WOMAC questionnaire for the presence of osteoarthritis of the knee. For these patients we also obtained the following laboratory parameters: fasting triglycerides, total cholesterol, HDL cholesterol, and we estimated the leves of LDL cholesterol. We also obtained serum levels of glucose, creatinin, alanine transaminaze, and we measured blood pressure. We recorded sex, age and body mass index of our subjects.

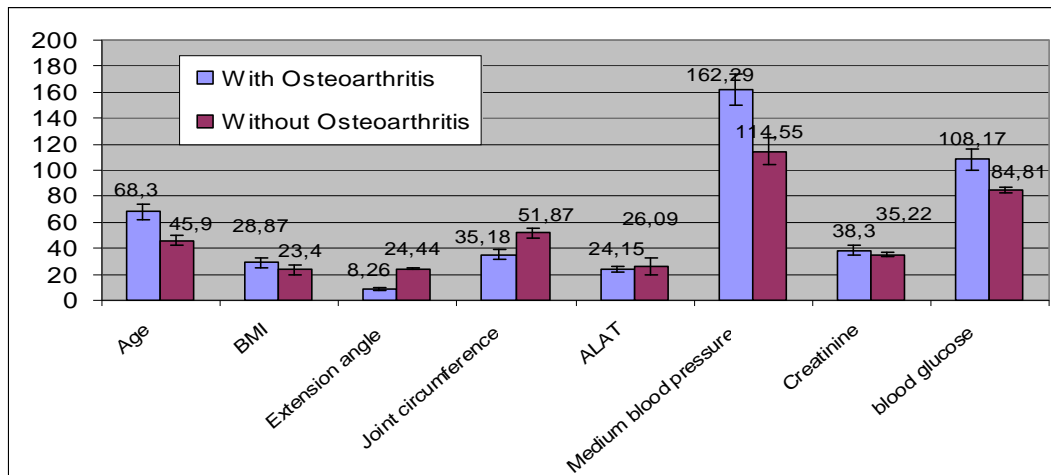


Figure 7. Comparison of studied laboratory, morphological and functional parameters in the healthy group compared with the group with osteoarthritis

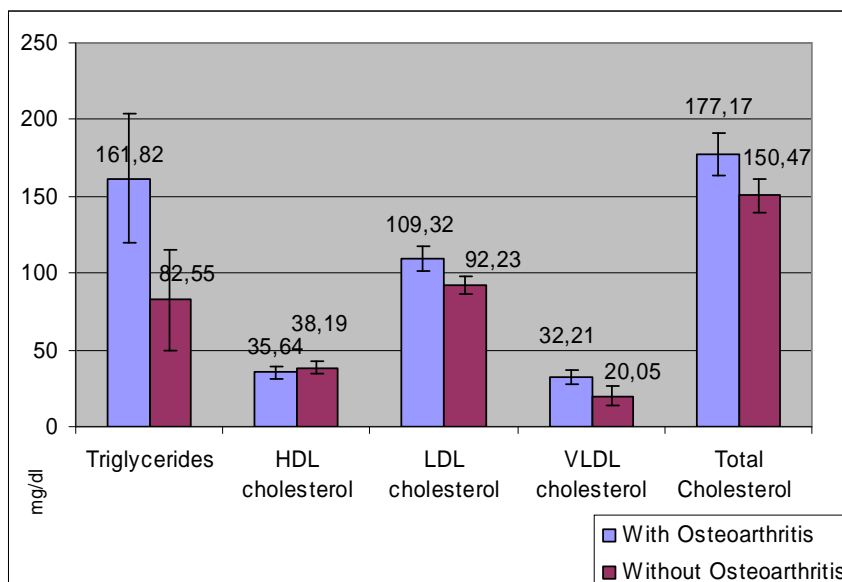


Figure 8. Comparison of the lipemic in the healthy group compared with the group with osteoarthritis

6. General conclusions

10. In experimental osteoarthritis the expression of iNOS is elevated and consequently there is a raise in NO levels, because we identified high levels of nitrites and nitrates.
11. The No excess acts as key mediator of systemic changes because lowering the NO synthesis reduced the white blood cell count, decreased the levels of C reactive protein and of IL-1 β . These results show the utility of NO synthesis monitoring for the evaluation of systemic changes in osteoarthritis.

12. In the presence of an estrogen deficiency and of hypothyroidism the production of NO is elevated as proved by raising levels of nitrites and nitrates.
13. Combined induced dyslipidemia causes the augmentation of the articular diameter in osteoarthritic rats but does not modify the evolution of osteoarthritis from the histological and functional standpoints. We conclude that lipemic profiling is not crucial in the battery of tests required for the laboratory investigation of articular disease.
14. Estrogen deficiency and of hypothyroidism precipitate the aggravation of an existing osteoarthritis in all three studied characteristics: morphologic – trough articular diameter, functional – trough the maximal extension angle and histologic – trough Mankin score. The adjustment of the deficiencies improves the evolution of osteoarthritis from morphological, histological, and functional standpoints. We therefore state that the titration of the laboratory parameters duo represented by FT4 and 17 β – estradiol is a good basis for prospective evaluation of osteoarthritis.
15. The alteration in the evolution of osteoarthritis by induced estrogen deficiency and experimental hypothyroidism is done via the raising of CRP, IL-1 β , and stromelysin, markers of osteoarthritis pathogenesis and of articular destruction.
16. Hyperthyroidism has a protective effect over the osteoarthritic joint, emphasizing the value of thyroid hormones titration in the assessment of already installed osteoarthritis as much as a possible screening test for highlighting the population groups exposed to the risk of developing osteoarthritis in the future.
17. Extrapolating the experimental results obtained in this species that is inherently protected from dyslipidemias and endocrine imbalances, we identify points of resemblance but also important differences. We proved that in humans, the BMI, blood pressure, blood glucose and total cholesterol are significantly raised in subjects with osteoarthritis compared with healthy ones.
18. There are significant correlations between raised levels of total cholesterol, blood glucose, obesity and blood pressure on one side and the degree of morphologic and clinical deterioration in osteoarthritis on the other side.

Key words: osteoarthritis, dyslipidemia, hypothyroidism, estrogen deficiency, high blood pressure, obesity, hyperthyroidism, hyperestrogenism

Selective Bibliography

3. Lawrence RC, Hochberg MC, Kelsey JL, McDuffie FC, Medsger TA Jr, Felts WR, et al. Estimates of the prevalence of selected arthritic and musculoskeletal diseases in the United States. *J Rheumatol* 1989;16:427-41.
4. Felson DT, Zhang Y. An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis Rheum* 1998;41:1343-55.
15. Al-Arfaj AS., Radiographic osteoarthritis and serum cholesterol. *Saudi Med J.* 2003 Jul;24(7):745-7.)_Al-Arfaj AS. Radiographic osteoarthritis and serum triglycerides. *Bahrain Med Bull* 2003; 25(2):77-79.
16. Nevitt M C, Felson D T Sex hormones and the risk of osteoarthritis in women: epidemiological evidence. *Ann Rheum Dis.* 1996 September; 55(9): 673–676.
17. JAH Wass¹, KG White² & A Elliott² Osteoporosis, osteopaenia and osteoarthritis in autoimmune hypoadrenalism. *Endocrine Abstracts* (2006) 11 P207.
18. Turmukhambetova Bt, Bagirova Vv, Boguslavskaja Mi. Thyroid status and clinical features of osteoarthritis in the region of goiter endemia. *Ter Arkh.* 2000;72(10):10-2.
19. Spector TD, Cicuttini F, Baker J, Loughlin J, Hart D. Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *BMJ.* 1996 Apr 13;312(7036):940-3.
20. M.Hurley The Role Of Muscle Weakness In The Pathogenesis Of Osteoarthritis *Rheumatic Disease Clinics of North America*, Volume 25, Issue 2, Pages 283-298.
21. M Doherty, M Patrick, and R Powell Nodal generalised osteoarthritis is an autoimmune disease. *Ann Rheum Dis.* 1990 December; 49(12): 1017–1020.
22. Martel-Pelletier J, Cloutier JM, Pelletier JP. Cathepsin B and cysteine protease inhibitors in human osteoarthritis. *J Orthop Res.* 1990 May;8(3):336-44.
23. E. Hedbom and H.J. Häuselmann Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role of inflammation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2002; 59 , 1: 45-53
24. Pelletier JP, DiBattista JA, Roughley P, McCollum R, Martel-Pelletier J. Cytokines and inflammation in cartilage degradation. *Rheum Dis Clin North Am* 1993;19:545-68.
25. Malesud CJ. The role of growth factors in cartilage metabolism. *Rheum Dis Clin North Am* 1993; 19:569-80.
140. Knauper V., Lopez-Otin C., Smith B., et al: Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* 1996; 271:1544-1550.
150. Mankin H.J., Mow V.C., Buckwalter J.A., et al: *Form and function of articular cartilage.* In: Simon S., ed. *Orthopaedic Basic Science*, Chicago: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 1994:1-44.
241. Xiao Y, Cui J, Li YX, Shi YH, Wang B, Le GW, Wang ZP. Dyslipidemic high-fat diet affects adversely bone metabolism in mice associated with impaired antioxidant capacity. *Nutrition.* 2010 Apr 12., Rui-li Yang, Wu Li, Yong-Hui Shi, Guo-Wei Le, Lipoic acid prevents high-fat diet-induced dyslipidemia and oxidative stress: A microarray analysis, *Nutrition* - June 2008 Vol. 24, Issue 6, Pages 582-588.

CURRICULUM VITAE

Name and surname: OVIDIU DRAGOMIR

Place and date of birth: Cluj – Napoca, August 12, 1977

Marital status: Married, 1 child

Education:

High School: CLUJ-NAPOCA, 1992-1996 “Tiberiu Popoviciu” Informatics High School

University: CLUJ-NAPOCA, 1996-2002 “Iuliu Hațieganu” University of Medicine and Pharmacy, Faculty of General Medicine

Licensure examination: CLUJ-NAPOCA, 2002, Iuliu Hațieganu” University of Medicine and Pharmacy, Faculty of General Medicine; Graduation Thesis: “Morphopathological, clinical and imagistic correlations in child bulbitis”, scientific coordinator: Prof. Dr. Nicolae Miu – Second Pediatrics Clinic – CLUJ NAPOCA

Master: CLUJ-NAPOCA, 2002-2004 “Iuliu Hațieganu” University of Medicine and Pharmacy, Bioinformatics

Licensure examination: CLUJ-NAPOCA, 2004, Iuliu Hațieganu” University of Medicine and Pharmacy, Bioinformatics; Graduation Thesis: “The role of mobile devices software in vital parameters monitoring”, scientific coordinator: Prof. Dr. Andrei Achimaș-Cadariu Department of Medical Informatics.

Doctoral studies: November 1, 2002 – present, Normal and Pathological Physiology, scientific coordinator: Prof. Dr. Luminița Pleșca-Manea: “Monitorizarea afecțiunilor inflamatorii articulare prin parametrii de laborator”

Medical career :

Internship: January 01, 2003 – December 31, 2003 Cluj-Napoca County Clinical Hospital

Residency : February 01, 2005 – October 15, 2008 Family Medicine - County Clinical Hospital Cluj Napoca

May, 2004 – October, 2005 Ship’s physician, M.V. Sapphire, Louis Cruise Lines – Marshall Islands

May 01,2008 – present Team Leading Physician – house call line of Ambulance Service Of Cluj County

February 01,2009 – present Unit’s physician of Emergency Situations Department, in County Medical Center – Cluj of Internal Affairs Ministry of Romania

May 01, 2009 – present Team Leading Physician / Coordinating Physician Prompturg Ambulance Service

Special scientific interests: articular pathology and pathophysiology, applied medical informatics

Foreign languages: English, French

Scientific activity

Publications in speciality journals:

- Dragomir O., Pleșca Manea L. Modificările profilului lipemic în osteoartrita adultului – studiu clinic în asistența medicală primară Clujul Medical 2009, 82-3:407-10.
- Dragomir O., Pleșca Manea L. Importanța hipotiroidismului în evoluția și prognosticul osteoartritei experimentale la șobolan. Clujul Medical 2010, 83-2:250-5.