

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
КАТЕДРА ПО ВЪТРЕШНИ БОЛЕСТИ
КЛИНИКА ПО РЕВМАТОЛОГИЯ

Д-Р ЦВЕТОСЛАВ АНТОНОВ ГЕОРГИЕВ

**КЛИНИЧНИ, СЕРОЛОГИЧНИ И ОБРАЗНИ
ПРОУЧВАНИЯ ПРИ БОЛНИ С ГОНАРТРОЗА,
ЛЕКУВАНИ С РАЗЛИЧНИ ТЕРАПЕВТИЧНИ
СРЕДСТВА**

**ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА
ОБРАЗОВАТЕЛНАТА И НАУЧНА СТЕПЕН “ДОКТОР”**

Научен ръководител: проф. д-р Румен Стоилов д.м.

**София
2018**

Съдържание

Използвани съкращения	3
Въведение	6
1. Литературен обзор	8
1.1. Епидемиология	9
1.2. Етиопатогенеза	9
1.3. Клинична картина	17
1.4. Диагностика и оценка	20
1.5. Лечение	39
1.6. Заключение	55
2. Цел и задачи	58
2.1. Цел	58
2.2. Задачи	58
3. Материали и методи	60
3.1. Пациенти и контроли	60
3.2. Клинични методи	61
3.3. Серологични методи	65
3.4. Образни методи	66
3.5. Дизайн на проучването	70
3.6. Статистически анализ	77
4. Резултати	79
4.1. Крос-секционно проучване	79
4.2. Лонгитудинално проспективно проучване	99
5. Обсъждане	131
5.1. Клинични проучвания върху пациенти с гонартроза	132
5.2. Серологични проучвания върху пациенти с гонартроза	140
5.3. Образни проучвания върху пациенти с гонартроза	146
5.4. Сравнение между терапевтичните групи	150
6. Изводи	154
7. Приноси	155
Библиография	157

Използвани съкращения

На кирилица

АДФ – аденозиндифосфат

АТФ – аденозинтрифосфат

ГоА – гонартроза

ДНК – дезоксирибонуклеиновата киселина

ДИФ – дистални интерфалангеални стави

ЕЦМ – екстрацелуларен матрикс

ИТМ – индекс на телесна маса

КМК – карпо-метакарпална става

КС – кортикостероиди

КТ – компютърна томография

МКЗП – минимално клинично значимо подобрене

МКФ – метакарпо-фалангеални стави

МРТ – магнитно-резонансна томография

НСПВС – нестероидни противовъзпалителни средства

ОА – остеоартроза

ПИФ – проксимални интерфалангеални стави

РА – ревматоиден артрит

РНК – рибонуклеинова киселина

т.т. – телесно тегло

УМБАЛ – университетска многопрофилна болница за активно лечение

ХК – хиалуронова киселина

На латиница

ACR – American College of Rheumatology

ADAMTS – a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs

ANOVA – analysis of variance

ARAMIS – Arthritis Rheumatism and Aging Medical Information System

AUC – area under the curve

BAFF – B-cell activating factor

BIPED – Burden of disease, Investigative, Prognostic, Efficacy of intervention and Diagnostic класификационна схема

BMPs – костни морфогенетични протеини

C2C – collagen type II cleavage

CD – cluster of differentiation

COMP – cartilage oligomeric matrix protein

COX – циклооксигеназа

CRP – C-реактивен протеин

CTX – C-terminal telopeptide

EGF – epidermal growth factor

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

ESCEO – European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases

EULAR – European League Against Rheumatism

FGF – fibroblast growth factor

HAQ-DI – Health Assessment Quality – Disease Index

HMWHAx1 – група на пациентите, лекувани с еднократно приложение на кръстосаносвързана високомолекулна хиалуронова киселина за период от 1 година

HMWHAx2 – група на пациентите, лекувани с двукратно приложение на кръстосаносвързана високомолекулна хиалуронова киселина през 6 месеца за период от 1 година

ICAM-1 – intracellular adhesion molecule-1

IFN – interferon

IGF-1 – insulin-like growth factor 1

IL – interleukin

IL-1RA – interleukin-1 receptor antagonist

iNOS – nitric oxide synthases

KL – Kellgren-Lawrence скала

miR – микро-рибонуклеинова киселина

MMP – matrix metalloproteinase

NF- κ B – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NO – азитен оксид

NS – not significant

NTX – N-terminal telopeptide

OARSI – Osteoarthritis Research Society International

OMERACT – Outcome Measures in Rheumatology

OR – odds ratio

PD – proton density

PDEGF – platelet derived epidermal growth factor

PDGF – platelet growth factor

PG - простагландин

PPP – бедна на тромбоцити плазма

PRP – богата на тромбоцити плазма

PRP_{x2} – група на пациентите, провели 2 курса по три инжекции с богата на тромбоцити плазма за период от 1 година

RHAMM - hyaluronan-mediated motility receptor

ROC – receiver operator characteristics

SD – standard deviation

SF-36 – Short Form 36

SYSADOA – symptomatic slow acting drugs for osteoarthritis

TGF- β – transforming growth factor beta

TIINE – type II collagen neoepitope

TNF – tumor-necrosis facto

VAS – visual analogue scale

VEGF – vascular endothelial growth factor

Wnt – протеини Wnt

WOMAC – Western Ontario and McMaster Universities OA index

WORMS – Whole-Organ magnetic Resonance iMaging Score

Въведение

Остеоартрозата (ОА) е най-честата причина за болка от ставен произход, придружена в различна степен от функционален дефицит и намалено качество и продължителност на живот [1-3]. Гонартрозата (ГоА), като най-честата локализация на ОА [4], засяга хора от различни възрастови групи, с вариращо ниво на физическа активност [5]. Една четвърт от популацията над 55-годишна възраст страда от болка в колянната става, а половината от тях показват рентгенови белези за ОА [6, 7].

Исторически терминът „остеоартроза“ е въведен, за да опише обичайна клинична находка: болезнени и деформирани стави при по-възрастната част от населението. Усилията за по-добро разбиране на патофизиологията на болестта са довели до рентгенографското ѝ охарактеризиране през 1957 от Kellgren и Lawrence [8]. Макар че са изминали повече от 60 години, съвременният клиницист все още се уповава на описаните от тях характеристики: стеснена ставна междина, субхондрална остеосклероза и остеофитоза. Нещо повече - лицевата рентгенография е всеобщо припозната като „златен стандарт“ за поставяне на диагноза [9]. Въпреки това причинно-следствената връзка между рентгенографските характеристики и първичната клинична изява (напр. болката) остава енигматична. Проучвания с големи кохорти пациенти с ГоА показват, че едва 50% от тях имат рентгенографски белези на ОА [10, 11]. От друга страна, едва половината от всички индивиди с характерна за ГоА рентгенографска находка изпитват болка в коляното [12]. Става ясно, че със своята полуколичествена скала за оценка и ниска чувствителност и специфичност, рентгенографията е недостатъчна за поставяне на ранна диагноза и мониторинг на болестната прогресия [13]. Ето защо в последните години все по-голямо приложение в клиничната практика намират новите образни модалности като магнитно-резонансната томография (МРТ) и ставната ултрасонография, на базата на които се разработват полуколичествени

скали за оценка, измерващи не само хрущялната дегенерация, но и други характерни за ОА увреди на ставния апарат [14-16].

Остеоартрозата се характеризира с асимптоматичен, молекулярен стадий, по време на който възможното патогенетично лечение би било най-ефективно [17]. Това създаде необходимост за проучване, търсене, откриване, изследване и верификация на нови диагностични индикатори при пациенти с ГоА в лицето на биомаркерите, отразяващи ставната ремоделация.

Дисбалансът между проинфламаторни (интерлевкин IL-1 α , IL-1 β и TNF- α) и антиинфламаторни цитокини (IL-4, IL-10 и IL-1 рецепторен антагонист) стои в основата на активирана каскада от протеолитични ензими, водеща до хрущялна деструкция [18]. Освен хиалинния хрущял, при ГоА се засягат и субхондралната кост, ставната капсула, лигаментите, менискусите, периставната мускулатура и сензорната нервна система [19]. Въпреки че вече разполагаме с по-голяма яснота около патогенетичните механизми на развитие и прогресия на ОА, утвърдените консервативни лечебни подходи служат по-скоро за облекчаване на симптомите, отколкото за повлияване на биохимичната среда на ставата и повлияване на болестния процес. Лъч надежда хвърлят високомолекулните кръстосаносвързани хиалуронови киселини, които служат за възстановяване на реологията на ставната течност, и иновативните ортобиологични средства като богатата на тромбоцити плазма (PRP). Освен че представлява висококонцентриран „коктейл“ от растежни фактори [20], PRP също освобождава анти-инфламаторни цитокини [21] с потенциален болестопроменящ ефект.

В своята монография Paul Dierre най-точно формулира основната пречка за разплитането на загадката „остеоартроза“, а именно: “Пред нас стои проблемът, че много малко изследователи активно проучват остеоартрозата, защото старата ѝ концепция като скучно, обусловено от възрастта, дегенеративно заболяване все още битува. Моят апел към следващото поколение ревматолози е да се заемат с предизвикателството остеоартроза“ [22].

1. Литературен обзор

ОА е заболяване на синовиалната става, характеризиращо се с хрущялна загуба, ремоделиране на прилежащата кост и съпътстващо възпаление [23]. Съвременната концепция за ОА представя заболяването като патологичен процес, който засяга всички структури на ставния апарат, включително хиалинния хрущял, синовиалната мембрана, субхондралната кост, лигаментите и периартикуларните мускули (*Фигура 1.1*). Ето защо ОА може да се разглежда като група от припокриващи се състояния с различна етиология, резултат от комбинация на системни (генетични, хормонални и метаболитни) и локални фактори (биомеханично или биохимично медиирани явления), които прогресивно водят до състояние с добре известни клиничко-морфологични характеристики.



Фиг. 1.1. Остеоартрозата е заболяване на цялата става

1.1. Епидемиология

ОА е най-честата причина за ставна болка, придружена в различна степен от функционален дефицит и намалено качество на живот [1-3, 24]. Според статистически данни ОА засяга 12-15% от възрастното население [6, 25]. Счита се също, че 46% от хората ще развият симптоматична ГоА в определен етап от живота си [26]. Тенденцията за идните десетилетия е да се увеличи честотата на артрозната болест поради застаряване на населението. Въпреки пандемичния характер на разпространение, точната етиология, патогенеза и прогресия на ОА остават енигматични и недокрай изяснени [27-29].

1.2. Етиопатогенеза

1.2.1. Морфологични промени в хиалинния хрущял

Най-ранните морфологични промени при ОА се наблюдават в повърхностния слой на хиалинния хрущял и включват загрубването му, поява на повърхностни неравности, фибрилиране и променено протеогликаново разпределение. На по-късен етап промените се изразяват в задълбочаване на образуваните неравности, преминаването им в междинния слой на хиалинния хрущял с поява на ерозии и евентуално развитие на улцерации, откриващи подлежащата кост (*Фигура 1.2*).

Опитите за репарация се изразяват в първоначално увеличение на броя на хондроцитите, които образуват струпвания от пролиферирани клетки, експресиращи високи нива на матриксни протеини, включително агрекан и тип II колаген, както и специфични за мезенхимните стволови клетки маркери, с последваща хипертрофична диференциация [30]. Тези хондроцитни струпвания са отличителен белег за ранната ОА, като се смята, че те допринасят за патогенезата и прогресията чрез освобождаване на протеинази, растежни фактори и възпалителни цитокини, които засягат заобикалящия екстрацелуларен матрикс и хондроцити.



Фиг. 1.2. Различия между нормална и артрозна става

След началната пролиферативна фаза стареещият хиалинен хрущял се характеризира с намален брой хондроцити (хипоцелуларитет) и намалена синтетична способност на екстрацелуларен матрикс. Докато в хиалинния хрущял на бедрената глава у млади възрастни клетъчната плътност се равнява на около $24\,000/\text{mm}^3$ в повърхностната зона и $8000/\text{mm}^3$ в дълбоката (радиална) зона и хондроцитите съставляват средно около 1,65% от целия обем на неувредения хрущял, този брой е силно намален при дегенеративна ставна болест поради преждевременна клетъчна смърт чрез некроза и най-вече апоптоза на хондроцитите. Тези процеси са резултат от натоварвания с дълга продължителност или висок интензитет. Инхибицията на апоптозата посредством потискане на активацията на каспази е обект на изследователска дейност и представлява потенциална бъдеща терапевтична алтернатива за предотвратяване на вторичната ОА в резултат травматизъм [31].

1.2.2. Промени в подлежащата кост и синовиалната тъкан

Характерна морфологична особеност на ОА са маргиналните остеофити и субхондралната остеосклероза – израз на компенсаторна репарация на периоста и подлежащата кост.

Остеофитите са съставени от новоформиран фиброхрущял и кост, разположени по периферията на ставата между хиалинния хрущял и периоста. Те са резултат от хондрогенна диференциация на прогениторните периостални клетки в резултат на компенсаторен клетъчен репарационен отговор към променената среда от растежни фактори. В определени условия остеофитите могат да изпълняват дори стабилизираща функция. Въпреки това при прогресия на заболяването остеофитите ограничават движенията и допринасят за появата и обострянето на болковата симптоматика.

Все повече доказателства подкрепят твърдението, че субхондралната кост активно участва в патогенетичните механизми на ОА. Повишената ремоделираща активност и отлагането на калций в субхондралната кост е начална промяна при ОА и може да бъде доловена рентгенографски още преди осезаема загуба на ставен хрущял. Промените, настъпващи на границата кост-хиалинен хрущял, водят до изменения в механичната среда и моделират отговора на надлежащите хондроцити към биомеханичните стимули [28]. Повишената васкуларизация и високите нива на инфламаторни цитокини в субхондралната кост вероятно играят роля за интензивната хрущялна ремоделация. Ранни промени се наблюдават и в най-дълбоко разположените радиална и дегенеративна зона на хиалинния хрущял, изразяващи се в повишено отлагане на калций [32]. При прогресия на състоянието се формират субхондралните кисти – резултат от развитието на некротични зони в субхондралната кост и проникването на синовиална течност под налягане през дефекти в хрущяла.

Възпалението на синовиалната мембрана и хидропсът са друга характерна особеност на патологията, наблюдавана при ОА. Тя традиционно се

приема като дегенеративно (невъзпалително) ставно заболяване, понеже броят на левкоцити в синовиалната течност не надвишава 2000 клетки/mm³. Тези параметри са често подвеждащи, защото нискостепенен възпалителен процес присъства в синовиалната тъкан и допринася за развитието на процеса. За разлика от ревматоидния артрит обаче синовиалното възпаление при ОА е локализирано в местата, разположени в близост до настъпили патологични увреди в хрущяла и костта. Активираната синовиална мембрана освобождава протеази и цитокини, които могат да ускорят деструкционния процес в близкия хрущял. В условията на нискостепенен възпалителен процес се стимулира производството на синовиалните цитокини IL-1 β и TNF, които безспорно допринасят за катаболната каскада [33], характерна за ОА.

1.2.3. Ранни метаболитни промени при ОА

В нормални условия матриксът на хиалинния хрущял е обект на нискоинтензивен динамичен ремоделиращ процес. Ниските нива на катаболна и синтетична ензимна активност гарантират равновесието, което запазва обема и качествения състав на хиалинния хрущял [34, 35].

Един от първите признаци за хрущялна дегенерация е намалената плътност на протеогликаните, резултат от репаративни процеси на синтеза на матрикс с „ниско качество”, а едва по-късно настъпва и количественият спад. Тази стъпка се смята за поне отчасти обратима. Въпреки това понижената плътност на протеогликаните увеличава хрущялната порьозност, правейки хиалинния хрущял, в частност колагенните фибри, по-поддатлив към действието на колагенази и други протеази. Това дава началото на порочен кръг от механизми с позитивна обратна връзка, които водят до по-нататъшна деградация на хиалинния хрущял [36].

1.2.4. Биомеханика и патогенеза на ОА

Една от основните функции на хондроцитите е да разпознават и отговарят на механични стимули, които превръщат в биохимични. Подобно на костната тъкан, те могат да ремоделират екстрацелуларния матрикс (ЕЦМ) в отговор на промени във функционалната натовареност на ставата. По този начин предадените физични сили (компресия, тензия, странично усукване) върху хиалинния хрущял повлияват синтеза, композицията и катаболизма му. Докато в нормални условия тези стимули подпомагат хондроцитите да поддържат състава и количеството на ЕЦМ, натоварвания с дълга продължителност или висок интензитет могат да причинят клетъчна смърт чрез апоптоза и увреди в колагенната мрежа [37].

Механотрансдукцията се осъществява от рецептори, разположени по хондроцитната повърхност, превръщащи механичните сигнали в биохимичен отговор. Човешките ставни хондроцити използват $\alpha 5 \beta 1$ интегрин като механорецептор. Механичната му стимулация предизвиква сигнална каскада, която последователно включва активиращи се от разпъване йонни канали (stretch-activated ion channels), актиновия цитоскелет и голям набор от адхезионни молекули [38]. Резултатът е анаболен отговор, който се манифестира с повишена експресия на агрегани и намалена такава на металопроотеинази. Механичната стимулация активира също Rho и Rho-киназните сигнални пътища, които се свързват с промени в актиновия цитоскелет. Стимулацията на Rho/ROCK пътя в този контекст е анаболен стимул, който води до ядрена транслокация и активация на Sox9, който е важен регулатор на генна експресия [39].

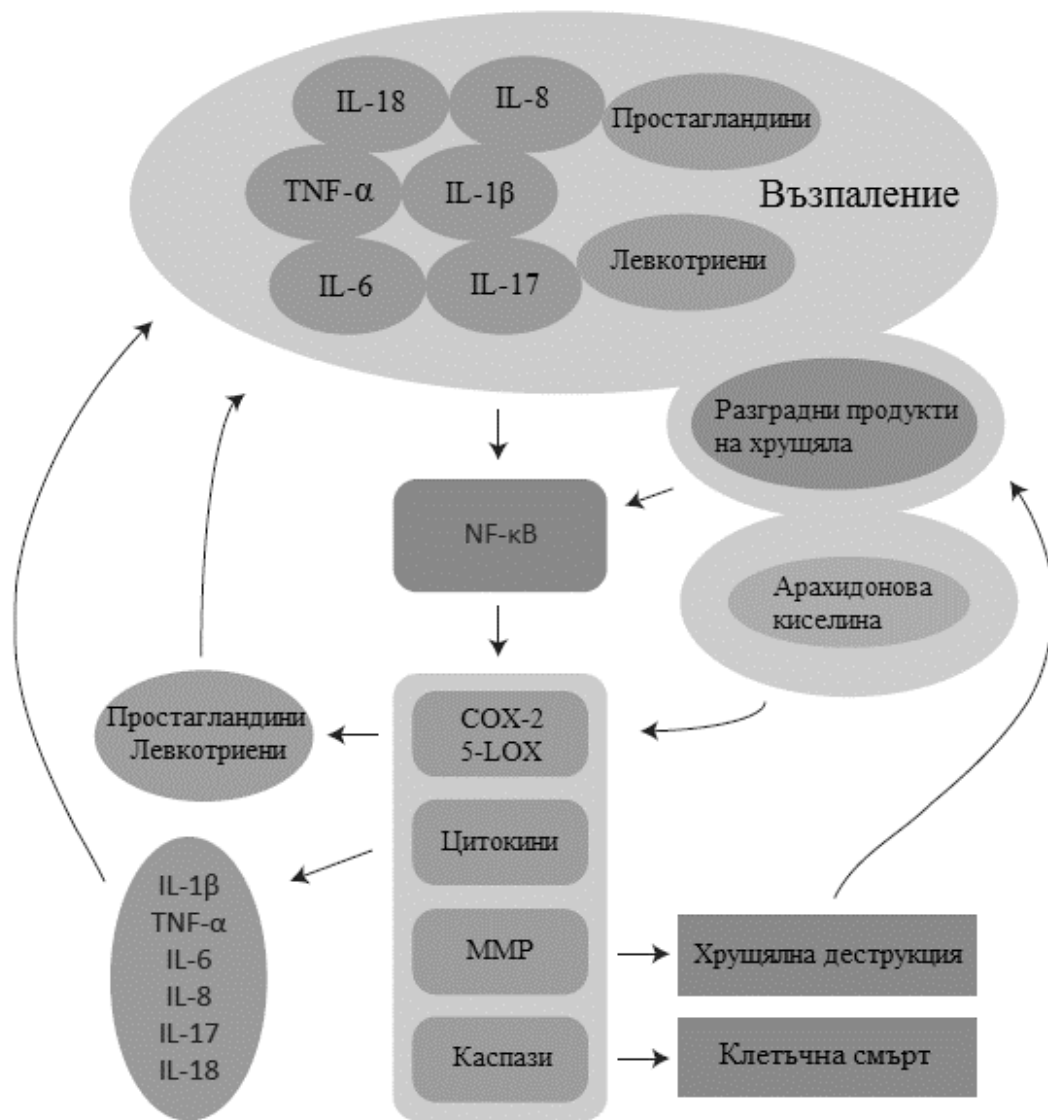
Дисрегулацията на тези анаболни пътища е допринасящ фактор за прогресията на ОА. Въпреки че $\alpha 5 \beta 1$ интегринът е също механично чувствителен при остеоартрозни хондроцити, последващите сигнални пътища при неговата стимулация се различават и тяхната стимулация води до повишено разграждане на хиалинен хрущял чрез продукция на

проинфламаторни субстанции, включващи цитокини, протеолитични ензими, простагландини (PGE₂) и азотен оксид (NO) [38, 40, 41].

1.2.5. Роля на възпалителните медиатори

Въпреки че нивата на възпалителни цитокини като IL-1 β , IL-6 и TNF са повишени в серума на пациенти с гонартроза [42-44], тези медиатори се произвеждат предимно вътреставно от активираните синовиална мембрана и хондроцити. Те автокаталитично индуцират собствената си синтеза и дифундират в хрущяла посредством синовиалната течност, като стимулират производството на протеинази, хемокини, азотен оксид и ейкозаноиди като простагландини и левкотриени. Ето как, въпреки че ОА не спада към групата на възпалителните ставни заболявания, възпалителните медиатори стоят в основата на болестната прогресия и представляват потенциален таргет за терапевтично повлияване [45] (*Фигура 1.3*).

Най-често асоциираните с ОА проинфламаторни цитокини са IL-1 β и TNF, продуцирани от активираните хондроцити [46] и синовиални клетки. И двата медиатора притежават съпоставими катаболни ефекти върху хондроцитния метаболизъм, понижавайки синтезата на протеогликани и колаген и увеличавайки освобождаването на агрекан чрез индукция на деструкционните протеази. IL-1 β и TNF също индуцират хондроцитите и синовиалните клетки да произвеждат други възпалителни медиатори като IL-8, IL-5, NO и простагландин E₂. Действието на двата ключови цитокина се медира чрез активацията на сигналния път на транскрипторния ядрен фактор капа B (NF κ B) [47, 48].



Фиг. 1.3. Порочният кръг, описващ патогенезата на артрозната болест

Действието на IL-1 зависи от взаимодействието му с два специфични клетъчни рецептора (тип I и тип II). Тип I рецепторът, пронизващ плазмената мембрана, е отговорен за сигналната трансдукция, докато тип II действа като рецептор примамка. Последният се експресира върху клетъчната мембрана, но не предава сигнала. Друга ключова молекула е IL-1 рецепторният антагонист (IL-1RA), който е естествен конкуритивен инхибитор на IL-1 β . Релативен дефицит на IL-1RA спрямо нивата на IL-1 е описан в синовиалната

тъкан на пациенти с ОА [49]. Прибавянето на IL-1RA или на разтворими тип I и тип II рецептори към хондроцитни култури блокира синтезата на простагландин E2, колагенази и NO [50].

Протеинази. Двете основни фамилии протеинази в патогенезата на ОА са:

- колагеназите, които разграждат тип II колагена (MMP-1, MMP-8, MMP-13 и MMP-28) и протеогликаните (MMP-3, който още превръща проензимите в техните активни форми);
- фамилията на агреканазите (ADAMTS), които медираат деструкцията на агрекан в хиалинния хрущял [51]. Тези протеолитични ензими се експресират в лезионните места на хиалинния хрущял, където се смята, че играят основна роля в деградацията на екстрацелуларен матрикс.

Азотен оксид. Той се продуцира от индуцируемата форма на азотоксидна синтаза (iNOS) и представлява основен катаболитен фактор, продуциран в отговор към проинфламаторните цитокини IL-1 β и TNF [52]. Въпреки че нормалният хрущял не експресира iNOS или азотен оксид без стимулация от цитокини, експлантите от хиалинен хрущял на пациенти с ОА спонтанно произвежда големи количества NO [53]. Азотният оксид притежава множество ефекти върху хондроцитите: (1) инхибиция на колагеновата и протеогликановата синтеза; (2) активация на MMP; (3) повишена чувствителност към увреди от други оксиданти (напр. H₂O₂) [54, 55].

Простагландини. Експресията на индуцируема циклооксигеназа-2 (COX-2) е повишена при остеоартрозни хондроцити, които спонтанно продуцират PGE₂ *ex vivo*. Неговото производство се индуцира от IL-1 β . Простагландините притежават разнообразни ефекти върху хондроцитния метаболизъм, включващи повишена синтеза на колаген тип II, активация на MMP и промоция на апоптозата. Инхибицията на COX-2 предпазва от IL-1 β -индуцираната деградация на протеоглигани [56].

Противовъзпалителни медиатори. В групата на антиинфламаторните медиатори се включват три цитокина IL-4, IL-10 и IL-13, притежаващи потенциала да модулират различни възпалителни процеси при ОА [57]. Сумарно те намаляват продукцията на IL-1 β , TNF, MMP и инхибират освобождаването на PGE2.

Анаболни фактори. Трансформирацият растежен фактор бета (TGF- β) е есенциален за формирането на хиалинния хрущял и балансираната му ремоделация. Той повлиява хрущялната хомеостаза на няколко нива: увеличава хондрогенезата на стволови клетки и индуцира продукцията на матрикс от хондроцитите. Костните морфогенетични протеини (BMPs) са структурно подобни на TGF- β , но активират различна група рецептори и вътреклетъчни сигнални молекули. BMPs влияят върху всички етапи на ембрионалната хондрогенеза и могат да стимулират хондрогенната диференциация от възрастни мезенхимни стволови клетки. Въпреки това свързването на TGF- β и BMP с определени рецептори може да има и противоположен ефект на описаното. При ОА те могат да индуцират крайната диференциация и хипертрофия на хондроцити – процеси, които са отличителен белег за ранна ОА [58].

1.3. Клинична картина

Гонартрозата е заболяване, което се характеризира с бавна прогресия в рамките на години или дори десетилетия. През този период пациентът обикновено понижава своята физическа активност, което го прави по-податлив на заболявания, асоциирани със заседнал начин на живот (включително затлъстяване и захарен диабет) [59].

1.3.1. Болка

Болката е основната причина, която кара пациентът да потърси лекарска помощ [60]. Въпреки че нейните характеристики често варират, пациентът описва типичната болка при ГоА като постепенно настъпваща, най-често умерена по интензитет, дълбока болка, разполагаща се на широка основа с пунктум максимум засегнатата става или дистално от нея, какъвто е случаят с колянната става [61]. Тя се усилва при прекомерна физическа дейност и се облекчава в покой.

Характеристиките на болката могат да подсказват причината за появата ѝ. Болка, която настъпва след физически натоварвания, обичайно е резултат на субхондрална исхемия – т.нар. „костна ангина“. Тази болка е често пареща и дълбоко разположена. Болка, която се разполага по ставните граници, с палпаторна болезненост на мястото, може да показва периставна увреда, резултат от разтягане на ставната капсула или периставните лигаменти или остеофитоза. Колянна болка, която се провокира или усилва при седене на нисък стол, често произхожда от пателофеморалната става.

Пациентите често свързват болката с промени в климатичните условия, дължащи се на алтерации в атмосферното налягане и околната температура [62]. В хода на развитие на заболяването болката променя своя характер. В началото тя се облекчава в покой и пациентите показват добър отговор към лечение с аналгетици, а впоследствие може да персистира в покой, без ефект от фармакологично лечение.

1.3.2. Скованост

Сковаността се появява след период на почивка, например веднага след ставане от сън или при изправяне след дълъг период в седнало положение. За разлика от възпалителните ставни заболявания, сковаността

при ОА трае само няколко минути, като много редки са случаите, при които достига и надвишава половин час. Пациентите рядко описват дифузна скованост, тъй като при ОА тя се ограничава само до засегнатите стави.

1.3.3. Походка

Артрозата на носещите стави води до характерни промени в походката, най-често поради съзнателни или подсъзнателни опити за щадене на засегнатата става. Походката при пациенти с ГоА е с определена характеристика, която трябва да се вземе под внимание при изработване на помощни средства. Промените в походката променят разпределението на тежестта и често са причини за акцелерация на дегенеративните промени в останалите стави и кръста.

1.3.4. Ставен оток

Ставният оток се дължи на пролиферация на ставната капсула и/или ставен излив. Пациентът често обаче съобщава погрешно за подуване, което се дължи на остеофитоза (напр. при артроза на ДИФС - възли на Хеберден) или хипертрофия на мастната възглавничка, какъвто е примерът с хипетрофията на телцето на Хофа при ГоА. Отокът, резултат от излив на синовиална течност, често води до загуба на пълна екстензия в колянната става.

1.3.5. Крепитации

Крепитациите при ОА най-често се описват от пациента като хрущене или пукане на ставата. Те са резултат от преместването на неравните ставни повърхности една спрямо друга. Въпреки че са налице при пасивно движение, най-добре се демонстрират при активно движение в засегнатата става. Крепитациите трябва да се разграничат от доброкачествения пукане

на МКФ и ПИФ стави, които са резултат от раздалечаване на ставните повърхности една от друга, с което се предизвиква вакуум.

1.3.6. Намален обем на движение

По-късно явяващият се намален обем на движения е резултат от хроничен синовит/излив или контрактури на периартикуларните меки тъкани. Когато има ограничение в обема на движение на носеща става (напр. колянна или тазобедрена става), допълнително се натоварват ипси- и контралатералните стави.

1.3.7. Деформитет и ставна нестабилност

Деформитетът, резултат от ОА, е късен симптом на заболяването. Най-често засегнатите стави са интерфалангиалните стави с образуване на характерните възли на Хеберден и Бушар, възможна сублуксация; първата метакарпофалангеална става; коляното (варус/валгус); тазобедрената става (скъсен крайник). Деформитет може да се асоциира с пълна анкилоза на ставата или нестабилност.

1.4. Диагностика и оценка

Поставянето на диагноза ГоА е базирана на строто определена, правилно подбрана комбинация от клинични, лабораторни и/или рентгенографски критерии [63]. В таблица 1.1 са показани класификационни критерии, препоръчани от Американския колеж по ревматология.

Табл. 1.1. Класификационни критерии на Американския колеж по ревматология [63]

Клинични и лабораторни критерии	Клинични и рентгенографски критерии	Клинични критерии
Болка в коляното и поне 5 от следните критерии:	Болка в коляното и наличие на остеофитоза на рентгенография, и поне 1 от следните критерии:	Болка в коляното и поне 3 от следните критерии:
<ul style="list-style-type: none"> • Възраст > 50 години • Скованост < 30 минути • Крепитации • Костна болезненост • Уголемяване на ставата • Липса на затопляне • СУЕ < 40 мм/ч • Ревматоиден фактор < 1:40 • Синовиална течност с характеристика на ОА * 	<ul style="list-style-type: none"> • Възраст > 50 години • Скованост < 30 минути • Крепитации 	<ul style="list-style-type: none"> • Възраст > 50 години • Скованост < 30 минути • Крепитации • Костна болезненост • Уголемяване на ставата • Липса на затопляне
Чувствителност, 92%	Чувствителност, 91%	Чувствителност, 95%
Специфичност, 75%	Специфичност, 86%	Специфичност, 69%

* Синовиалната течност трябва да съдържа < 2000 клетки/микролитър

1.4.1. Клинични проучвания върху пациенти с гонартроза

Комплексната клинична оценка на пациента и представянето ѝ в обработваем вид са крайъгълен камък в оценката на болестната активност и тежест, в проследяването на заболяването и отговора към лечение. Това включва както изследване на болката, сковаността и функционалния дефицит, така и измерване на последствията от болестта за пациента [65-68]. Съществува голямо разнообразие от инструменти за измерване на различните аспекти на здравословното състояние при пациенти с ГоА [69], които се характеризират с различни клинкометрични характеристики. По-специално внимание следва да се обърне на надеждността, валидността и особено на чувствителността на използваните тестове при минимална промяна в състоянието. Hawker и сътрудници считат, че оценката на пациенти с ГоА трябва да включва както болест-специфични, така и генерични инструменти, които покриват определени важни аспекти от цялостното състояние на пациента [70].

Клиничните проучвания при ОА трябва да използват публикувани и утвърдени тестове, които да позволяват сравнението на резултатите при отделните изпитвания на различните терапевтични интервенции [71]. Международното общество за проучване върху остеоартроза (OARSI) препоръчва включването на следните клинични показатели при разработката на дизайна и провеждането на клиничните изпитвания върху пациенти с остеоартроза [71]:

- Болка
- Физическа функция
- Глобална оценка на пациента

Допълнително се поощрява използването на въпросници за цялостна здравна оценка и оценка на инвалидизацията като Health Assessment Quality

– Disease Index (HAQ-DI) и Short Form 36 (SF-36) и глобалната оценка на лекаря на 10-сантиметрова аналогова скала. Други полезни показатели са:

- Сутрешна скованост
- Прием на аналгетични средства

Болест-специфични клинични въпросници. От многомерните инструменти за оценка най-често използваните са алгофункционалния индекс на Lequesne [72-74] и Western Ontario and McMaster Universities OA index (WOMAC) [75, 76]. Различни концептуално, тези два инструмента имат сходна цялостна статистическа ефективност, въпреки че WOMAC изглежда малко по-ефективен при предварителното проучване на пациентите с гонартроза за откриване на промени в болката и физическата функция [64, 77]. Докато WOMAC индексът оценява симптоми и функционален дефицит в отделни скали, които могат да бъдат впоследствие агрегирани в композиторен индекс, индексът на Lequesne сумира директно симптомите и функционалния дефицит. При него липсва възможност те да се оценяват поотделно. Също така WOMAC е пациентски въпросник, а Lequesne е разработен първоначално като интервю [72-76] и едва след това валидиран и като пациентски въпросник.

Генерични въпросници. Настоящите насоки препоръчват, освен болест-специфични въпросници, използването на генерични (неспецифични за заболяването) за оценка на общото здравословно състояние и качеството на живот при пациентите с хронични заболявания [78]. Чрез тях могат да се установят и измерят прояви или странични ефекти, несвързани с гонартрозата, но дължащи се на терапията или на други заболявания, да се съпостави здравословното състояние и степента на инвалидизация при отделните ревматични заболявания. Пример за генерични въпросници, използвани широко при пациенти с ГоА, включително в настоящия дисертационен труд, са Short Form 36 (SF-36) и Health Assessment Quality –

Disease Index (HAQ-DI).

HAQ-DI е въпросник за оценка на качеството на живот на пациента, свързано с неговото здравословно състояние и инвалидизация. Той оценява как ставното заболяване влияе върху ежедневните дейности на пациента. Въпросникът се попълва самостоятелно от пациента, без помощ от страна на здравен работник.

Според данни от Станфордската артритна, ревматична и ейджинг медицинска информационна система (ARAMIS), до 2003 г. въпросникът HAQ е използван повече от 200 000 пъти в рутинната практика и в изследователски условия [79] и се препоръчва от Американския колеж по ревматология (ACR) за измерване на физическата функция при пациенти с ревматоиден артрит [80]. Средните оценки, докладвани в проучвания за OA и ревматоиден артрит, са съответно 0,8 и 1,2. В общата популация този скор е 0,49 [79].

1.4.2. Серумни биомаркери при пациенти с гонартроза

OA се характеризира с асимптоматичен, молекулярен стадий (*Фигура 1.4*), през който патогенетичното лечение би било най-ефективно [17]. Това потвърждава необходимостта от търсене на алтернативни параметри за мониторинг на OA, които могат да служат като биомаркери в диагностиката на болестта [81].

Една от общоприетите дефиниции представя биомаркерите като „величина, която обективно може да бъде измерена и оценена като индикатор на нормалните биологични процеси, патогенетичните процеси или фармакологичния отговор към терапевтична интервенция“ [82].

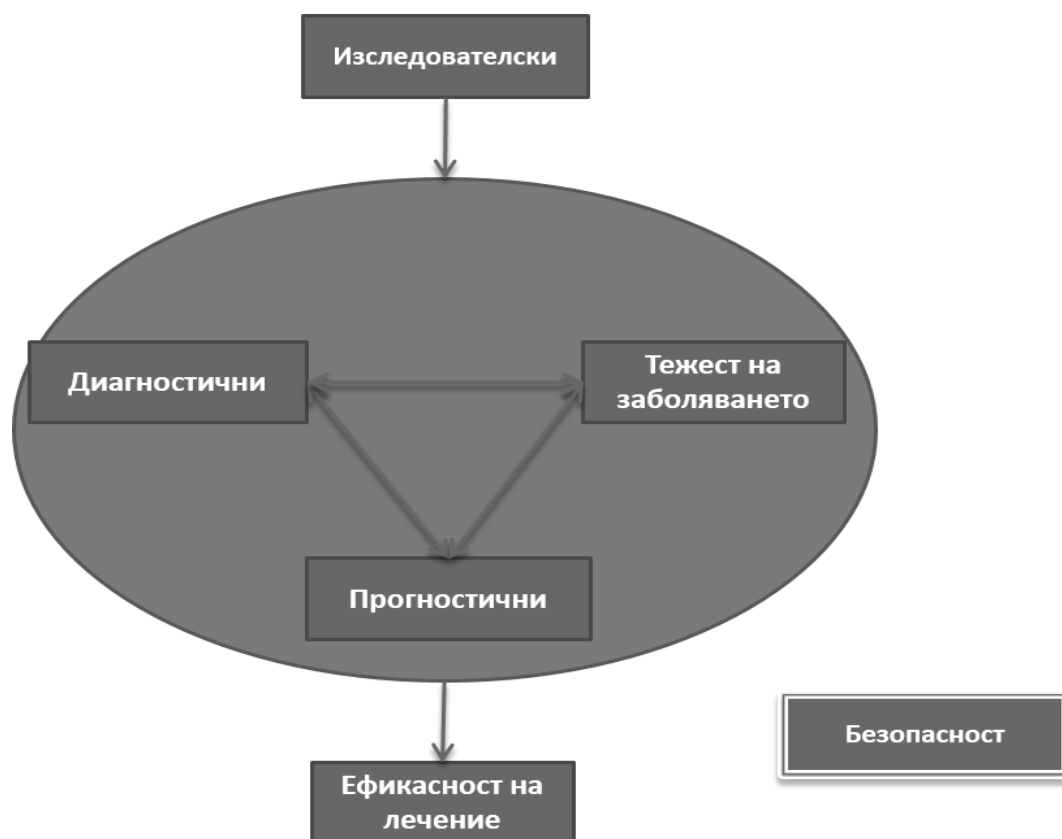


Фиг. 1.4. Стадии на остеоартроза според Kraus и сътрудници [17]

BIPED(S) класификационна схема. Мултидисциплинарна група (Osteoarthritis Biomarkers Network), отговаряща за осигуряването на обща рамка за комуникация в развиващата се област на биомаркерите при ОА, предлага класификационна схема, която категоризира биомаркерите според тяхната информативна стойност. Те могат да спаднат в една или повече от следните пет групи: диагностични, изследователски, прогностични, оценяващи тежестта на заболяването и ефикасността на терапията (BIPED – Burden of disease, Investigative, Prognostic, Efficacy of intervention and Diagnostic) (Фигура 1.5). „Диагностичен“ биомаркер е този, който може да отдиференцира дали определен пациент страда или не от ОА с добра позитивно- и негативно- предиктивна стойност, висока чувствителност и специфичност. Оценката на болестната активност се определя от т.нар. „биомаркери за оценка на тежестта“. „Прогностичните“ биомаркери прогнозираят началото на заболяването при здрави индивиди и имат предиктивна стойност по отношение на прогресията при хора с вече установена ОА. Биомаркерите за „ефикасност на терапията“ са тези, които намират приложение в рандомизирани контролирани проучвания за оценка на краткосрочните или дългосрочните успехи на лечението. „Изследователските“ биомаркери не могат да бъдат класифицирани в нито една от останалите категории [83].

Биохимични маркери. Тъй като дисбалансът между синтезата и деструкцията стои в основната на повишената хрущялна загуба при ОА, биомаркерите отразяващи тези метаболитни процеси представляват обект на интензивни изследвания (Фигура 1.6).

Засега съществуват осем биохимични маркери, отнасящи се до колагеновия метаболизъм. Шест от тях участват в неговото разграждане (CTX-II, Helix-II, C2C, Coll2-1, TIINE, Coll2-1 NO₂). Измежду тях С-терминалният телопептид на колаген тип II (CTX-II) е проучван най-обстойно. Благодарение на своя малък размер, той свободно се филтрира в бъбреците и се концентрира в урината. Уринният CTX-II кореспондира с остеофитозата и спада към четири от шестте възможни категории биомаркери според VIPED класификационната схема. [84-86].



Фиг. 1.5. Предложено от *ESCEO* развитие на биомаркерите



Фиг. 1.6. Разпределение на биомаркерите според *BIPEDs* класификацията на *ESCEO*

Друг добре проучен биомаркер, метаболит на колагена, е Coll2-1, който се характеризира с висока специфичност [87] и притежава предиктивна стойност по отношение на рентгенографската прогресия [88]. Той е чувствителен към структурни промени, настъпващи при артроза на една единствена става [87]. Coll2-1 и Coll2-1 NO2 са полезни за изучаването на окислително-свързаната разграждаща мрежа на колаген тип II при ОА [89].

Хрущялният олигомерен матриксен протеин (COMP) е тъканно-специфичен матриксен протеин, принадлежащ към тромбоспондиновата фамилия, който се синтезира от хондроцитите. Той се намира в големи количества в хиалинния хрущял, но може да бъде открит също и в серума, и в синовиалната течност. Неговата концентрация е десет пъти по-висока в синовиалната течност от тази в серума [90]. Въпреки това остава имплицитна ролята му в патогенезата на ОА. Той е вторият най-изследван биомаркер за

ОА и се категоризира в четири от групите на VIPED [91, 92]. Серумните нива на COMP позитивно корелират с магнитно-резонансната цялостна оценка на колянната става [93]. Те могат да помогнат за сепариране на артрозни пациенти от здрави контроли и да отразят болестната активност [94-96]. От друга страна COMP може да се използва с цел прогноза на заболяването [97].

Агреканът е важен протеогликан в ЕЦМ, който е отговорен за резистентността на хрущяла към компресионни сили. Агрекановото изчерпване в артрозния хрущял се дължи на повишеното разграждане на белтъчната част на молекулата от различни матриксни протеинази. Търсенето на фрагменти от молекулата на агрекана в човешкия серум и урина е обект на редица проучвания, резултатите от които са все още недостатъчни. [98, 99]

При ОА дисбалансът между проинфламаторните и антиинфламаторни цитокини стои в основата на активираната каскада от протеолитични ензими, водеща до хрущялна деструкция [18]. Матриксната металопроотеиназа 3 (MMP-3) принадлежи към голямото семейство на матриксните металопроотеинази: цинк-зависими ендопептидази с екстрацелуларна протеолитична активност. Серумните нива на MMP-3 са увеличени при възпалителни стави заболявания [100, 101], но скорошни изследвания показват, че този ензим играе важна роля в патогенезата на ОА [102]. Проучване на Li и сътрудници показва, че нивата на MMP-3 при умерена и напреднала ОА са по-високи от тези при ранна ОА и здрави контроли [103]. В допълнение MMP-3 нивата корелират с редукцията на обема на хиалинния хрущял във времето [104].

Съвременната концепция за остеоартроза (ОА) представя заболяването като патологичен процес, който засяга всички структури на ставния апарат, включително хиалинния хрущял, синовиалната мембрана, субхондралната кост, лигаментите и периартикуларните мускули. Промените в тези структури са част от патогенетичните механизми на болестта и

представляват интересен таргет за проучване в търсене на потенциални биомаркери.

Хиалуроновата киселина (ХК) е глюкозаминогликан, който е постоянна съставка на хиалинния хрущял и синовиалната мембрана, а в ставната течност изпълнява функцията на лубрикант. Серумната концентрация на ХК корелира позитивно със степента на остеофитоза и е третият най-проучван биомаркер, включен също в четири категории на VIPED [105].

Разграждането на тип I колаген по време на субхондралната костна резорбция може да бъде проследен от повишените нива на N- и C-терминални кръстосаносвързани телопептиди (NTX-I и CTX-I). Тези два маркера за костна резорбция се асоциират с прогресивна ОА, но няма разлика в нивата им между здрави и болни с непрогресивен ход на заболяването [106].

Генетични маркери. Генетичните фактори играят определяща роля за развитието на ОА. Проучвания на еднояйчни близнаци показват, че генетичната компонента съставлява между 39% и 65% от общия риск за развитие на ОА [107, 108], а първородствените роднини имат от два до три пъти по-висок риск за развитието ѝ [107]. Вероятно генетични фактори оказват влияние както върху структурата на хрущяла и настъпващите изменения в него под влияние на локални фактори (биомеханично или биохимично медиирани явления), така и върху костния метаболизъм и експресията на проинфламаторни цитокини. Идентификацията на специфични генетични фактори за развитие на ОА ще подпомогне по-доброто разбиране на болестта и откриването на отделни индивиди и фамилии с висок риск за ранна ОА.

Потенциални кандидати за генетични биомаркери са витамин D рецепторният ген и гените, кодиращи молекули, участващи в сигналния път на трансформацията растежен фактор β . Единичен нуклеотиден

полиморфизъм на ген, кодиращ ключов интрацелуларен трансмитер (SMAD3) в сигналния път на трансформиращия растежен фактор β , се асоциира с повишен риск за развитие както на коксартроза, така и на гонартроза [109].

Епигенетични маркери. През последното десетилетие се полагат големи усилия за изучаване на молекулярно ниво на етиопатогенетичните механизми на заболяванията. Епигенетиката изучава промените в генната експресия, които се предават от едно клетъчно поколение на друго, без това да води до промени в ДНК последователността. Регулационните механизми на епигенетиката са обект на въздействие на факторите на околната среда и включват метилизиране на ДНК, модификация на хистони и некодиращи РНК-и.

Резултатите от актуални клинични проучвания разкриват възможността микроРНК-ите да служат като биомаркери при ОА. Докладвани са увеличени нива на експресия на някои микроРНК-и (miR-9 и miR-98) в хиалинен хрущял при ОА. В същото време експресията на други (miR-146, miR-27b и miR-140) е намалена. Мурата и сътрудници установяват, че концентрациите на miR-16, 132, 146a и 223 в синовиална течност са значително по-ниски от плазмените концентрации при пациенти с РА и ОА. Плазмените нива на miR-132 имат добра дискриминативна стойност по отношение на диференцирането на здрави контроли от пациенти с РА и ОА, докато експресията на синовиалните микроРНК-и разграничават пациентите с РА и ОА [110-112].

Метаболомика и биомаркери. Все повече аргументи се натрупват в полза на твърдението, че остеоартрозата е първично метаболитно нарушение и че липидни, метаболитни и хуморални фактори допринасят за началото и прогресията ѝ [113].

Метаболомиката е иновативен подход, който позволява количествено определяне на голям брой метаболити с ниска молекулна маса в дадена

телесна течност или тъкан. Тя притежава потенциала за поставяне на ранна диагноза, контрол на терапията и разбиране на произхода и патогенетичните механизми за развитие на редица заболявания. Методът успешно се прилага в диагностиката и прогнозата на диабет, ИБС и артериална хипертония.

Приложението на метаболомния подход в търсенето на биомаркери за ОА е обект на интензивни проучвания. Изследване на синовиалната течност на 39 пациенти, разпределени в три групи (10 с ОА, 18 с РА и 11 с посттравматични ставни изливи), с помощта на ЯМР спектроскопия, показва, че в синовиалния пунктат на пациентите с посттравматични хидропси се установяват по-високи нива на наситени триглицериди, отколкото при ОА. Средната дължина на веригите на триглицеридите при ОА е по-къса от тази на останалите групи [114].

Друго проучване демонстрира висока корелация между рентгенографския стадий според Kellgren-Lawrence скалата и метаболитния профил, установен чрез ЯМР спектроскопия на урина [115].

Макар и без приложение в рутинната практика на този етап, резултатите от метаболомните анализи предлагат алтернативна перспектива за изследване на променените биохимични процеси, отговорни за началото и прогресията на ОА.

Бъдещи насоки в разработването на биомаркери. Европейското общество за клинични и икономически аспекти на остеопорозата и остеоартрозата (ESCEO) (*Фигура 1.7*) маркира възможните насоки за развитие на бъдещи изследвания в областта (*Таблица 1.2*). Изпълнението на тези препоръки би позволило на биомаркерите да заемат полагащото им се място в рутинната практика за ранна диагностика и мониториране на болестната активност [116].



Фиг. 1.7. Лого на ESCEO

Табл. 1.2. Бъдещи насоки в разработването на биомаркери според ESCEO

Направление	Насоки
Механизми на болестта и развитието на нови биомаркери	<ul style="list-style-type: none"> • По-добро разбиране на подлежащите механизми на болестта за валидиране на съществуващите биомаркери и идентифициране на нови кандидати • По-задълбочени изследвания в областта на биомедицинските науки с наставка „-омика“ • Откриване на специфични биомаркери за ОА на специфични стави
Технологично развитие	<ul style="list-style-type: none"> • Подобрени изследвания и технологии • Стандартизация/калибрация на биомаркерите • Разработване на диагностични алгоритми, комбиниращи панел от вече известни биомаркери с или без образни изследвания
Прогноза и риск	<ul style="list-style-type: none"> • Подобрене на дефиницията за ранна остеоартроза • Идентификация на биомаркери в ранните стадии на ОА (предрентгенографски) • По-задълбочени проучвания върху корелацията между нивата на биомаркери и някои критични точки в клиниката на ОА, които налагат ендопротезиране • Включване на определени биомаркери в скали за оценка на риска

1.4.3. Образни проучвания при пациенти с гонартроза

Структурните промени в колянната става включват формиране на остеофити, намаляване на хиалинния хрущял, субхондрална остеосклероза, субхондрални кисти, синовиален излив и възпаление. ГоА често се съпътства и от нарушение в оста на засегнатото коляно. Тези промени са обект на образната диагностика.

Невинаги обаче оплакванията кореспондират със структурните промени, оценени чрез образни изследвания [117, 118]. Ето защо в диагностично-лечебния процес е необходим комплексен подход за оценка на тежестта на заболяването.

1.4.3.1. Нативна рентгенография

Нативната рентгенография и досега остава „златен стандарт“ за оценка на структурните промени, асоциирани с ОА [9]. Радиографски измереното стеснение на ставната междина е най-достъпният метод за оценка на хрущялната загуба. Други рентгенографски промени са наличие на остеофити, субхондрална остеосклероза и субхондрални кисти.

Нативната рентгенография представлява двуизмерно проектиране на триизмерни ставни структури. Това създава предпоставка за вариации на образа при различно позициониране на ставата в пространството.



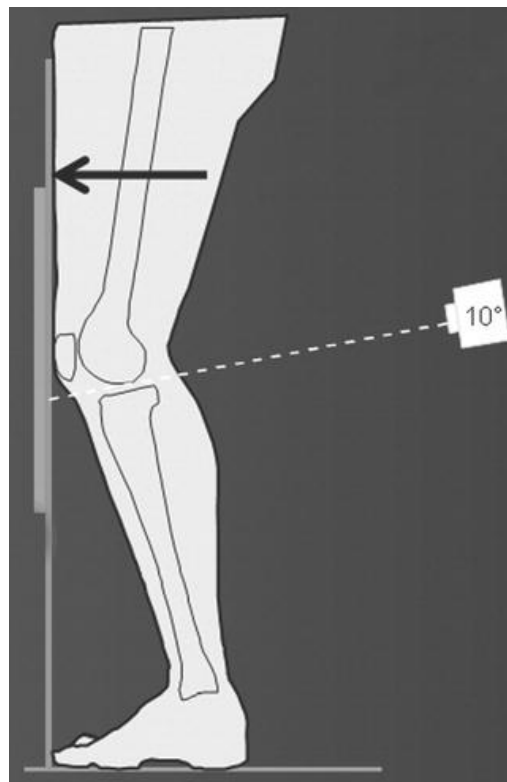
Фиг. 1.8. Вариации в размера на ставната междина при фасова рентгенография (a) без натоварване (b) с натоварване. Без натоварване ставните повърхности не са в контакт една с друга, правейки невъзможна оценката на ставната междина [119].

Лицева проекция. Въпреки че фасовата рентгенография при пълна екстензия на двете колена с натоварване (*Фигура 1.8*) [119], постигнато чрез позициониране на пациента в изправено положение, е предпочитан метод от много лекари, данни от съвременни проучвания показват, че рентгенографията при фиксирана флексия в изправено положение е по-чувствителна по отношение на стесняването на ставната междина при

пациенти с умерена гонартроза (II-III стадий по Kellgren-Lawrence скалата). [120-123]. Това се дължи на факта, че лицевата рентгенография при разгънато коляно невинаги изобразява акуратно стеснението на ставната междина, тъй като предилекционното място на хрущялна увреда е задната част на феморалния кондил.

По силите на повечето образни звена е постигане на фасова рентгенография на коляното в позицията на Lyon-Schuss с ъгъл от 10° на рентгеновия лъч спрямо хоризонталата (Фиг. 1.9). Рентгенография, която отговаря на тези изисквания би предложила две предимства спрямо конвенционалната с позиция на коляното в екстензия. На първо място сгънатото положение на коляното е по-вероятно да разкрие хрущялната загуба, характерна за задната част на феморалните кондили [124]. Друго преимущество е по-голямата вероятност за представяне на ставната междина в успоредна равнина с рентгеновия лъч. Тези предимства предоставят на метода по-голяма точност, що се отнася до оценката на структурните промени и проследяването им във времето.

Профилна проекция. Профилната проекция често се подценява при оценката на остеоартроза на колянната става. Тя предлага сравнително надежден анализ на ставното пространство. Контурите на кондилите и тибиялното плато са лесни за идентифициране. Профилната рентгенография позволява надежден и репродуцируем анализ на



Фиг. 1.9. Протокол за фиксирана флексия на коляното, при който палецът, пателата и тазът са опрени в рентгеновата касета, а лъчът е под 10° ъгъл. Това осигурява сгъване на коляното в ъгъл от около 20° [125].

пателофеморалната става, обективизирайки не само маргиналните остифити и стесняването на ставната междина, но и асоциираните лезии като малпозицията на пателата [126].

Полуколичествени рентгенографски методи. Скалата на Kellgren и Lawrence е широко използвана система за оценка на артрозното коляно [8]. Според нея диагнозата е налице при рентгенографски данни за втори или по-висок стадий (Таблица 1.3).

Табл. 1.3. Полуколичествена скала на Kellgren-Lawrence

Скала на Kellgren-Lawrence	
Стадий	Рентгенографска находка
0	Нормална рентгенография
I	Предполагаемо стеснение на ставната междина и възможни остеофити
II	Несъмнена остеофитоза и възможно стеснение на ставната междина
III	Умерени множество остеофити, несъмнено стеснение на ставната междина, остеосклероза и възможен деформитет на костния контур
IV	Големи остеофити, изразени намаляване на ставната междина, тежка склероза и несъмнен деформитет на костния контур

Основните ограничения при използване на Kellgren-Lawrence скалата включват 1) голямото значение, което се отдава на остеофитите; 2) нечувствителността на скалата към промени във времето; 3) липсата на адекватна оценка на ставната междина [127].

Атласът на международното общество за изследване на остеоартроза (OARSI) предлага друг подход. С цел класификация на гонартрозата се оценяват както наличието и степента на остеофитоза, така и стесняването на ставната междина. Методът е полуколичествен, като тибioфеморалната междина и остеофитите се интерпретират поотделно за всяка зона на коляното с оценки от 0 до 3 (0 = липсва; 1 = лека; 2 = умерена; 3 = тежка), базирайки се на изложените в атласа на OARSI рентгенографии (Таблица 1.4) [128]. По този начин се повишава чувствителността на метода по отношение на динамичното проследяване на радиографските промени.

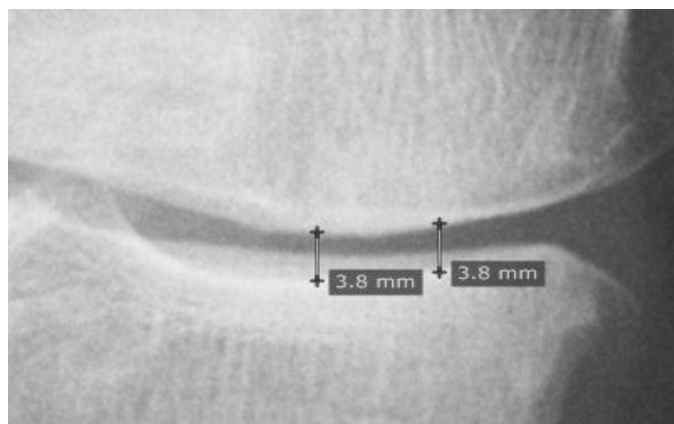
Табл. 1.4. Оценка според атласа на международното общество за изследване на остеоартроза (OARSI)

Тибioфеморална става						
Маргинални остеофити					Стесняване на ставната междина	
Зони на коляното	Медиален феморален кондил	Медиално тибialно плато	Латерален феморален кондил	Латерално тибialно плато	Медиален компартмент	Латерален компартмент
Оценка	0-3+	0-3+	0-3+	0-3+	0-3+	0-3+

При сравнително проучване, съпоставящо двата полуколичествени метода, се достига до заключението, че радиографската тибioфеморална остеоартроза се дефинира два пъти по-често при използване на критериите според атласа на OARSI в сравнение с Kellgren-Lawrence системата. Това несъответствие вероятно допринася за голямата вариабилност на литературните данни за разпространението на остеоартрозата. Границите, които двата метода дефинират, не трябва да се счита за взаимозаменяеми. [129]

Количествена оценка. Измерването на разстоянието между проектираните феморални и тибиялни граници е най-разпространеният количествен похват за оценка на степента на гонартроза. За целта се използва линия. С масовото въвеждане на дигиталната рентгенография все по-често тибеофеморалното разстояние се измерва чрез софтуерен продукт. Феморалната граница се проектира като ръб на костта, докато тибиялната граница се определя от ярката линия, кореспондираща с проекцията на лъча, минал през плътната кортикална обвивка на базата на тибиялното плато. Определянето на минималния размер на ставната междина е по-чувствителен на промени и по-лесно приложим отколкото усреднения размер на ставната междина [130]. Използваният протокол включва коляно в стандартна флексия.

Предимства и недостатъци на нативната рентгенография. При сравнение на стойностите на ставната междина, придобита чрез МРТ от една страна и рентгенография от друга, са установени съпоставими резултати. Въпреки че ограниченията на рентгенографията са добре известни, проучване на Dureya и сътрудници показва че, предвид ниските разходи и по-голямата достъпност на радиографията, тя все още има роля в клиничните проучвания. Забавянето на радиографската прогресия е единствената структурна крайна точка, препоръчвана от регулаторните органи в САЩ (FDA) при изпитване на ефикасността на болестопроменящи ОА медикаменти във фаза 3 клинични проучвания [131].



Фиг. 1.10. Измерване на ставната междина

Въпреки това добре известно е, че менисциалните лезии като екструзия или сублуксация също могат да допринесат до стесняване на ставното пространство (*Фигура 1.10*) [132], което прави метода по-ниско чувствителен от ЯМР. Друго ограничение е наличието на вариации при позиционирането на колянната в полуфлектирано състояние. Kinds показва, че подобни вариации имат значително влияние върху количественото измерване на радиографските параметри при ОА, включително измереното ставно пространство [133]. Следователно, по-добра стандартизация трябва да бъде постигната при извършването на рентгенографии.

1.4.3.2. Компютърна томография

Компютърната томография (КТ) е ценен метод за оценка на гонартроза в случаите, когато обект на изследване са костните промени като субхондрална остеоосклероза и кисти, остеофитоза и качество на кортикалната кост. Периставните калцификати също се изобразяват по-добре в сравнение с МРТ. Основният недостатък е ниският контраст, който се постига за меките тъкани, правейки метода практически нечувствителен към настъпващите промени в периставни лигаменти и инсерции, ставната капсула и менисци. Друг недостатък е сравнително високата доза радиационно лъчение за пациента.

КТ артрографията служи за индиректна визуализация на хрущяла и други вътреставни структури, използвайки контрастна материя. Най-широко използваната техника е инжектиране на йоден контраст вътреставно, разреден във физиологичен разтвор или локален анестетик, и последващо изследване със спирален скенер. Чрез КТ артрографията е възможно постигане на множество слайсове с плътност < 1 mm, като скенирането на цялото коляно се извършва за много кратко време (< 30 сек). Методът представлява надеждна алтернатива на МРТ при липса на достъп до апаратура или в случаите, когато МРТ е противопоказана. Спиралната КТ артрография на колянната и раменната става дава възможност за отлично

изобразяване на ставните повърхности [134]. Пенетрацията на контрастната среда в по-дълбоките слоеве на хрущялната повърхност показва дефектите, разположени по ставната повърхност. Високата пространствена резолюция и ясното разграничение между хрущялната повърхност и контрастното вещество правят отчетливи фокалните морфологични промени. Ограничения на метода са неговата по-ниска чувствителност спрямо лезии, разположени в по-долните слоеве, несвързани с повърхността на хрущяла и неговата инвазивна природа [135, 136].

1.4.3.3. Магнитно-резонансна томография

В последните години бяха събрани убедителни доказателства подкрепящи констатацията, че симптоматична ГоА представлява процес, който ангажира всички ставни тъкани и структури. Хиалинният хрущял вече не е единствената зона на интерес и структурните промени следва да се разглеждат в по-широк контекст [137]. Съвременните образни модалности, особено МРТ, позволяват безпрецедентна директна визуализация на всички тъкани, участващи в патологичния процес, включително ставните хрущял, менискуси, субхондрална кост и меки тъкани. Поради възможността да предоставя информация за тъканната патология в триизмерен вид, МРТ се счита за най-информативната образна техника при ГоА [138-140]. За разлика от нативната рентгенография, при МРТ липсва йонизиращо лъчение, а томографската ѝ същност предотвратява артификални феномени като морфологично „изкривяване“, магнификация и наслагване на образи. От друга страна, МРТ дава възможност за създаване на силно контрастни изображения между отделните меки тъкани и позволява визуализацията на хиалинния хрущял, меникусите, костния мозък, синовията и мускулите, които остават „невидими“ за рентгенографските методи. Благодарение на тези ѝ предимства, в последните години се разработиха полуколичествени скали за оценка на целия ставен апарат, разглеждащи различните компартменти на коляното [14-16].

1.5. Лечение

Залегналите в настоящите препоръки за лечение на ГоА фармакологични средства са насочени към облекчение на болката и подобрене на ставната функция [141-146]. Въпреки това тяхното дългосрочно приложение и безопасност не са системно проучени и проследени. Друга част от терапевтичните средства претендират да притежават т.нар. болестопроменящ ефект. В доклад на OARSI от 2016 г. се отбелязва [147], че съществуват малко доказателства в полза на твърдението, че използваните фармакологични средства имат „ефективно действие срещу прогресията на заболяването“. В това число влизат гликозаминогликаните глюкозамин и хондроитин, екстракти на неосапуняеми фракции на масла от авокадо и соя, вътреставно приложените хиалуронова киселина (вискосуплементация), богатата на тромбоцити плазма и мезенхимни стволови клетки.

Препоръките на EULAR за лечение на гонартроза са създадени и валидирани през далечната 2003 [146]:

- ✓ Оптималното лечение на гонартроза изисква комбинация от нефармакологични и фармакологични лечебни мероприятия.
- ✓ Лечението на гонартрозата трябва да бъде съобразено с множество обстоятелства:
 - ❖ Рискните фактори, касаещи коляното (затлъстяване, странични механични фактори, физическа активност).
 - ❖ Общите рискови фактори (възраст, коморбидитет, полифармация).
 - ❖ Нивото на болковия интензитет и функционалното ограничение.
 - ❖ Признаците на възпаление (напр. ставен излив).
 - ❖ Мястото и степента на структурните увреди.
- ✓ Нефармакологичното лечение при гонартроза трябва да включва регулярни курсове на обучение, физически упражнения, помощни средства и намаляване на телесното тегло.

- ✓ Парацетамол (ацетаминофен) е оралният аналгетик на първи избор и при успех е предпочитаният дългосрочен орален аналгетик.
- ✓ Локалните приложения на НСПВС и капсаицин имат клинично значим ефект и са безопасни.
- ✓ НСПВС трябва да бъдат обмислени при пациенти без отговор към парацетамол (ацетаминофен). При пациенти с повишен гастроинтестинален риск неселективни НСПВС в комбинация с ефективна гастропротекция или селективни COX-2 инхибитори трябва да бъдат използвани.
- ✓ Опиоидните аналгетици, в комбинация с или без парацетамол (ацетаминофен), са алтернатива при пациенти, при които НСПВС, вкл. COX-2 селективните инхибитори, са контраиндицирани, неефективни и/или недобре толерирани.
- ✓ SYSADOA (глюкозамин сулфат, хондроитин сулфат, ASU, диацереин, хиалуронова киселина) имат симптоматичен ефект и могат да притежават структуро-модифициращ ефект.
- ✓ Вътреставните инжекции на дългодействащи кортикостероиди са индицирани при пристъп на колянна болка, особено когато се съпътства с излив.
- ✓ Ендопротезирането може да се обмисли при пациенти с радиографски доказателства за гонартроза и рефрактерна болка и функционален дефицит.

Липсата на обновяване на близо 15-годишните препоръки на EULAR говори за сериозен застой във въвеждането и валидирането на нови терапевтични модалности в последното десетилетие. Поради наличието на голям брой лечебни средства, които трудно бихме обхванали предвид ограничения обем на дисертационния труд, в настоящия обзор ще се спрем по-подробно на изследваните глюкозамин сулфат, хиалуронати и богата на тромбоцити плазма.

1.5.1. Глюкозамин

Гликозаминогликаните, към които спадат хондроитин и глюкозамин, са представители на т.нар. симптоматични бавнодействащи лекарства за остеоартроза (Symptomatic Slow Acting Drugs for Osteoarthritis [SYSADOA]) с потенциален болест-модифициращ ефект, забавяйки рентгенографските промени. Отреденото им място в лечението на гонартроза, както и значимостта на клиничната им ефективност, са често тема на дебат сред научните среди.

Оралната бионаличност на глюкозамин сулфат е 44% [148] и се медира чрез мембранните глюкозни транспортери GLUT в тънките черва [149, 150]. Търпи „first-pass“ метаболизъм поради участието си в хексозаминния биосинтетичен път в епителиалните клетки на червата [151].

SYSADOA ефектът на глюкозамин се свързва с неговата способност да намалява NF-κB нуклеарната транслокация чрез няколко механизма [152, 153]. В човешки ставен хрущял на артрозно болни глюкозамин не стимулира синтеза на колаген тип II или агрекан, но може да увеличи освобождаването на протеоглигани [154].

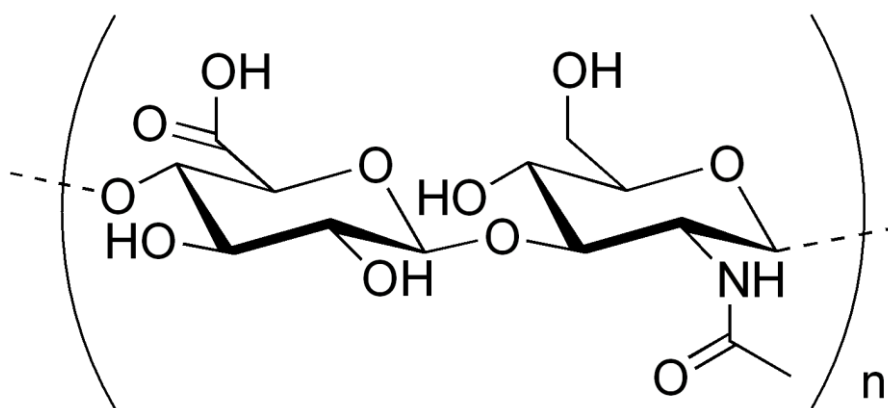
Болест-модифициращият ефект на глюкозамина е анализиран в няколко скорошни мета-анализи [155, 156] и обзор [157] с противоречиви резултати. Wandel и сътрудници докладват за липсата на значим клиничен ефект, базирайки се на размера на ефекта върху ставната болка от -0,17 (-0,28 до -0,05) и върху ставната междина от -0,16 (-0,25 до 0,00) [155]. Валидността на това заключение е поставен под въпрос от редица експертни групи. Другият метаанализ, включващ две лонгитудинални изпитвания на медикамента [156], докладва малък до умерен ефект на глюкозамин сулфат върху минималната ставна междина след три години лечение при ГоА. Това е в подкрепа с данните от друго проучване, което показва, че глюкозамин сулфатът предотвратява ендопротезирането на колянната става [158]. Най-голямото за момента рандомизирано проучване, изпитващо ефективността

на глюкозамина, не открива сигнификантен ефект при пациенти с гонартроза [159]. Трябва да се отбележи обаче, че използваната форма е била глюкозамин хидрохлорид. *Wi* и неговият колектив разглеждат обстойно проблема, адресиращ значението на формулата на препарата за неговия ефект. В резултат на своето проучване те достигат до констатацията, че глюкозамин хидрохлоридът е неефективен за намаляване на болката, докато глюкозамин сулфатът може да има подобряващ функцията ефект при пациенти с ГоА, когато се приема повече от 6 месеца [160]. Въпреки това последният също не е оправдал очакванията по отношение на болката след реализирано 6-месечно лечение.

1.5.2. Хиалуронати

През 1934 г. Карл Майер и Джон Палмър изолират непозната дотогава химична субстанция от стъкловидното тяло на животинско око. Те откриват, че субстанцията съдържа две захаридни молекули, една от които е уронова киселина. За удобство те предлагат името на неизвестната молекула да бъде хиалуронова киселина (ХК), произхождащо от гръцката дума за стъкло „hyalos“ и уронова киселина [161]. Понятието хиалуронан е въведено през 1986 година в съответствие с международната номенклатура на полизахаридите, с цел да обхване различните форми, които молекулата може да приеме, в това число киселинна форма (хиалуронова киселина) и различни соли (напр. натриев хиалуронат, който спонтанно се образува при физиологично рН) [162]. Понастоящем повечето продукти се синтезират чрез бактериална биоферментация.

Химична структура и биологични функции. ХК е линеарен анионен, несулфониран гликозаминогликан, изграден от дизахарид, съставен от D-глюкуронова киселина и D-N-ацетилглюкозамин свързани чрез β -1,4 и β -1,3 гликозидни връзки (*Фигура 1.11*). Когато не е асоцииран с други молекули, той се свързва с водата, придавайки и гъст вискозен вид подобен на „желе“.



Фиг. 1.11. Химична структура на хиалуроновата киселина

ХК се открива предимно в екстрацелуларния и перицелуларния матрикс, но в малки количества може да се синтезира и вътреклетъчно. Биологичните функции на ХК включват поддържане на еластовискозитета на синовиалната течност, контрол на тъканната хидратация и водния транспорт, подредбата на протеогликаните в екстрацелуларния матрикс, но и множество медиранни на рецепторно ниво функции като клетъчна миграция, адхезия, митоза и модулация на възпалителния отговор. [163-165]. При гонартроза концентрацията и молекулната маса на ендогенната хиалуронова киселина намалява, а заедно с тях – вискозитетът и еластичността на синовиалната течност [166]. Уникалната вискоеластична природа на ХК, заедно с нейната биосъвместимост и неимуногенност, са довели до клиничното ѝ приложение под формата на вътреставни инжекции в ревматологията и ортопедията.

Механизъм на действие. Тя действа като квази-механична добавка към по-малко вискозната и устойчива ставна течност, присъща за артрозните стави [167]. Нискомолекулните ХК обаче имат кратък полуживот, следователно дългосрочните им ефекти не могат да бъдат приписани единствено на заместителната им функция.

Влизайки в състава на синовиалната течност и междуклетъчния матрикс, ХК осигурява предпазен слой на повърхността на ставния хрущял и блокира загубата на протеоглигани от междуклетъчното вещество в

синовиалното пространство, запазвайки нормалната му структура. По подобен механизъм ХК може би възпрепятства инвазията на възпалителни клетки в ставното пространство. В синовиалната течност от коленни стави на пациенти с ОА концентрацията на ХК, гликозаминогликани и кератан сулфат е по-ниска от тази при здрави индивиди. В допълнение експерименти върху животни показват, че проинфламаторните цитокини IL-1 и TNF- α стимулират експресията на хиалуронидази, които могат да допринесат за фрагментацията ѝ при възпаление [168, 169].

Вътрестваното инжектиране на хиалуронати може да стимулира продукцията на ендогенна ХК – свойство, известно още като вискоиндукция. Това се демонстрира от проучване, при което среди, богати на хиалуронови киселини с различна молекулна маса (от 340 KDa до 4700 KDa), стимулират производството на ендогенна ХК от синовиалните фибробласти на пациенти с гонартроза. Количеството новосинтезирана хиалуронова киселина зависи както от концентрацията на ХК в средата, така и от молекулната маса. В това отношение проучването дава предимство на високомолекулните ХК [170].

През последните години широко се възприема хипотезата, че ХК се свързва със специфични клетъчни рецептори като CD44, ICAM-1 (интрацелуларна адхезионна молекула-1) и RHAMM (рецептор за хиалуронат-медираната подвижност). Те са малка част от рецепторите, свързващи се специфично с ХК, и са пример за повърхностни молекули, експресиращи се върху различни клетки, участващи в ставните тъкани [171]. Най-проученият от тях е CD44 рецепторът, който медира хондроцитната пролиферация и функция. Потискането на експресията му води до почти пълна загуба на протеогликанова синтеза в хрущяла на животни. Подобен ефект е постигнат при блокиране на повърхностните CD44 рецептори поради свързването им с голям брой нискомолекулни ХК [172, 173].

Облекчението на болката след прилагане на хиалуронати в клиничната практика може би се дължи на ефектите на ХК върху нервните

импулси. Възпалението на колянната става повлиява чувствителността на ноцирецепторите в ставната капсула и понижава болковия праг, сочат експериментални модели на ОА. В условия на ставно възпаление рецепторите за болка спонтанно се деполяризират и повишават своята чувствителност към нетравматични ставни движения. Приложението на ХК върху изолирани медиални ставни нерви значително намалява болковите стимули при движение. В друг модел нервните импулси, породени от движение на възпалено коляно, са значително потиснати с до 60% под действието на hyal G-F 20 в сравнение с контроли [174, 175]. Освен това, ХК има директни и/или индиректни ефекти върху субстанция Р, която има изразен алгогенен потенциал. Тъй като субстанция Р взаимодейства с възбудни аминокиселини, простагландини и азотен оксид, ефектите на ХК върху тези фактори може индиректно да влияе върху производството ѝ. Допълнително ХК инхибира повишения васкуларен пермеабилитет, индуциран от субстанция Р [176].

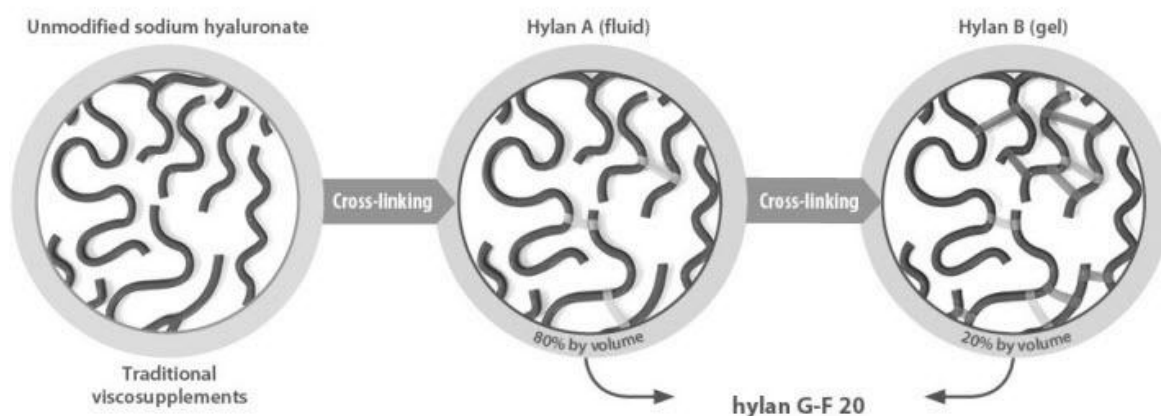
Ин витро и ин vivo проучвания показват, че ХК стимулира простагландиновата и хондроитиновата синтеза и запазва тяхната концентрация в екстрацелуларния матрикс, като намалява тяхното освобождаване в синовиалното пространство [177, 178]. По отношение на възпалението, ХК потиска продукцията и действието на проинфламаторните медиатори и протеази, но и променя функцията на определени клетки на имунната система, инхибирайки лимфоцитната пролиферация и миграция [179, 180].

Големият набор от функции, присъщи за ХК, показват сложните и многофакторни механизми, по които инжектирането на хиалуронати повлиява болката и подобрява ставната функция.

Произход и класификация. Нативната хиалуронова киселина има сравнително кратък полуживот и поради тази причина се използват различни производствени техники за удължаване на веригата и стабилизиране на

молекулата. Във връзка с начините на синтеза, хиалуроновите киселини могат да се класифицират в две групи:

- Хиалуронани: Дълговерижни молекули от птичи произход или резултат на биоферментация с молекулна маса обичайно между 0,5 и 2,8 mDa.
- Кръстосаносвързани (cross-linked) хиалуронани: хиалуронови молекули, химично модифицирани чрез кръстосаносвързване, състоящи се от течна фаза с по-голяма молекулна маса (около 6 mDa) и солидна съставка с неограничена молекулна маса, формирани чрез кръстосаносвързани връзки между дълги вериги хиалуронови киселини (Фигура 1.12).



Фиг. 1.12. Съпоставка на традиционните хиалуронани и прототипа на кръстосаносвързаните хиалуронови киселини (hylan G-F 20) [181]

Ниска или висока молекулна маса? Въпреки че от фармакологична гледна точка всички хиалуронови киселини за вътреставно приложение представляват големи молекули, за клиничната практика по-удобно е разделянето им на такива с ниска, средна и висока молекулна маса:

- „Ниска“ молекулна маса – между 500 и 1000 KDa,
- „Средна“ молекулна маса – между 1000 и 2800 KDa,
- „Висока“ молекулна маса – отнася се най-често за кръстосаносвързани молекули, чиято молекулна маса е по-висока от 3 000 KDa.

Кръстосаносвързаните молекули са създадени с цел постигане на продукт с подобрени вискоеластични свойства и с по-голяма устойчивост на действието на вътреставните хиалуронидази. Проучванията показват, че вътреставният полуживот на хиалуронатите с ниска молекулна маса е едва 24 часа, докато този на кръстосаносвързаните молекули може да достигне няколко дни и дори седмици [182].

Въпреки теоретичните ползи от вътреставното приложение на високомолекулни хиалуронови киселини пред тези с по-ниска молекулна маса, темата за оптималния размер на молекулата остава обект на противоречия. Болшинството проучвания, които показват, че ефектът е право пропорционален на молекулната маса, са проведени в ин витро условия. Това поражда редица съмнения дали резултатите от тях са приложими ин vivo. Голямата молекулна маса би могла да възпрепятства движението на ХК от вътреставната към вътреклетъчната среда, предотвратявайки възможността тя да взаимодейства със синовиоцитите и хондроцитите. Според застъпниците на тази хипотеза продукти с молекулна маса между 0,5 и 1 KDa имат най-добър ефект ин vivo [183, 184].

Мета-анализ от 2007 г., включващ 13 проучвания, показва липса на превъзходство по отношение на ефективността на кръстосаносвързаните хиалуронати (Synvisc®) в сравнение с техните предшественици със средна (Orthovisc®) и ниска (Ostenil®) молекулна маса [185]. Друг мета-анализ от 2012 г. на 74 проучвания пък заключава, че поради голямата хетерогенност на проучванията и техните резултати, не е възможно да се заключи, че даден продукт показва превъзходство спрямо друг [186].

Трябва да се отбележи, че броят на необходимите инжекции е по-малък при препаратите с високо молекулно тегло, което е предимство за пациентите. Изборът на ХК трябва да бъде определен от експертното мнение на лекаря и предпочитанията на пациента.

Препоръки и официални позиции. Обновените през 2012 г. препоръки на ACR условно препоръчват използването на хиалуронати при лечение на гонартроза, докато не се препоръчва инжектирането им при ОА на ръката. ACR изрично не дава насоки по отношение на вътреставните инжекции с ХК при коксартроза [187].

Актуалните препоръки на EULAR изтъкват, че съществуват доказателства в подкрепа на ефикасността на ХК в лечението на гонартроза както за намаляването на болката (1А), така и за функционалното подобрене (1В). Въпреки че облекчението на оплакванията може да бъде постигнато за период от няколко месеца, за разлика от сравнително по-краткото действие при стероидите, инжектирането на хиалуронова киселина е свързано с по-бавно настъпване на ефект и по-висока цена. Не съществуват преки доказателства за ролята на ХК в модификация на болестната прогресия [188].

Препоръките на OARSI, разработени след консенсус и обзор на съществуващите препоръки и системни обзори, гласят: “Инжектирането на вътреставни хиалуронати може да бъде от полза при хора с гонартроза и коксартроза. Ефектът им се характеризира със забавено начало, но по-продължително времетраене, в сравнение с вътреставното приложение на кортикостероиди. Препоръката е направена с доказателствена стойност от 64%” [189].

Американската академия на ортопедичните хирурзи (AAOS) публикува през 2008 г. своите препоръки за неоперативно лечение на гонартроза, според които настоящите доказателства са все още неубедителни, за да се направи препоръка за лечение на гонартроза с хиалуронати [190].

1.5.3. Богата на тромбоцити плазма (Platelet-Rich Plasma, PRP)

Биологичен стимул за репарационния процес в почти всички тъкани играят редица растежни фактори и хиалинният хрущял не прави изключение.

Именно този принцип стои в основата на терапията с автоложна плазма богата на тромбоцити, която е продукт на собствената кръв на болния. Методът представлява атрактивна сравнително нова алтернатива в лечението на остеоартрозата поради първоначалните обнадеждаващи резултати и минималния риск от непоносимост и странични ефекти.

Дефиниция на PRP. PRP е кръвен дериват с по-висока концентрация на тромбоцити в сравнение с периферна кръв, като тромбоцитния брой трябва да бъде поне 2 пъти по-висок. По литературни данни концентрацията варира в широки граници – до девет пъти над базалните нива [191].

След като терапевтичният ефект най-вероятно се реализира от тромбоцитната маса, би следвало тромбоцитната концентрация да е критичен момент в резултатите от приложението. Въпреки че някои проучвания съобщават за корелация между резултатите и броя тромбоцити, литературна справка показва, че добри клинични резултати могат да бъдат постигнати и при по-ниски стойности на тромбоцити [192].

Технология на извличане. В зависимост от концентрацията на тромбоцитите, PRP препаратите могат да бъдат разделени в две категории – с ниска ($\times 2,5$ - $\times 3$) и висока концентрация ($\times 5$ - $\times 9$) на тромбоцити. Въпреки, че на пръв поглед изглежда, че по-високият брой тромбоцити ще осигури повече растежни фактори и по-добри клинични резултати, това все още не е доказано. Напротив, Graciani и сътрудници предполагат, че оптималната концентрация на тромбоцити в кръвния дериват е 2,5 пъти над тази в кръвта. Над тази концентрация растежните фактори или други съставки на PRP може да проявяват инхибиторен ефект [192].

Броят на тромбоцитите е силно зависим от метода на обработка на кръвта (*Фигура 1.13*). В клиничната практика се е наложил метода на центрофугиране на цяла кръв двукратно до получаването на плазма с приблизително 4-5 пъти по-висока концентрация на тромбоцити от периферната кръв. Няколко променливи като броят, скоростта и времето на

центрофугиране могат да повлияят крайния продукт по отношение на концентрацията на различните формени елементи.



Фиг. 1.13. Примерна постановка на етапите на приготвяне на PRP

В светлината на тези различия трябва да се има предвид ролята на някои променливи при анализа на отделните проучвания [193]:

- Метод на приготвяне на тромбоцитния концентрат,
- Клетъчен състав, концентрация и брой клетки,
- Съхранение на PRP,
- Методи за активация на PRP,
- Терапевтичните протоколи при прилагането PRP (в това число количество, брой инжекции, интервали и др.),
- Стадий на OA, който е обект на лечение с богата на тромбоцити плазма.

Съвременните системи за извличане на PRP са от затворен тип за еднократна употреба, предпазващи от контаминация на кръвния дериват. Те позволяват прецизно разделяне и регулиране концентрацията на тромбоцити според нуждите на клинициста (*Фигура 1.14*).

Механизми на действие. Все още няма пълна яснота коя съставка е отговорна за терапевтичния ефект на PRP. Позитивните резултати от интра-артикуларното му прилагане могат да се обяснят с факта, че тромбоцитите са източник на про- и анти-инфламаторни цитокини и растежни фактори във висока концентрация, които регулират редица процеси, свързани с тъканната регенерация, част от които включват клетъчна миграция, клетъчна пролиферация, ангиогенеза, процеси на възпаление и синтеза на колаген. Извлечените от тромбоцити растежни фактори са група полипептиди, играещи основна роля в регулацията на растежа и развитието на редица тъкани, включително хиалинния хрущял [194-200]:

- Тромбоцитен растежен фактор (PDGF);
- Трансформиращ растежен фактор (TGF- β);
- Тромбоцитен епидермален растежен фактор (PDEGF);
- Васкуларен ендотелиален растежен фактор (VEGF);
- Инсулино-подобен растежен фактор 1 (IGF-1);
- Фибробластен растежен фактор (FGF);
- Епидермален растежен фактор (EGF).



Фиг. 1.14. Кит и центрофуга, използвани за приготвяне на PRP в Клиниката по ревматология към УМБАЛ “Св. Ив. Рилски“

В състава на тромбоцитите се включват и алфа-гранули с висока концентрация на цитокини, хемокини и много други протеини, които вероятно участват в стимулацията на хемотаксиса, клетъчната пролиферация и матурацията, модулирайки възпалителните молекули и привличайки левкоцити. Освен тях тромбоцитите съдържат плътни гранули, които складира АДФ, АТФ, калциеви йони, хистамин, серотонин и допамин, които също играят комплексна роля в тъканната модулация и регенерация. Лизозомните гранули пък могат да секретират киселинни хидролази, катепсин D и E, еластази и лизозим и вероятно други фактори, ролята на които не бива да се подценява [201]. Всички по-горе изброени растежни фактори и цитокини биха могли да допринесат за мекотъканната и костна регенерация.

Тромбоцитите отделят тези растежни фактори и цитокини след контакт с колаген или тромбин и калций.

Смята се, че в основата на патогенетичните процеси при остеоартрозата стои дисбалансът между проинфламаторни (IL-1 α , IL-1 β , TNF α) и антиинфламаторни цитокини (IL-4, IL-10, IL-1RA), водещ до активиране на протеолитични ензими и разрушаване на ставния хрущял [202].

Тромбоцитите са източник на инфламаторни медиатори и модулатори. Те могат да освобождават редица антиинфламаторни цитокини, включително IL-1 рецепторен антагонист, разтворимия рецептор за TNF, IL-4, IL-10, IL-13, IFN γ . Чрез тях се инхибира действието и бионаличността на IL-1 (чрез блокиране рецепторите му), TNF α (блокиране на сигналната трансдукция) и други проинфламаторни цитокини. Въпреки че тромбоцитите освобождават и проинфламаторни цитокини, като например IL-1a, IL-1b, IL-6, TNF α , IL-8, тяхната концентрация е значително по-ниска. По този начин прилагането на PRP потиска възпалителния процес при остеоартроза, протектира ставния хрущял и намалява симптомите на болка.

Ключова роля в патогенетичните механизми на възпалителната реакция играе TNF α . Той е познат като медиатор на острата възпалителна реакция и активатор на матриксните металопротеинази (MMPs) в множество тъкани, включително и в ставните елементи. Повишаването на нивата на TNF α в синовиална течност при пациенти с остеоартроза е често срещано явление и корелира с индексите за болка. Един от механизмите, по който действа PRP е именно понижението на нивата на TNF [203]. Още повече, прилагането на PRP води до сигнификантно понижаване на експресията на MMP-13, която стои в основата на деградацията на хрущялния матрикс.

Възпалителният отговор се осъществява от активирането на различни сигнални пътища, които регулират експресията както на проинфламаторни, така и на антиинфламаторни медиатори в тъканните клетки и левкоцитите. Един от основните сигнални пътища включва нуклеарен фактор NF- κ B сигналния път. Познати са два начина на активиране на NF- κ B сигналния път:

- класически - чрез проинфламаторни цитокини, като TNF α и IL-1;
- алтернативен - чрез цитокини от семейството на TNF – лимфотоксин b, BAFF, CD40ligand. Приложението на PRP намалява активността на NF- κ B сигналния път и по този начин оказва своето антиинфламаторно действие. PRP може да предпази хондроцитите активирани от IL-1 β чрез инхибиране на Wnt/ β -catenin сигналния път [204].

Безопасност. Във връзка с безопасността, съобразно наличните литературни данни, могат да се направят следните заключения:

- Страничните ефекти, свързани с инжектирането на PRP, се наблюдават рядко [205, 206].
- Когато са налице, са леки и самоограничаващи се в рамките на часове до дни след апликацията [207].
- Локалните реакции са най-честите странични събития, вариращи от болка в областта на инжектиране до транзитни признаци на артрит [208].
- Начинът на извличане оказва влияние върху степента на вътреставен възпалителен отговор. Концентрацията на левкоцити не повишава честотата на страничните реакции [209, 210].
- Спазването на принципите на асептика и антисептика при извличане и инжектиране на PRP е задължение на лекаря, с цел предпазване от инфекция.

Клиничен опит. От 2006 г. насам са публикувани няколко окуражаващи животински модела и ин витро проучвания върху човешки теноцити, показващи потенциален позитивен ефект на PRP в стимулирането на клетъчния анаболизъм и тъканната регенерация и по този начин са създали предпоставка за използването на тромбоцитни концентрати и при хора [211]. И докато само преди няколко години научната литература за клиничното приложение на PRP се състоеше предимно от единични съобщения или експертни мнения, то към настоящия момент е направена голяма стъпка в посока доказването на ползите от консервативната терапия с PRP при ГоА.

Безспорно най-добре изследваната става е колянната и по-голямата част от проучванията докладват положителни резултати от вътреставно инжектиране на PRP.

1.6. Заключение

Критичният поглед към направеното литературно проучване показва, че адекватната реакция към предизвикателствата пред съвременната

приложна наука е обусловила неизбежна и неотложна нужда от качественни нови идеи за решаването на множество значими казуси, касаещи съвременната диагностика и лечение на остеоартрозата и в частност гонартрозата. Нещо повече – адекватната реакция налага спешни мерки, за да бъде реализирана промяната на статуквото и постигане на така необходимия, належащ и неминуем катарзис в теорията и практиката на диагностиката и лечението на това обществено значимо заболяване.

Направеният литературен обзор показва още, че в голяма част от публикациите липсва каквото и да било разграничаване на дейностите, свързани с профилактиката, диагностиката и стадирането, от дейностите, касаещи лечението на пациентите. Често липсва сепариране дори на доминантни за лечението казуси, касаещи индивидуализираната терапия на заболяването според нейната тежест и личностни особености на болните. Възможно е дори това да е една от съществените причини за аморфната форма на представяне на много от добрите идеи в тази значима за съвременната медицина област.

От очертаните по-горе проблеми при лечението на остеоартрозата, и в частност на гонартрозата, се налага изводът, че все пак най-важни остават въпросите, свързани с подходящия избор на дейности, включени в диагностиката на заболяването, начинът на тяхното редуване, вземането на решения, относно това, коя от дейностите да бъде включена към групата на периодичните, превантивни изследвания и коя - към групата на неотложните намеси. Безспорно, в тази сфера няма стройна логическа система, която да служи като фундамент за вземане на решения и за преценка на целесъобразността на тези решения.

От направения обзор на литературата става ясно, че през последните години е постигнат значителен напредък по отношение на изучаването на патогенетичните механизми на болестта. В клиничната практика навлязоха образни модалности, които отразяват комплексността на структурните промени при ОА, на базата на които се разработиха полуколичествени скали за оценка

на колянната става и прилежащите меки тъкани. До значителен прогрес в областта доведе магнитно-резонансната томография, която направи възможно визуализирането на качествени изменения на хиалинния хрущял. В същото време активно се разработват и проучват нови диагностични методи в лицето на иновативните биомаркери, отразяващи процесите на ставно ремоделиране. Постигнат беше напредък в измерването и мониторирането на прогресията на болестта чрез набор от средства, позволяващи оценка на болестния процес при отделните пациенти и идентифициране на тези с бързо-прогресиращо заболяване. Сферата с най-незадоволителен прогрес в развитието изглежда, че остава фармакологичното повлияване на болестта. Лъч надежда хвърлят въведените в последните няколко години ортобиотици в лицето на богатата на тромбоцити плазма, таргетираща патогенетичните механизми на болестта.

За българската популация от болни с гонартроза не е осъществено комплексно проучване на аспектите на болестния процес – болестната активност, болката, физическата функция и структурната увреда и връзката между тях посредством осъвременените версии на средствата за тяхната оценка. Не е проведено изследване на отговора към различните терапевтични режими с помощта на валидирани в последните години болестоспецифични въпросници, иновативни биомаркери, отразяващи ставната ремоделация, и валидирани образни изследвания. Това беше мотив да направим обстойно и задълбочено проучване на тези ключови компоненти на заболяването и отговора към лечение, посредством широко възприетите и валидирани болестоспецифични измервания и образни методи, но и с иновативни и недотам изследвани серологични биомаркери.

В този смисъл, настоящото изследване е опит да се осъществи комплексна оценка на болестния процес и да се оценят терапевтичните възможности пред болните с ГоА. Считаме, че то внася допълнение към значимите постижения на българската ревматологична школа – от обширния и значим дисертационен труд на проф. Д. Пехливанов [212] през практичната монография на проф. Й. Шейтанов [213].

2. Цел и задачи

Изброените в обзора проблеми категорично ни убеждават в необходимостта от задълбочени научни изследвания в конкретната ревматологична област.

2.1. Цел

Целта на дисертационния труд е да се анализира стойността на клиничните, серологичните и образните методи за оценката на гонартроза и да се оцени ефективността и безопасността на три терапевтични средства за лечението ѝ: богатата на тромбоцити плазма, високомолекулна кръстосаносвързана хиалуронова киселина и глюкозамин сулфат.

2.2. Задачи

1. Да се измерят и сравнят серумните биомаркери С-реактивен протеин (CRP), хрущялен олигомерен матриксен протеин (COMP), Coll2-1 и матриксна металопротеиназа 3 (MMP-3) при пациенти с ГоА и здрави доброволци.
2. Да се определи диагностичния потенциал и праговите стойности на изследваните биомаркери за разграничаване на здрави от болни с гонартроза индивиди, както и на пациенти с изолирана гонартроза от пациенти с генерализирана остеоартроза.
3. Да се изследва връзката между CRP, COMP, Coll2-1, MMP-3 и клиничните показатели на болестта, качеството на живот на пациентите и структурните промени, оценени чрез рентгенография и МРТ.
4. Да се установи ролята на изходните нива на изследваните серумни биомаркери за прогресията на заболяването и отговора към терапията.

5. Да се оцени и сравни промяната в качеството на живот и инвалидизацията между лекуваните пациенти с различни терапевтични средства – различни режими на лечение с интраартикуларна хиалуронова киселина, интраартикуларна богата на тромбоцити плазма и перорален глюкозамин сулфат.
6. Да се направи сравнителен анализ на промяната в болката и функционалния дефицит между лекуваните пациенти с интраартикуларна хиалуронова киселина, интраартикуларна богата на тромбоцити плазма и перорален глюкозамин сулфат.
7. Да се анализира пропорционалната разлика в дела на пациентите, постигнали минимално клинично значимо подобрене на болката и физическата функция и отговорили на терапията според обединените критерии на OARSI и OMERACT.
8. Да се оценят и сравнят структурните промени, оценени чрез рентгенография и магнитно-резонансна томография, между пациенти, лекувани с перорален глюкозамин сулфат, интраартикуларна хиалуронова киселина и интраартикуларна богата на тромбоцити плазма.
9. Да се определят независимите фактори, асоциирани с отговора към лечение, в отделните терапевтични групи.
10. Да се оцени и сравни безопасността на различните терапевтични средства – интраартикуларното инжектиране на хиалуронова киселина и богата на тромбоцити плазма и широко използваните перорални хондропротектори (глюкозамин сулфат).

3. Материали и методи

3.1. Пациенти и контроли

В настоящото проучване бяха включени за период от 2 години и 5 месеца (от 10.2014 г. до 02.2017г.) 132 болни със симптоматична ГоА, от които 107 жени и 25 мъже (81% жени). Пациентите бяха на средна възраст (mean \pm SD) – 63,45 \pm 8,71 години (от 40 до 80 години). Средната продължителност на болката беше 13,62 \pm 9,63 години (определена като брой години от началото на болката). Пациентската група бе сравнена с 31 здрави контроли на средна възраст 51,77 \pm 6,10 години (от 40 до 60 години), съответстващи по пол и индекс на телесна маса (ИТМ) на болните с ГоА. Здрави доброволци над 60 години не бяха включени поради наличие на клинични и/или рентгенови данни за ГоА.

За да установим разликите в клиничното протичане и тежестта на ГоА при двата пола, изследвахме клиничните, лабораторните и образните особености при пациентите, взели участие в проучването.

3.1.1. Включващи критерии при пациентската група

За нуждите на настоящото проучване бяха подбрани и изследвани пациенти на възраст от 40 до 80 години, изпълняващи критериите на ACR за гонартроза [63]. Те страдаха от симптоматична унилатерална или билатерална гонартроза, ангажираща медиалното фемуро-тибиално пространство, с продължителност на оплакванията над 6 месеца. Пациентите бяха разделени на групи, като бяха класифицирани според рентгенографските промени, оценени според Kellgren-Lawrence (KL) скалата от I-III.

3.1.2. Изключващи критерии при пациентската група

В проучването не бяха включени пациенти, които отговарят на един или повече от следните изключващи критерии:

- IV рентгенов стадий ГоА;

- коморбидност с други ревматични заболявания (в това число ревматоиден артрит, псориазичен артрит, спондилоартрит, васкулити и системни заболявания на съединителната тъкан, фибромиалгия);
- предшестваща вътреставна фрактура или документирана високоенергийна травма на долния крайник;
- декомпенсирано метаболитно или сърдечносъдово заболяване;
- лекувани със системни глюкокортикоиди (доза > 7,5 mg) в предходните 3 месеца, както и интраартикуларни хиалуронани, глюкокортикоиди или ортобиотици в предходните 6 месеца;
- лекувани с хондропротектори (глюкозамин, хондроитин, осалоняеми деривати на соя и авокадо) в предходните 6 месеца;
- анамнеза за вазовагален шок;
- бременност или кърмене;
- валгитет или варитет в коленните стави повече от 20 градуса.

За постигане на адекватна оценка на болката и физическата функция, пациентите бяха помолени, в рамките на 48 часа преди всяко посещение, да не приемат лекарства, повлияващи болката (включително аналгетици и нестероидни противовъзпалителни лекарства).

3.2. Клинични методи

3.2.1. Анамнеза и обективно състояние на болните

3.2.2. Оценка на болката

Интензитетът на болката в колянната става е оценен с визуална аналогова скала (VAS) – хоризонтална линия със 100 mm дължина. От лявата страна на скалата е отбелязано "Без болка", а от дясната - "Много силна болка". Пациентите бяха помолени да отбележат вертикална черта върху скалата според възприятието им за болка. Резултатът се определя чрез измерване на отстоянието, на което пациентът е поставил вертикалната черта. Според интензитета на болката пациентите бяха разделени в четири

групи: лека болка (< 40 mm), умерена (40-60 mm), тежка (60-80 mm) и много тежка (> 80 mm).

3.2.3. Оценка на тежестта (алгофункционален индекс на Lequesne)

Оценката според алгофункционалния индекс на Lequesne варира от 0 до 24 точки. Резултат на пациента, чиято стойност е по-висока или равна на 14, показва изключително сериозен функционален дефицит, а резултати, чиято стойност е 11-14, 8-10, 5-7, и 1-4 показват респективно много тежко, тежко, средно и леко функционално увреждане.

Индексът на Lequesne за оценка на тежестта на гонартрозата може да бъде използван за оценка на ефективността на терапевтичните интервенции [74]. Секциите на индекса включват:

- болка или дискомфорт;
- максимална дистанция при ходене;
- ежедневни дейности.

3.2.4. Оценка на болестната активност (Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index [WOMAC])

WOMAC представлява болест-специфичен въпросник, който се попълва самостоятелно от пациента и дава информация за неговата болестна активност, оценявайки основните болестни симптоми. Оценката според WOMAC индекса варира от 0 до 96 точки, разпределени в три основни раздела:

- болка (общо: 20 точки),
- скованост (общо: 8 точки),
- функционално увреждане (общо: 68 точки).

По-високите стойности на индекса са свързани с по-тежка симптоматика и нарушена ставна функция.

Глобалната оценка на лекаря за болестната активност бе нанесена върху 10-сантиметрова стандартна визуална аналогова скала. Тя влезе в

съображение при определяне на отговора към лечението, съобразно използваните обединени критерии на OARSI и OMERACT [214].

3.2.5. Оценка на качеството на живот и инвалидизация

Health Assessment Questionnaire – Disability Index (HAQ-DI).

Отговорите се отбелязват от пациентите на 4-степенна Likert-тип скала, варираща от 0 (без затруднение) до 3 (невъзможно е да го направя). Повисоките стойности на HAQ-DI индекса са свързани с по-висока степен на инвалидизация. Стойностите му могат да бъдат интерпретирани в следните три категории:

- от 0 до 1: леки затруднения до умерена инвалидизация;
- от 1 до 2: умерена до тежка инвалидизация;
- от 2 до 3: тежка до много тежка инвалидизация.

3.2.6. Критерии за отговор към лечението

Минимално клинично значимо подобрение (МКЗП). Според отговора си към терапията, пациентите бяха разделени на респондери и нон-респондери според това, дали са постигнали или не МКЗП. Терминът МКЗП отразява най-малката промяна в клиничните показатели, която показва сигнификантно подобрение в симптомите на пациента. МКЗП се основава на пациентското мнение за промяната в състоянието на индивидуално ниво и дава възможност за изчисление на пропорцията на подобрените пациенти. МКЗП зависи от нивата на изследваните показатели (VAS и WOMAC) преди интервенцията, като при по-ниски изходни нива минималното подобрение е по-малко, изразено в абсолютна стойност, и обратно при по-високи изходни – МКЗП е по-голямо. Използваните в дисертационния труд стойности се базират на утвърдените от Tubach и неговия колектив [215] и са представени в *Таблица 3.1.*

Табл. 3.1. Минимално клинично значимо подобрене (МКЗП) на абсолютната промяна при пациенти с гонартроза с ниска, умерена и висока изходна оценка според WOMAC и VAS

		Пациенти с гонартроза		
		Изходни стойности		
		Ниски	Умерени	Високи
WOMAC	Граници на показателя	< 35.4	{35.4 до 51.5}	> 51.5
	Промяна	-5.3	-11.8	-20.4
VAS	Граници на показателя	{30 – 51}	{51.1 – 66.2}	> 66.2
	Промяна	-10.8	-27.4	-36.6

Пациентите с по-тежки симптоми се нуждаят от по-голяма промяна, за да определят подобрието си като клинично значимо, в сравнение с пациентите с леки и умерени симптоми. [215]

OARSI-OMERACT критерии за отговор. Обединените критерии за отговор към терапията на OARSI и OMERACT показват сходна чувствителност и специфичност, независимо от използваните терапевтични средства (системни или локални), пътя на приложение и локализацията на ОА [214]. За да се отчете отговор към терапията, се изисква относителна и абсолютна промяна от началните стойности на показателя (*Фигура 3.1*).



Фиг. 3.1. Критерии на OARSI и OMERACT за отговор към терапията

3.3. Серологични методи

След попълване на информирано съгласие на участниците (пациенти и здрави контроли) е взета 5 ml венозна кръв в епруветка с клот активатор и полимерен гел. След престояване на температура 37 °C за 10 min, кръвта е центрофугирана на 5000 оборота/min за 10 min. Чрез микропипета серумът е отделен в епруветки тип „Епендорф”, които са съхранявани според указанията на производителя. Преди венепункцията всички пациенти са почивали за период от 30 минути. При пациентите и здравите контроли са анализирани серумните нива на следните биомаркери:

С-реактивен протеин е изследван (CRPLX, C-Reactive Protein [Latex], Roche Diagnostics GmbH) на принципа на турбидиметричен анализ с частици. Референтните стойности за използвания кит са били <6 mg/L.

Отразяващи ставното ремоделиране биомаркери. Количественото определяне на нивата на изследваните биомаркери беше проведено чрез комерсиално налични китове за ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA):

- **Хрущялен олигомерен матриксен протеин (COMP)** - KA0021, Abnova Corporation, Taiwan с аналитична чувствителност на теста за детекция на COMP, равняваща се на 0,4 ng/ml;
- **Матриксна металопротеиназа 3 (MMP-3)** - BMS2014/2, Affymetrix, eBioscience, BenderMed Systems GmbH, Austria с аналитична чувствителност на теста за детекция на MMP-3, равняваща се на 0,008 ng/ml;
- **Coll2-1** - CSB-EQ027311HU, Cusabio Biotech Co., LTD. с аналитична чувствителност на теста за детекция на Coll2-1, равняваща се на 11,72 pg/ml.

Резултатите са отчетени на ELISA четец 450/630 nm. Концентрациите на биомаркерите в серума са определени чрез стандартна крива, използвайки инструкциите на производителя, в нанोगрами на милилитър (ng/ml) за MMP-3 и COMP и пикограми на милилитра (pg/ml) за Coll2-1. По данни на производителя серумните нива на MMP-3 при 40 здрави неселектирани донори са < 60 ng/ml, като тази стойност бе приета за гранична: пациентите със стойности на MMP-3 < 60 бяха определени като MMP-3 негативни, а ≥ 60 като MMP-3 позитивни.

3.4. Образни методи

3.4.1. Нативна рентгенография

Лицева рентгенография на двете коленни стави в пълна екстензия е проведена в отделението по образна диагностика към Университетска болница „Св. Иван Рилски“. Използван е дигитален рентгенов апарат (DR) „GE Presicion Rxi“. По време на изследването пациентите са заемали изправено положение с цел натоварване на коленните стави. Образите са разчетени от специалист по образна диагностика и са стратифицирани според Kellgren-Lawrence скалата (*Таблица 3.2*).

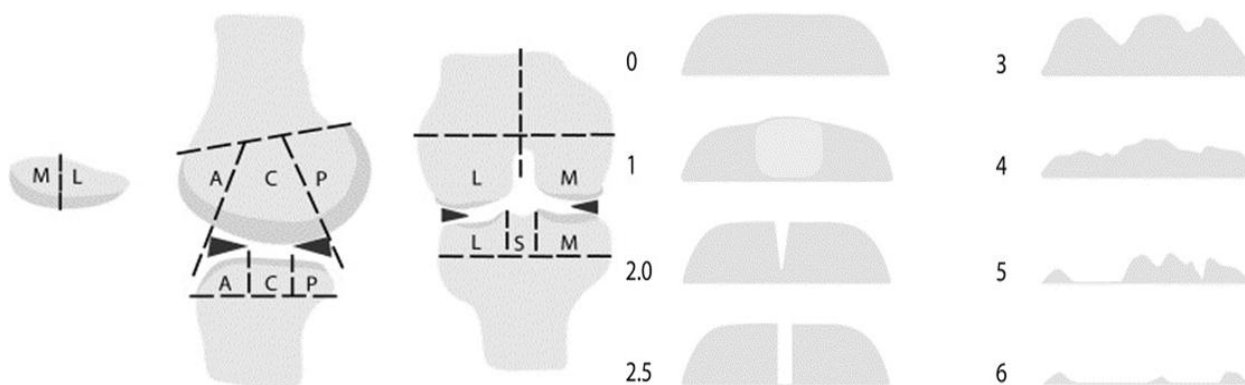
Табл. 3.2. Полуколичествена система за оценка на Kellgren-Lawrence [8]

Скала на Kellgren-Lawrence	
Стадий	Рентгенографска находка
0	Нормална рентгенография
I	Предполагаемо стеснение на ставната междина и възможни остеофити
II	Несъмнена остеофитоза и възможно стеснение на ставната междина
III	Множество умерени остеофити, несъмнено стеснение на ставната междина, остеосклероза и възможен деформитет на костния контур
IV	Големи остеофити, изразено намаляване на ставната междина, тежка склероза и несъмнен деформитет на костния контур

3.4.2. Магнитно-резонансна томография

Магнитно-резонансните образи са получени в отделението по образна диагностика към Университетска болница „Св. Иван Рилски“ с магнитен резонанс "GE Signa HDxt" с 1,5 Т интензитет на полето. МРТ е направена на симптоматичното коляно при едностранна гонартроза, а в случай на двустранно ангажиране – на коляното, което е показало по-напреднало структурно увреждане според Kellgren-Lawrence скалата, наречена още индексна става.

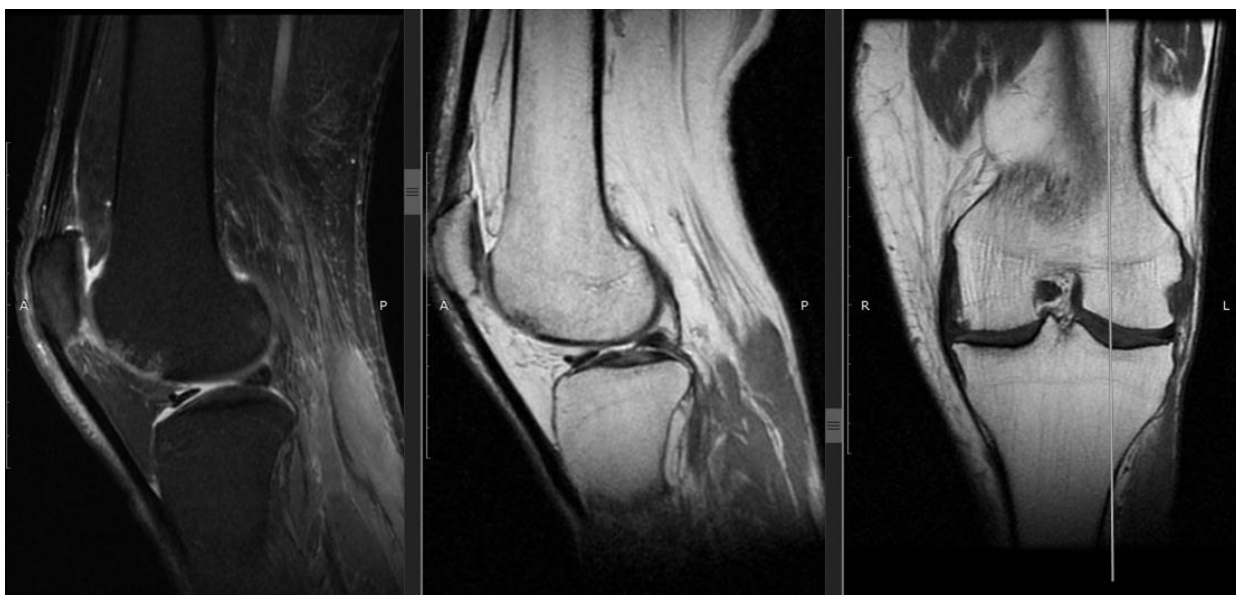
Образите са оценени чрез Whole-Organ magnetic Resonance iMaging Score (WORMS) от най-малко един независим специалист по образна диагностика. WORMS е система за полуколичествена оценка на магнитно-резонансните характеристики при гонартроза, а именно: загуба на хиалинен хрущял (*Фигура 3.2*), субхондрални костно-мозъчни лезии, субхондрални кисти, остеофитоза, костно изтриване, състояние на менискусите и наличие на синовит или ставен излив, както и увреди на кръстни връзки. WORMS използва комплексно подрегионално разделение на зоните на коляното. Методът WORMS предоставя мултифункционална цялостна оценка на коляното при ОА, използвайки конвенционална МРТ и показва висока степен на съгласие между оценителите [14].



Фиг. 3.2. Оценка на промените в хиалинния хрущял в отделните региони на колянната става според Whole-Organ magnetic Resonance iMaging Score (WORMS) при пациенти с ГоА [14]

Използвани са следните магнитно-резонансни секвенции (*Фигура 3.3*), с цел оценка на структурните промени:

- T1 – мастно-чувствителна секвенция, добра разделителна способност (“truth” sequence);
- Proton Density (PD) FatSat – висока чувствителност по отношение на течности, тъкани с ниско съдържание на вода са тъмни, секвенция на патологията;
- PD Cube – предлага висока разделителна способност и предоставя възможност за продължителни, тънкосрезови образи на комплексни анатомични структури.



Фиг. 3.3. Магнитно-резонансни секвенции. Образът не е репрезентивен за цялата извадка, но представя добре използваните секвенции и дава възможност за оценка на латералния компартмент на коляното.

В съответствие с полу-количествената система за оценка WORMS са използвани по-долу представените дефиниции при разчитане на магнитно-резонансните изображения, с цел установяване на структурни промени. Хрущялна увреда е налице, ако при разчитането на образите е била установена фокална загуба на хрущял по-малка от 1 cm в най-големия си размер или са налице зони на дифузна частична или пълна загуба на хрущял (WORMS оценка ≥ 2). При увеличаване на WORMS оценката ($\Delta\text{WORMS} \geq 1$), отразяваща хрущялната увреда в определения регион на коляното на дванадесетия месец, е налице прогресия на хрущялната увреда.

Лезии на менискуси (WORMS оценка ≥ 1) се наблюдават тогава, когато се изобразява руптура (дислоцирана или не) на менискус, или доказателства за предходна хирургична намеса, или пълно разкъсване или деструкция (загуба на контура и хомогенността или пълна резекция) в структурата на предния и задния рог и тялото на медиалния или латералния менискус. Остеофитоза е налице, когато се установят костни израстъци, които излизат извън нормалните костни контури на тибioфеморалната става на коляното

(WORMS оценка ≥ 2). Лигаментни нарушения бяха дефинирани като наличие на разкъсана предна или задна кръстна връзка или разкъсан или задебелен медиален или латерален колатерален лигамент (WORMS оценка ≥ 1). Костно-мозъчните лезии са некистични субхондрални зони на висок сигнален интензитет на PD FatSat магнитно-резонансни изображения (WORMS оценка ≥ 1). Субхондралните кисти се дефинират като зони на значимо повишен сигнален интензитет в субартикуларната кост с гладко очертани заоблени граници, които не съдържат костен мозък или трабекуларна кост (WORMS оценка ≥ 1). Синовит е налице в случаите, когато синовиалната кухина е разширена и/или изпълнена с течност, представляваща синовиална хипертрофия и/или ставен излив (WORMS оценка ≥ 1). Костно износване се дефинира като изравняване или депресия на артикуларните повърхности на тибията или фемура (WORMS оценка ≥ 1).

3.5. Дизайн на проучването

3.5.1. Крос-секционно обсервационно проучване

Изследваната група се състоеше от 132 пациенти ($62,59 \pm 10,11$ години, обхват 40-80 години) с първична гонартроза и 31 здрави доброволци ($51,77 \pm 10,10$ години, възрастов обхват 40-60 години). След подписване на информирано съгласие за участие в проучването всички пациенти бяха разпитани и прегледани, попълниха въпросниците за самооценка, беше им взета кръв за CRP и бяха проведени нативна рентгенография на двете коленни стави и магнитно-резонансна томография. При 56 от изследваните пациенти ($62,59 \pm 10,11$ години, обхват 40-80 години) и всички контроли бе проведено изследване на серумните нива на COMP, MMP-3 и Coll2-1. Включващите и изключващите критерии на пациентите са описани по-подробно в т. 3.1.

Всички участници подписаха формуляри за информирано съгласие. Проучването бе одобрено от Етичната комисия (Протокол № 1721 / 06.04.2015 г.) на Медицински университет - София.

Пациентите допълнително са разделени на две групи: с генерализирана ОА и с изолирана ГоА. Пациентите, класифицирани с генерализирана ОА, са страдали от симптоматична ОА на две или повече зони (ръце [вкл. проксимални и дистални интерфалангеални стави, и първа КМК], тазобедрени стави, коленни стави, гръбначен стълб, ходила), доказани впоследствие чрез рентгенография на засегнатите стави. Пациенти с изолирана ГоА не са имали признаци на ОА в който и да е друг регион или, ако са имали, не са били потвърдени рентгенографски.

3.5.2. Едногодишно проспективно, лонгитудинално, отворено проучване

За целите на проучването, за период от една година, се проследиха четири групи пациенти със симптоматична гонартроза, които отговаряха на включващите и изключващите критерии по точка 3.1.

За период от една година бяха проследени група (първа) пациенти ($n = 24$; $63,96 \pm 7,77$ години), които приемаха перорален глюкозамин сулфат в доза 1500 mg дневно (Дона®). В крайния анализ са включени единствено болните с ГоА, които са приемали глюкозамин сулфат 1500 mg дневно най-малко 36 пълни седмици (9 месеца) през периода на проследяване (12 месеца).

Втората ($n=25$; $63,56 \pm 10,4$ години) и третата група пациенти ($n=25$; $61,18 \pm 8,4$ години) бяха лекувани за период от 1 година съответно с еднократно (1 инжекция) или двукратно (2 инжекции през 6 месеца) вътреставно аплицирана високомолекулна кръстосаносвързана хиалуронова киселина - Flexus® fluid One 3,0 ml (Valentis AG Via Lugano 13, CH-6982 Agno - Lugano, Switzerland) с рН 6,8-7,8, осмоларитет 0,9 – 1,3 ms/cm и концентрация 2,2%.

При четвъртата група пациенти ($n = 26$; $60,38 \pm 7,4$ години) се проведеха два курса на лечение с автоложна плазма богата на тромбоцити (PRP) през 6 месеца. Всеки курс се състоеше от трикратно интраартикуларно инжектиране на PRP (4 ml) в три последователни седмици, съответно на 0,7 и 14 ден.

Технологията за приготвяне на PRP (*Фигура 3.4*) включваше извличане на 30 (32) ml кръв чрез венепункция от кубиталната вена при пациенти от мъжки (женски) пол, с игла с лумен 20G и спринцовка от 50ml. В същата спринцовка се добавя антикоагулант – 600 IU Heparin sodium. Внимателно се разклаща спринцовката, като ръката се движи във въздуха рисувайки символа за безкрайност. Кръвта се инжектира в специален, стерилен контейнер TriCell® (Rev-Med Inc, Korea) и се измерва на везна.

Центрофугирането за отделяне на тромбоцитния концентрат се извършва с центрофуга HQ-6000 (Vision Scientific Ltd, Korea, произведена за Rev-Med Ltd) с летящ ротор. След изравняване на теглото на TriCell® контейнера с балансния такъв се извършва първо центрофугиране при 3200 RPM за 5 минути и се отделя еритроцитната маса. След настройка на необходимото крайно количество тромбоцитен концентрат се прави второ центрофугиране при 3000 RPM за 3 минути. Полученият тромбоцитен концентрат (4ml) се отделя от бедната на тромбоцити плазма (PPP) и се инжектира вътреставно в засегнатото (индексното) коляно при стерилни условия, чрез класически подход за интраартикуларно инжектиране на колянна става (медиален среднопателарен достъп при колянна става в екстензия).



Фиг. 3.4. Принципна постановка за извличане и последващо инжектиране на PRP

Независимо дали е приложена богата на тромбоцити плазма или хиалуронова киселина, се спазиха следните процедури преди, по време и след въвеждане на лекарственото средство:

- Преди провеждане на манипулацията надлежащата кожа щателно бе почистена и дезинфекцирана.
- При наличие на ставен излив, преди да се пристъпи към интраартикуларно инжектиране се аспирира абнормната ставна течност чрез пункция с игла с размер 20G.
- Терапевтичното средство (PRP или ХК) се инжектира при стерилни условия, чрез класически подход за интраартикуларно инжектиране на колянна става (медиален среднопателарен достъп при разгънато коляно).

- След 10-15 минути почивка пациентите бяха помолени активно да сгънат и разгънат коляното си с цел по-добро разпределение на инжектираната субстанция в ставното пространство.
- На пациентите им се осигури още 10-15 минути почивка в центъра и им бе препоръчано да почиват през следващите 48 часа. В случай на поява на болка и/или оток в коляното, пациентите са инструктирани да приемат 1 таблетка парацетамол през устата и да се свържат с отговорното лице по телефона.

Всички участници подписаха формуляри за информирано съгласие. Проучването бе одобрено от Етичната комисия (Протокол № 8 / 22.04.2016 г.) на Медицинския университет - София.

Преди започване на лечението пациентите попълниха въпросниците HAQ-DI, WOMAC, алгофункционален индекс на Lequesne, оценена бе болката чрез VAS. Снети бяха пълна анамнеза и физикален статус, включително ставен статус. Взета бе кръв за CRP и бяха проведени рентгенография и MPT на индексната колянна става. Всички пациенти бяха проследени на 12, 24 и 52 седмица след инициране на лечението с въпросници. На 52 седмица бяха измерени серумните нива на CRP и проведена рентгенография и MPT на индексната колянна става (*Таблица 3.3*).

Още преди започване на терапията, от първоначално насочените за участие в проучването 174 болни с ГоА отпаднаха 42, поради наличието на един или повече изключващи критерии или неизпълнение на някой от включващите критерии. По-подробна разбивка на причините за отпадане на пациенти в хода на проследяването са представени на *Фигура 3.5*.

Табл. 3.3. Извършени клинични, серологични и образни изследвания при пациентите с гонартроза

Изследвания	Начало	12 седмица	24 седмица	52 седмица
Анамнеза	v	v	v	v
Обективно състояние	v	v	v	v
Оценка на болката (VAS)	v	v	v	v
Болестна активност (WOMAC индекс)	v	v	v	v
Болестна тежест (индекс на Lequesne)	v	v	v	v
Качество на живот (HAQ-DI)	v	v	v	v
С-реактивен протеин	v			v
Серумни нива на COMP, MMP-3 и COLL2-1 (n = 50)	v			
Рентгенография (оценка по Kellgren-Lawrence)	v			v
Магнитно-резонансна томография (WORMS)	v			v



Фиг. 3.5. Диаграма, проследяваща разпределението на пациентите по групи

3.6. Статистически анализ

Статистическият анализ е проведен с помощта на софтуерния продукт SPSS 21. Използвани са дескриптивна статистика, параметрични и непараметрични тестове, линеен регресионен и бинарен логистичен анализ, ROC анализ. Разпределението на данните е изчислено чрез теста на Shapiro–Wilk. Екзактният тест на Fisher е използван за анализиране на наличието на линейна връзка между категорийни величини. Данните с ненормално разпределение са трансформирани чрез натурален логаритъм. Параметрични тестове (корелация на Pearson, Student T-тест, T-тестът за сдвоени разлики, дисперсионен анализ ANOVA с post-hoc анализ на Tukey) са използвани в случаите на нормално разпределение на данните. При сравнение на непрекъснати величини в групите, изложените хипотези отразяват разликата в средните стойности (mean) \pm стандартната девиация (SD).

Ако след логаритмичното преобразуване данните останат с ненормално разпределение, непараметричните U-тест на Mann-Whitney, H-тестът на Kruskal-Wallis и тестът на Wilcoxon за сдвоени разлики са използвани за сравнение на вариациите. Хомогенността на вариациите е измерена чрез теста на Levene за равнопоставеността на вариациите. Когато кривите на разпределение са били идентични за изследваните групи, изложените хипотези отразяват разликата между медианите (минимум; максимум). Ранговият анализ на Spearman е използван с цел изследване на корелациите при ненормална дистрибуция на данните.

Многофакторен линеарен регресионен анализ бе проведен, за да предскаже нивата на COMP и HAQ-DI, въз основа на независими предиктори, като условието за нормалитет на остатъците на зависимата бе спазено. Независимите предиктори за отговора към терапията, постигнатото минимално клинично значимо подобрение и прогресията за хрущялната увреда са изследвани чрез бинарен логистичен анализ. Корекция е направена за потенциални допринасящи фактори, в това число възраст и

пол. Mantel-Haenszel тестът бе използван за изследване на асоциацията между бинарни предиктори (възможни допринасящи фактори) и бинарна зависимост. Нивото на значимост е заложено да бъде 0,05.

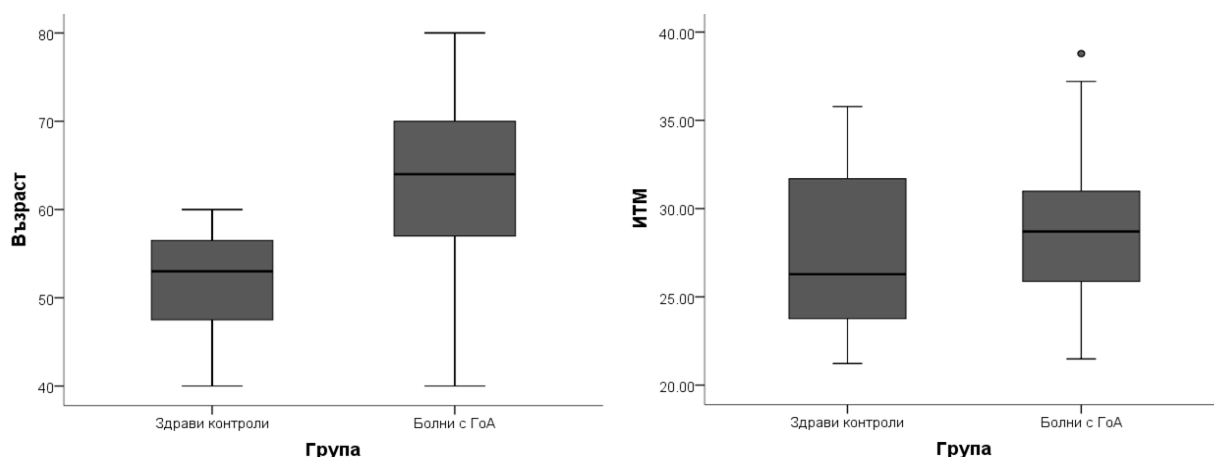
Проведен бе Receiver operating characteristic (ROC) анализ, чрез който бе оценен диагностичният потенциал на MMP-3 и COMP за ГоА. С помощта на ROC анализ също бяха определени праговите стойности на MMP-3 за сепариране на ГоА в контекста на генерализирана ОА от изолирана ГоА. Площта под кривата (AUC) бе също калкулирана, като диагностични тестове, които доближават 1, показват перфектна дискриминация. Бяха изчислени чувствителността и специфичността на предложените прагови стойности за биомаркерите.

4. Резултати

4.1. Крос-секционно проучване

4.1.1. Демографски и клинични параметри на пациенти и контроли

В крос-секционната част на проучването взеха участие 132 пациенти ($63,45 \pm 8,71$; обхват 40-80 години) и 31 контроли ($51,77 \pm 6,10$ години; обхват 40-60 години). В резултат на проведеня анализ на данните бе констатирана значима разлика във възрастовото разпределение между пациентите и контролите ($t(161) = 7,07$; $p < 0,001$). Двете групи показаха сходно полово разпределение ($\chi^2(1) = 0,211$; $p = 0,406$), като броят жени беше съответно 81% и 77%. Болните с ГоА и здравите доброволци не се различаваха значимо по своя индекс на телесна маса (ИТМ) ($29,93 \pm 3,88$ и $27,48 \pm 4,53$; $t(161) = 1,81$; $p = 0,072$) (Фигура 4.1).



Фиг. 4.1. Разпределение по възраст и ИТМ при пациенти и контроли

По анамнестични данни, болката в коленните стави бе с давност от 1/2 до 17 години ($Mdn = 3$) в групата на болните с ГоА. При всички пациенти оценихме болестната активност чрез въпросника WOMAC, интензитета на болката чрез VAS, тежестта на заболяването чрез алгофункционалния индекс на Lequesne, инвалидизацията и качеството на живот чрез HAQ-DI. Средните им стойности, както и други релевантни демографски, клинични и

образни параметри на групата с гонартроза и нейните подгрупи, са представени в *Таблица 4.1*.

4.1.2. Връзка между демографските характеристики и клиничните параметри

Медианата на болката, оценена чрез визуалната аналогова скала, се равнява на 52 mm (обхват: 22-95 mm). Тя корелираше с възрастта и продължителността на оплакванията ($r_s=0,173$; $p=0,047$ и $r_s=0,395$; $p<0,001$, респективно), но не и с ИТМ. Колкото по-възрастни са пациентите и по-голяма е давността на болката, толкова по-високо е нивото ѝ според VAS. Същите корелации бяха установени и за болката, измерена чрез Likert скала и включена във въпросника WOMAC. Въпреки това нивото на болка не се различаваше значимо между групите на пациентите под ($n=49$) и над 60 ($n=83$) годишна възраст (Mann-Whitney $U=1904$; $p=0,543$). Жените и мъжете имаха сигнификантно различни стойности на болката, оценена чрез VAS: 57 (22; 95) mm и 45 (26; 87) mm, респективно, Mann-Whitney $U=882,5$; $p=0,008$.

Медианата на оценката на болестната активност според WOMAC при изследваните пациенти се равнява на 37,5 (обхват: 22-92). Стойностите на WOMAC корелираха с възрастта ($r_s=0,257$; $p=0,003$), но не и с давността на болката ($r_s=0,102$; $p=0,242$) и ИТМ ($r_s=0,158$; $p=0,070$). Въпреки това нивото на болестната активност не се различаваше значимо между групите на пациентите под и над 60 годишна възраст (Mann-Whitney $U=1841,5$; $p=0,221$). Жените и мъжете имаха сигнификантно различни стойности на болестната активност: 45 (6; 92) и 33 (7; 64), респективно, Mann-Whitney $U=742,5$; $p=0,001$.

Медианата на алгофункционалния индекс на Lequesne при изследваните пациенти се равнява на 11 (обхват: 4 - 23). Стойностите на индекса на Lequesne корелираха с възрастта ($r_s=0,250$; $p=0,004$), с давността на болката ($r_s=0,191$; $p=0,029$) и ИТМ ($r_s=0,199$; $p=0,022$). Жените и мъжете имаха сигнификантно различни стойности на болестната тежест според

индекса на Lequesne: 12,5 (4; 23) и 9 (5; 15), респективно, Mann-Whitney U = 719,5; $p < 0,001$.

Медианата на оценката на свързаното със здравето качество на живот според HAQ-DI при изследваните пациенти се равнява на 0,88 (обхват: 0 – 2,25). Стойностите на HAQ-DI корелираха с давността на болката ($r_s = 0,187$; $p = 0,032$), но не и с възрастта ($r_s = 0,128$; $p = 0,143$) и ИТМ ($r_s = 0,068$; $p = 0,441$). Жените и мъжете имаха сигнификантно различни стойности на качеството на живот, оценено чрез HAQ-DI: 1 (0; 2,25) и 0,5 (0; 2,25), респективно, Mann-Whitney U = 786,5; $p = 0,001$. Всички клинични параметри, включително VAS, WOMAC, Lequesne и HAQ-DI, корелираха помежду си със значителен или висок афинитет ($r_s > 0,5$) и са представени в *Таблица 4.2*.

За да бъдат определени, кои непрекъснати клинични и демографски параметри (измежду възраст, ИТМ, давност на болката, болката, Lequesne, WOMAC) са независими предиктори за качеството на живот при пациентите с ГоА (HAQ-DI), бе проведен стъпаловиден многофакторен регресионен анализ. За целта бе установено сигнификантно регресионно уравнение ($F(2,130) = 110,70$; $p < 0,001$), с $R^2 = 0,626$. В случая предиктивните стойности на HAQ-DI са определени с помощта на следната аналитична зависимост

$$0,23 + 0,014x(\text{WOMAC}) + 0,045x(\text{LEQ}),$$

където WOMAC и LEQ са съответно оценките в WOMAC и Lequesne индексите. HAQ-DI се увеличава съответно с 0,014 и 0,045 за всяка измерена единица от WOMAC и Lequesne индексите, които са независим предиктор за качеството на живот на пациентите с ГоА. В *Таблица 4.3* са представени нива на клиничните параметри при категоризиране на пациентите според нивото на болка (VAS) и тежестта на заболяването (Lequesne), а *Фигура 4.2* илюстрира констатираното разсейване, характеризиращо зависимостта между HAQ-DI (X) и болест-специфичните индекси на Lequesne (Y) и WOMAC (Y).

Табл. 4.1. Демографски, клинични и образни параметри на изследваните пациенти с гонартроза

Променлива величина	Пациенти с ГоА (n = 132)	Клинични групи			Рентгенографски групи			
		Пациенти с изолирана гонартроза (n = 65)	Пациенти с генерализирана ОА (n = 67)	P	KL I пациенти (n = 39)	KL II пациенти (n = 65)	KL III пациенти (n = 28)	P
Демографски параметри								
Възраст (години)*	63,45 ± 8.71	61,74 ± 8,48	65,12 ± 8,68	0,025	58,92 ± 9.1	65,74 ± 7,61	64,46 ± 8,5	> 0,001
Пол (% жени)	81%	75%	87%	NS	67%	86%	88%	0,024
Индекс на телесна маса (kg/m²)*	28,93 ± 3.88	28,26 ± 4,08	29,58 ± 3,59	NS	28,60 ± 3,81	28,91 ± 3,92	29,45 ± 3,98	NS
Клинични параметри								
Изолирана ГоА (%)	49,2% (65/132)	-	-	-	59% (23/39)	43,1% (28/65)	50% (14/28)	NS
Генерализирана ОА (%)	50,8% (67/132)	-	-	-	41% (16/39)	56,9% (37/65)	50% (14/28)	NS
Продължителност на болката (години)**	3,5 (0,5; 17)	3 (0,5; 15)	4 (0,5; 17)	NS	2 (0,5; 15)	5,00 (0,5; 17)	7,00 (0,5; 15)	0,003

Продължителност на сутрешна скованост (минути)**	12,5 (5; 60)	12,5 (5; 60)	15 (5; 60)	NS	10 (5; 45)	15 (5; 60)	15 (5; 60)	NS
Визуална аналогова скала за болка (mm) **	52 (22; 95)	52 (22; 95)	53 (26; 95)	NS	46 (22; 95)	51 (32; 95)	70 (29; 95)	0,001
HAQ-DI**	0,88 (0; 2.25)	0,75 (0; 2.25)	0,88 (0,10; 2.25)	NS	0,50 (0; 2.0)	0,75 (0,10; 2,25)	1,00 (0,13; 2,00)	0,001
WOMAC функционален индекс **	37,5 (6; 91)	46 (13; 91)	31 (6; 91)	NS	32 (6; 92)	42 (11; 81)	50 (13; 91)	0,004
Тежест на заболяването (индекс на Lequesne)**	11,00 (4; 23)	12 (4,5; 23)	11 (4; 23)	NS	9,50 (4; 23)	12 (5; 21,5)	14,25 (4,5; 23)	0,010

Образни характеристики

Рентгенографска оценка на ГоА (KL)

KL I (%)	29,5% (39/132)	35,3% (23/65)	23,9% (16/67)	NS	-	-	-
KL II (%)	49,3% (65/132)	43% (28/65)	55,2% (37/67)	NS	-	-	-
KL III (%)	21,2% (28/132)	21,5% (14/65)	20,9% (14/67)	NS	-	-	-

ГоА - гонартроза; ОА – остеоартроза; KL - Kellgren-Lawrence; HAQ-DI - Health Assessment Questionnaire Disability Index; WOMAC - Western Ontario and McMaster Universities index; NS – несигнификантно.

* Нормално разпределените данни са представени като средна стойност ± стандартна девиация

** Ненормално разпределените данни са представени като медиана (минимум; максимум)

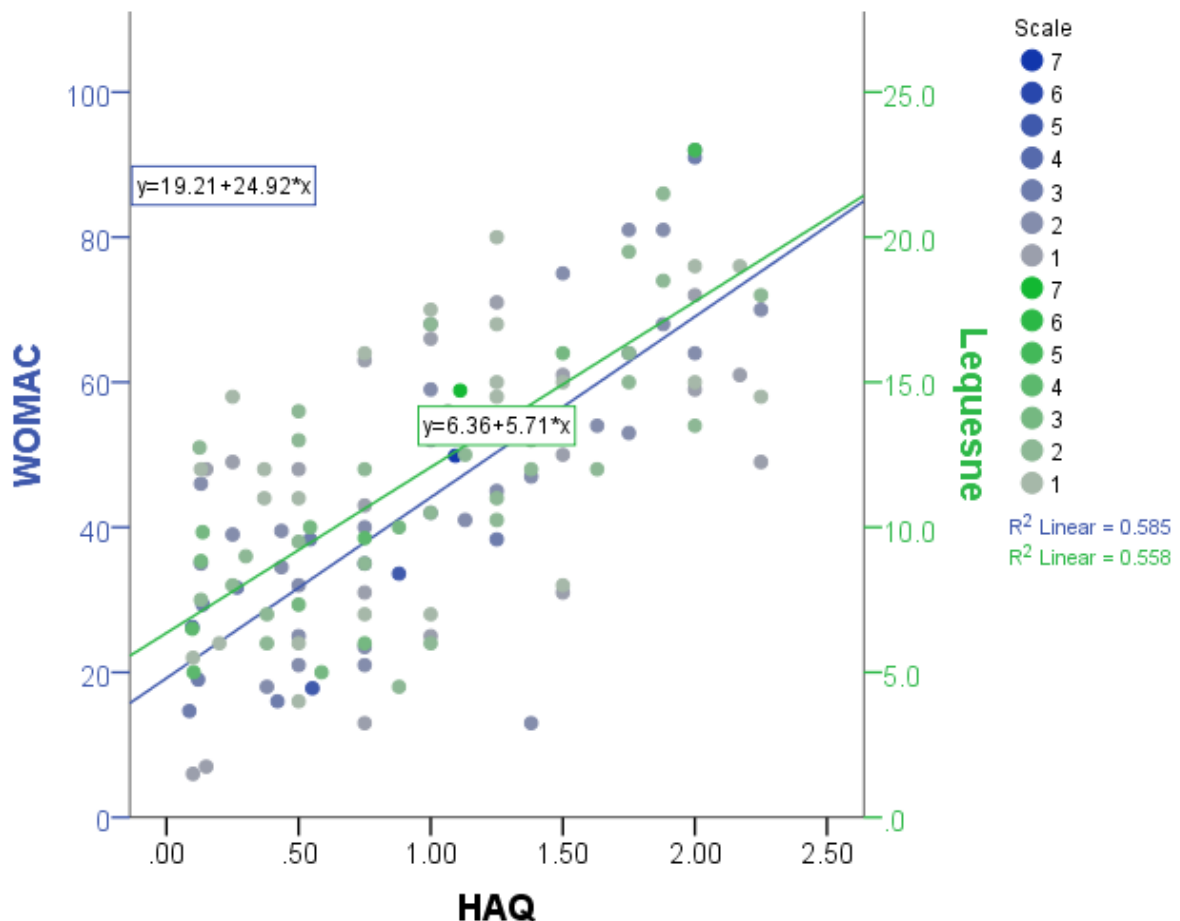
Табл. 4.2. Корелации между клиничните параметри (Spearman rho)

Параметър		HAQ-DI	VAS	WOMAC	Lequesne
Качество на живот (HAQ-DI)	Корелационен коефициент	1,000	,692**	,674**	,625**
	Sig. (2-tailed)	.	,000 [¥]	,000 [¥]	,000 [¥]
	N	132	132	132	132
Интезитет на болката (VAS)	Корелационен коефициент	,692	1,000	,815*	,748*
	Sig. (2-tailed)	,000 [¥]	.	,000 [¥]	,000 [¥]
	N	132	132	132	132
Болестна активност (WOMAC)	Корелационен коефициент	,674**	,815*	1,000	,724*
	Sig. (2-tailed)	,000 [¥]	,000 [¥]	.	,000 [¥]
	N	132	132	132	132
Алгофункционален индекс на Lequesne	Корелационен коефициент	,625**	,748*	,724*	1,000
	Sig. (2-tailed)	,000 [¥]	,000 [¥]	,000 [¥]	.
	N	132	132	132	132

* $0,7 < r_s < 0,9$ – висока корелация

** $0,5 < r_s < 0,7$ – значителна корелация

¥ $p < 0.001$



Фиг.4.2. Диаграма на разсейване, показваща зависимостта на HAQ-DI (X) от болест-специфичните индекси на Lequesne (Y) и WOMAC (Y)

4.1.3. Връзка между клинични и образни параметри

Рентгеновият стадий според KL корелираше с възрастта на пациентите ($r_s = 0,279$; $p = 0,001$) и давността на болката ($r_s = 0,290$; $p = 0,001$). Наблюдава се и връзка между KL оценката и HAQ-DI ($r_s = 0,287$; $p = 0,001$), VAS ($r_s = 0,325$; $p < 0,001$), WOMAC ($r_s = 0,288$; $p < 0,001$) и Lequesne индекса ($r_s = 0,374$; $p < 0,001$). Връзката се запазваше след корекция за потенциални допринасящи фактори като възраст и пол. Медианите на изброените по-горе зависими също се различаваха в рентгеновите групи и са подробно представени в Таблица 4.1, а разпределение на рентгенографския стадий според тежестта на заболяването и болката – на Таблица 4.4. Разпределението на болните според тежестта на заболяването и интензитета на болката е представено на Таблица 4.3.

Табл. 4.3. Нива на клиничните параметри при категоризиране на пациентите според нивото на болка (VAS) и тежестта на заболяването (Lequesne)

Категорийна величина	Тежест на заболяването (Lequesne)				P	Болка (VAS, mm)				P
	лека и умерена (n=24)	тежка (n=38)	много тежка (n=25)	изключител- но тежка (n=45)		< 40 (n=24)	≥ 40 < 60 (n=53)	≥ 60 < 80 (n=36)	≥ 80 (n=19)	
Непрекъснатата величина										
Качество на живот (HAQ-DI)	0,50 (0; 1)	0,50 (0,13; 1,25)	0,75 (0,13; 2)	1,25 (0,25; 2,25)	< 0,001	0,50 (0; 2,17)	0,63 (0,13; 2)	1,25 (0,13; 2,25)	1,25 (0,13; 2)	< 0,001
Интезитет на болката (VAS, mm)	41 (24; 64)	51 (32; 79)	52 (22; 88)	73 (32; 95)	< 0,001	33,5 (22; 39)	49,5 (40; 59)	70 (60; 79)	87 (80; 95)	< 0,001
Болестна активност (WOMAC)	19 (6; 59)	31,50 (21; 42)	42 (13; 64)	55 (17; 91)	< 0,001	30 (7; 61)	31,50 (6; 91)	51 (23; 81)	49 (30; 91)	< 0,001
Алгофункционален индекс на Lequesne	6 (3; 7,5)	9,5 (8; 10,5)	12,5 (11; 13,5)	16 (14; 23)	< 0,001	7,25 (3; 19)	9,5 (4; 23)	14,5 (5; 20)	16 (12; 23)	< 0,001

Данните следват ненормално разпределение и затова са представени като медиана (минимум; максимум)

Табл. 4.4. Разпределение на рентгенографския стадий според тежестта на заболяването и болката

Пациенти с ГоА										
Рентенов стадий	Тежест на заболяването (Lequesne)				P	Болка (VAS, mm)				P
	лека и умерена (n=24)	тежка (n=38)	много тежка (n=25)	изключително тежка (n=45)		< 40 (n=24)	≥ 40 (n=53)	≥ 60 (n=36)	≥ 80 (n=19)	
KL I (39)	10	15	8	6	0,022	15	13	7	4	<0,001
KL II (65)	8	20	13	24		6	35	15	9	
KL III (28)	6	3	4	15		3	5	14	6	

KL – Kellgren-Lawrence; P – ниво на значимост; VAS – визуална аналогова скала

Магнитно-резонансната оценка на структурните промени на цялото коляно WORMS корелираше с HAQ-DI ($r_s = 0,276$, $p = 0,007$), VAS ($r_s = 0,276$, $p < 0,001$), WOMAC ($r_s = 0,350$, $p = 0,001$) и Lequesne индекса ($r_s = 0,287$, $p < 0,007$).

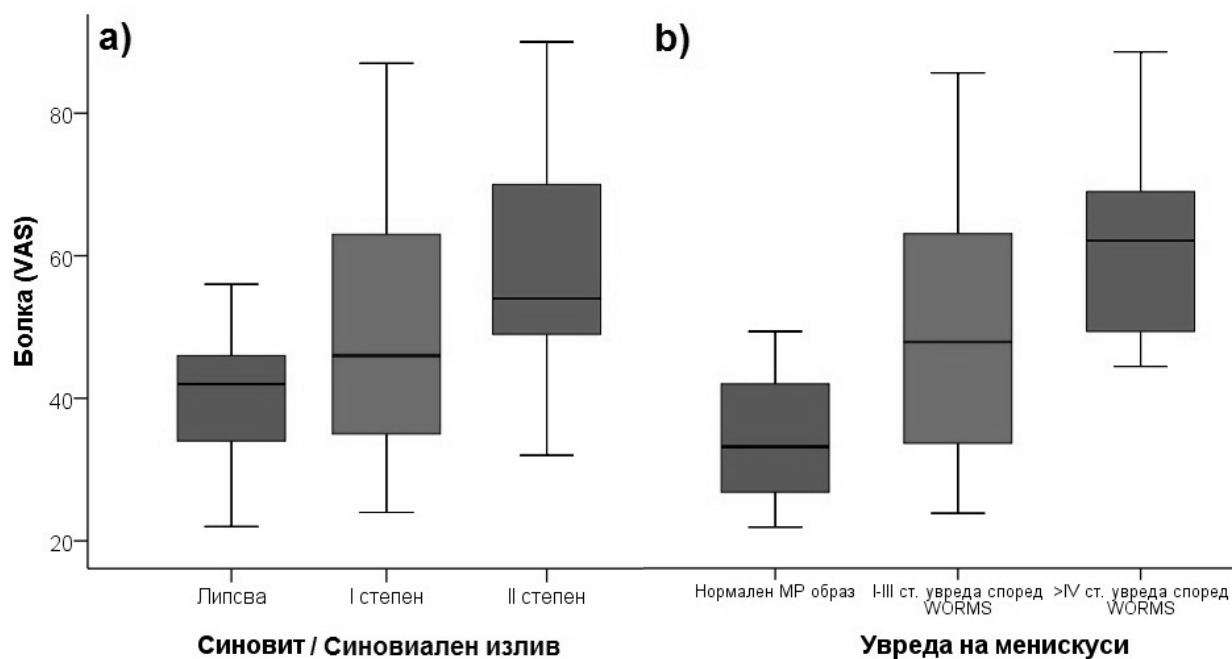
Възрастта на пациентите ($r_s = 0,378$, $p < 0,001$), давността на болката ($r_s = 0,235$, $p = 0,007$) и ИТМ ($r_s = 0,187$, $p < 0,032$) също показва връзка с WORMS. По-подробен анализ, включващ отделните структурни промени, оценени чрез МРТ е представен в *Таблица 4.5*. Костно-мозъчните лезии, остеофитозата и увредата на менискуси в най-добра степен корелираха с болката, болестната активност и сковаността.

Табл. 4.5. Корелационен анализ (Spearman rho) между MPT установените увреди и клиничните показатели

Клиничен показател	MPT установени увреди							
	Хрущял	BML	BC	BA	OP	Менискуси	S/E	
Интензитет на болката (VAS)	Коефициент	.371*	.489*	.272	.210	.442*	.290	.356*
	Sig. (2-tailed)	.020	.002	.094	.200	.005	.073	.026
	N	132	132	132	132	132	132	132
Болестна активност (общ WOMAC)	Коефициент	.331*	.436*	.345*	.268	.471*	.475*	.433*
	Sig. (2-tailed)	.042	.006	.034	.104	.003	.003	.007
	N	132	132	132	132	132	132	132
Скованост (WOMAC)	Коефициент	.235	.512*	.249	.332*	.418*	.353*	.449*
	Sig. (2-tailed)	.155	.001	.131	.042	.009	.030	.005
	N	132	132	132	132	132	132	132
Физическа функция (WOMAC)	Коефициент	.274	.353*	.297	.161	.389*	.342*	.274
	Sig. (2-tailed)	.096	.030	.071	.334	.016	.035	.096
	N	132	132	132	132	132	132	132
Болестна активност (обща оценка по WOMAC)	Коефициент	.279	.389*	.291	.208	.415*	.385*	.323*
	Sig. (2-tailed)	.085	.014	.072	.204	.009	.016	.045
	N	132	132	132	132	132	132	132
	Коефициент	.245	.315*	.155	.103	.341*	.239	.204

Болестна тежест (Lequesne)	Sig. (2-tailed)	.133	.049	.348	.534	.033	.143	.213
	N	132	132	132	132	132	132	132
Качество на живот (HAQ-DI)	Коефициент	.156	.265	-	.015	.234	.296	.204
				.003				
	Sig. (2-tailed)	.344	.103	.986	.928	.152	.067	.213
	N	132	132	132	132	132	132	132

BML – костно-мозъчен лезии; BC – костни кисти; BA – костно триене; OP – остеофитоза; S/E – синовит или излив; Sig. (2-tailed) – ниво на значимост; * - сигнификантна корелация.



Фиг. 4.3. Нива на болката (VAS) при пациенти, групирани според степента на синовиална хипетрофия и/или излив (а) и според степента на увреда на медиалния менискус (b), оценени чрез WORMS

Нивата на болка се различават сигнификантно в следните три групи: пациенти без магнитно-резонански данни за синовит, със синовит първа степен и със синовит втора степен ($p=0,05$) (Фигура 4.3.а). По отношение на увредите на медиалния менискус, разделихме пациентите също в три групи:

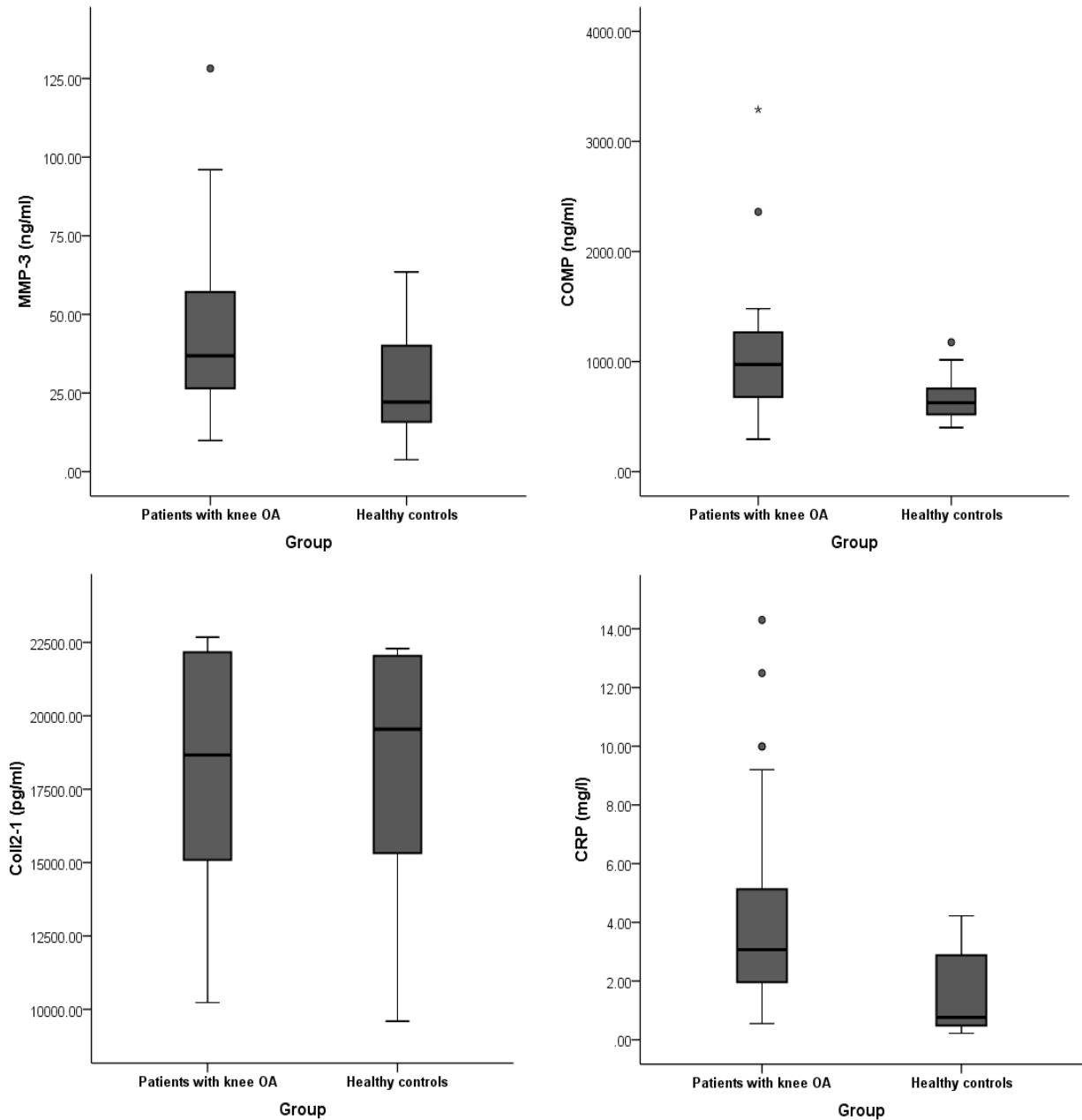
пациенти без увреда, пациенти с увреда I-III степен според WORMS скалата и пациенти с увреда на медиалния менискус над IV степен. Съпоставяйки нивата на болката, открихме сигнификантна разлика между групите ($p = 0,036$) (Фигура 4.3.b).

4.1.4. Анализ на серумните нива на биомаркерите при изследваните групи. Измерване и сравнение на серумните нива на С-реактивен протеин, COMP, Coll2-1 и MMP-3 при пациенти с ГоА и здрави доброволци

Серумните нива на COMP, MMP-3 и Coll2-1 бяха изследвани при 56 пациенти ($62,59 \pm 10,11$ години, обхват 40-80 години) с ГоА и 31 здрави контроли. Серумните нива на COMP и MMP-3 корелираха значимо с възрастта ($r_s=0,431$; $p<0,001$ и $r_s=0,299$; $p=0,005$, респективно). Констатирана бе също корелация между серумните нива на COMP и давността на болката ($r_s=0,338$; $p= 0,011$) при болните с ГоА. Не се установи сигнификантна връзка между концентрациите на циркулиращите Coll2-1, COMP и MMP-3 в серума от една страна и клиничните параметри, включително самооценката на пациентите за болка (VAS и WOMAC индекс), физическа функция (WOMAC индекс) и качеството на живот (HAQ-DI), сковаността и тежестта на заболяването (Lequesne индекс). CRP корелираше положително с VAS ($r_s=0,354$; $p=0,007$) и WOMAC индекса ($r_s= 0,338$; $p=0,011$). С помощта на Mann-Whitney U тест се съпоставиха нивата на серумните MMP-3, sCOMP, sColl2-1 и CRP между пациенти ($n= 56$) с ГоА (включително пациенти с изолирана ГоА и ГоА в контекста на генерализирана ОА) и здрави контроли ($n = 31$). Пациентите с гонартроза имаха сигнификантно по-високи нива на серумните MMP-3 (36,85 (9,9; 128,2) vs. 22,10 (3,8; 63,5) ng/ml; $U=538$; $p=0,003$), COMP (985 (285; 3290) vs. 625 (400; 1175) ng/ml; $U=421$; $p < 0,001$) и CRP (3,08 (0,55; 14,30) vs. 1,27 (0,22; 4,22) mg/l; $U=367$; $p < 0,001$), където медианата на серумните нива на CRP при пациентите беше в рамките на референтните граници за лаборатория (<6 mg/l). Не се наблюдава статически значима разлика в нивата на Coll2-1

между пациенти и контроли (18670 (10230; 22680) и 19545 (9597; 22290) pg/ml; $U=526,50$; $p=0,693$) (Фигура 4.4).

Тъй като рентгенографски ГоА се дефинира като степен 2 или по-висока съобразно скалата на Kellgren-Lawrence, с присъствие на



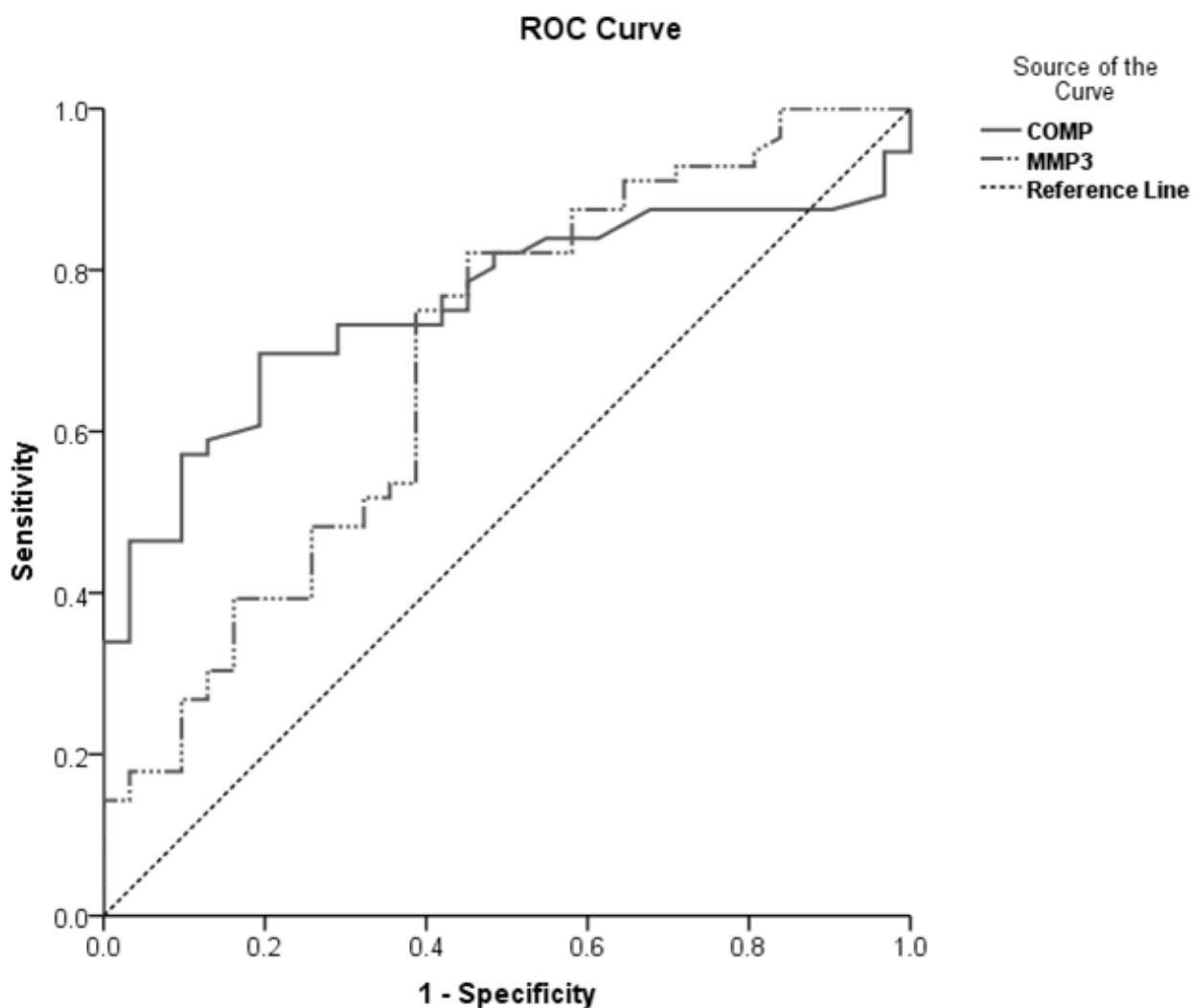
Фиг. 4.4. Сравнение на нивата на изследваните биомаркери

дефинитивна остеофитоза и възможно стеснение на ставната междина при лицева рентгенография с натоварване [216], серумните нива на MMP-3,

COMP, Coll2-1 и CRP бяха също сравнени в следните две групи: първата група (n=48) бе съставена от здрави индивиди и пациенти без дефинитивни данни за ГоА (KLI пациенти), а втората група (n=39) – съставена от пациенти с рентгенови данни за гонартроза KL II/III. Установи се, че пациентите с KLII/III имаха по-високи серумни нива на MMP-3 (36,2 (9,9; 128,2) и 28,55 (3,8; 85,4) ng/ml; U = 654,5; p = 0,016), COMP (1095,00 (315; 3290) и 640 (285; 1255) ng/ml; U = 344, p < 0,001) и CRP (3,51 (0,55; 14,30) и 1,62 (0,22; 9,99) mg/l; U = 507,5; p = 0,001).

4.1.5. Определяне на стойностите на изследваните биомаркери за разграничаване на здрави от болни с гонартроза индивиди, както и на пациенти с изолирано ангажиране на колянната става от пациенти с генерализирана остеоартроза

С цел определяне на стойностите на изследваните биомаркери за разграничаване на здрави от болни с гонартроза индивиди бе проведен анализ на receiver operating characteristic (ROC) крива. Площта под кривата (AUC) за серумните нива на COMP бе 0,757, с 95% доверителен интервал от 0,657 до 0,858. ROC анализът определи гранични нива от 717,5 ng/ml с чувствителност 73,2 и специфичност 71% за диференциация между контроли и пациенти с гонартроза. 100% специфичност за серумния COMP се постигна при нива на биомаркера от 1185 ng/ml с чувствителност 33,9%. За MMP-3 AUC беше равна на 0,690, с 95% доверителен интервал от 0,571 до 0,809. ROC анализът на серумните нива на MMP-3 определи граница за диференциране 26,65 ng/ml с чувствителност 75% и специфичност 61,3% за отграничаване между контроли и пациенти с ГоА. В *Таблица 4.6* са представени данните за серумните нива на COMP и MMP-3, дискриминиращи пациенти с гонартроза от здрави индивиди, а на *Фигура 4.5* са илюстрирани ROC кривите на серумните нива на COMP и MMP-3, съответстващи на данните, нанесени в таблицата.



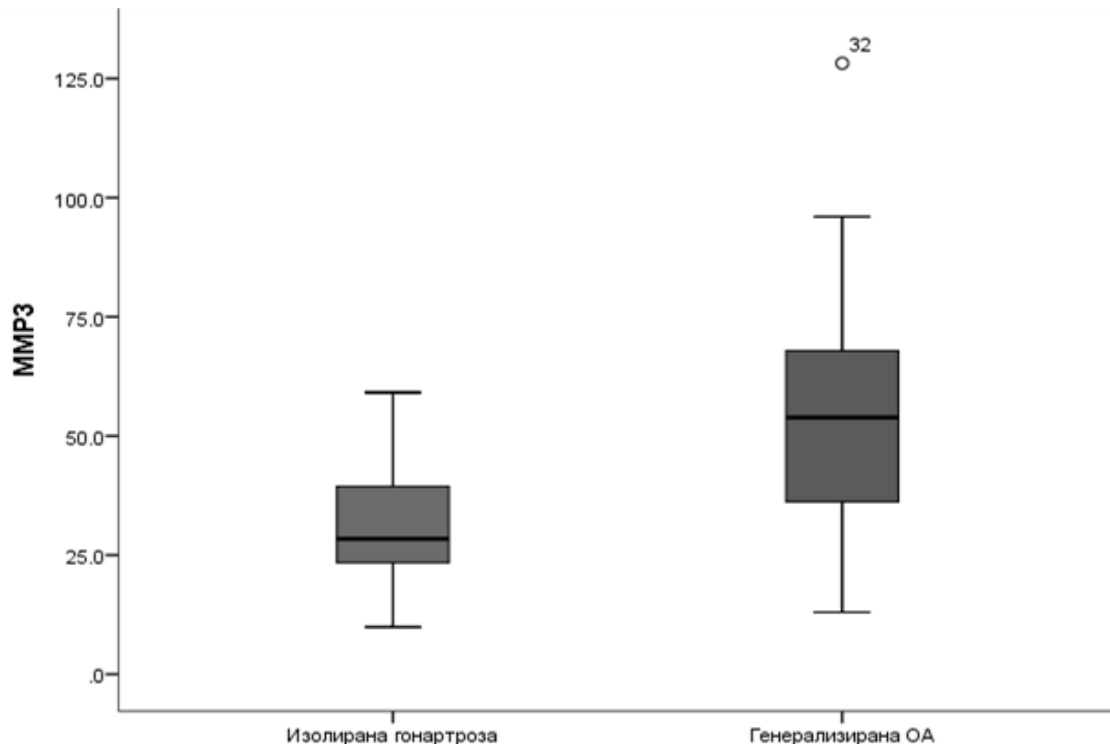
Фиг. 4.5. ROC крива на серумните нива на COMP и MMP-3, дискриминиращи пациенти с гонартроза от здрави индивиди

Табл. 4.6. Серумните нива на COMP и MMP-3, дискриминиращи пациенти с гонартроза от здрави индивиди

Биомаркер	AUC	Стойност и (ng/ml)	Чувствителност	Специфичност	CI	
					Горна граница	Долна граница
COMP	0,757	717,50	0,732	0,710	0,657	0,858
MMP3	0,690	26,65	0,750	0,613	0,571	0,809

AUC = площ под кривата; ng/ml = нанограми за милилитър; CI = доверителен интервал

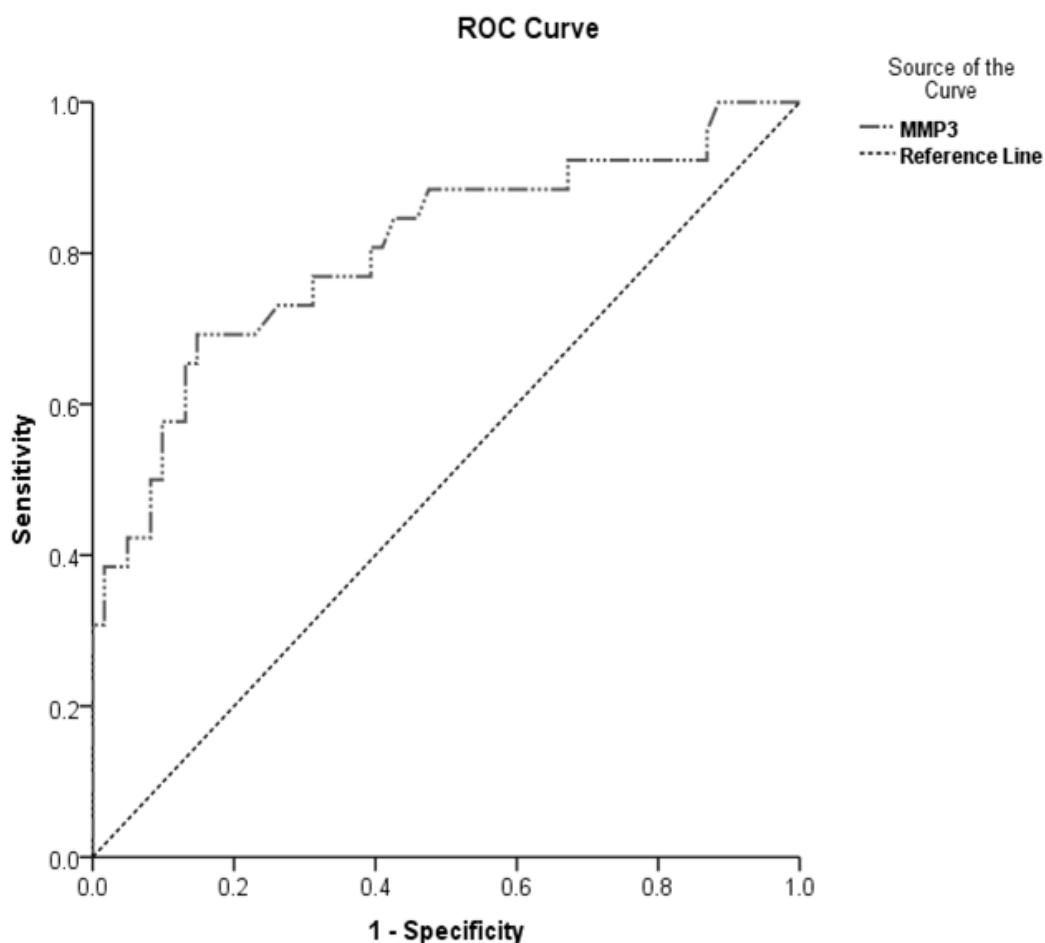
Сигнификантна разлика се наблюдаваше и в серумните нива на MMP-3 между групата на болни с изолирана гонартроза и болни с ГоА в контекста на генерализирана ОА ($30,40 \pm 11,84$ и $55,13 \pm 27,51$ ng/ml; $t(54) = -4,47$; $p < 0,001$).



Фиг. 4.6. Сравнение на нивата на MMP-3 при пациенти с изолирана гонартроза и пациенти с гонартроза в контекста на генерализирана остеоартроза

С цел сепариране на болни с изолирана ГоА от болни с генерализирана ОА бе проведен ROC анализ за определяне на праговите стойности на MMP-3. AUC беше равна на 0,822, с 95% интервал на доверителност от 0,715 до 0,928. ROC анализът на серумните нива на MMP-3 определи гранични стойности от 41,35 ng/ml с чувствителност 73,1% и специфичност 86,9% за отграничаване на пациенти с изолираната ГоА от пациенти с ГоА в контекста на генерализирана ОА. Данни за серумните нива на MMP-3, дискриминиращи пациенти с изолирана гонартроза от пациенти с гонартроза в контекста на генерализирана ОА са нанесени в *Таблица 4.7*, а ROC крива на серумните нива на MMP-3, дискриминиращи пациенти с изолирана ГоА от

пациенти с ГоА в контекста на генерализирана ОА е изобразена на *Фигура 4.7*.



Фиг. 4.7. ROC крива, определяща праговете серумни нива на MMP-3, дискриминиращи пациенти с изолирана гонартроза от пациенти с гонартроза в контекста на генерализирана ОА

Табл. 4.7. Серумните нива на MMP-3, дискриминиращи пациенти с изолирана гонартроза от пациенти с гонартроза в контекста на генерализирана ОА

Биомаркер	AUC	Стойности (ng/ml)	Чувствителност	Специфичност	CI	
					Горна граница	Долна граница
MMP-3	0,822	41,35	0,731	0,869	0,715	0,928

AUC = площ под кривата; ng/ml = нанोगрами за милилитър; CI = доверителен интервал

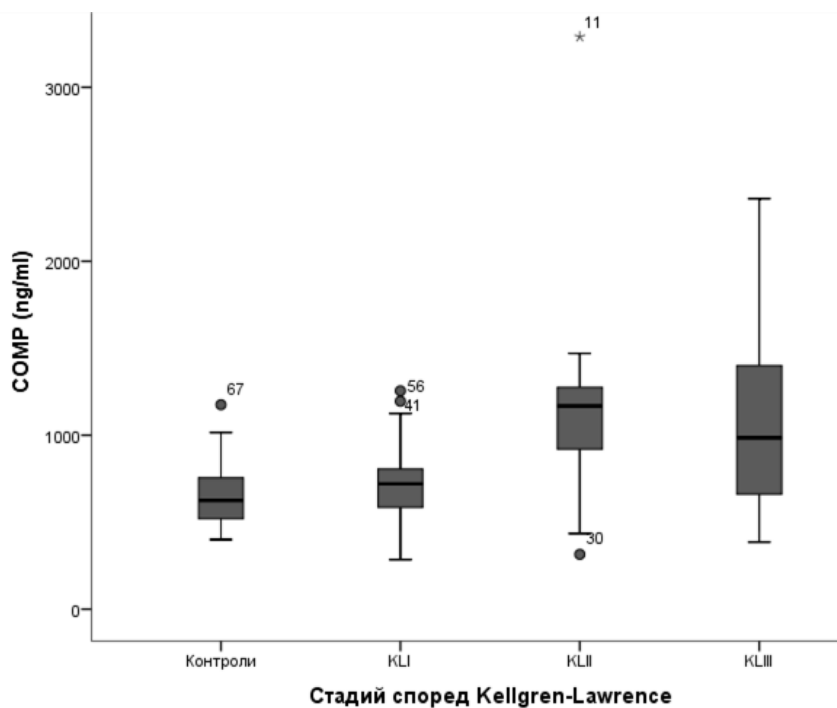
4.1.6. Корелации между отделните биомаркери

Получените експериментални резултати разкриха сигнификантна връзка между нивата на COMP и MMP-3 в серума ($r_s = 0,337$; $p = 0,003$). Други значими корелации между изследваните биомаркери не бяха наблюдавани.

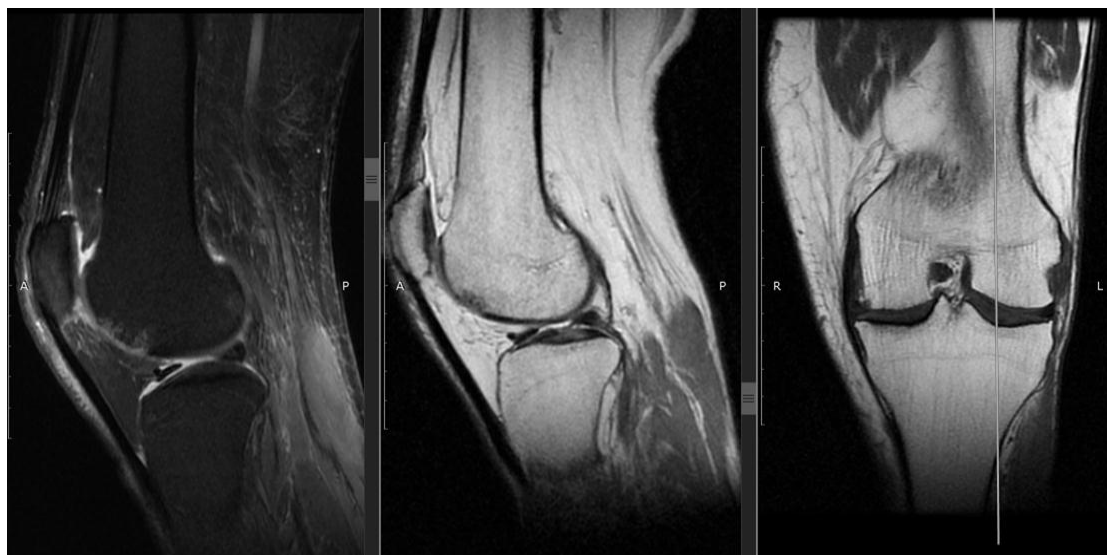
4.1.7. Изследване на връзката между биомаркерите и структурните промени, оценени чрез рентгенография и МРТ

Рентгенографски стадии и серумни нива на биомаркери. Пациентите с рентгенографски данни за по-напреднало заболяване (KLII/KLIII) имаха значимо по-високи серумни нива на COMP от тези с по-ранна гонартроза (KL stage I) (1095 (315; 3290) и 720 (285; 1255) ng/ml; $U = 147$; $p = 0,001$). Здравите контроли и KLI пациентите (Фиг. 4.8) имаха сравними стойности на COMP (605 (400; 1175) и 720 (285; 1255) ng/ml; $U = 224$; $p = 0,394$), Coll2-1 (19545 (9597; 22290) и 18930 (10230; 22600) pg/ml; $U = 139$; $p = 0,345$) и MMP-3 (24,35 (13,0; 63,5) и 37,50 (14,2; 85,4) ng/ml; $U = 187$; $p = 0,099$). Не се установи сигнификантна разлика в изследваните нива на Coll2-1, COMP, MMP-3 и CRP между пациенти с KLII и KLIII рентгенографски стадий (Фигура 4.8).

Магнитно-резонансна оценка (WORMS) и серумни нива на биомаркери. Серумните нива на COMP корелираха положително с полуколичествената магнитно-резонансна оценка според WORMS ($r_s = 0,454$; $p < 0,001$) (Фигура 4.9), която представлява сбор от оценките на всички структурни промени, характерни за ГоА, засягащи хиалинен хрущял, костен мозък, субхондрална кост, костно триене, остеофитоза, менискуси и синовия във всички изследвани региони и подрегиони на колянната става (Фигура 4.10).

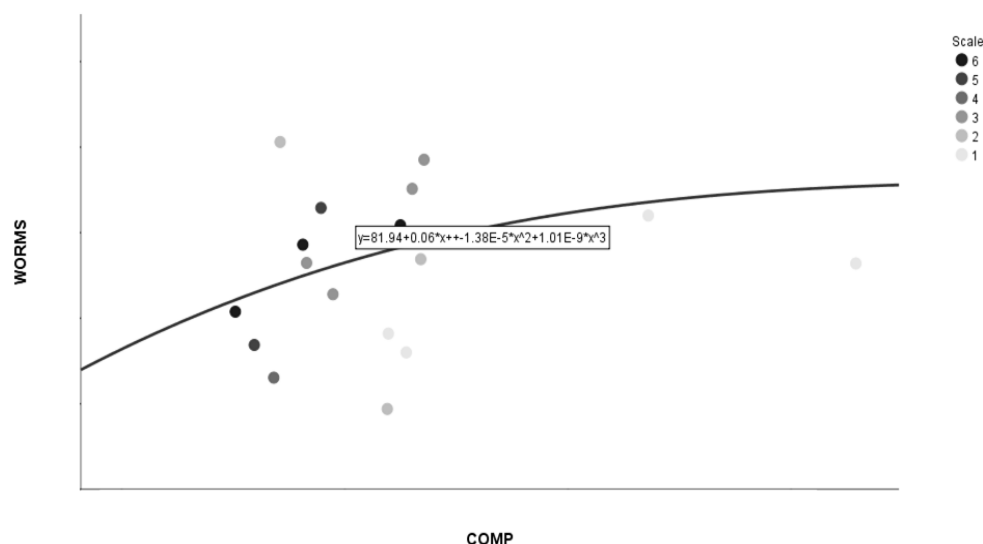


Фиг. 4.8. Нива на COMP при здрави контроли и в различните групи пациенти според рентгенографския стадий на гонартроза

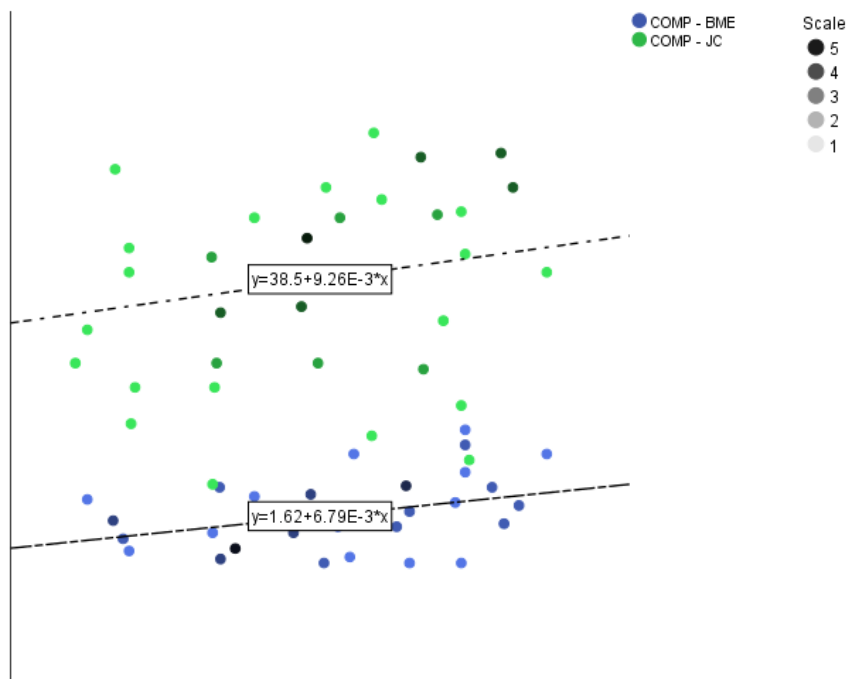


Фиг. 4.9. МРТ изображения на пациент с гонартроза. Образът не е репрезентивен за цялата извадка на проучването, но представя акуратно използваните секвенции и дава възможност за оценка по WORMS.

При по-подробна разбивка на отделните компоненти на WORMS, се установи, че серумните нива на COMP корелираха с най-голям афинитет с оценката на костно-мозъчните лезии (BML) ($p < 0.001$, $r_s = 0,479$) и структурните промени на хиалинния хрущял (JC) ($p < 0,001$, $r_s = 0,464$). Освен това серумният COMP показва положителна връзка с магнитно-резонансната оценка на остеофитозата ($p = 0,019$, $r_s = 0,312$) и на синовиата ($p = 0,004$, $r_s = 0,383$). Многофакторен регресионен анализ бе проведен, за да предскаже нивата на COMP в зависимост от морфологичните промени на отделните ставни структури. В тази връзка бе установено сигнификантно регресионно уравнение ($F(2,54) = 14,14$; $p < 0,001$), с $R^2 = 0,314$. Предиктивните стойности на COMP се определят по следната формула $279 + 75,5x(\text{BML}) + 21,4x(\text{JC})$, където COMP е измерен в ng/ml, а BML и JC са съответно оценката на костно-мозъчните лезии и ставния хрущял по WORMS. Серумните нива на COMP се увеличават със 75,5 и 21,4 за всяка измерена единица костно-мозъчен едем и промяна в ставния хрущял, респективно, които са независим предиктор за серумния COMP (Фигура 4.11).



Фиг. 4.10. Зависимост на стойностите на COMP (X) от WORMS (Y) при пациентите с ГоА



Фиг. 4.11. Зависимост на стойностите на COMP (X) от костно-мозъчния едем (BME, Y) и промените в хрущяла (JC, Y), оценени с МРТ, при пациенти с ГоА

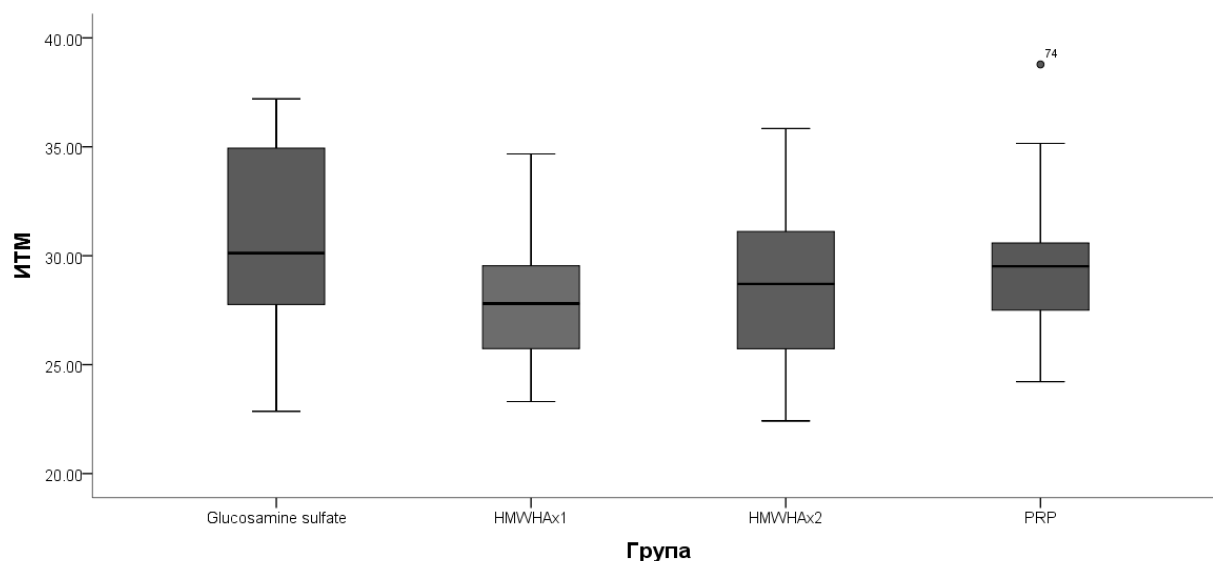
4.2. Лонгитудинално проспективно проучване

4.2.1. Основни характеристики на пациентите при началната визита

99 пациенти ($62,21 \pm 8.56$; обхват 40-80 години) бяха разпределени в четири терапевтични групи и проследени за период от една година. Липсваше сигнификантно значима разлика във възрастта в четирите изследвани групи пациенти ($F(3, 95) = 1,047, p = 0,38$).

Нивата на ИТМ на базисната визита обаче се различаваха сигнификантно в две от групите, а именно: между първата група ($n = 23$; приемачи перорален глюкозамин сулфат пациенти) и втората група ($n = 25$; с еднократно приложение на високомолекулна хиалуронова киселина за една година) ($U = 168,5, p = 0,014$). Останалите две терапевтични групи не показаха значими различия по отношение на ИТМ помежду си и с пациентите от

гореизброените две групи (Фигура 4.12). Четирите групи показаха сходно полово разпределение ($\chi^2(3) = 6,16, p = 0,104$).



**Фиг. 4.12. Разпределение на пациентите според индекса на телесна маса (ИТМ):
сигнификантна разлика между първата и втората група**

По анамнестични данни, болката в коленните стави е датирана от 1/2 до 17 години ($Mdn = 3$) при болните, като не се отчете сигнификантна разлика между групите. Средни стойности или медиани на основните демографски, клинични, серологични и образни параметри по време на първата визита на четирите групи пациенти са представени в Таблица 4.8. Изходните нива на изследваните серумни биомаркери (CRP, COMP, MMP-3, Coll2-1) не се различаваха сигнификантно между отделните терапевтични групи.

Табл. 4.8. Демографски, клинични и образни параметри на изследваните пациенти с гонартроза

Показатели от началната визита	Общ брой пациенти с гонартроза (n = 99)	Терапевтични групи пациенти с гонартроза				p
		Лекувани с перорален глюкозамин сулфат (n = 23)	Лекувани еднократно с интраартикуларна хиалуронова киселина (n = 25)	Лекувани двукратно през 6 месеца с интраартикуларна хиалуронова киселина (n = 25)	Лекувани с два курса PRP през 6 месеца (n = 26)	
Демографски параметри						
Възраст (години)*	62,21 ± 8,56	63,96 ± 7,77	63,56 ± 10,37	61,16 ± 8,37	60,38 ± 7,40	NS
Пол (% жени)	83%	91%	92%	80%	69.2%	NS
Индекс на телесна маса (кг/м ²)**	29,43 (22,42; 38,78)	30,12 (22,86; 37,20)	28,36 (23,31; 35,84)	28,80 (22,42; 35,84)	29,52 (24,22; 38,78)	0.014
Клинични параметри						
Изолирана ГоА (%)	44% (44/99)	52% (12/23)	40% (10/25)	44% (11/25)	42% (11/26)	NS
Продължителност на болката (години)**	4 (0,5; 17)	5 (0,5; 17)	3,5 (0,5; 13)	3 (0,5; 15)	5 (0,5; 15)	NS
Продължителност на сутрешна скованост (минути)**	12,5 (5; 60)	12,5 (5; 60)	15 (5; 45)	12,5 (5; 60)	12,5 (5; 45)	NS

Визуална аналогова скала за болка (mm) *	57,89 ± 17,94	61,26 ± 19,03	57,56 ± 19,87	58,06 ± 17,12	55,54 ± 16,29	NS
HAQ-DI**	1 (0; 2,25)	1.13 (0,13; 2)	1 (0; 2,25)	1 (0,13; 2)	0,88 (0.38; 1,5)	NS
Болестна активност (обща оценка WOMAC) **	38 (7; 92)	47 (21; 92)	45 (7; 92)	37 (10; 70)	40,5 (23; 66)	NS
Болка (WOMAC) **	9,84 (1; 22)	10,2 (4; 21)	11,6 (1; 22)	8,42 (4; 16)	9,04 (6; 16)	NS
Скованост (WOMAC)**	3.83 (0; 8)	4 (2; 7)	4 (0; 8)	3.34 (1; 7)	3.62 (2; 6)	NS
Физическа функция (WOMAC) **	28 (4; 64)	32 (15; 64)	30 (4; 62)	26 (4; 50)	27.50 (14; 44)	NS
Тежест на заболяването (индекс на Lequesne)**	11 (4; 23)	12 (4; 22)	12 (4,5; 23)	11 (5,5; 20)	10,5 (5,5; 20,5)	NS

Образни характеристики

Рентгенографска оценка на ГоА (KL)						
KL I (%)	31/99 (31%)	9/31 (29%)	6/31 (19,4%)	10/31 (32,2%)	6/31 (19,4%)	NS
KL II (%)	46/99 (47%)	12/46 (26.1%)	11/46 (23,9%)	10/46 (21,7%)	13/46 (28,3%)	

KL III (%)	22/99 (22%)	2/22 (9,1%)	8/22 (36,4%)	5/22 (22,7%)	7/22 (31,8%)	
Серологични показатели						
C-реактивен протеин*	3,99 ± 3,06	5,3 ± 3,35	3,91 ± 3	4,17 ± 4.06	3,32 ± 2,1	NS
Брой пациенти с изработени Coll2-1, MMP-3, COMP (n)	50	13	23	8	6	< 0,001
Coll2-1** (pg/ml)	18915 (10230; 22680)	18200 (10250; 22600)	21270 (10230; 22580)	20240 (15200; 22680)	18005 (14060; 22150)	NS
MMP-3** (ng/ml)	36,85 (12,6; 128,20)	27,5 (18,2; 85,40)	39,4 (12,5; 96)	27,85 (13; 128,2)	48,75 (19,2; 60)	NS
COMP** (ng/ml)	980 (285; 3290)	945 (285; 1430)	1125 (315; 3290)	780 (585; 1240)	1245 (420; 2115)	NS

KL - Kellgren-Lawrence; HAQ-DI - Health Assessment Questionnaire Disability Index; WOMAC - Western Ontario and McMaster Universities index; WORMS - Whole Organ Magnetic Resonance Imaging Score; NS - несигнификантно; MMP-3 – матриксна металопротеиназа 3; COMP – хрущялен олигомерен матриксен протеин; NS – незначим.

* Нормално разпределените данни са представени като средна стойност ± стандартна девиация

** Ненормално разпределените данни са представени като медиана (минимум; максимум)

4.2.2. Оценка и сравнение на клиничните показатели между отделните терапевтични групи

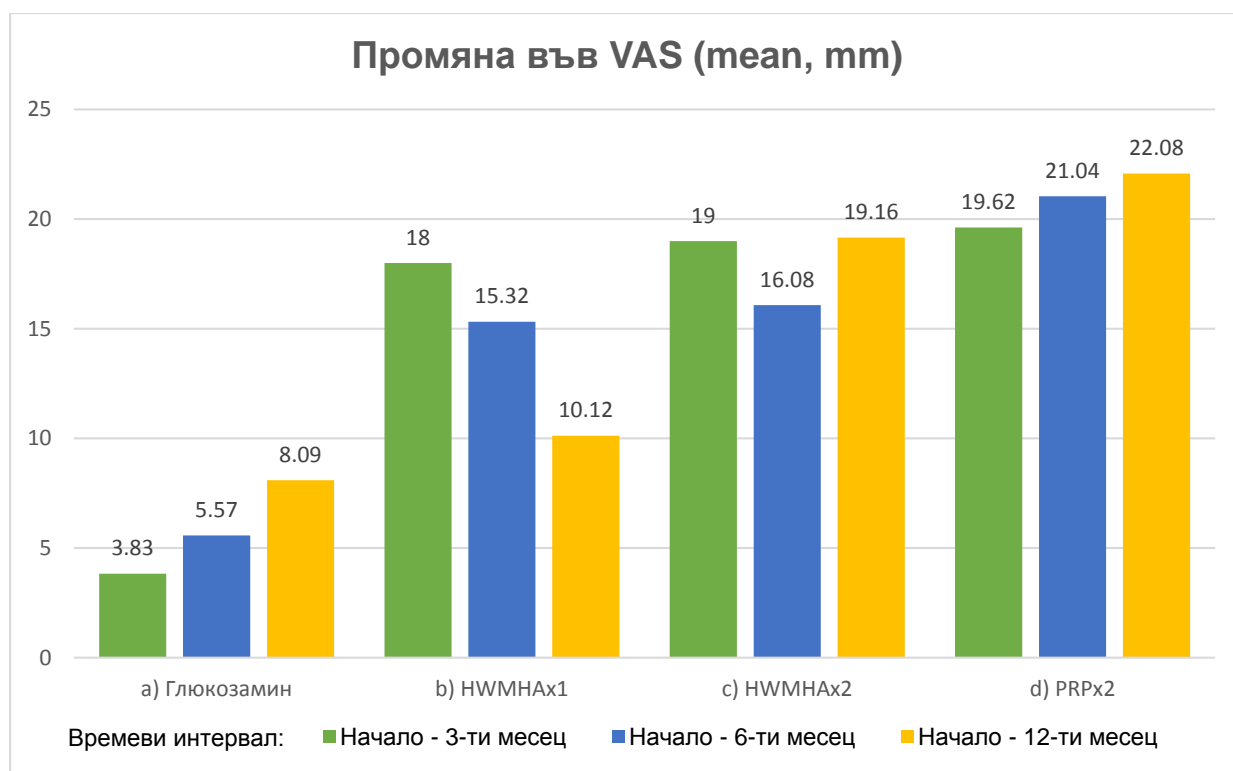
Оценка на болката в отделните групи. В групата на пациентите, лекувани с перорален глюкозамин сулфат (I група), липсва сигнификантно значима разлика в нивата на болката според VAS между началото и на третия месец лечение ($3,83 \pm 9,05$ mm; $t[22] = 1,5$, $p = 0,148$, CI [-1,09; 6,74]). Възприятието за болка при пациентите съществено се различаваше обаче след шестия месец, като се отчете сигнификантна разлика между началото и на шестия месец ($5,57 \pm 7,29$ mm; $t(22) = 3$, $p = 0,007$, CI [1,4; 7,7]) и между началото и дванадесетия месец ($8,09 \pm 10,46$ mm; $t(22) = 3,25$, $p = 0,004$, CI [2,57; 11,61]) (Фигура 4.13.a). Подобриенето в края на година бе 13,2% в сравнение с началните нива на болка. WOMAC оценката за болка не бе повлияна сигнификантно на дванадесетия месец (12 [3; 18]) на лечение с глюкозамин сулфат ($Z = -1,31$, $p = 0,190$), в сравнение с началото (10,02 [4; 21]).

В групата на пациентите, лекувани с еднократно приложение на хиалуронова киселина за период от 1 година (II група), се установи сигнификантна разлика между възприятието за болка според VAS и WOMAC между началната визита и всички останали визити поотделно, като на третия месец разликата беше най-голяма и постепенно намаляваше. Наблюдавана бе промяна от $18 \pm 14,31$ mm, $15,32 \pm 12,43$ mm и $10,12 \pm 14,5$ mm съответно на 3, 6 и 12 месец ($t[24] = 6,32$; $p < 0,001$, $t[24] = 6,17$, $p < 0,001$, $t[24] = 3,49$, $p < 0,001$, респективно) (Фигура 4.13.b). Подобриенето в края на година бе 17,7% в сравнение с началните нива на болка. WOMAC скалата за болка отчете също сигнификантна разлика в началото и на дванадесетия месец на лечение във II група ($Z = -2,5$, $p = 0,013$).

В групата на пациентите, лекувани с двукратно приложение на хиалуронова киселина през 6 месеца за период от 1 година (III група), както и в групата на пациентите, лекувани с 2 курса на PRP през 6 месеца за период от 1 година (IV група), се установи сигнификантна разлика във възприятието

за болка, оценено чрез VAS, между началната визита и всички останали визити поотделно. Средните стойности на разликата в отчетената болка за първото тримесечие, шестмесечие и година в III група бяха съответно $19 \pm 15,02$ mm ($t[24] = 6,62$, $p < 0,001$), $16,08 \pm 10,83$ mm ($t[24] = 7,42$, $p < 0,001$) и $19,16 \pm 13,32$ mm ($t[24] = 7,19$, $p < 0,001$) (Фигура 4.13.с). Подобриенето в края на година бе 33% в сравнение с началните нива на болка.

За IV група пациенти средната разлика между началото и третия месец беше $19,62 \pm 14,71$ ($t[25] = 6,8$, $p < 0,001$), между началото и шестия месец – $21,04 \pm 14,93$ ($t[25] = 7,2$, $p < 0,001$) и между началото и първата година – $22,08 \pm 15$ ($t[25] = 7,5$, $p < 0,001$) (Фигура 4.13.d). Подобриенето в края на година бе 41% в сравнение с началните нива на болка. WOMAC скалата за болка също отчете сигнификантна разлика в началото и на дванадесетия месец на лечение във III и IV групи ($Z = -3,94$, $p < 0,001$ и $Z = -4,28$, $p < 0,001$, респективно).



Фиг. 4.13. Промяна (Δ) в перцепцията за болка, оценена чрез визуална аналогова скала, в терапевтичните групи за отделните времеви интервали

При проведен дисперсионен анализ ANOVA на промените в нивата на болка между началната визита и дванадесетия месец в отделните терапевтични групи се установи статистически значима разлика ($F(3, 95) = 6,88, p < 0,001$). Последващият post-hoc анализ на Tukey е представен в Таблица 4.9, като сигнификантните резултати са означени с *. Групата на пациентите, лекувани с PRP показаха значително повлияване на болката според VAS в сравнение с групите на пациентите, лекувани с глюкозамин сулфат и еднократно инжектиране на хиалуронова киселина ($p = 0,001$ и $p = 0,011$, респективно). Групата на пациентите, лекувани с двукратно инжектирана високомолекулна хиалуронова киселина през 6 месеца, имаше сигнификантно по-добро повлияване на болката на дванадесетия месец в сравнение с пациентите, приемали глюкозамин сулфат ($p = 0,014$).

Табл. 4.9. Post-hoc анализът на Tukey представя промяната (между началото и дванадесетия месец) в болковото възприятие между отделните групи

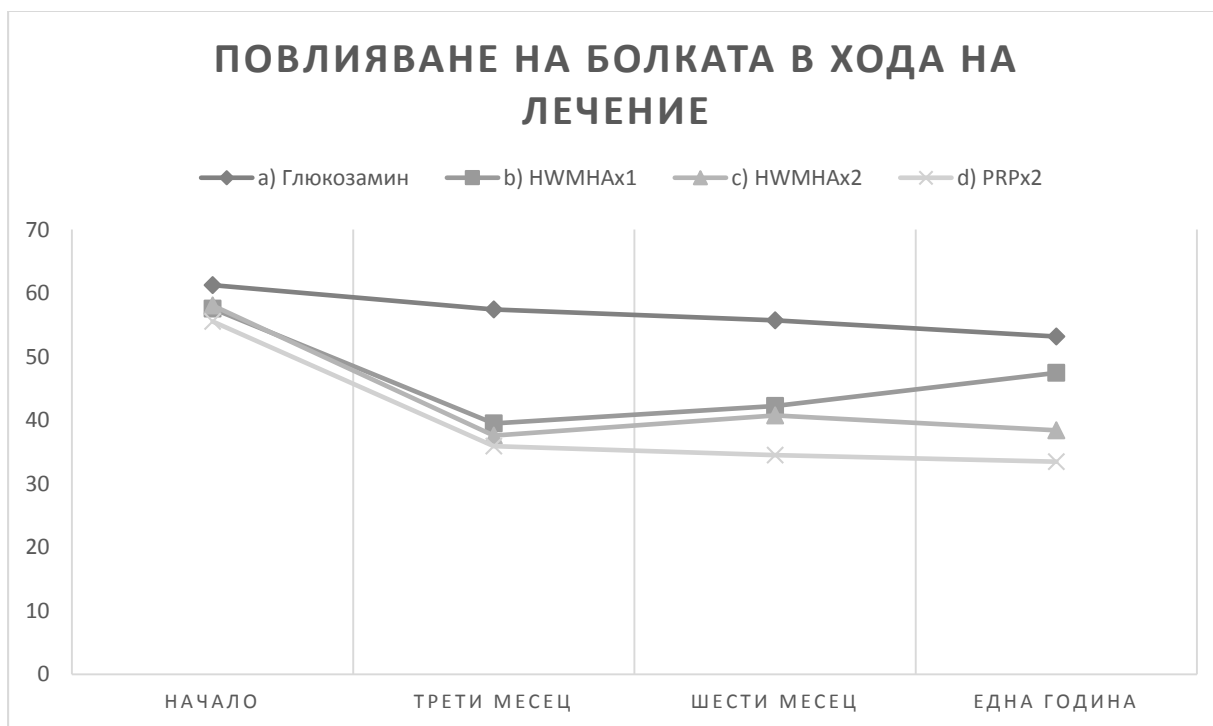
Tukey HSD						
(I) Група	(J) Група	Средна разлика (mm, I-J)	Станд. грешка	P	95% доверителен интервал	
					Горна граница	Долна граница
Glucosamine sulfate	HMWHAx1	-2,0330	3,9036	NS	-13,241	7,175
	HMWHAx2	-11,073*	3,9036	,014	-22,281	-1,865
	PRP	-13,99*	3,8675	,001	-25,104	-4,876
HMWHAx1	Glucosamine sulfate	3,0330	3,9036	NS	-7,175	13,241
	HMWHAx2	-9,0400	3,8215	NS	-19,033	,953
	PRP	-11,9569*	3,7845	,011	-21,854	-2,060
HMWHAx2	Glucosamine sulfate	11,0730*	3,9036	,014	1,865	22,281
	HMWHAx1	9,0400	3,8215	NS	-,953	19,033

	PRP	-2,9169	3,7845	NS	-12,814	6,980
PRP	Glucosamine sulfate	13,9900*	3,8675	,001	4,876	25,104
	HMWHAx1	11,9569*	3,7845	,011	2,060	21,854
	HMWHAx2	2,9169	3,7845	NS	-6,980	12,814

* Средната разлика е сигнификантна при $p < 0.05$.

HMWHAx1 – лекувани с еднократна апликация на хиалуронова киселина; HMWHAx2 – лекувани с двукратно инжектиране на хиалуронова киселина през 6 месеца; PRP – провели 2 последователни курса на лечение през 6 месеца с богата на тромбоцити плазма; NS – несигнификантно.

На *Фигура 4.14* са представени средните нива на болката за четирите терапевтични групи в отделните периоди на изследване.



Фиг. 4.14. Средни нива на болката според VAS в хода на лечение с а) глюкозамин сулфат, б) еднократна апликация на високомолекулна ХК, в) двукратна апликация на високомолекулна ХК, д) двукратен курс с PRP

Оценка на болестната активност, физическата функция и сковаността (WOMAC) в отделните групи. В I група е налице сигнафикантна разлика между болестната активност според общата оценка на WOMAC между началото (47 [21; 92]) и на третия месец (45 [23; 89]), между

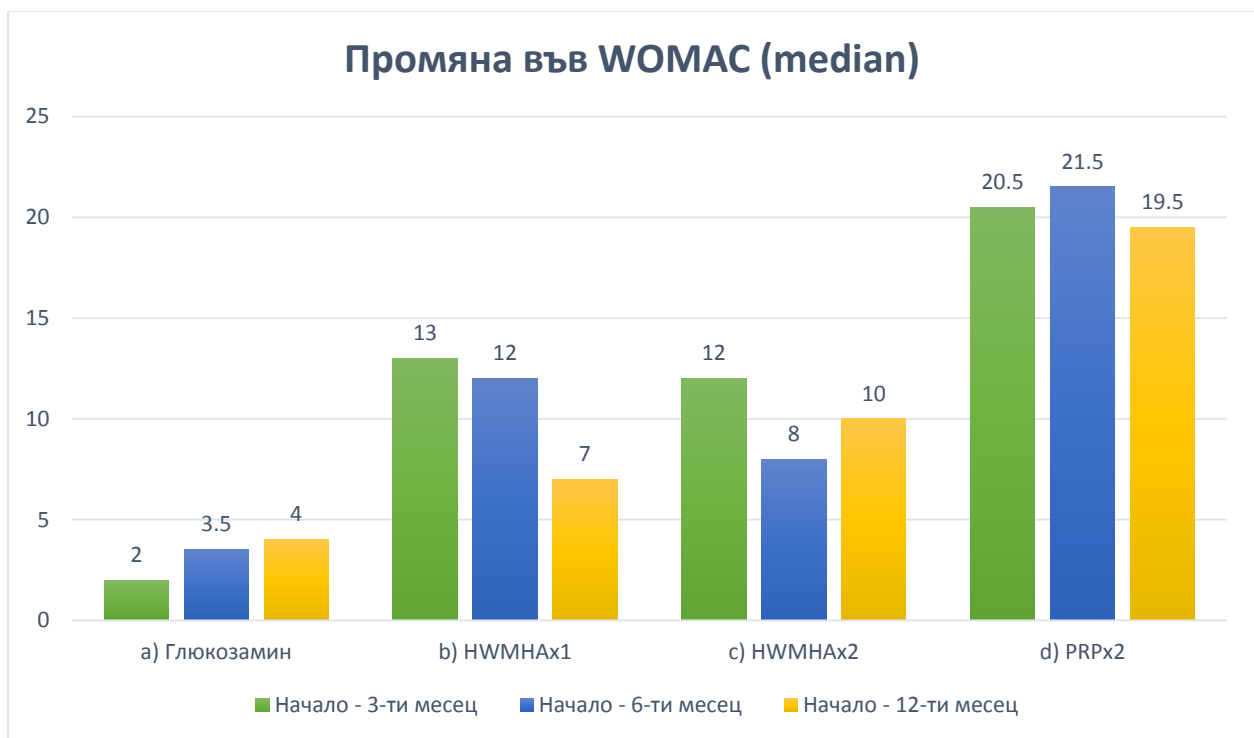
началото и на шестия месец (44,5 [21; 89]) на лечение и между началото и на дванадесетия месец (43 [17; 82]) на лечение, съответно: $Z = -2,26$, $p = 0,024$; $Z = -2,143$, $p = 0,032$; $Z = -2,1$, $p = 0,036$ (Фигура 4.15.a). Болестната активност се подобри 8,5% в края на първата година в сравнение с началните ѝ нива. Физическата функция според WOMAC индекса също търпи подобрене на дванадесетия месец от проследяването ($Z = -2.7$, $p = 0,006$), докато разликата в сковаността е статистически незначима ($Z = -1.81$, $p = 0,070$).

Във II група е налице статистически значима разлика между болестната активност според общата оценка на WOMAC между началото (45 [7; 92]) и третия месец (32 [3; 88]), между началото и шестия месец (33 [3; 62]) и между началото и дванадесетия месец (38 [9; 68]) на лечение, съответно: $Z = -3,8$, $p < 0,001$; $Z = -3,34$, $p = 0,001$; $Z = -2,44$, $p = 0,015$ (Фигура 4.15.b), което се равнява на 15,6% подобрене в края на първата година в сравнение с началните нива на болестната активност. Физическата функция според WOMAC индекса също търпи подобрене на дванадесетия месец от проследяването ($Z = -2.6$, $p = 0.009$), докато разликата в сковаността е статистически незначима ($Z = -0.44$, $p = 0.657$).

В III група е налице сигнафикантна разлика между болестната активност според общата оценка на WOMAC между началото (37 [10; 70]) и третия месец (25 [6; 50]), между началото и шестия месец (29 [5; 50]) и между началото и дванадесетия месец (27 [6; 51]) на лечение, съответно: $Z = -3,92$, $p < 0,001$; $Z = -3,88$, $p < 0,001$; $Z = -4,21$, $p < 0.001$ (Фигура 4.15.c). Тази промяна се равнява на 27% подобрене в края на първата година в сравнение с началните нива на болестната активност. Физическата функция и сковаността според WOMAC индекса също търпят подобрене на дванадесетия месец от проследяването ($Z = -4,3$, $p < 0,001$ и $Z = -3,03$, $p = 0,002$).

В IV група е налице значима разлика между болестната активност според общата оценка на WOMAC между началото (40,5 [23; 66]) и третия месец (20 [10; 40]), между началото и шестия месец (19 [7; 60]) и между

началото и дванадесетия месец (21 [6; 65]) на лечение, съответно: $Z = -4,46$, $p < 0,001$; $Z = -4,46$, $p < 0,001$; $Z = -4,23$, $p < 0,001$ (Фигура 4.15.d). Тази промяна се равнява на малко над 50% подобрене в края на първата година в сравнение с началните нива на болестната активност в групата. Физическата функция и сковаността според WOMAC индекса също търпят подобрене на дванадесетия месец от проследяването ($Z = -4,46$, $p < 0,001$ и $Z = -4,28$, $p < 0,001$).



Фиг. 4.15. Промяна (Δ) в болестната активност според WOMAC индекса в терапевтичните групи в отделните времеви интервали

При проведен Н тест на Kruskal-Wallis, сравняващ промените в нивата на болестната активност между началната визита и дванадесетия месец в отделните терапевтични групи, се установи статистически значима разлика ($H(3) = 25,6$, $p < 0,001$). Post-hoc анализ с установените междугрупови разлики е представен на Таблица 4.10. От него можем да съдим, че групата, лекувана с PRP, има по-голямо подобрене в края на първата година в сравнение с пациентите, лекувани с глюкозамин сулфат и еднократно приложение на кръстосаносвързана високомолекулна хиалуронова киселина.

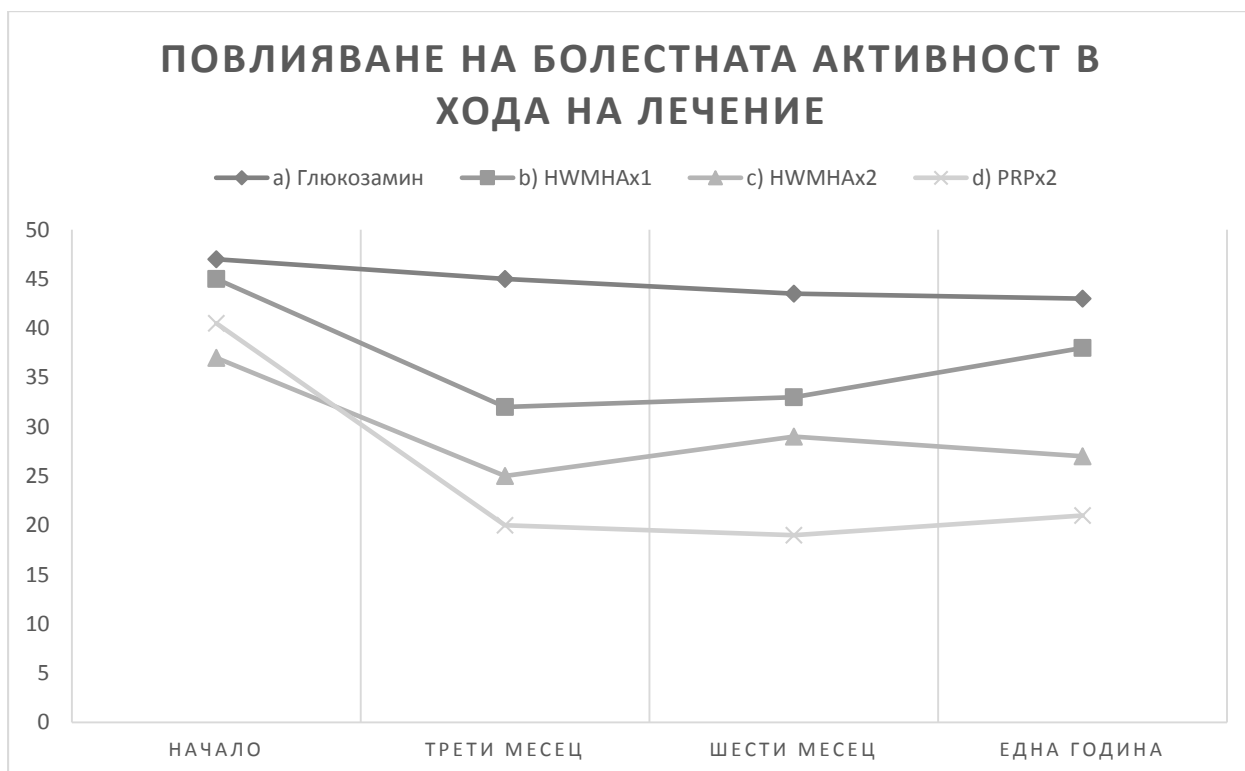
Табл. 4.10. Сдвоено сравнение на групите представя разликата в промяната (между началото и дванадесетия месец) на болестната активност в четирите терапевтични групи

Сдвоено сравнение на групите					
(I) Група	(J) Група	Статистически тест	Станд. грешка	P	Кор. P
I група Glucosamine sulfate	HMWHAx1	-8,1	8,3	,329	NS
	HMWHAx2	-19,6	8,3	,018	NS
	PRPx2	-38,8*	8,2	<,001	<,001
II група HMWHAx1	Glucosamine sulfate	8,1	8,3	,329	NS
	HMWHAx2	-11,5	8,1	,156	NS
	PRPx2	-30,7*	8,2	<,001	,001
III група HMWHAx2	Glucosamine sulfate	19,6	8,3	,018	NS
	HMWHAx1	11,5	8,1	,156	NS
	PRPx2	-19,1	8,0	,017	NS
IV група PRPx2	Glucosamine sulfate	38,8*	8,2	<,001	<,001
	HMWHAx1	30,7*	8,0	<,001	,001
	HMWHAx2	19,1	8,0	,017	NS

* Средната разлика е сигнификантна при $p < 0,05$ след корекция по Bonferroni

HMWHAx1 – лекувани с еднократна апликация на хиалуронова киселина; HMWHAx2 – лекувани с двукратно инжектиране на хиалуронова киселина през 6 месеца; PRP – провели 2 последователни курса на лечение през 6 месеца с богата на тромбоцити плазма; NS – несигнификантно.

На *Фигура 4.16* са представени медианните стойности на WOMAC за четирите терапевтични групи в отделните периоди на изследване. Графично представено, макар и несигнификантно спрямо третата група, най-голямо подобрение в болестната активност се наблюдаваше при пациентите, лекувани с PRP.



Фиг. 4.16. Нива на WOMAC (медиани) в хода на лечение с а) глюкозамин сулфат, б) еднократна апликация на високомолекулна ХК, с) двукратна апликация на високомолекулна ХК, d) двукратен курс с PRP

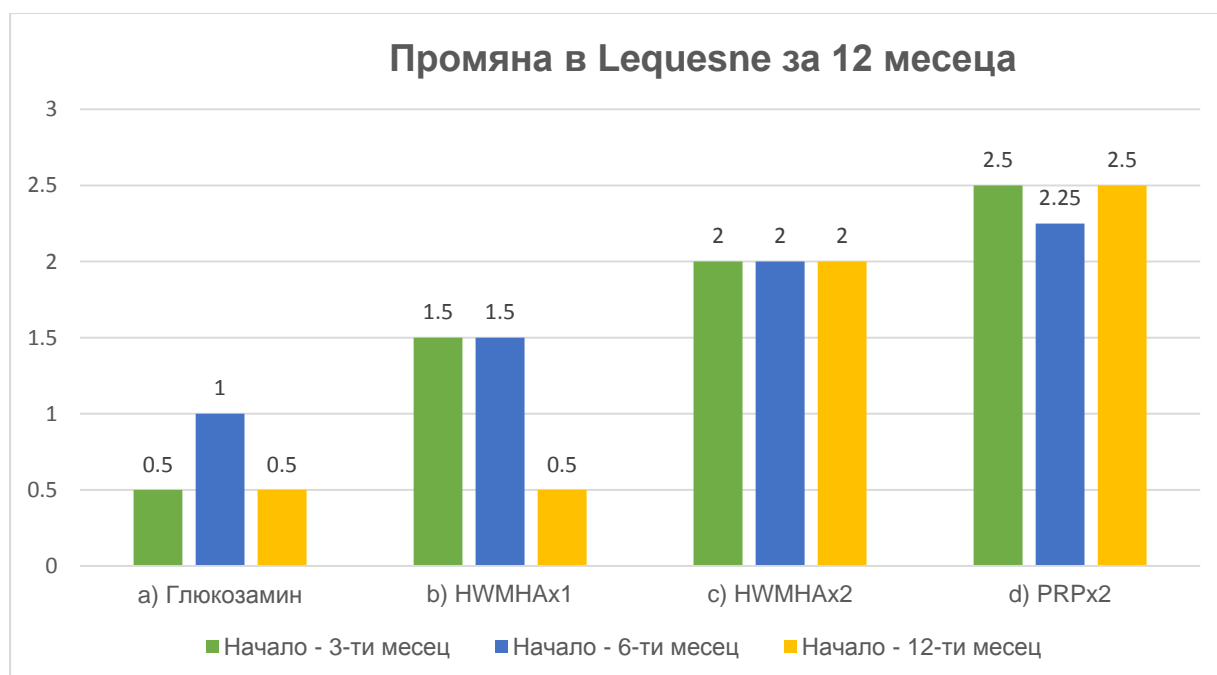
Оценка на болестната тежест (Lequesne) в отделните групи. В I група липсваше значима разлика в алгофункционалния индекс на Lequesne между началото (12 [4; 22]) и третия месец (11,5 [4,5; 21]), между началото и шестия месец (11 [4; 22]) и между началото и дванадесетия месец (11,5 [2,5; 23]) на лечение, съответно: $Z = -0,09$, $p = 0,93$; $Z = -0,75$, $p = 0,46$; $Z = -0,30$, $p = 0,77$ (Фигура 4.17.a).

Във II група е налице значима разлика в алгофункционалния индекс на Lequesne между началото (12 [4,5; 23]) и третия месец (10,5 [3,5; 18]), между началото и шестия месец (10,5 [3,5; 21]) на лечение, докато такава липсваше между началото и дванадесетия месец (11,5 [4,5; 23]) на лечение, съответно: $Z = -3,62$, $p < 0,001$; $Z = -3,04$, $p = 0,002$; $Z = -1,08$, $p = 0,28$ (Фигура 4.17.b).

В III група е налице значима разлика в алгофункционалния индекс на Lequesne между началото (11 [5,5; 20]) и третия месец (9 [4; 18]), между началото и шестия месец (9 [4; 18,5]) и между началото и дванадесетия месец

(9 [4; 15]) на лечение, съответно: $Z = -3,54$, $p < 0,001$; $Z = -2,86$, $p = 0,004$; $Z = -3,38$, $p = 0,001$. (Фигура 4.17.с).

В IV група е налице сигнафикантна разлика в алгофункционалния индекс на Lequesne между началото (10,5 [6; 21]) и на третия месец (8 [5; 17]), между началото и шестия месец (8,25 [4,5; 17]) на лечение и между началото и дванадесетия месец (8 [2,5; 16,5]) на лечение, съответно: $Z = -4,02$, $p < 0,001$; $Z = -4,15$, $p < 0,001$; $Z = -4,21$, $p < 0,001$. (Фигура 4.17.d).



Фиг. 4.17. Промяна (Δ) в болестната тежест според Lequesne индекса в терапевтичните групи през отделните времеви интервали

При проведен Н тест на Kruskal-Wallis, сравняващ промените в нивата на болестната активност между началната визита и дванадесетия месец в отделните терапевтични групи, се установи статистически значима разлика ($H(3) = 13,5$, $p = 0,004$). Последващото сдвоено сравнение очертава групите, между които тази разлика е налице (Таблица 4.11).

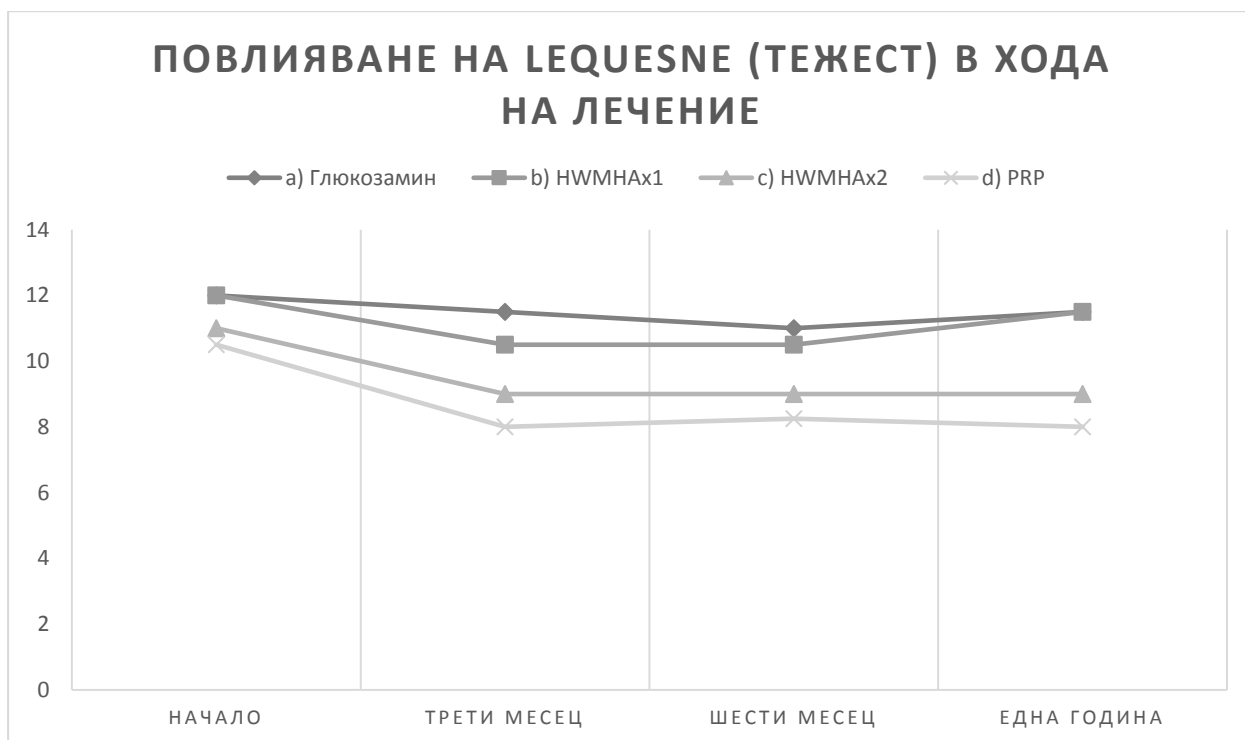
Табл. 4.11. Сдвоено сравнение на групите представя разликата в промяната (между началото и дванадесети месец) на болестната тежест (Δ Lequesne) между отделните групи

Сдвоено сравнение на групите					
(I) Група	(J) Група	Статистически тест	Станд. грешка	P	Кор. P
I група Glucosamine sulfate	HMWHAx1	-5,8	8,3	,483	NS
	HMWHAx2	-18,7	8,3	,024	NS
	PRPx2	-26,9*	8,2	,001	,006
II група HMWHAx1	Glucosamine sulfate	5,8	8,3	,483	NS
	HMWHAx2	-12,9	8,1	,111	NS
	PRPx2	-21,1	8,1	,008	,051
III група HMWHAx2	Glucosamine sulfate	19,6	8,3	,024	NS
	HMWHAx1	11,5	8,1	,111	NS
	PRPx2	-8,2	8,0	,307	NS
IV група PRPx2	Glucosamine sulfate	38,8*	8,2	,001	,006
	HMWHAx1	30,7	8,0	,008	NS
	HMWHAx2	19,1	8,0	,307	NS

* Средната разлика е сигнификантна при $p < 0,05$ след корекция по Bonferroni

HMWHAx1 – лекувани с еднократна апликация на хиалуронова киселина; HMWHAx2 – лекувани с двукратно инжектиране на хиалуронова киселина през 6 месеца; PRP – провели 2 последователни курса на лечение през 6 месеца с богата на тромбоцити плазма; NS – несигнификантен.

На *Фигура 4.18* са представени медианните стойности на алгофункционалния индекс на Lequesne за четирите терапевтични групи в отделните периоди на изследване.



Фиг. 4.18. Нива на Lequesne (медиани) в хода на лечение с а) глюкозамин сулфат, б) еднократна апликация на високомолекулна ХК, в) двукратна апликация на високомолекулна ХК, г) двукратен курс с PRP

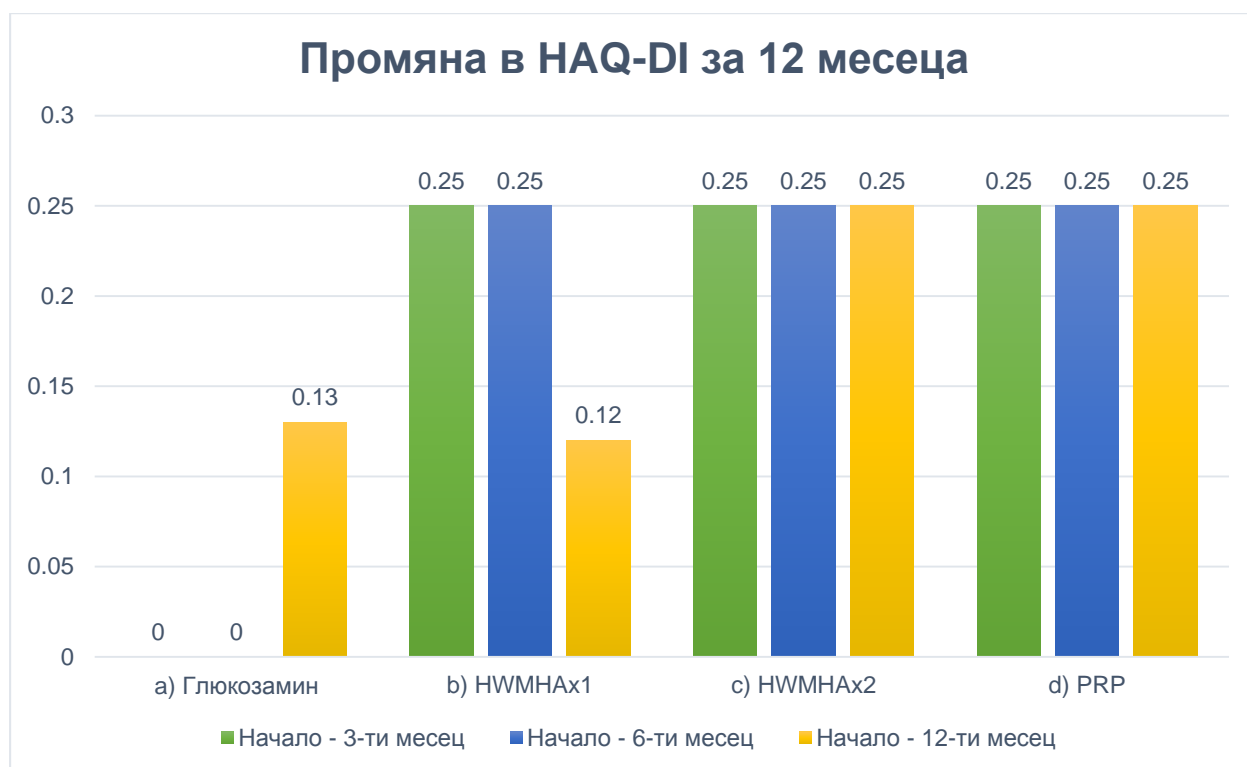
Оценка на качеството на живот (HAQ-DI) в отделните групи. В I група липсваше значима разлика в алгофункционалния индекс на Lequesne между началото (1,13 [0,13; 2]) и третия месец (1,13 [0,13; 2]), между началото и шестия месец (1,13 [0; 2,13]) на лечение и между началото и дванадесетия месец (1 [0; 2,13]) на лечение, съответно: $Z = 0$, $p = 1$; $Z = -0,25$, $p = 0,81$; $Z = -1,38$, $p = 0,17$. (Фигура 4.19.а).

Във II група е налице значима разлика в качеството на живот, оценено чрез HAQ-DI, между началото (1 [0; 2,25]) и третия месец (0,75 [0,1; 2]), между началото и шестия месец (0,75 [0,1; 2,25]), докато такава липсваше между началото и дванадесетия месец (0,88 [0; 2,5]) на лечение, съответно: $Z = -3,99$, $p < 0,001$; $Z = -3,65$, $p < 0,001$; $Z = -0,902$, $p = 0,367$ (Фигура 4.19.б).

В III група е налице значима разлика в качеството на живот, оценено чрез HAQ-DI, между началото (1 [0,13; 2]) и третия месец (0,75 [0,13; 1,5]), между началото и шестия месец (0,75 [0; 1,5]) и между началото и

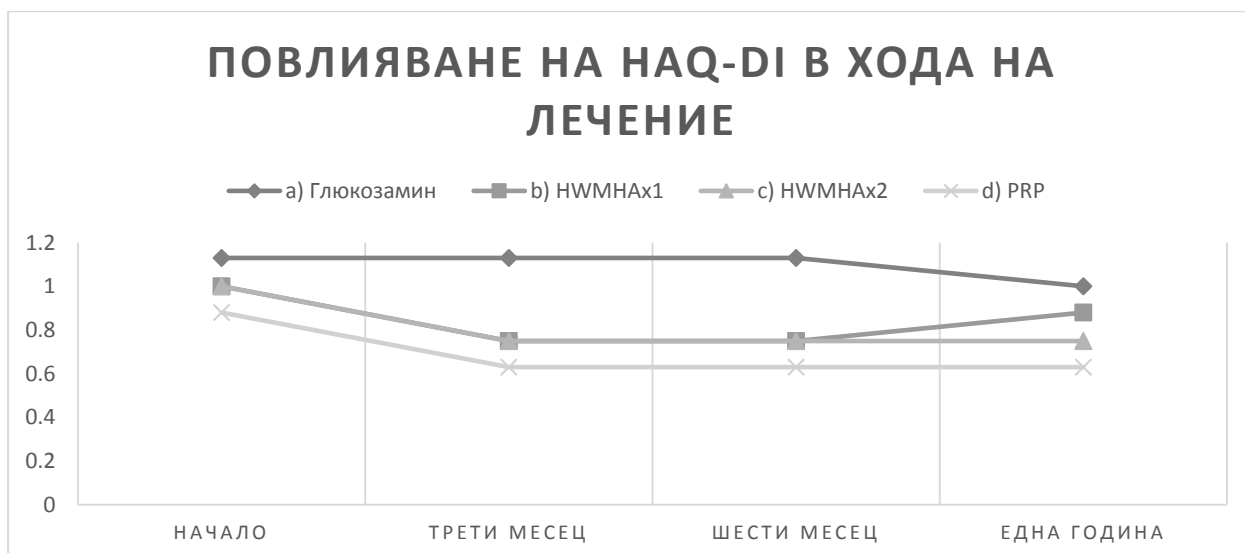
дванадесетия месец (0,75 [0; 1,5]) на лечение, съответно: $Z = -3,2$, $p = 0,002$; $Z = -3,35$, $p = 0,001$; $Z = -3,35$, $p = 0,001$ (Фигура 4.19.с).

В IV група е налице сигнафикантна разлика в качеството на живот (HAQ-DI) между началото (0,88 [0,38; 1,5]) и третия месец (0,63 [0,25; 1,5]), между началото и шестия месец (0,63 [0; 1,62]) и между началото и дванадесетия месец (0,63 [0; 1,62]) от лечението, съответно: $Z = -3,6$, $p < 0,001$; $Z = -3,25$, $p = 0,001$; $Z = -3,25$, $p = 0,001$ (Фигура 4.19.d).



Фиг. 4.19. Промяна (Δ) в качеството на живот в терапевтичните групи през отделните времеви интервали

При проведен Н тест на Kruskal-Wallis, сравняващ промените в качеството живот между началната визита и дванадесетия месец в отделните терапевтични групи, се установи липса на статистически значима разлика ($H(3) = 5,74$, $p = 0,125$). На Фигура 4.20 са представени медианните стойности на качеството на живот за четирите терапевтични групи в отделните периоди на изследване.



Фиг. 4.20. Нива на НАQ-DI (медиани) в хода на лечение с а) глюкозамин сулфат, б) еднократна апликация на високомолекулна ХК, в) двукратна апликация на високомолекулна ХК, г) двукратен курс с PRP

4.2.3. Определяне на пропорцията пациенти, отговорили на лечението или подобрили се клинично, в отделните терапевтични групи. Прогностични фактори за отговор към терапията.

Минимално клинично значимо подобрене (МКЗП) на болката на първата година постигнаха 17,4% (4/23) пациенти в I група, 32% (8/25) пациенти от II група, 56% (14/25) от III група и 69,2% (18/26) от IV група. Това разпределение доведе до наличие на сигнификантна разлика в пропорцията повлияни пациенти по отношение на болката в групите ($\Phi = 0,405$, $p = 0,001$). МКЗП на болестната активност на първата година постигнаха 17,4% (4/23) пациенти в I група, 32% (8/25) пациенти от II група, 52% (13/25) в III група и 80,8% (21/26) в IV група. Това разпределение доведе до наличие на сигнификантна разлика в относителния дял на повлияните пациенти по отношение на болестната активност в групите ($\Phi = 0,477$, $p = 0,001$). Отговорилите на лечението според обединените критерии на OARSI и OMERACT на първата година бяха 26,1% (6/23) от пациентите в I група, 40% (10/25) от пациентите във II група, 60% (15/25) от III група и 84,6% (22/26) от IV група. Това разпределение показва наличие на сигнификантна разлика в относителния дял на постигналите

отговор към лечението в отделните терапевтични групи (Phi = 0,442, p < 0,001). Данните са обобщени в Таблица 4.12.

4.12. Брой и процентно разпределение на постигналите МКЗП и отговорилите на терапия пациенти по терапевтични групи на 12 месец

Критерий		Група				P	
		I група Glucosamine sulfate	II група HMWHAx 1	III група HMWHAx 2	IV група PRPx2		
OARSИ-OMERACT критерии	OARSИ нон-респондер	Брой	17	15	10	3	<,001
		% от OARSИ	37,80%	33,30%	22,20%	6,70%	
		% от групата	73,90%	60,00%	40,00%	11,50%	
		% от общия брой	17,20%	15,20%	10,10%	3,00%	
		Остатък	6,5	3,6	-1,4	-8,8	
	OARSИ респондер	Брой	6	10	15	22	
		% от OARSИ	11,30%	18,90%	28,30%	41,50%	
		% от групата	26,10%	40,00%	60,00%	84,60%	
		% от общия брой	6,10%	10,10%	15,20%	22,20%	
		Остатък	-6,3	-3,4	1,6	8,1	
МКЗП за болка	Без МКЗП	Брой	19	17	11	8	,001
		% от МКЗП	34,50%	30,90%	20,00%	14,50%	
		% от групата	82,60%	68,00%	44,00%	30,80%	
		% от общия брой	19,20%	17,20%	11,10%	8,10%	
		Остатък	6,2	3,1	-2,9	-6,4	
	МКЗП	Брой	4	8	14	18	
		% от МКЗП	9,10%	18,20%	31,80%	40,90%	
		% от групата	17,40%	32,00%	56,00%	69,20%	
		% от общия брой	4,00%	8,10%	14,10%	18,20%	

	Остатък	-6,2	-3,1	2,9	6,4		
МКЗП за болестна активност	Брой	19	17	12	5	<,001	
	% от МКЗП	35,80%	32,10%	22,60%	9,40%		
	Без МКЗП	% от групата	82,60%	68,00%	48,00%		19,20%
	% от общия брой	19,20%	17,20%	12,10%	5,10%		
	Остатък	6,7	3,6	-1,4	-8,9		
	Брой	4	8	13	21		
	% от МКЗП	8,70%	17,40%	28,30%	45,70%		
	МКЗП	% от групата	17,40%	32,00%	52,00%		80,80%
	% от общия брой	4,00%	8,10%	13,10%	21,20%		
	Остатък	-6,7	-3,6	1,4	8,9		

НМВНАх1 – лекувани с еднократна апликация на хиалуронова киселина; НМВНАх2 – лекувани с двукратно инжектиране на хиалуронова киселина през 6 месеца; PRP – провели 2 последователни курса на лечение през 6 месеца с богата на тромбоцити плазма; МКЗП – минимално клинично-значимо подобрение.

Резултатите от бинарна многофакторна логистична регресия (стъпкова процедура) показаха, че лечението с двукратно инжектирана високомолекулна хиалуронова киселина (III група) увеличава шанса за постигане на МКЗП на болката (VAS) с около 5 пъти в сравнение с групата, която приема глюкозамин сулфат (OR=4,76; 95% CI: 1,155-19,655, p=0,031), а попадането в IV група (лекувани с PRP) увеличава този шанс с над 10 пъти (OR = 10,3; 95% CI: 2,43-43,8, p = 0,002). Всяко нарастване на изходния индекс на телесна маса с 1, води до намаляване на шанса за МКЗП на болката с 20,2% (OR = 0,798; 95% CI: 0,687-0,928, p=0,003), независимо от начина на лечение. Подобна констелация наблюдавахме и при МКЗП на болестната активност (WOMAC). Лечението с двукратно инжектирана високомолекулна хиалуронова киселина (III група) увеличава шанса за постигане на МКЗП на болестната активност с близо 6 пъти в сравнение с групата, която приема глюкозамин сулфат (OR = 6,05; 95% CI: 1,59-23, p=0,008), а лечението с PRP в два курса (IV група) увеличава този шанс с повече от 10 пъти (OR = 10,69;

95% CI: 2,74-41,74, $p = 0,001$). Отчете се също различна вероятност за постигане на обединените критерии на OARSI и OMERACT в отделните терапевтични групи. Лечението с двукратно приложена ХК увеличи шанса за постигане на отговор към терапията с над 4 пъти (OR = 4,25, 95% CI: 1,25-14,5, $p = 0,021$) в сравнение с лечението с глюкозамин сулфат, докато терапията с PRP – над 20 пъти (OR 21,7; 95% CI: 4,7-99,4, $p < 0,001$).

4.2.4. Оценка и сравнение на серологичните показатели между лекуваните пациенти с различни терапевтични средства.

Средните нива на С-реактивен протеин при пациентите бяха $3,99 \pm 3,06$ mg/dL. Според референтните граници за лабораторията повишени нива (< 6 mg/dL) на CRP бяха наблюдавани едва в 21,2% (21/99) от пациентите в началото и 18,3% (17/93) на дванадесетия месец. Разпределението по групи е означено на таблица 4.14. От нея става ясно още, че липсва сигнификантна разлика в относителния дял на пациентите с повишени нива на CRP, постигнали МКЗП и отговорили на терапията, както и на пациенти с или без прогресия в структурните промени. Началните нива на CRP корелираха сигнификантно с възрастта ($r_s = 0,23$, $p = 0,022$), оценката по Kellgren-Lawrence ($r_s = 0,22$, $p = 0,029$), магнитно-резонансната находка (цялостната оценка по WORMS) ($r_s = 0,27$, $p = 0,007$), качеството на живот (HAQ-DI) ($r_s = 0,284$, $p = 0,004$), болката (VAS) ($r_s = 0,415$, $p < 0,001$), тежестта на заболяването (Lequesne индекс) ($r_s = 0,3$, $p = 0,003$) и болестната активност (общия WOMAC скор) ($r_s = 0,38$, $p < 0,001$). Връзката с KL и WORMS не остана значима след корекция за допринасящи фактори (възраст, пол, болка). Корелациите на CRP с клиничните параметри се запазиха и на дванадесетия месец (N = 93). При базисната визита липсваше сигнификантна разлика между отделните терапевтични групи. Статистически значима разлика не бе установена и на дванадесетия месец. Връзка не бе установена между нивата на CRP (базални и на дванадесети месец) и прогресията на заболяването: не се установи корелация със структурните промени (WORMS) и промяната в

клиничните параметри. Нямаше сигнификантна разлика при пациентите с прогресия и с липса на такава при рентгенографската находка (Таблица 4.13).

Табл. 4.13. Нива на CRP в началото и на 12 месец в отделните терапевтични групи, промяната в клиничните показатели и промяната в МРТ и рентгенографската находка

Групи			CRP в началото		CRP на 12 месец		P		
			Норма	Повишен	Норма	Повишен			
Tx група	Glucosamine sulfate	брой	15	8	14	6	NS		
		%	65,2%	34,8%	70,0%	30,0%			
	HMWHAx1	брой	22	3	19	3			
		%	88,0%	12,0%	86,4%	13,6%			
	HMWHAx2	брой	19	6	19	6			
		%	76,0%	24,0%	76,0%	24,0%			
	PRPx2	брой	22	4	24	2			
		%	84,6%	15,4%	92,3%	7,7%			
	общо	брой	78	21	76	17			
		%	78,8%	21,2%	81,7%	18,3%			
	Промяна на 12 месец	Липса на прогресия	брой	73	19	72		14	NS
			%	79,3%	20,7%	83,7%		16,3%	
Прогресия		брой	5	2	4	3			
		%	71,4%	28,6%	57,1%	42,9%			
общо		брой	78	21	76	17			
		%	78,8%	21,2%	81,7%	18,3%			
Промяна на медиалния хрущяла (МРТ)		Липса на прогресия	брой	62	18	61	13	NS	
			%	77,5%	22,5%	82,4%	17,6%		
		Прогресия	брой	16	3	15	4		
			%	84,2%	15,8%	78,9%	21,1%		
		общо	брой	78	21	76	17		
			%	78,8%	21,2%	81,7%	18,3%		

		%	78,8%	21,2%	81,7%	18,3%	
МКЗП за болка	Без МКЗП	брой	45	10	39	10	NS
		%	81,8%	18,2%	79,6%	20,4%	
	МКЗП	брой	33	11	37	7	
		%	75,0%	25,0%	84,1%	15,9%	
	общо	брой	78	21	76	17	
		%	78,8%	21,2%	81,7%	18,3%	
МКЗП за болестна активност	Без МКЗП	брой	42	11	38	11	NS
		%	79,2%	20,8%	77,6%	22,4%	
	МКЗП	брой	36	10	38	6	
		%	78,3%	21,7%	86,4%	13,6%	
	общо	брой	78	21	76	17	
		%	78,8%	21,2%	81,7%	18,3%	
OARSI-OMERACT критерии	Нон-респондер	брой	39	6	33	6	NS
		%	86,7%	13,3%	84,6%	15,4%	
	OARSI респондер	брой	39	15	43	11	
		%	72,2%	27,8%	79,6%	20,4%	
	общо	брой	78	21	76	17	
		%	78,8%	21,2%	81,7%	18,3%	

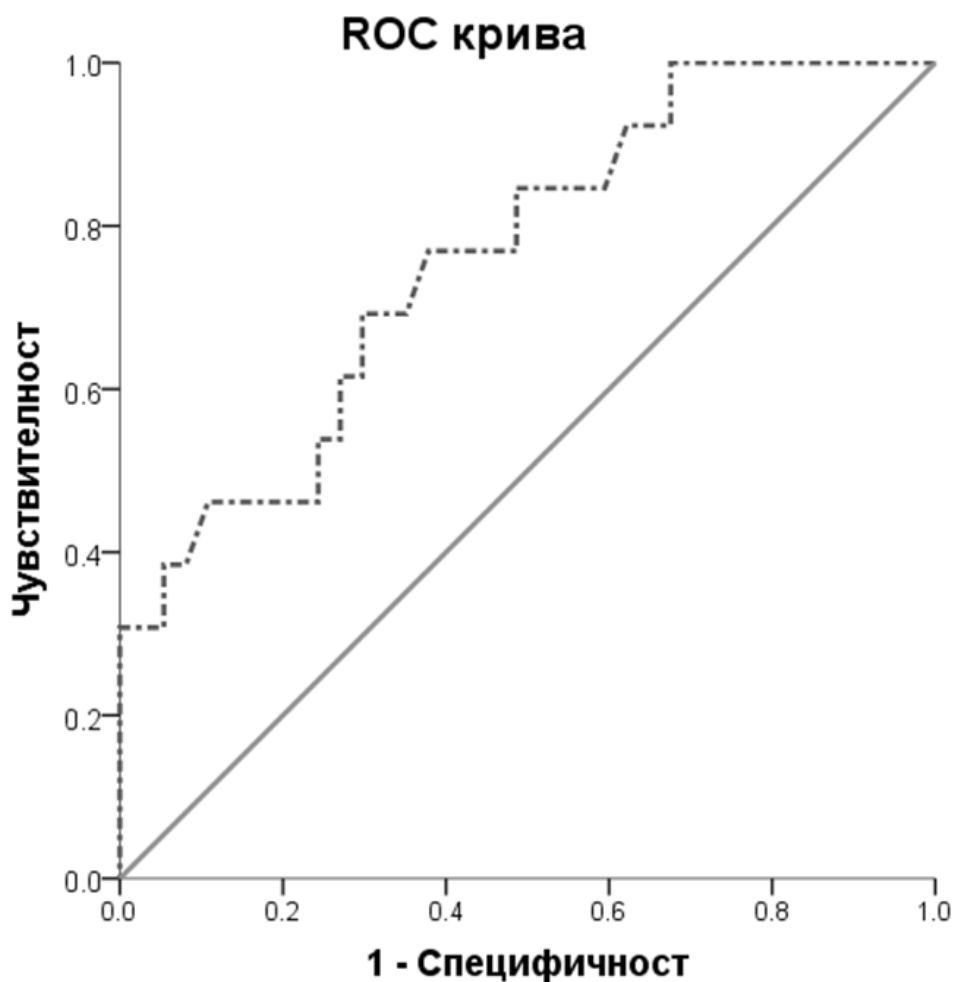
HMWHAx1 – лекувани с еднократна апликация на хиалурунова киселина; HMWHAx2 – лекувани с двукратно инжектиране на хиалурунова киселина през 6 месеца; PRP – провели 2 последователни курса на лечение през 6 месеца с богата на тромбоцити плазма; МКЗП – минимално клинично-значимо подобрене, NS – несигнификантно.

MMP-3 – прогностичен белег за прогресираща хрущялна увреда.

При 50 пациенти, приключили 12-месечния проследяващ период, бяха изследвани базалните нива на MMP-3 (ng/ml). Те, освен с генерализацията на остеоартроза, се асоциираха с прогресията на структурните увреди (промяната в общата WORMS оценка), отразяващи цялостната магнитно-резонансна оценка на коляното, след една година на проследяване ($r_s = -0,38$,

$p = 0,006$). Нива над 60 ng/ml се наблюдаваха в 22% (11/50) от изследваните и проследени пациенти с ГоА, които бяха означени като MMP-3 позитивни. Останалите 78% от пациентите имаха нива на MMP-3 под 60 и бяха означени като MMP-3 отрицателни. В терапевтичните групи дялът на MMP-3 позитивните болни бе съответно 15,3% (2/13), 21,7% (5/23), 37,5% (3/8) и 16,7% (1/6) за I, II, III и IV група, без статистически значима разлика в пропорционалното разпределение ($\Phi = 0,176$, $p = 0,670$). Сигнификантно по-високи стойности бяха наблюдавани при пациенти с настъпила прогресия на хрущялната увреда в медиалния компартмент на коляното (30,7 [12,6; 82,5]), отколкото при пациентите с липса на прогресия (44,3 [26,1; 128,2]) на дванесетия месец, Mann-Whitney U = 114,5, $p = 0,005$. Всяко покачване на MMP-3 с 1 ng/ml увеличава шанса за прогресия на хрущялната увреда в медиалната тибιο-феморална става с 4% (OR = 1,043, CI 95%: 1,01-1,08, $p = 0,01$). Бинарен логистичен регресионен анализ показва, че по-високите от 60 ng/ml начални нива на MMP-3 увеличават шанса за последваща прогресия на хрущялната увреда в медиалния отдел на индексното коляно с над 6 пъти, установени чрез MPT след 12 месеца проследяване (OR 6,28, CI 95% 1,3-30,5, $p = 0,023$). Потенциални ко-фактори (възрастови групи, пол, терапия, генерализирана ОА) не допринасяха за този резултат след провеждане на Mantel-Haenszel тест и парциален коефициент на корелация.

При анализ на ROC крива с цел отграничаване на прогресорите от непрогресорите за настъпване или влошаване на хрущялната увреда въз основа на началните нива на MMP-3, площта под кривата (AUC) за серумните нива на MMP-3 бе 0,761, с 95% доверителен интервал от 0,614 до 0,910. ROC анализът определи гранични нива от 40,8 ng/ml с чувствителност 69,2% и специфичност 70,3% за диференциация между прогресори и непрогресори. 100% специфичност за серумния MMP-3 се постигна при нива на биомаркера под 26,1 ng/ml с чувствителност 32,4% (Таблица 4.14) (Фигура 4.21).



Фиг. 4.21. ROC крива за отграничаване на прогресори от непрогресори с помощта на серумните нива на MMP-3 при AUC = 0.761

Табл. 4.14. Основни характеристики на ROC кривата за отграничаване на прогресори от непрогресори за влошаване на хрущялната увреда

Биомаркер	AUC	Стойности (ng/ml)	Чувствителност	Специфичност	CI	
					Горна граница	Долна граница
MMP3	0,761	40,8	0,692	0,703	0,614	0,910

CI – интервал на доверителност; MMP3 – матриксна металопротеиназа-3; AUC – площ под кривата

4.2.5. Оценка и сравнение на структурните промени, установени чрез рентгенография и магнитно-резонансна томография, в отделните терапевтични групи. Прогностични фактори за отчетената чрез МРТ загуба на хрущял.

Рентгенографска прогресия. Рентгенография е проведена в началото и на дванадесетия месец от проследяването. Липсваше статистически значима разлика в разпределението по рентгенографските стадии в началото ($\Phi = 0,24$, $p = 0,44$) и дванадесетия месец ($\Phi = 0,252$, $p = 0,390$) между отделните терапевтични групи (Таблица 4.15).

Табл. 4.15. Разпределение на пациентите по рентгенов стадий в четирите терапевтични групи

			Терапевтични групи				P
			I група Glucosamine	II група HMWHAx1	III група HMWHAx2	IV група PRPx2	
KL начало	I стадий	Брой	9	6	10	6	NS
		%	29,00%	19,40%	32,30%	19,40%	
		Остатък	1,8	-1,8	2,2	-2,1	
	II стадий	Брой	12	11	10	13	
		%	26,10%	23,90%	21,70%	28,30%	
		Остатък	1,3	-0,6	-1,6	0,9	
	III стадий	Брой	2	8	5	7	
		%	9,10%	36,40%	22,70%	31,80%	
		Остатък	-3,1	2,4	-0,6	1,2	
KL 12 месеца	I степен	Брой	9	5	9	5	NS
		%	32,10%	17,90%	32,10%	17,90%	
		Остатък	2,5	-2,1	1,9	-2,4	
	II степен	Брой	10	10	11	14	
		%	22,20%	22,20%	24,40%	31,10%	
		Остатък	-0,5	-1,4	-0,4	2,2	
	III степен	Брой	4	10	5	7	
		%	15,40%	38,50%	19,20%	26,90%	
		Остатък	-2	3,4	-1,6	0,2	

HMWHAx1 – лекувани с еднократна апликация на хиалуронова киселина; HMWHAx2 – лекувани с двукратно инжектиране на хиалуронова киселина през 6 месеца; PRP – провели 2 последователни курса на лечение през 6 месеца с богата на тромбоцити плазма; KL – Kellgren-Lawrence, NS – несигнификантно.

При анализ на рентгенографиите на дванадесети месец и сравнението им с тези от началото на проучване се установява, че по един пациент от II, III и IV група са преминали от първи рентгенографски стадий по KL във втори. В I група липсваха пациенти с първи рентгенографски стадий в началото и отчетена прогресия на дванадесетия месец. От втори рентгенографски стадий в трети са преминали 2, 2, 0 и 0 съответно в I, II, III и IV групи в рамките на едногодишния период на проследяване (*Фигура 4.23*). Обратно развитие не се наблюдава при нито един пациент. Общият брой на пациентите с прогресия, независимо от рентгенографския стадий, бе 7,1% (7/99), а разбивка по групи е представена на *Фигура 4.22*. Липсваше статистически сигнификантна разлика в пропорцията на рентгенографските прогресори между отделните групи ($p = 0,618$).



Фиг. 4.22. Пропорция на пациентите с рентгенова прогресия спрямо общи брой пациенти в групата



Фиг. 4.23. Пациент с прогресия в рентгенографската находка според Kellgren-Lawrence скалата. Лявата рентгенография е проведена в началото на проучването и отговаря на KL II стадий, докато дясната рентгенография е проведена на дванадесетия месец и отговаря на KL III стадий.

Промени в магнитно-резонансната находка. МРТ е проведена в началото и на дванадесетия месец от проследяването. Средните стойности на промяната в общия WORMS скор (отразяващ комплексната оценка на отделните тъкани при OA) е $-0,93 \pm 4,8$ (Mdn = 0; Min = -16; Max = 14)]. Независимо от терапията, средните стойности на общия WORMS са намалели с приблизително 1 единица за период от 12 месеца. Не се установи статистически значима разлика в нивата на промяна на общия WORMS между отделните терапевтични групи ($F(3; 95) = 0,897$, $p = 0,482$). Разбивката по групи е представена в Таблица 4.16.

Табл. 4.16. Средни стойности и медиани на промяната в WORMS за периода на проследяване

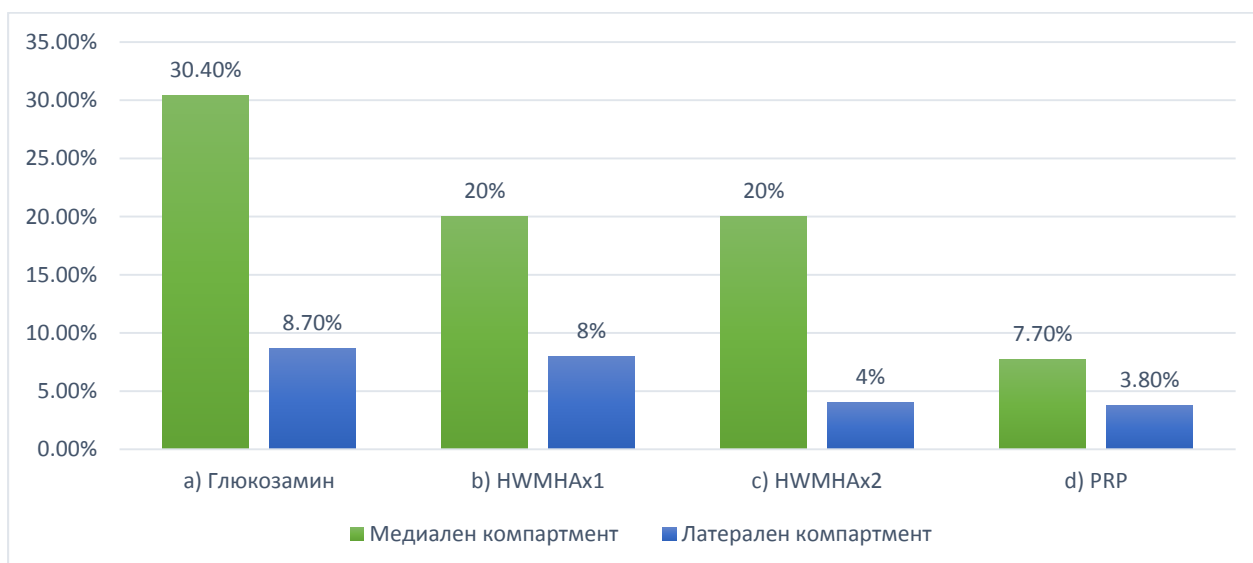
Терапевтична група	Промяна в WORMS за период от 12 месеца					P
	N	Mean \pm SD	Median	Min	Max	
I група Glucosamine	23	-1,72	-2	-16	6	NS
II група НВМНАх1	25	-1,66	-2	-13	6	

III група HWMHAx2	25	-0,48	0	-11	4
IV група PRPx2	26	0,04	0	-10	14

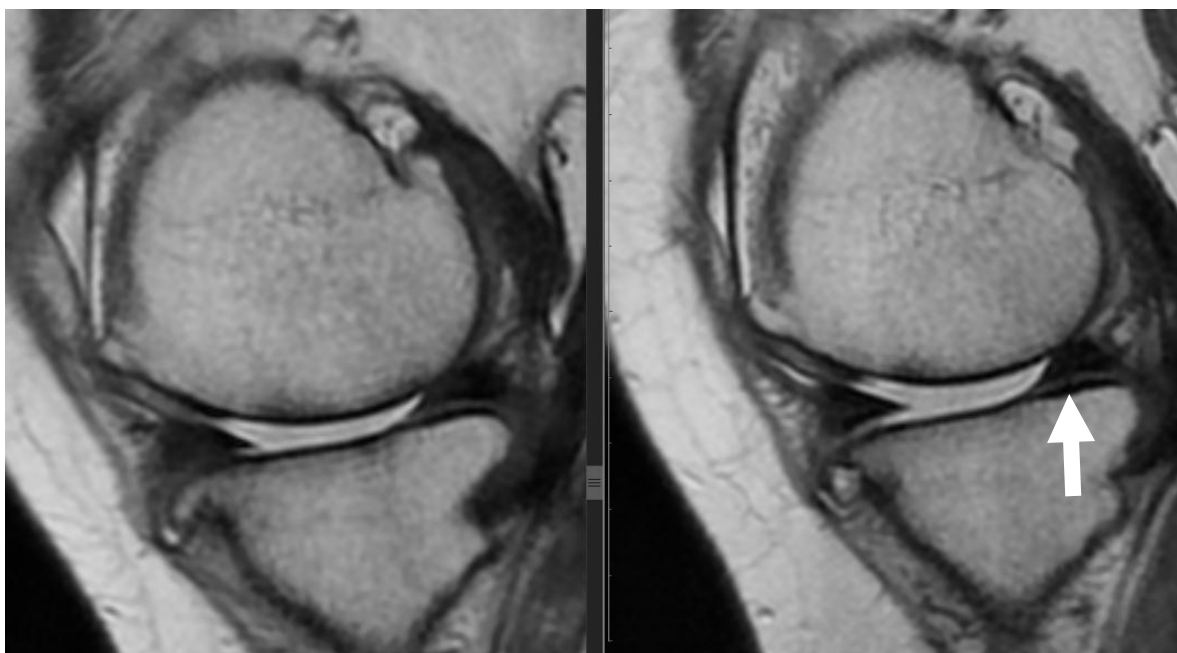
HWMHAx1 – лекувани с еднократна апликация на хиалуронова киселина; HWMHAx2 – лекувани с двукратно инжектиране на хиалуронова киселина през 6 месеца; PRPx2 – провели 2 курса на лечение през 6 месеца с богата на тромбоцити плазма; NS – несигнификантно.

Сигнификантна разлика в промяната на общата WORMS оценка се отчете между рентгенографските прогресори и непрогресори ($-6,6 \pm 5,3$ и $-0,5 \pm 4,5$, респективно, $t[97] = 3,41$; $p = 0,001$).

Отчете се прогресия в увредата на хиалинния хрущял на медиалния компартмент на индексното коляно при 19,2% (19/99) от пациенти на дванадесетия месец (Фигура 4.25). По групи отчетеното влошаване на хиалинния хрущял е 30,4% (7/23), 20% (5/25), 20% (5/25) и 7,7% (2/26) съответно в I, II, III и IV групи. Екзатният тест на Фишер не установи сигнификантна разлика между групите ($\Phi = 0,2$; $p = 0,25$). При отчитане на прогресията в хрущялната увреда на латералния тибioфеморален компартмент на индексното коляно се установи, че влошаване е налице при 8,7% (2/23) от пациентите в I група, 8% (2/25) във II група, 4% (1/25) в III група и 3,8% (1/26) в IV група, като липсва статистически значима разлика в групите ($\Phi = 0,093$, $p = 0,836$) (Фигура 4.24).



Фиг. 4.24. Пациенти с прогресия в хрущялната увреда по терапевтични групи



Фиг. 4.25. Прогресивна хрущялна увреда в задния подрегион на медиалната част на тибията на първата година (вдясно, бяла стрелка)

Освен нивата на MMP-3, прогностичен фактор за влошаване на хиалинния хрущял беше индекса на телесна маса в началото на проучването, ($OR=1,208$; 95% CI: 1,048-1,390, $p=0,009$). Всяко нарастване на ИТМ с 1 kg/m^2 , води до увеличаване на шанса за прогресия с 20,8%.

4.2.6. Сравнение на комплайънс и безопасност между прилаганите в групата лекарствени средства

В хода на проследяване отпаднаха почти половината от пациентите в първата група (20/43), лекувани с глюкозамин сулфат. При тях се установи най-лош комплайънс към терапията в сравнение с останалите три терапевтични рамена, като 11 болни започнаха лечението с глюкозамин сулфат, но в хода му бяха изключени поради по-кратък прием от заложения в дизайна (по-малко от 36 седмици за период от 1 година).

Съответно 5, 4, 3 и 1 пациенти от I, II, III и IV група не се явиха при една или повече от проследяващите визите и бе невъзможно тяхното проследяване, поради което отпаднаха от крайния анализ на данните.

Един пациент от групата с PRP отпадна от проследяването поради нежелание за последващи ставни манипулации след първата поставена инжекция. При него не се наблюдаваха странични реакции след манипулацията. По-подробен анализ на данните е представен на *Таблица 4.17*.

Табл. 4.17. Причини за отпадане в хода на проследяване на отделните терапевтични групи

Терапевтични групи	Глюкозамин I група	НМВНА II и III група	PRPх2 IV група	P
Лош комплайънс	11	0	1	<0,001
Неявяване	5	7	1	NS
Ендопротезиране	1	1	1	NS
Причина за отпадане Интраартикуларен КС	2	2	0	NS
Покачване на т.т.	1	0	0	NS
Общо	20/43	10/60	3/29	<0,001

НМВНАх1 – лекувани с еднократна апликация на хиалуронова киселина; НМВНАх2 – лекувани с двукратно инжектиране на хиалуронова киселина през 6 месеца; PRPх2 – провели 2 курса на лечение през 6 месеца с богата на тромбоцити плазма; NS – несигнификантно.

Регистрирани странични реакции. В хода на проследяването 1 (2,3%) пациент отказа прием на глюкозамин сулфат след първия месец поради покачване на телесно тегло, което свързва с приема на изследваното средство. 1 пациент съобщи за транзиентен „стомашен дискомфорт“ след прием на глюкозамин сулфат, което обаче не доведе до спиране на препарата, тъй като отмина след третия прием. 1 пациент от втората група съобщи за транзиентен оток и затопляне в областта на инжектираното с ХК коляно, които отзвучаха в рамките на 24 часа след апликацията. Пациентът бе инструктиран да приеме парацетамол и да прилага лед локално, да повдигне долния си крайник високо и да се въздържа от физическа активност

за период от 24 часа. При двама пациенти (7,6%) от четвъртата група наблюдавахме преходна болка и оток в инжектираното коляно, които отзвучаха след прилагане на лед, покой, прием на парацетамол, елевация на крайника. Те също преминаха в рамките на 24 часа след приложението на изследваното терапевтично средство. Единият от тези пациенти не бе следвал стриктно нашите препоръки за почивка след интраартикуларното приложение на богата на тромбоцити плазма, описани подробно в материали и методи. Този страничен ефект не отказа нито едни от пациентите да продължат участието си в проучването, съобразно неговия протокол.

5. Обсъждане

В настоящото проучване си поставихме за цел да съчетаем и съпоставим добре познатите и използвани в рутинната клинична практика методи за диагностика с други иновативни и малко проучени диагностични модалности, с оглед постигане на комплексна оценка на основните ключови компоненти на заболяването. По този начин събрахме ценна информация, от една страна, за клиничните и образните характеристики на болестта като болка, ограничена функция, скованост и структурна увреда, а от друга страна – информация за процесите на ставно ремоделиране, използвайки набор от серологични биомаркери. С помощта на тези методи, част от които препоръчани от международната организация OARSI [144-146], сравнихме болни в различни стадии на заболяването помежду им и със здрави контроли. Едногодишният период на проследяване чрез образни методики не е случайно избран, а е в съответствие с актуалните препоръки за определяне на минималния времеви интервал за детекция и акуратна оценка на структурните промени чрез рентгенография и МРТ [217].

Включените в проучването пациенти и контроли бяха балансирани по антропометрични характеристики като пол и индекс на телесна маса. Все пак съществуваше сигнификантна разлика във възрастта на пациентите, тъй като не успяхме да подберем контроли над 60-годишна възраст, при които да липсват данни (клинични или рентгенографски) за гонартроза. Този проблем се очертава основен за проучванията с участие на пациенти с ГоА. ОА е класически пример за асоциирано с възрастта заболяване [218, 219] и често, дори и асимптоматични, пациентите над 60-годишна възраст показват белези на ГоА при снемане на щателна анамнеза и преглед, и провеждане на рентгенография [12]. Все пак в нашите анализи коригирахме данните по възраст чрез статистически методи. Повечето участници в проучването бяха от женски пол, което се обяснява с факта, че ГоА е по-често срещана при

жени [220] и относително по-голям брой пациенти от женски пол потърсиха медицинска помощ в изследователския център и писмено се съгласиха да участват в изследването.

В подбора на пациенти насочихме нашите усилия към селектиране и последващ анализ на популация от болни с различна продължителност на болестта и разнородни по характер реализирани структурни промени. Само по този начин бихме успяли да обхванем възможно най-голям спектър на въздействие на болестта върху пациента.

В дизайна на проучването имплементирахме най-популярните форми на лечение в рутинната клиничната практика, които сравнихме с по-малко познато терапевтично средство в лицето на PRP. За целта бе използван кит (TriCell® [Rev-Med Inc, Korea]), който разделя отделните фракции на кръвта чрез двуетапно центрофугиране (double-spinning) и позволява постигане на концентрация на тромбоцити 5 пъти над тази в кръвта на конкретния пациент [221]. И накрая се опитахме да отговорим на въпрос с голяма приложно-практическа стойност, а именно кой е оптималният терапевтичен режим при пациенти с гонартроза, предвид ограничения набор от средства, с които разполага българският ревматолог?

5.1. Клинични проучвания върху пациенти с гонартроза

За целите на настоящото проучване бяха използвани болест-специфични и генерични въпросници, оценяващи основните клинични характеристики на болестта, а именно: болка, физическа функция, скованост, качество на живот и степен на инвалидизация. Отделните въпросници и скали показаха висока степен на корелация по между си, като индексите WOMAC и Lequesne имаха най-силна връзка по между си, въпреки че двата оценъчни инструмента се различават концептуално. Сходна статистическа ефективност съобщават и други автори, макар че WOMAC изглежда да е малко по-ефективен, поради включените в него раздели за оценка на болката и физическата функция [64, 77].

5.1.1. Оценка на болката

Болката е доминантният симптом при ГоА, който кара пациента да посети кабинета на ревматолога. В представените резултати интензитетът ѝ корелираше положително с възрастта на пациентите, но по-важното е, че тя показва по-силна връзка с давността на оплакванията. Това отчасти отдадохме на напредналите структурни промени, но и на централните механизми на сенсибилизация, присъщи за пациентите с ОА [222]. „Очувствяването“ към болкови стимули се осъществява чрез развитие на сенсibiliзиращи централни ноцицептивни вериги, които амплифицират болковото усещане, при различна степен на периферна тъканна увреда [223]. Полът може да бъде рисков фактор за сенсибилизация, предполагат скорошни изследвания [224] и подобна констатация може да бъде направена от настоящето проучване, където бе налице сигнификантна разлика между двата пола в болковото възприятие. Жените отбелязаха статистически по-високи нива на болка върху визуалната аналогова скала, въпреки че те не се отличаваха статистически значимо от мъжете по своите структурни увреди, оценени посредством рентгенография и МРТ. Някои автори предполагат, че половите различия се дължат по-скоро на по-ниския болков праг, съчетан с по-голямата чувствителност на жените към болка, отколкото на напреднали структурни промени [225-227]. При анализа на данните оценката на болката според Likert скалата не показва особени различия спрямо VAS, което говори за взаимозаменяемост на двете скали. Тези данни са в съответствие с констатираните в други проучвания резултати при пациенти с ГоА [227, 228].

Пациентите, стратифицирани според нивата на болка посочени в табл. 4.3, се характеризираха както със сигнификантна разлика при отчитане на останалите клинични параметри като качество на живот, болестна активност и тежест, така и с различна степен на структурна увреда. Интересен е фактът, че липсваше сигнификантна разлика между двете групи с най-висок интензитет на болка (60-80 mm и ≥ 80 mm върху визуалната аналогова скала) по отношение на качеството на живот, болестната

активност, болестната тежест и структурните промени, оценени чрез образните методи. Тези резултати говорят от една страна за многофакторните механизми, които играят роля в определянето на перцепцията за болка на болния с ГоА, а от друга – за известно несъответствие между интензитета на болката и реализираните структурни увреждания в резултат на болестната активност. Още повече при проследяване на лекуваните пациенти не се отчете корелация между рентгенографската находка и интензитета за болка. Това говори още веднъж в полза на твърдението, че основна роля във формирането на болковия усет играят централните механизми на въздействие и възбуда, подобно на фибромиалгичния синдром.

В лонгитудиналната част на настоящото изследване се установи сигнификантна разлика в болката между началото и третия месец, между началото и шестия месец и между началото и дванадесетия месец в хода на лечение с интраартикуларна хиалуронова киселина (II и III група) и богата на тромбоцити плазма (PRP, IV група). Ефектът на лечението с глюкозамин сулфат бе по-късно осезаем, като то доведе до статистически сигнификантно намаляване на болката едва на шестия месец. Оценени на дванадесетия месец, пациентите в I и II група имаха сходна промяна в болковото възприятие.

Провеждането на лечение с PRP според протокола на проучването превъзхождаше терапията с глюкозамин сулфат и еднократно инжектиране на хиалуронова киселина при болни с гонартроза в края на проследявания период по отношение на облекчаване на болката, а при сравнение с двукратното инжектиране на високомолекулна хиалуронова киселина (IV група) се наблюдават сходни резултати. Необходимо е да се отбележи, че макар и незначима, имаше разлика от почти 3 mm в болковата перцепция върху VAS скалата в полза на PRP, която може да достигне “сигнификантност“ при по-голяма кохорта от пациенти или по-дълъг период за проследяване. Нашите клинични резултати бяха в съответствие със

скорошни литературни съобщения [229, 230], сравняващи ефекта върху болката на PRP и ХК при пациенти с гонартроза, които показват, че богатата на тромбоцити плазма е поне толкова ефективна в облекчаване на болката, колкото ХК.

В този си формат, по наши данни, това е първото изследване, което сравнява подобен „интензифициран“ (състоящ се от 2 курса през 6 месеца по 3 инжекции) PRP режим с най-често използваните в клиничната практика лечебни режими за повлияване на болката при гонартроза. Предпочетохме провеждането на 2 курса PRP през шест месеца, поради факта, че предишни проучвания показват, че при провеждане на еднократен курс нивата на болка прогресивно се повишават между 24 и 52 седмица от проследяването [207, 231, 232]. В настоящото изпитване не открихме сигнификантна разлика на болката между шестия и дванадесетия месец в групата на PRP, въпреки че известно подобрене, макар и несигнификантно, имаше. Само чрез подобен интензифициран инжекционен режим на PRP, какъвто сме приложили, можем правилно да оценим наличието или не на болестопроменящ (в това число хондропротективен) ефект от терапията. Според нас въведените еднократно или в рамките на няколко седмици анти-инфламаторни цитокини и растежни фактори, съдържащи се в богатата на тромбоцити плазма, не биха достигнали критичния минимум за значима промяна на дисбаланса, който стои в основата на активирана каскада от протеолитични ензими, водеща до хрущялна деструкция.

Особен интерес от практическа гледна точка представляват резултатите от директното сравнение в края на първата година на еднократното с двукратното (през 6 месеца) инжектиране на ХК – два от най-често прилаганите режими на вискосуплементация с кръстосаносвързана ХК при пациенти с ГоА в рутинната практика. Представените данни показват, че еднократното приложение на използваната в проучването ХК води до статистически значимо подобрене на болката дори и на 12 месец, въпреки че ефектът прогресивно намалява след третия месец. Когато сравняваме

двата режима на инжектиране на ХК, средната разлика в промяната на болката бе около 9 mm в полза на двукратното инжектиране, но този резултат не е достатъчен за достигане на „статистическа“ сигнификантност. Ако търсим максимален ефект върху болката, би било логично да изберем двукратен режим, но ако вземем под внимание и финансовия аспект, вероятно би ни задоволил и еднократното инжектиране на кръстосаносвързана ХК за период от 1 година.

5.1.2. Оценка на болестната активност

Оценката на болестната активност е извършена с помощта на WOMAC индекса, който включва основните симптоми на заболяването, а именно – болка, физическа функция и скованост. Индексът на WOMAC е първоначално разработен за употреба при пациенти с гонартроза и коксартроза, а години по-късно намира приложение и при пациенти с други ревматични заболявания [233-236].

След анализ на резултатите се установи, че за разлика от болката, болестната активност не корелираше с давността ѝ, а само с възрастта. Тенденция, без наличие на статистическа връзка, се наблюдаваше между ITM и WOMAC индекса.

Изследването на WOMAC индекса в различните времеви интервали при отделните групи показва сходни резултати с тези за болката, разгледани в предходната точка. Съществена разлика се установи в I група, където се наблюдава статистически значима промяна на болестната активност в началото и на трети месец. Тази констелация може да се обясни с факта, че общият WOMAC индекс включва, освен оценка на болката чрез Likert скала, но и раздели, оценяващи сковаността и физическата функция, което прави методът по-чувствителен към промени, продиктувани от терапията. Като отделен компонент от WOMAC индекса, сковаността обаче не е повлияна в степен на статистическа значимост в I група в рамките на 12-месечния период на проследяване. Провеждането на двукратен курс на инжектиране на PRP

показа превъзходство в намаляване на болестната активност спрямо пероралния прием на глюкозамин сулфат и еднократното инжектиране на изследваната ХК, оценено в края на първата година. Спрямо двукратното инжектиране на ХК през 6 месеца данните показват, че PRP е поне толкова ефективна в постигането на подобрене.

5.1.3. Оценка на болестната тежест

С помощта на алгофункционалния индекс на Lequesne може да се оцени тежестта на заболяването, ефективността на фармакологичните интервенции [73] и да се подпомогне процеса на подбор на кандидати, подходящи за ендопротезиране [64]. С негова помощ е възможна стратификацията на пациентите в зависимост от тежестта на заболяването в пет групи. В крос-секционната част стойностите на Lequesne показваха връзка с възрастта на пациентите, давността на болката и ИТМ. Медианата на алгофункционалния индекс е 11 точки, а от таблица 4.3. е видно, че подбраната кохорта пациенти е предимно с тежка и много тежка ГоА. Добрата корелация с HAQ-DI ($p < 0,001$) предполага, че доминантната част от пониженото качество на живот и инвалидизацията се дължат именно на болестната тежест при болни от ГоА [237], въпреки полиморбидитетата на изследваната популация.

При проследяване на отговора към лечение с глюкозамин сулфат липсва сигнификантна разлика в болестната тежест според индекса на Lequesne между началото и останалите измервания, извършени на трети, шести и дванадесети месец. Това говори, че въпреки известното облекчаване на болката и ставната функция, глюкозамин сулфатът има по-малък ефект по отношение на един по-консервативен показател, какъвто е тежестта на заболяването. При еднократно инжектиране на високомолекулна хиалуронова киселина също липсва сигнификантен ефект след 1 година проследяване. В сравнение с другия използван болест-специфичен въпросник WOMAC и оценката на болката според VAS се установява, че индексът на Lequesne е по-малко чувствителен към промени и може би

нетолкова ефективен за проследяване на симптоматичното подобрене. Тази констатация е направена още от Stucki и сътрудници [64], а по-късно потвърдена от Konstantinidis в гръцка популация [238].

5.1.4. Оценка на качеството на живот

Първоначално разработен за оценка на качеството на живот при ревматоиден артрит, въпросникът HAQ-DI (още известен като съкратената форма на HAQ) се прилага в широка гама от заболявания, включително ГоА. Докладваната от нас медиана за HAQ-DI (0,88) в изследваната популация от пациенти с ГоА е сходна с рапортуваните стойности в епидемиологични проучвания на по-големи кохорти от пациенти [79].

Проведеният множествен линеен анализ показва, че стойностите на HAQ-DI могат да бъдат прогнозирани с голяма точност, когато са известни индексите WOMAC и Lequesne, извлечени от болест-специфични въпросници, както следва:

$$\text{HAQ} - \text{DI} = -0,23 + 0,014 * (\text{WOMAC}) + 0,045 * (\text{LEQ}),$$

където WOMAC и LEQ са съответно оценките в WOMAC и Lequesne индексите. Имайки предвид и коефициента на детерминация на представения модел, двата болест-специфични индекса определят близо 63% от вариациите в стойностите на HAQ-DI.

В хода на лечение статистически значимо подобрене е налице единствено в III и IV група. Въпреки това при анализ на промяната между началото и дванадесетия месец, HAQ-DI е единственият клиничен параметър без статистически значима разлика в отделните групи.

5.1.5. Минимално клинично значимо подобрене на симптомите и отговор към терапията

Оказва се, че статистически значимата промяна невинаги съответства на клинично значимото подобрене на индивидуално ниво. Поради тази причина се въвежда терминът минимално клинично значимо подобрене

(МКЗП), който се дефинира като най-малката промяна в измерването на определен клиничен показател, която води до значимо подобрене на симптомите на пациента [215]. Към днешна дата МКЗП изглежда най-подходящият показател за дихотомизация и поляризация на болните, с цел проследяване на отговора към приложената терапия [239]. МКЗП дава допълнителна информация на читателя за размера на реализирания ефект чрез предоставяне на по-съдържателна информация под формата на брой (респективно процент) подобрили се болни в хода на лечение. Това се оказва валидно и за нашия масив от данни: При пациентите, лекувани с PRP, се постигна сигнификантно по-висока честота на МКЗП, отчитащо болестната активност, в сравнение с всички останали терапевтични групи, включително и пациентите, провели лечение с двукратни инжекции на кръстосаносвързана ХК. Лечението с PRP увеличи шанса за постигане на МКЗП на болестната активност с около 2 пъти в сравнение с терапията, приложена в III група, с 5 пъти в сравнение с II група и с над 10 пъти в сравнение с I група. До подобна констатация е достигнато и в скорошен мета-анализ, сравняващ ефективността на PRP и хиалуронова киселина [240]. В друг мета-анализ, изготвен от Chang и сътрудници и включващ 16 отделни проучвания, се установи, че PRP е по-ефективен начин на лечение от терапията с плацебо и кортикостероиди [241].

Освен от груповата принадлежност, постигането на клинично подобрене на болката зависеше от ИТМ на пациентите, като всяко покачване на изходния индекс на телесна маса с 1 kg/m^2 , водеше до намаляване на шанса за МКЗП на болката с $1/5$. White и неговият колектив също наблюдават подобна зависимост. При тях клинично подобренията пациенти са имали по-нисък ИТМ, по-висока скорост на ходене и по-малко симптоми на депресия [242]. Още повече, че в същото проучване се отчита връзка между понижаването на телесната маса в хода на проследяване и симптоматичното подобрене при болни с ГоА [243].

Данните за постигнат OARSI отговор на 12 месец бяха най-впечатляващи за лекуваната с PRP група – при цели 22 от 26 (84,6%) проследени болни се постигна отговор към терапията, което е значително по-висок процент от лекуваните пациенти в останалите терапевтични групи.

От изнесените дотук данни можем да заключим, че, що се отнася до облекчаването на симптомите, провеждането на 2 курса с интраартикуларно инжектиране на PRP през 6 месеца е поне толкова ефективна терапия (ако не и по-ефективна), колкото двукратното инжектиране на кръстосаносвързана високомолекулна хиалуронова киселина през 6 месеца при едногодишно проследяване.

5.2. Серологични проучвания върху пациенти с гонартроза

Серологичните биомаркери са разработени да представят количествено процесите на ставно ремоделиране и болестна прогресия. ESCEO маркира основните направления, очертаващи развитието и разработването на нови биомаркери още през 2013 г. [116]. Релевантни към настоящия дисертационен труд са постигането на по-добро осмисляне на подлежащите болестни механизми с цел валидиране на съществуващите биомаркери и идентификацията на нови кандидати, стандартизацията и калибрацията на известните биомаркери и разработването на нови диагностични алгоритми, които комбинират вече добре известни биомаркери и други инструментални изследвания за формиране на диагностичен панел [116]. Постигането на тези задачи ще позволи на биомаркерите да заемат своето заслужено място в рутинната клинична практика за ранна диагноза и мониторинг на болестната активност и прогресията. Макар и слабо проучено, полиартикуларното ангажиране, не само болестната активност, в хода на артрозната болест може да даде сериозно отражение върху серумните концентрации на биомаркерите. Такъв бе случаят с MMP-3.

Въпреки че в световен мащаб темата изглежда широко изследвана, всички биомаркери за ОА се класифицират като кандидати и нито един от тях

не е навлязал в рутинната клинична практика. В този контекст обстойното изследване и сравнение на COMP, MMP-3, Coll2-1 и CRP, използвайки клинични и образни методи, би било ценно с цел по-нататъшна валидация, определяне на референтни граници и разработването на диагностични алгоритми, комбиниращи панел от биомаркери с или без други диагностични модалности [116].

Серумните нива на Coll2-1, COMP и MMP-3 не отразяваха нито един от заложените клинични параметри при пациентите с ГоА. Това вероятно се дължи на факта, че докладваните от пациента болка и ограничена функция се основават на психо-емоционалното му състояние и индивидуалния праг на болка, което води до несъответствие в някои случаи между симптомите и структурните увреди или биомаркерите, отразяващи ремоделиращите ставата процеси.

С-реактивен протеин. С-реактивният протеин е острофазов белтък, който се продуцира от хепатоцитите и адипоцитите и се регулира от про-инфламаторни цитокини [244]. Граничните нива на CRP се наблюдават при заболявания, характеризиращи се с локален, нискостепенен възпалителен процес, какъвто е случаят с исхемичната болест на сърцето [245-247]. Гонартрозата не прави изключение от това правило: в настоящото проучването серумните нива на CRP се различаваха значимо между пациентската и контролната групи, въпреки че средните нива при болните останаха в референтни за нашата лаборатория граници (< 6 mg/L). Подобно твърдение изказват още през 1997 г. Spector и сътрудници, като в тяхната група нивата на CRP са били умерено, но сигнификатно повишени при жени с ранна гонартроза. Тези нива са предсказали болестната прогресия през следващите 4 години на проследяване [248] – твърдение, което ние не потвърдихме, вероятно поради по-късия период на проследяване. От друга страна скорошен мета-анализ показва, че серумната концентрация на CRP няма съществена предиктивна стойност за прогресията на структурните увреждания при ГоА (OR = 0,99; p = 0,93) [249].

В различните студия се отчита голяма разлика в средните нива на CRP, вариращи от 0,9 до 9,8 mg/L [250]. За настоящото проучване средните нива на CRP бяха 3,99 mg/L. Вариабилността в нивата на CRP може би се дължат на различните техники за изследване на острофазовия показател или на факта, че в някои студия болните с CRP над определена стойност за били изключени, поради опасения за наличието на придружаващо възпалително ставно заболяване [250].

Китовете за високочувствителен CRP (high sensitivity [hs]CRP) са способни да доловят нива на CRP, които са с един порядък по-ниски от традиционните CRP китове. Поради тази причина те могат да бъдат по-акуратни в оценката на локалното възпаление в ставата [251]. Нивата на CRP показва корелации с клиничните и, макар и слаби, с образните характеристики на пациентите. С най-силна връзка ($r_s = 0,415$; $p < 0,001$) се отличаваше корелацията с болката, която е установена и в предишни проучвания [248, 252]. Тези наблюдения могат да бъдат обяснени с хипотезата, че при OA може да има системна възпалителна компонента. Предишни лонгитудинални проучвания показват, че високите нива на CRP прогнозира клиничните симптоми при OA [252], в подкрепа на твърдението, че възпалението играе роля в етиопатогенезата на болестта. Друга гледна точка представя хипералгезията като възможна причина за ниско-степенното повишение на CRP при пациенти с OA. Тя сама по себе си може да доведе до повишени нива на острофазовия реактант [253]. Пациенти, които вербално изразяват по-нисък болков праг към експериментално дразнене реагират със значително по-висок възпалителен отговор към болката [253].

Във връзка с проследяване на прогресията, изходните и крайните нива на CRP и тяхната промяна във времето не предоставиха ценна информация за прогресията в клиничните или структурните характеристики на пациентите с ГоА. Според мета-анализ от 2010 от всички разгледани студия, изследващи асоциацията на CRP с прогресията на OA, липсват категорични данни, които свързват този възпалителен показател с прогнозата на ГоА [250].

Coll 2-1. Серумните нива на изследвания биомаркер не се различаваха между болни и здрави индивиди. Те не корелираха нито с интензитета на болката, тежестта, физическата функция и инвалидизацията, нито със структурните промени, оценени чрез рентгенография и МРТ. Нивата на Coll 2-1 не показаха връзка с останалите изследвани серумни биомаркери, в това число – CRP, COMP и MMP-3. Тези резултати са в противовес на докладваните от Deberg и Henrotin, и техните колективи [87-89]. Това несъответствие може да се обясни с малкия брой пациенти, които бяха изследвани в настоящото проучване, както и с различните китове, които бяха използвани. Нивата на Coll2-1 по време на началната визита не отразяваха нито клиничното подобрене, нито структурната прогресия в изследваните групи.

Хрущялен олигомерен матриксен протеин (COMP). Деструкцията на хиалинния хрущял е една от основните характеристики на артрозната болест и логично серумните нива на разградните продукти на ставния хрущял като COMP да се увеличават при пациенти с ГоА и напреднали структурни промени [254]. MMP-3 е важен ефектор на хрущялния метаболизъм и затова неговата корелация с COMP не е изненадваща. Серумните нива на COMP могат да бъдат полезни в диагностиката на ГоА и за отграничаването на пациенти от здрави индивиди.

Докладваните стойности за диференциация на серумния COMP в настоящото проучване (717,5 ng/ml) се доближават до тези, съобщени от Singh и колеги [95], но се различават значимо от установените в изследване на екип, оглавяван от Awadallah [96]. Последният установява, че нива на COMP равни или по-високи от 1097,5 ng/ml (чувствителност 87,7%) отграничават в добра степен болни с рентгенографски дефинираната ГоА (KL \geq 2) от болни с механична болка в коляното без рентгенографски промени. При стойности над 1290 ng/ml те докладват, че се постига 100% специфичност при чувствителност от 65,7%. Авторите на проучването пледират за използването на COMP като скринингов метод за

диагностициране на пациенти с ГоА от пациенти с други причини за болка в коляното. Нашите данни показваха, че нито един от здравите пациенти нямаше по-високи нива от 1185 ng/ml, със сравнително ниска чувствителност от 33,9%. Вариабилността на тези стойности отдаваме на различния подбор на пациенти, заложен в дизайна на проучванията. В представеното от нас проучване сравняваме пациенти с ГоА, изпълващи критериите на ACR, със здрави индивиди, докато Awadallah и сътрудници сравняват пациенти с дефинитивни рентгенографски данни за ГоА (KL ≥ 2) и без (KL ≤ 1) [96]. В нашата кохорта серумните нива на COMP се различаваха значимо между пациентите с KL I и KL II/III.

Освен рентгенографската прогресия COMP отразява в добра степен и магнитно-резонансната находка, оценена чрез полуколичествена скала WORMS. Този резултат потвърждава твърдението на Bruyere, който установява също статистически значима връзка между серумните нива на COMP и WORMS [93]. Допълнителната верификация на тези резултати в по-големи кохорти може да подпомогне процеса на имплементиране на COMP и други биомаркери в клиничната практика в определени случаи, когато употребата на MPT е ограничена поради нейната висока цена, лимитирана наличност или множество контраиндикации. Следваща стъпка, която предприехме и описахме в резултатите, е корелацията на отделните структурни промени, оценени с MPT и COMP, хвърляйки известна светлина върху енигматичните патогенетични механизми на болестта. Установени чрез магнитно-резонансна томография и оценени чрез WORMS, костно-мозъчните лезии и увредата на хиалинния хрущял корелираха в най-висока степен с нивата на COMP и бяха негови независими предиктори.

Проведеният множествен линеен анализ показва, че серумните нива на COMP могат да бъдат прогнозирани, когато са известни стойностите на костно-мозъчния едем и хрущялната увреда, извлечени след анализ на MPT и оценени чрез полуколичествения скор WORMS, както следва:

$$\text{COMP (ng/ml)} = 279 + 75,5x(\text{BME}) + 21,4x(\text{JC}),$$

където COMP е измерен в ng/ml, а BME и JC са съответно оценката на костно-мозъчния едем и ставния хрущял според магнитно-резонансната полуколичествена система за оценяване WORMS.

Подобно на костно-мозъчния едем при възпалителните ставни заболявания, костно-мозъчните лезии отразяват моментното възпаление при ГоА. Предвид корелацията им с нивата на COMP, нашите данни могат да служат за потвърждение на твърдението, че възпалителният процес в колянната става (в частност субхондралната кост) води до интензивно разграждане на хиалинен хрущял и повишен инфлукс на COMP в серума. Друг биомаркер, също показал завишени стойности при наличие на магнитно-резонансни данни за възпаление на субхондралната кост, е уринарният СТХ-II, метаболит на колаген тип II. Неговите нива корелират с присъствието и степента на костно-мозъчен едем, оценен чрез MPT при пациенти с ГоА [255].

Матриксна металопроотеиназа 3. Серумните нива на MMP-3 отразяваха генерализацията на артрозния процес, изразяваща се в ангажиране на поне още една ставна зона, освен коляното. Полиартикуларната остеоартроза, не само нейната тежест, може да бъде основен фактор, който повлиява серумните концентрации на MMP-3. Въпреки че тази хипотеза не е нова и е изказана за пръв път през далечната 1999 г. от Naito и колеги [256], тя все още остава слабо проучена. Тъй като MMP-3 се секретира от хондроцитите и синовиалните клетки, неговите серумни нива кореспондират със степента и площта на засегнатата синовиална и хрущялна тъкан.

Биомаркерите на ставна увреда като MMP-3 могат да носят потенциално важна информация за бъдещите структурни промени при пациенти с ОА. В изследваната група, нивата на MMP-3 се асоциираха и бяха независим предиктор за прогресията на структурните увреди, оценени чрез промяната в общата WORMS оценка. Бинарна логистична регресия показва, че при пациенти със серумни нива на ензима над 60 ng/ml шансът за прогресия на хрущялната увреда на медиалния регион на тибιο-

феморалната става е увеличен с над 6 пъти след период от 12 месеца. Отделно всяко покачване на MMP-3 с 1 ng/ml увеличи вероятността за влошаване на хрущялната увреда с 4%. Тези резултати не зависеха от проведеното лечение и/или от генерализацията на артрозната болест. Въз основа на тези данни бе построена ROC крива, която определи стойност от 40,8 като гранична между прогресори и непрогресори.

Доколкото ни е известно, към днешна дата това е първото проспективно проучване, което установява връзка между нивата на MMP-3 и последващата магнитно-резонансната прогресия на хрущялната увреда при пациенти с ОА. Връзката между нивата на MMP-3 и структурните промени предполага, че този биомаркер може да се използва като сурогатен показател в клиничните проучвания на болест-модифициращи средства, които протектират ставния хрущял.

Връзка между рентгенографската прогресия и нивата на MMP-3 не бе установена и вероятна причина за това е краткият период на проследяване. През 2005 г. Lohmander и сътрудници докладват, че концентрацията на MMP-3 може да предскаже рентгенографското намаляване на ставната междина, отчетено за период от 30 месеца [257].

Серумните концентрации на MMP-3 се свързват с прогресията на структурните увреди и при заболявания като анкилозиращ спондилит и ревматоиден артрит [258, 259].

5.3. Образни проучвания върху пациенти с гонартроза

Рентгенографията представлява „златен“ стандарт в диагностиката на ГоА и отправна точка за стратификация на групите в представеното проучване. Въпреки това то притежава редица недостатъци, описани по-подробно в първата глава. Най-важният от тях, в контекста на настоящото изследване, е ниската чувствителност към промени на ставните структури, реализирани за кратък период от време. Ето защо ние бяхме длъжни да

включим в дизайна на проучването метод с по-висока чувствителност в лицето на МРТ, с цел проследяване на тъканните промени.

Рентгенография. Оценката по KL корелираше с болката, болестната активност, тежестта и качеството на живот. От *таблица 4.1* се вижда ясно разликата в медианите на клиничните характеристики на болните в отделните рентгенографски групи. Най-осезаемо различие изглежда, че има в качеството на живот. Медианата на пациентите в KLI стадий на ГоА е 0,5, което ги определя като болни с предимно лека към умерена степен на инвалидизация, докато в групата на пациентите с KLIII медианата на HAQ-DI е 1 – стойност отговаряща на умерена към тежка инвалидизация.

Рентгенографска прогресия се наблюдава в общо 7 болни в четирите терапевтични групи на дванадесетия месец от началото на проследяването. Статистическа разлика между групите не се установи. Възможно е това да се дължи на ниската честота на това събитие в групите, респективно 8,7%, 12%, 4% и 3,8% в I, II, III и IV група, и малкия брой участници.

Магнитно-резонансна томография. Използването на МРТ и извлечените посредством разчитането ѝ данни са се превърнали в задължителна част от методологията на клиничните изпитвания при пациенти с ГоА [260]. Литературни данни показват, че полуколичествената оценка на магнитно-резонансната находка при ГоА е валиден и надежден метод, който подпомага изследователите в по-доброто разбиране на естествения ход на комплексната природа на болестта и в селектирането и оценката на потенциално нови терапевтични средства в клиничните изпитвания [260-262]. Съществуват няколко надеждни полуколичествени оценъчни системи, които са валидирани в големи, многоцентрови, крос-секционни и лонгитудинални, епидемиологични и интервенционални проучвания [14-16]. В представеното проучване предпочетохме да използваме предложения от Peterfy полуколичествен скор за магнитно-резонансна оценка на колянната става – WORMS [14]. Методът се отличава с предоставяне на по-точна информация за пространствените

взаимодействия между различните структурни промени при гонартроза в сравнение с останалите полуколичествени оценъчни системи, поради относително по-големия брой включени ставни повърхности и по-голямата площ оценена субхондрална кост [263].

Нашите резултати показват, че костно-мозъчните лезии са свързани както с най-важния симптом при ОА – болката ($p = 0,002$), така и с цялостната болестна активност (общия WOMAC скор) ($p = 0,006$) и сковаността, оценена отново чрез WOMAC индекса ($p = 0,001$). Връзката между костно-мозъчните лезии и нивата на болка не може напълно да бъде обяснена със съпътстващи фактори като тежест на рентгенографската прогресия и наличието на излив [264]. Ето защо резултатите потвърждават, че костно-мозъчните лезии при ГоА допринасят за появата на болка при болните. В друга статия по темата Arnoldi и колеги съобщават, че пациентите с ГоА и придружаваща болкова симптоматика често имат повишено налягане в костната структура поради слабия венозен дренаж от костния мозък [265]. Такива пациенти имат положителна сцинтиграфска находка при използване на радиофармацевтик като технециев (^{99m}Tc) станипирофосфат – находка, която силно корелира с костно-мозъчния едем на МРТ [266].

Данни от по-нови проучвания показват, че не само интензитета, но и честотата във флукуацията на болката е асоциирана със синовита и костно-мозъчния едем, като последният е по-силен предиктор за настъпване на болка в коляното [266, 267]. Подобренето на костно-мозъчните лезии е било асоциирани с намален риск за рецидив на болката, а при наличие все пак на такъв, болката е била с по-нисък интензитет [267]. При хистологични срезове се оказва, че костните участъци, в които се визуализира костно-мозъчни лезии от МРТ, съответстват на зони с костно-мозъчен едем, некроза или фиброза, но могат да бъдат и нормална тъкан [268].

Освен костно-мозъчните лезии, според изведените данни в *таблица 4.5* на настоящото проучване, загубата на хрущял, остеофитозата и синовитът или ставният излив също корелират с болката. Възпалението на

синовиалната мембрана по презумпция се асоциира с възпалителните ставни заболявания, но в последните години се доказва, че ниско-степенното възпаление е неизменна част от патогенетичните механизми на ОА. Пролиферацията на синовията и разграничаването ѝ от ставния излив може най-акуратно да се прецизира чрез контрастно усилване с гадолиний, което би подобрила визуализацията на възпалението [266, 269].

По-доброто разбиране на магнитно-резонансните характеристики на ОА и асоциацията им с болката ще внесе голяма доза яснота върху точните патогенетични механизми на болестта, а в дългосрочен план ще допринесе за разработването на лечение, което да таргетира точния субстрат на болката [269]. Една от задачите на представеното от нас лонгитудинално проучване е именно да проследи структурните промени при оболени пациенти за период от 1 година.

Въпреки че ГоА често има инвалидизиращ и необратим ход, в представеното проучване прогресия в хрущялната увреда за период от една година е установена едва в около 1/5 от пациентите, а средната промяна в WORMS е едва 1 единица. Сред независимите предиктори за хрущялна увреда в медиалния тибιο-ферморален регион бяха ИТМ и нивата на MMP-3. Тъй като по-горе се обсъдиха обстойно нивата на MMP-3 като независим предиктор, тук ще се спрем по-подробно на наднорменото тегло (респективно затлъстяването). Всяко нарастване на ИТМ с 1 kg/m^2 , води до увеличаване на шанса за прогресия с 20,8%. Тъй като по-голяма хрущялна загуба при пациенти с висок ИТМ е бил докладван и в други публикувани проучвания [270-274], тя бе очаквана от нас. За съжаление обаче употребата единствено на ИТМ като мярка за телесна композиция не предоставя адекватна информация за връзката между затлъстяването и ОА, тъй като ИТМ отразява количествено както мастната, така и мускулната маса. Още повече отношението между килограмите и височината в метри² не притежава информативна стойност по отношение на метаболитната среда, характерна за индивида, или нивата на адипоцитокени, които вероятно допринасят за

прогресията на ГоА [275]. В бъдеще е необходимо да се обърне специално внимание на адипоцитокините, метаболитните фактори и механичния стрес като компоненти на затлъстяването, за да разширим нашия периметър на мислене относно потенциалните таргети за превенция и интервенция при ГоА [276].

В първата терапевтична група (перорален глюкозамин сулфат) наблюдавахме влошаване на хиалинния хрущял в медиалния компартмент при 30% от пациентите. За същия период прогресия в останалите групи е наблюдавана съответно в 20%, 20% и 7,7% от болните в II, III и IV група. Макар и статистически несигнификантна, тази разлика в групите поражда идеята, че терапията с PRP може да бъде хондропротективна, защото едва при двама души е установена прогресия в хрущялната увреда в медиалната част на тибιο-феморалната става. Трябва да отбележим също, че и двамата пациенти бяха със затлъстяване с нива на ИТМ 30,28 и 35,16 kg/m², а както вече установихме, високият ИТМ се асоциира с по-агресивен ход на болестта. В латералния регион на тибιο-феморалната става, където увредите по правило се наблюдават по-рядко, пропорцията на прогресорите бе сходна в терапевтичните групи.

5.4. Сравнение между терапевтичните групи

Ефективност на терапията. Пероралният прием на глюкозамин сулфат за минимален период от девет месеца в рамките на една година и еднократно приложената кръстосаносвързана високомолекулна хиалууронова киселина за период от една година, макар и различни концептуално, имаха статистически сходни нива на подобрение на заложените клинични параметри в края на периода на проследяване. Подобрението на болката е съответно 13,2% и 17,3% от изходните й стойности. Въпреки че проведеното лечение във втората група показва малко по-добри резултати в нивата на болката, болестната активност и тежест, качеството на живот в края на първата година от проследяването, те не

достигнаха статистически значимост. От фармако-икономическа гледна точка двата коренно различни типа лечение имаха подобна финансова тежест за пациентите, но придържането към терапията се различаваше значимо. Все пак ефектът върху симптомите след инжектирането на ХК настъпва много по-бързо и се задържа във времето. Разбира се, в индивидуалния подбор на подходяща терапия в реалната клинична практика се вземат под внимание и други фактори, като свързаните с вътреставното инжектиране болка и последващ дискомфорт.

Третата група пациенти, при които е инжектирана двукратно през период от 6 месеца кръстосаносвързана високомолекулна хиалуронова киселина, е по-добре клинично повлияна в края на първата година в сравнение с първите две групи. Въпреки че например подобрението в болката е почти двойно по-голямо в третата група в сравнение с втората (съответно 17,7% и 33%), не се установи статистически значима разлика между двете групи. Вземайки под внимание обаче пропорцията на пациентите с минимално клинично значимо подобрение в болката и болестната активност (*Таблица 4.14*), разликата в двете групи е статистически сигнификантна.

Четвъртата група представляваше специален интерес за нас. Тя се отличаваше също със статистически по-значимо подобрение в клиничните характеристики в сравнение с първата и втората групи. Анализирайки количествената промяна в клиничните параметри на дванадесетия месец в хода на терапията, ние не установихме сигнификантна разлика, но можем да заключим, че терапията с два курса от по три инжекции с PRP е поне толкова ефективна, колкото терапията с двукратно инжектиране на ХК. В отчитане на пропорцията пациенти, постигнали минимално клинично значимо подобрение за болестна активност и изпълнили обединените критерии за отговор към терапията, се отчете сигнификантна разлика между III и IV група. При всички случаи провеждането на два курса през 6 месеца PRP е поне толкова ефективно, колкото е двукратното инжектиране на

кръстосаносвързана високомолекулна хиалуронова киселина през 6 месеца за период от една година.

По отношение на структурните промени можем само да предположим известна хондропротективна роля на лечението с PRP, която следва да се потвърди в по-големи кохорти. Halpern и колеги, използвайки количествен метод за определяне на хрущялната увреда, наблюдават прогресия в нея в 27% от пациентите, лекувани с PRP за период от 1 година [275]. Проучването не може пряко да бъде съпоставено с изложеното, поради различните режими на PRP, използвани в тях, и различията в методите на отчитане на хрущялна увреда. „Интензифицираният“ режим на PRP, който ние предлагаме, получен след двойно центрофугиране, вероятно притежава различен потенциал за повлияване на хрущялната увреда. Голям брой теории са предложени за обяснение на механизмите, по които богатата на тромбоцити плазма може да забави хрущялната увреда. Пролиферация на автоложни хондрцити и мезенхимни стволови клетки е демонстрирана след излагане на PRP в ин витро условия [278]. Повишената секреция на ендогенна хиалуронова киселина (вискоиндукция) е също описана в присъствието на плазма богата на тромбоцити [279].

Комплайънс към терапията. Комплайънс (compliance) е понятие, което дефинира степента, в която поведението на пациента съответства на препоръките на лекаря относно приема на лекарството. Сериозен проблем се оказва придържането към терапията при проследената група пациенти с глюкозамин сулфат, при която близо 1/4 отпаднаха поради лош комплайънс за период от 1 година. Лошият комплайънс към терапията е характерна особеност на пероралните режими на лечение при остеоартроза с т.нар. симптоматичните бавнодействащи средства за OA (SYSADOA), тъй като част от пациентите имат негативна перцепция за даденото им лечение и изпитват чувство на „безнадеждност“ във връзка с развитието на ГоА, което може да намали техния комплайънс и да доведе до търсене на алтернативни средства [280].

Безопасност на терапията. И трите вида терапии се очертаха като безопасни, като описаните странични реакции при вътреставните инжекции бяха самоограничаващи се. Към страничните реакции не отчетохме съпътстващите болка и дискомфорт при интраартикуларните приложения на ХК и PRP. Като основен недостатък се отчете по-големият брой инжекции, които бяха заложили по протокол в групата с PRP – общо 6 за периода на проследяване 1 година. Те обаче се извършваха с игла с по-малък лумен от иглата, с която бе инжектирана високомолекулната хиалуронова киселина, което водеше до по-ниска степен на травматичност при манипулациите.

Тъй като PRP се приготвя чрез центрифугиране на автоложна кръв, всякакъв риск от алергични реакции и пренос на трансмисивни заболявания е елиминиран. Към днешна дата липсват данни, че PRP може да индуцира хиперплазия, канцерогенеза или туморен растеж [281].

Описаните странични реакции след вътреставно приложение на богата на тромбоцити плазма бяха самоограничаващи се в рамките на 24 часа след вътреставната манипулация. Те доведоха до транзитно влошаване на болковата симптоматика, съпътствана с оток, и трябва да се разглеждат в контекста на направените в проучването 156 инжекции с автоложна богата на тромбоцити плазма. Подобни странични реакции са описани в част от студията, изследващи безопасността на вътреставното инжектиране на PRP в колянната става [282-284], и бяха очаквани събития.

6. Изводи

1. Серумните нива на COMP в най-добра степен отразяват структурните промени, оценени чрез рентгенография и MPT.
2. Определените посредством ROC криви прагови стойности на серумен COMP могат да послужат като клинично референтен индикатор за разграничаване на болни с ГоА от здрави индивиди, а на серумен MMP-3 – за разграничаване на пациентите с генерализирана ОА от тези с изолирана ГоА.
3. В сравнение с останалите изследвани биомаркери, CRP в най-добра степен отразява болката, болестната активност и тежест.
4. Лечението с PRP се отличава с по-голяма ефективност по отношение на едногодишното подобрене в болката, сковаността, болестната активност и тежест спрямо лечението с перорален глюкозамин сулфат и с еднократна инжекция на кръстосаносвързана високомолекулна хиалуронова киселина.
5. Провеждането на два курса с PRP през 6 месеца е със съпоставима или по-голяма ефективност по отношение на облекчаване на симптомите болка и скованост, оценени в края на първата година, в сравнение с двукратното инжектиране на кръстосаносвързана високомолекулна хиалуронова киселина през 6 месеца.
6. По отношение на относителния дял на пациентите, отговорили на терапията, PRP превъзхожда останалите терапевтични режими.
7. Структурната прогресия на хрущялната увреда не зависи от избора на терапия, а от изходните нива на MMP-3 и ИТМ.
8. Лечението с глюкозамин сулфат се отличава с по-лош комплайънс в сравнение с вътреставните терапевтични средства.
9. Лечението с PRP притежава добър профил на безопасност, като наблюдаваните странични реакции са леки и самоограничаващи се.

7. Приноси

Методични

1. За пръв път в ревматологичната практика у нас са приложени препоръчаните от международната експертна група OARSI средства за оценка на болката, болестната активност, физическата функция, рентгенографската и магнитно-резонансната структурна увреда.
2. За пръв път в българска популация бе използван полуколичествен метод за оценка на магнитно-резонансните структурни промени на цялото коляно при болни с ГоА.

Научно-приложни

1. За пръв път в българската популация са изследвани циркулиращите биомаркери COMP, MMP-3 и Coll2-1, отразяващи ставната ремоделация, и е установена връзката им с генерализацията на артрозната болест и редица образни показатели.
2. Установени са независими предиктори за прогресия на хрущялната увреда в лицето на повишените нива на MMP-3 и индекса на телесна маса при болни с гонартроза.
3. За пръв път в българската популация е предложен и изследван режим на лечение с 2 курса по 3 вътреставни инжекции на вътреставна богата на тромбоцити плазма за период от 1 година, като същевременно бе доказана неговата ефективност за облекчаване на болката и сковаността, за подобряване на физическата функция и за понижаване на болестната активност и тежест при пациенти с ГоА.

Научно-теоретични

1. Формулирани са рисковите фактори, повлияващи постигането на минимално клинично значимо подобрене на болката и болестната

активност и отговор на терапията според OARSI-OMERACT критериите.

С потвърдителен характер

1. Определена е чувствителността и специфичността на праговите стойности на COMP и MMP-3 за диференциация на болни от здрави индивиди.

Библиография

1. McAlindon TE, Cooper C, Kirwan JR, Dieppe PA . Knee pain and disability in the community. *Br J Rheumatol* . 1992;31:189–192.;
2. Nuesch E, Dieppe P, Reichenbach S, et al.; All cause and disease specific mortality in patients with knee or hip osteoarthritis: population based cohort study. *BMJ* . 2011;342:d1165;
3. Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA, et al. Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Ann Intern Med*. 2000;133(8):635–46.;
4. Oliveria SA, Felson DT, Reed JL, et al. Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization. *Arthritis Rheum* 1995;38:1134–41.
5. Weiss JM, Noble PC, Condit MA, et al. . What functional activities are important to patients with knee replacements? *Clin Orthop Relat Res* . 2002;404:172–188.
6. Andrianakos AA, Kontelis LK, Karamitsos DG, et al.; ESORDIG Study Group. Prevalence of symptomatic knee, hand, and hip osteoarthritis in Greece. The ESORDIG study. *J Rheumatol* 2006;33:2507–13.,
7. Peat G, McCarney R, Croft P. Knee pain and osteoarthritis in older adults: a review of community burden and current use of primary health care.
8. Kellgren JH, Lawrence JS . Radiological assessment of osteo-arthritis. *Ann Rheum Dis* . 1957;16:494–502.
9. Zhang W, Doherty M, Peat G, et al. . EULAR evidence-based recommendations for the diagnosis of knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* . 2010;69:483–489.
10. Neogi T, Felson DT, Niu J, et al. . Association between radiographic features of knee osteoarthritis and pain: results from two cohort studies. *BMJ* . 2009;339:b2844.,
11. Bedson J, Croft PR . The discordance between clinical and radiographic knee osteoarthritis: a systematic search and summary of the literature. *BMC Musculoskelet Disord* . 2008;9:116.
12. Bedson J, Croft PR . The discordance between clinical and radiographic knee osteoarthritis: a systematic search and summary of the literature. *BMC Musculoskelet Disord* . 2008;9:116.
13. Hart DJ, Spector TD, Brown P, Wilson P, Doyle DV, Silman AJ (1991) Clinical signs of early osteoarthritis: reproducibility and relation to x ray changes in 541 women in the general population. *Annals of the Rheumatic Diseases* 50(7): 467-470.
14. Peterfy, C. G., et al. "Whole-organ magnetic resonance imaging score (WORMS) of the knee in osteoarthritis." *Osteoarthritis and Cartilage* 12.3 (2004): 177-190.
15. Hunter, David J., et al. "The reliability of a new scoring system for knee osteoarthritis MRI and the validity of bone marrow lesion assessment: BLOKS (Boston–Leeds Osteoarthritis Knee Score)." *Annals of the rheumatic diseases* 67.2 (2008): 206-211.
16. Hunter, David J., et al. "Evolution of semi-quantitative whole joint assessment of knee OA: MOAKS (MRI Osteoarthritis Knee Score)." *Osteoarthritis and cartilage* 19.8 (2011): 990-1002.
17. Kraus VB, Burnett B, Coindreau J et al (2011) Application of biomarkers in the development of drugs intended for the treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 19(5): 515-542.
18. Dennison E, Cooper C: Osteoarthritis: epidemiology and classification, in Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS (eds). *Rheumatology Two*. Philadelphia, PA, Elsevier Ltd, 2003, pp 1781–91
19. Evans CH: Novel biological approaches to the intraarticular treatment of osteoarthritis. *BioDrugs*2005;19:355–62
20. Leitner, G. C., et al. "Platelet content and growth factor release in platelet-rich plasma: a comparison of four different systems." *Vox sanguinis* 91.2 (2006): 135-139.
21. Amable, Paola Romina, et al. "Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors." *Stem cell research & therapy* 4.3 (2013): 67.
22. *Developments in Osteoarthritis*, Paul Dieppe, *Rheumatology*. 2011;50(2):245- 247
23. National, Clinical Guideline Centre UK. "Osteoarthritis: care and management in adults." (2014).
24. Herndon JH, Davidson SM, Apazidis A: Recent socioeconomic trends in orthopaedic practice, *J Bone Joint Surg Am*, 2001 83-A(7):1097–1105.
25. Dillon CF, Rasch EK, Gu Q, Hirsch R . Prevalence of knee osteoarthritis in the United States: arthritis data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey 1991–94. *J Rheumatol* . 2006;33:2271–2279.
26. Jordan, Joanne M., et al. "Prevalence of knee symptoms and radiographic and symptomatic knee osteoarthritis in African Americans and Caucasians: the Johnston County Osteoarthritis Project." *The Journal of rheumatology* 34.1 (2007): 172-180.
27. Paule. Di Cesare, Dominik R. Haudenschild, Jonathan Samuels, Steveb Abramson In: Firestein GS, Budd RC, Gabriel SE,

- et al, eds. *Kelley's Textbook of Rheumatology*. 9th ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier;2012.
28. М. Панчовска-Мочева, М. Иванова и Р. Стоилов. Новости в патогенезата на остеоартрозата, *Ревматология* 20.4 (2012)
 29. Р. Шумналиева, С. Монов, Зл. Коларов и Р. Рашков. Остеоартроза или остеоартрит, *Ревматология* 21.1 (2013)
 30. Grogan SP, Miyaki S, Asahara H, et al: Mesenchymal progenitor cell markers in human articular cartilage: normal distribution and changes in osteoarthritis, *Arthritis Res Ther*, 2009 11(3):R85.
 31. Hunziker E: Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage, *Osteoarthritis Cartil*, 2002 10(7):564–572.
 32. Goldring MB, Goldring SR: Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis, *Ann N Y Acad Sci*, 2010 1192(1):230–237.
 33. Abramson S, Krasnokutsky S: Biomarkers in osteoarthritis, *Bull Hosp Jt Dis*, 2006 64(1-2):77–81.
 34. Goldring, Mary B., and Steven R. Goldring. "Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1192.1 (2010): 230-237.
 35. Bruyere, Olivier, et al. "Biochemical markers of bone and cartilage remodeling in prediction of longterm progression of knee osteoarthritis." *The Journal of rheumatology* 30.5 (2003): 1043-1050.
 36. Inerot S, Heinegard D, Audell L, Olsson SE: Articular-cartilage proteoglycans in aging and osteoarthritis, *Biochem J*, 1978 169(1):143–156.
 37. Huser, Camille AM, and M. Elisabeth Davies. "Validation of an in vitro single-impact load model of the initiation of osteoarthritis-like changes in articular cartilage." *Journal of Orthopaedic Research* 24.4 (2006): 725-732.
 38. Millward-Sadler, S. J., et al. "Altered electrophysiological responses to mechanical stimulation and abnormal signalling through $\alpha 5 \beta 1$ integrin in chondrocytes from osteoarthritic cartilage." *Osteoarthritis and cartilage* 8.4 (2000): 272-278.
 39. Appleton, C. Thomas G., et al. "Rho/ROCK and MEK/ERK activation by transforming growth factor- α induces articular cartilage degradation." *Laboratory Investigation* 90.1 (2010): 20-30.
 40. S. H. Hassanali, et al. OSTEOARTHRITIS: A LOOK AT PATHOPHYSIOLOGY AND APPROACH TO NEW TREATMENTS: A REVIEW. *East African Orthopaedic Journal*, 2011.
 41. Neu CP, Reddi AH, Komvopoulos K, et al: Increased friction coefficient and superficial zone protein expression in patients with advanced osteoarthritis, *Arthritis Rheum*, 2010 62(9):2680–2687.
 42. Hlavacek M: The role of synovial fluid filtration by cartilage in lubrication of synovial joints—IV. Squeeze-film lubrication: the central film thickness for normal and inflammatory synovial fluids for axial symmetry under high loading conditions, *J Biomech*, 1995 28(10):1199–1205.
 43. Hlavacek M, Novak J: The role of synovial fluid filtration by cartilage in lubrication of synovial joints—III. Squeeze-film lubrication: axial symmetry under low loading conditions, *J Biomech*, 1995 28(10):1193–1198.
 44. Hlavacek M: Squeeze-film lubrication of the human ankle joint with synovial fluid filtrated by articular cartilage with the superficial zone worn out, *J Biomech*, 2000 33(11):1415–1422.
 45. Krasnokutsky, S., et al. "Current concepts in the pathogenesis of osteoarthritis." *Osteoarthritis and Cartilage* 16 (2008): S1-S3.
 46. Stannus O, Jones G, Cicuttini F, et al: Circulating levels of IL-6 and TNFalpha are associated with knee radiographic osteoarthritis and knee cartilage loss in older adults, *Osteoarthritis Cartil* , 2010 18(11):1441–1447.
 47. Kapoor, Mohit, et al. "Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis." *Nature Reviews Rheumatology* 7.1 (2011): 33-42.
 48. Marcu KB, Otero M, Olivotto E, et al: NF-kappaB signaling: multiple angles to target OA, *Curr Drug, 2010 Targets* 11(5):599–613.
 49. Martel-Pelletier J, Alaaeddine N, Pelletier JP: Cytokines and their role in the pathophysiology of osteoarthritis, *Front Biosci*, 1999 4:D694–703.
 50. Attur MG, Dave M, Cippolletta C, et al: Reversal of autocrine and paracrine effects of interleukin 1 (IL-1) in human arthritis by type II IL-1 decoy receptor. Potential for pharmacological intervention, *J Biol Chem*, 2000 275(51):40307–40315.
 51. Kevorkian L, Young DA, Darrah C, et al: Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage, *Arthritis Rheum*, 2004 50(1):131–141.
 52. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB: Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets, *Arthritis Rheum*, 2001 44(6):1237–1247.
 53. Amin AR, Di Cesare PE, Vyas P, et al: The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase, *J Exp Med*, 1995 182(6):2097–2102.
 54. Abramson SB, Attur M, Amin AR, Clancy R: Nitric oxide and inflammatory mediators in the perpetuation of osteoarthritis, *Curr Rheumatol Rep*, 2001 3(6):535–541.
 55. Hirai Y, Migita K, Honda S, et al: Effects of nitric oxide on matrix metalloproteinase-2 production by rheumatoid synovial cells,
-

- Life Sci, 2001 68(8):913–920.
56. Hardy, Medora M., et al. "Cyclooxygenase 2-dependent prostaglandin E2 modulates cartilage proteoglycan degradation in human osteoarthritis explants." *Arthritis & Rheumatology* 46.7 (2002): 1789-1803.
 57. Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP: The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology, *Biorheology*. 2002;39(1-2):237-46
 58. Chen, Guiqian, Chuxia Deng, and Yi-Ping Li. "TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation." *International journal of biological sciences* 8.2 (2012): 272.
 59. Anderson, Jennifer J., and David T. Felson. "Factors associated with osteoarthritis of the knee in the first national Health and Nutrition Examination Survey (HANES I) evidence for an association with overweight, race, and physical demands of work." *American journal of epidemiology* 128.1 (1988): 179-189.
 60. Peat, G., R. McCarney, and P. Croft. "Knee pain and osteoarthritis in older adults: a review of community burden and current use of primary health care." *Annals of the rheumatic diseases* 60.2 (2001): 91-97.
 61. Hochberg. *Rheumatology*, Sixth Edition. Elsevier, 2015.
 62. McAlindon, Tim, et al. "Changes in barometric pressure and ambient temperature influence osteoarthritis pain." *The American journal of medicine* 120.5 (2007): 429-434.
 63. Altman R et al. Classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum*. 1986;29:1039-1049.
 64. Stucki, Gerold, et al. "Comparison of the WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities) osteoarthritis index and a self-report format of the self-administered Lequesne–Algofunctional index in patients with knee and hip osteoarthritis." *Osteoarthritis and cartilage* 6.2 (1998): 79-86.,
 65. Dieppe P. Therapeutic targets in osteoarthritis. *J Rheumatol* 1995;22(suppl. 43):136–9. 2.
 66. Bellamy N. Outcome measurement in osteoarthritis clinical trials. *J Rheumatol* 1995;22(suppl. 43):49–51.
 67. Lequesne M. ILAR guidelines for testing slow acting drugs in osteoarthritis (SYSADOAs). *Rev Esp Rheumatol* 1993;20(suppl. 1):220–1.
 68. Bellamy N. WOMAC Osteoarthritis Index. A user's guide. University of Western Ontario, London, Ontario, Canada, 1995
 69. Theiler R, Brooks P, Ghosh P. Clinical, biochemical and imaging methods of assessing osteoarthritis and clinical trials with agents claiming chondromodulating activity. *Osteoarthritis and Cartilage* 1994;2:1–23.
 70. Hawker G, Melfi C, Paul J, Green R, Bombardier C. Comparison of a generic (SF-36) and a disease specific (WOMAC) instrument in the measurement of outcomes after knee replacement surgery. *J Rheumatol* 1995;22:1193–6.
 71. Altman, Roy, et al. "Design and conduct of clinical trials in patients with osteoarthritis: Recommendations from a task force of the Osteoarthritis Research Society: Results from a workshop." *Osteoarthritis and Cartilage* 4.4 (1996): 217-243.
 72. Lequesne M, Samson M, Ge´rard P, Me´ry C. Indices algo-fonctionnels pour le suivi des arthroses de la hanche et du genou. *Rev Rhumatisme* 1990;57:32–6.
 73. Lequesne M. Indices of severity and disease activity for osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum* 1991;20(suppl. 2):48–54.
 74. Lequesne M, Me´ry C, Samson M, Ge´rard P. Indexes of severity for osteoarthritis of the hip and knee. *Scand J Rheumatol* 1987;65(suppl):85–9.
 75. Bellamy N, Buchanan WW. A preliminary evaluation of the dimensionality and clinical importance of pain and disability in osteoarthritis of the hip and knee. *Clin Rheumatol* 1986;5:231–41. 12.
 76. Bellamy N, Buchanan WW, Goldsmith CH, Campbell J, Stitt LW. Validation study of WOMAC: A health status instrument for measuring clinically important patient relevant outcomes to antirheumatic drug therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee. *J Rheumatol* 1988;15:1833–40.
 77. Faucher, M., et al. "Algo-functional assessment of knee osteoarthritis: comparison of the test–retest reliability and construct validity of the WOMAC and Lequesne indexes." *Osteoarthritis and cartilage* 10.8 (2002): 602-610.
 78. D.L. Patrick, R.A. Deyo, Generic and disease-specific measures in assessing health status and quality of life, *Med Care*, 27 (1989), pp. S217-S232
 79. Bruce, Bonnie, and James F. Fries. "The Stanford Health Assessment Questionnaire: a review of its history, issues, progress, and documentation." *The Journal of rheumatology* 30.1 (2003): 167-178.
 80. Felson, David T., et al. "The American College of Rheumatology preliminary core set of disease activity measures for rheumatoid arthritis clinical trials." *Arthritis & Rheumatology* 36.6 (1993): 729-740.
 81. Kittelson, Andrew J., et al. "Future directions in painful knee osteoarthritis: harnessing complexity in a heterogeneous population." *Physical therapy* 94.3 (2014): 422-432.
 82. Atkinson AJ, Colburn WA, DeGruttola VG, et al. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69:89–95
 83. BAUER, D. C., et al. Classification of osteoarthritis biomarkers: a proposed approach. *Osteoarthritis and cartilage*, 2006, 14.8: 723-727.
-

84. Charni-Ben Tabassi N, Garnero P. Monitoring cartilage turnover. *Current Rheumatol Rep.* 2007;9(1):16–24.
85. van Spil WE, DeGroot J, Lems WF, Oostveen JC, Lafeber FP. Serum and urinary biochemical markers for knee and hip-osteoarthritis: a systematic review applying the consensus BIPED criteria. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010;18(5):605–612.
86. Elsaid KA, Chichester CO. Review: Collagen markers in early arthritic diseases. *Clin Chim Acta.* 2006;365(1–2):68–77.
87. Henrotin Y, Conrozier T, Deberg M, Walliser-Lohse A, Richette P, Mulleman D et al (2013) Early decrease of serum biomarkers of type II collagen degradation (Coll2-1) and joint inflammation (Coll2-1 NO2) by hyaluronic acid intra-articular injections in patients with knee osteoarthritis: A research study part of the Biovisco study. *Journal of Orthopaedic Research* 31(6): 901-907.
88. M.A. Deberg, A.H. Labasse, J. Collette, L. Seidel, J.Y. Reginster, Y.E. Henrotin (2005) One-year increase of Coll 2-1, a new marker of type II collagen degradation, in urine is highly predictive of radiological OA progression. *Osteoarthritis Cartilage* 13: 1059-1065
89. Deberg M, Labasse A, Christgau S, Cloos P et al (2005) New serum biochemical markers (Coll 2-1 and Coll 2-1 NO 2) for studying oxidative-related type II collagen network degradation in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis and cartilage* 13(3): 258-265.
90. Smith RKW, Heinegård D (2000) Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) levels in digital sheath synovial fluid and serum with tendon injury. *Equine veterinary journal* 32(1): 52-58.
91. Bauer DC, Hunter DJ, Abramson SB et al (2006) Classification of osteoarthritis biomarkers: a proposed approach. *Osteoarthritis and Cartilage* 14(8): 723-727.
92. Rousseau JC, Garnero P (2012) Biological markers in osteoarthritis. *Bone* 51(2): 265-277.
93. Bruyere O, Collette J, Kothari M, et al (2006) Osteoarthritis, magnetic resonance imaging, and biochemical markers: a one year prospective study *Annals of the Rheumatic Diseases* 65: 1050-1054.
94. Vilim V, Olejarova M, Macháček S, Gatterova J, Kraus VB, Pavelka K (2002) Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) correlate with radiographic progression of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage* 10(9): 707-713.
95. Singh S, Shahi U, Kumar D, Shahi NT (2014) Serum Cartilage Oligomeric Matrix Protein: Tool for early diagnosis and grading of severity of primary knee osteoarthritis. *Int J Osteol Orthop* 1: 1-7.
96. Awadallah AM, Gehan HS, Tarek MK (2010) Serum level of cartilage oligomeric matrix protein as a screening modality for osteoarthritis among knee joint pain patients. *Journal of American Science* 6(12).
97. Clark AG, Jordan JM, Vilim V, Renner JB, Dragomir AD, Luta G, Kraus VB (1999) Serum cartilage oligomeric matrix protein reflects osteoarthritis presence and severity: the Johnston County Osteoarthritis Project. *Arthritis & Rheumatology* 42(11): 2356-2364
98. Huang K, Wu LD. Aggrecanase and aggrecan degradation in osteoarthritis: a review. *J Int Med Res.* 2008;36(6):1149–1160.
99. Swearingen CA, Carpenter JW, Siegel R, et al. Development of a novel clinical biomarker assay to detect and quantify aggrecanase-generated aggrecan fragments in human synovial fluid, serum and urine. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010;18(9):1150–1158.
100. Ribbens CY, Porras MM, Franchimont N et al (2002) Increased matrix metalloproteinase-3 serum levels in rheumatic diseases: relationship with synovitis and steroid treatment. *Annals of the rheumatic diseases* 61(2): 161-166.
101. Kopchev A, Monov S, Kyurkchiev D, Ivanova I, Georgiev T (2017) Vascular endothelial growth factor (VEGF), cartilage oligomeric protein (COMP) and matrix metalloproteinase 3 (MMP-3) as serum biomarkers in psoriatic arthritis. *International Journal of Pharmaceutical Science Invention.* 6(7): 08-12
102. Connelly AE, Tucker AJ, Kott LS, Duncan AM, Wright AJ (2014) Serum biochemical markers of joint metabolism and inflammation in relation to clinical symptoms and physical function in adults with symptomatic knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 22: S66.
103. Li W, Du C, Wang H, Zhang C (2014). Increased serum ADAMTS-4 in knee osteoarthritis: a potential indicator for the diagnosis of osteoarthritis in early stages. *Genet Mol Res* 13(4): 9642-9.
104. Pelletier J, Raynaud J, Caron J, Mineau F, Abram F, Dorais M et al (2010) Decrease in serum level of matrix metalloproteinases is predictive of the disease-modifying effect of osteoarthritis drugs assessed by quantitative MRI in patients with knee osteoarthritis *Annals of the Rheumatic Diseases* 69(12): 2095-2101
105. Garnero P, Rousseau JC, Delmas PD. Molecular basis and clinical use of biochemical markers of bone, cartilage, and synovium in joint diseases. *Arthritis Rheum.* 2000;43(5):953–968.
106. Berry PA, Maciewicz RA, Cicuttini FM, Jones MD, Hellowell CJ, Wluka AE. Markers of bone formation and resorption identify subgroups of patients with clinical knee osteoarthritis who have reduced rates of cartilage loss. *J Rheumatol.* 2010;37(6):1252–1259.
107. T.D. Spector, F. Cicuttini, J. Baker, J. Loughlin, D. Hart, Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study, *BMJ*, 312 (1996), pp. 940-943

108. Zhai G, Hart DJ, Kato BS, Sharma L, Spector TD. Genetic contribution to knee radiographic osteoarthritis and knee alignment: a classical twin study. *Arthritis Rheum.* 2006;54(Suppl 9):S512.
109. Valdes AM, Spector TD, Tamm A, et al. Genetic variation in the SMAD3 gene is associated with hip and knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2010;62(8):2347–2352.
110. Jones SW, Watkins G, Le Good N, et al. The identification of differentially expressed microRNA in osteoarthritic tissue that modulate the production of TNF-alpha and MMP13. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009;17(4):464–472.
111. Yamasaki K, Nakasa T, Miyaki S, et al. Expression of MicroRNA-146a in osteoarthritis cartilage. *Arthritis Rheum.* 2009;60(4):1035–1041.
112. Murata K, Yoshitomi H, Tanida S, et al. Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(3):R86.
113. Velasquez MT, Katz JD. Osteoarthritis: another component of metabolic syndrome? *Metab Syndr Relat Disord.* 2010;8(4):295–305.
114. Williamson MP, Humm G, Crisp AJ. 1H nuclear magnetic resonance investigation of synovial fluid components in osteoarthritis, rheumatoid arthritis and traumatic effusions. *Br J Rheumatol.* 1989;28(1):
115. Lamers RJ, van Nesselrooij JH, Kraus VB, et al. Identification of an urinary metabolite profile associated with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005;13(9):762–768.
116. Lotz, M., J. Martel-Pelletier, C. Christiansen, M. L. Brandi, O. Bruyère, R. Chapurlat, J. Collette et al. "Value of biomarkers in osteoarthritis: current status and perspectives." *Annals of the rheumatic diseases* 72, no. 11 (2013): 1756-1763.
117. Miller ME, Rejeski WJ, Messier SP et al (2001) Modifiers of change in physical functioning in older adults with knee pain: the Observational Arthritis Study in Seniors (OASIS). *Arthritis Rheum.* 45: 331–339.
118. Bedson J, Croft PR (2008) The discordance between clinical and radiographic knee osteoarthritis: a systematic search and summary of the literature. *BMC musculoskeletal disorders* 9:116.
119. Carrillon, Y. "Imaging knee osteoarthritis." *Osteoarthritis of the Knee.* Springer Paris, 2008. 3-14.
120. Duddy J, Kirwan JR, Szebenyi B, Clarke S, Granell R, Volkov S. A comparison of the semiflexed (MTP) view with the standing extended view (SEV) in the radiographic assessment of knee osteoarthritis in a busy routine X-ray department. *Rheumatology.* 2004;44(3):349–514
121. Piperno M, Hellio Le Graverand MP, Conrozier T, Bochu M, Mathieu P, Vignon E. Quantitative evaluation of joint space width in femorotibial osteoarthritis: comparison of three radiographic views. *J Osteoarth Cartilage.* 1998;6:252–9.
122. Vignon E, Piperno M, Hellio Le Graverand MP, Mazzuca SA, Brandt KD, Mathieu P, Favret H, Vignon M, Merle-Vincent F, Conrozier T. Measurement of radiographic joint space width in the tibiofemoral compartment of the osteoarthritic knee. *Arthritis Rheum.* 2003;48(2):378–84.
123. Niinimäki, Tuukka, et al. The standing fixed flexion view detects narrowing of the joint space better than the standing extended view in patients with moderate osteoarthritis of the knee. *Acta orthopaedica* 81.3 (2010): 344-346.
124. Messieh SS, Fowler PJ, Munro T. Anteroposterior radiographs of the osteoarthritic knee. *J Bone Joint Surg Br* 1990;72(4):639–640
125. Le Graverand, MP Hellio, et al. "Head-to-head comparison of the Lyon Schuss and fixed flexion radiographic techniques. Long-term reproducibility in normal knees and sensitivity to change in osteoarthritic knees." *Annals of the rheumatic diseases* 67.11 (2008): 1562-1566.
126. LaValley, Michael P., et al. "The lateral view radiograph for assessment of the tibiofemoral joint space in knee osteoarthritis: its reliability, sensitivity to change, and longitudinal validity." *Arthritis & Rheumatism* 52.11 (2005): 3542-3547.
127. Vignon E. Radiographic issues in imaging the progression of hip and knee osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl* 2004;70:36–44
128. Altman, Roy D., and G. E. Gold. "Atlas of individual radiographic features in osteoarthritis, revised." *Osteoarthritis and cartilage* 15 (2007): A1-A56.
129. Culvenor, Adam G., et al. "Defining the presence of radiographic knee osteoarthritis: a comparison between the Kellgren and Lawrence system and OARSI atlas criteria." *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 23.12 (2015): 3532-3539.
130. Conrozier T, Lequesne M, Favret H, et al.. Measurement of the radiological hip joint space width. An evaluation of various methods of measurement. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9(3):281–286.
131. Altman R, Asch E, Bloch D, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum.* 1986;29:1039-1049.
132. Adams, J. G., et al. "Contribution of meniscal extrusion and cartilage loss to joint space narrowing in osteoarthritis." *Clinical radiology* 54.8 (1999): 502-506.
133. Kinds, M. B., et al. "Influence of variation in semiflexed knee positioning during image acquisition on separate quantitative radiographic parameters of osteoarthritis, measured by Knee Images Digital Analysis." *Osteoarthritis and Cartilage* 20.9

- (2012): 997-1003.
134. Vande Berg BC, Lecouvet FE, Poilvache P, et al. Assessment of knee cartilage in cadavers with dual-detector spiral CT arthrography and MR imaging. *Radiology*. 2002;222:430-436.
 135. Guermazi, A., F. W. Roemer, and H. K. Genant. "Role of imaging in osteoarthritis: diagnosis, prognosis, and follow-up." *Medicographia* 35 (2013): 164-171.
 136. Guermazi, Ali, et al. "Imaging of osteoarthritis." *Rheumatic Disease Clinics of North America* 39.1 (2013): 67-105.
 137. Hunter, D. J., et al. "Responsiveness and reliability of MRI in knee osteoarthritis: a meta-analysis of published evidence." *Osteoarthritis and cartilage* 19.5 (2011): 589-605.
 138. F. Eckstein, F. Cicuttini, J.P. Raynauld, J.C. Waterton, C. Peterfy Magnetic resonance imaging (MRI) of articular cartilage in knee osteoarthritis (OA): morphological assessment *Osteoarthritis Cartilage*, 14 (Suppl A) (2006), pp. A46-A75
 139. F. Eckstein, T. Mosher, D. Hunter Imaging of knee osteoarthritis: data beyond the beauty *Curr Opin Rheumatol*, 19 (5) (2007), pp. 435-443
 140. D. Burstein, M.L. Gray Is MRI fulfilling its promise for molecular imaging of cartilage in arthritis? *Osteoarthritis Cartilage*, 14 (11) (2006), pp. 1087-1090
 141. Jordan, K. M., et al. "EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT)." *Annals of the rheumatic diseases* 62.12 (2003): 1145-1155.
 142. M.C. Hochberg, R.D. Altman, K.T. April, et al. American College of Rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 64 (2012), pp. 465-474 CrossRefView Record in Scopus
 143. W. Zhang, M. Doherty, N. Arden, et al. EULAR evidence based recommendations for the management of hip osteoarthritis: report of a task force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT) *Ann Rheum Dis*, 64 (2005), pp. 669-681 CrossRefView Record in Scopus
 144. W. Zhang, R.W. Moskowitz, G. Nuki, et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines *Osteoarthritis Cartilage*, 16 (2008), pp. 137-162 ArticlePDF (454KB)View Record in Scopus
 145. W. Zhang, R.W. Moskowitz, G. Nuki, et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis. Part I: Critical appraisal of existing treatment guidelines and systematic review of current research evidence *Osteoarthritis Cartilage*, 15 (2007), pp. 981-1000 ArticlePDF (336KB)View Record in Scopus
 146. W. Zhang, G. Nuki, R.W. Moskowitz, et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis. Part III: changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009 *Osteoarthritis Cartilage*, 18 (2010), pp. 476-499 ArticlePDF (374KB)View Record in Scopus
 147. Osteoarthritis: A Serious Disease, in White Paper Submitted to the U.S. Food and Drug Administration 2016, Pre Competitive Consortium for Osteoarthritis Osteoarthritis Research Society International: https://www.oarsi.org/sites/default/files/docs/2016/oarsi_white_paper_oa_serious_disease_121416_1.pdf.
 148. Setnikar, I., & Rovati, L. C. (2001). Absorption, distribution, metabolism and excretion of glucosamine sulfate. A review. *Arzneimittelforschung* 51, 699–725.
 149. Caccia, S., Casartelli, M., Grimaldi, A., Losa, E., de Eguileor, M., Pennacchio, F., et al. (2007). Unexpected similarity of intestinal sugar absorption by SGLT1 and apical GLUT2 in an insect (*Aphidius ervi*, Hymenoptera) and mammals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292, R2284–R2291
 150. Ibrahim, A., Gilzad-kohan, M. H., Aghazadeh-Habashi, A., & Jamali, F. (2012). Absorption and bioavailability of glucosamine in the rat. *J Pharm Sci* 101, 2574–2583.
 151. Anderson, J. W., Nicolosi, R. J., & Borzelleca, J. F. (2005). Glucosamine effects in humans: A review of effects on glucose metabolism, side effects, safety considerations and efficacy. *Food Chem Toxicol* 43, 187–201.
 152. Largo, R., Alvarez-Soria, M.A., Diez-Ortego, I., Calvo, E., Sanchez-Pernaute, O., Egido, J., et al. (2003). Glucosamine inhibits IL-1beta-induced NFkappaB activation in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 11, 290–298.;
 153. Lin, Y. C., Liang, Y. C., Sheu, M. T., Hsieh, M. S., Chen, T. F., & Chen, C. H. (2008). Chondroprotective effects of glucosamine involving the p38 MAPK and Akt signaling pathways. *Rheumatol Int* 28, 1009–1016.
 154. Uitterlinden, E. J., Jahr, H., Koevoet, J. L., Jenniskens, Y. M., Bierma-Zeinstra, S. M. Degroot, J., et al. (2006). Glucosamine decreases expression of anabolic and catabolic genes in human osteoarthritic cartilage explants. *Osteoarthritis Cartilage* 14, 250–257.
 155. S. Wandel, P. Juni, B. Tendal, et al. Effects of glucosamine, chondroitin, or placebo in patients with osteoarthritis of hip or knee: network meta-analysis *Br Med J*, 341 (2010), p. c4675
 156. Y.H. Lee, J.H. Woo, S.J. Choi, et al. Effect of glucosamine or chondroitin sulfate on the osteoarthritis progression: a meta-

- analysis *Rheumatol Int*, 30 (2010), pp. 357-363
157. Henrotin, Yves, Marc Marty, and Ali Mobasheri. "What is the current status of chondroitin sulfate and glucosamine for the treatment of knee osteoarthritis?" *Maturitas* 78.3 (2014): 184-187.
 158. O. Bruyere, K. Pavelka, L.C. Rovati, et al. Total joint replacement after glucosamine sulphate treatment in knee osteoarthritis: results of a mean 8-year observation of patients from two previous 3-year, randomised, placebo-controlled trials *Osteoarthritis Cartilage*, 16 (2008), pp. 254-260
 159. D. Clegg, D. Reda, C. Harris, et al. Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis *N Engl J Med*, 354 (2006), pp. 795-808
 160. D. Wu, Y. Huang, Y. Gu, W. Fan Efficacies of different preparations of glucosamine for the treatment of osteoarthritis: a meta-analysis of randomised, double-blind, placebo-controlled trials *Int J Clin Pract*, 67 (2013), pp. 585-594
 161. K. Meyer, JW Palmer; The polysaccharide of the vitreous humor. *J. Biol. Chem.*, 107 (1934), pp. 629–634.
 162. Balazs, Endre A., Torvard C. Laurent, and Roger W. Jeanloz. "Nomenclature of hyaluronic acid." *Biochemical Journal* 235.3 (1986): 903.
 163. Toole, Bryan P. "Hyaluronan promotes the malignant phenotype." *Glycobiology* 12.3 (2002): 37R-42R.
 164. Entwistle, Joycelyn, Christine L. Hall, and Eva A. Turley. "HA receptors: regulators of signalling to the cytoskeleton." *Journal of cellular biochemistry* 61.4 (1996): 569-577.
 165. Stern, Robert. "Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway." *European journal of cell biology* 83.7 (2004): 317-325.
 166. Solte´s L, Mendichi R, Kogan G, Schiller J, Stankovska´ M, Arnhold J (2006) Degradative action of reactive oxygen species on hyaluronan. *Biomacromolecules* 7:659–668
 167. Balazs, Endre A., and JANET L. Denlinger. "Viscosupplementation: a new concept in the treatment of osteoarthritis." *The Journal of rheumatology. Supplement* 39 (1993): 3-9.
 168. Comer JS, Kincaid SA, Baird AN, Kammermann JR, Hanson RR, Jr, Ogawa Y. Immunolocalization of stromelysin, tumor necrosis factor (TNF) alpha, and TNF receptors in atrophied canine articular cartilage treated with hyaluronic acid and transforming growth factor beta. *Am J Vet Res.* 1996;57:1488–1496.
 169. Fukuda, K., et al. "Hyaluronic acid inhibits interleukin-1-induced superoxide anion in bovine chondrocytes." *Inflammation Research* 46.3 (1997): 114-117.
 170. Smith MM, Ghosh P. The synthesis of hyaluronic acid by human synovial fibroblasts is influenced by the nature of the hyaluronate in the extracellular environment. *Rheumatol Int.* 1987;7:113–122.
 171. Ishida O, Tanaka Y, Morimoto I, Takigawa M, Eto S. Chondrocytes are regulated by cellular adhesion through CD44 and hyaluronic acid pathway. *J Bone Miner Res.* 1997;12:1657–1663.
 172. Knudson W, Loeser RF. CD44 and integrin matrix receptors participate in cartilage homeostasis. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59:36–44.
 173. Chow G, Niefeld JJ, Knudson CB, Knudson W. Antisense inhibition of chondrocyte CD44 expression leading to cartilage chondrolysis. *Arthritis Rheum.* 1998;41:1411–1419.
 174. Aihara, S., et al. "[Effects of sodium hyaluronate on the nociceptive response of rats with experimentally induced arthritis]." *Nihon yakurigaku zasshi. Folia pharmacologica Japonica* 100.4 (1992): 359-365.
 175. Belmonte C, Pozo MA, Balazs EA. Modulation by hyaluronan and its derivatives (hylans) of sensory nerve activity signaling articular pain. In: Laurent T, editor. *In Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and Its Derivatives Proceedings of the Wenner-Gren Foundation International Symposium*. London: Portland Press; 1998. 205–217
 176. Moore AR, Willoughby DA. Hyaluronan as a drug delivery system for diclofenac: a hypothesis for mode of action. *Int J Tissue React.* 1995;17:153–156.
 177. Kawasaki K, Ochi M, Uchio Y, Adachi N, Matsusaki M. Hyaluronic acid enhances proliferation and chondroitin sulfate synthesis in cultured chondrocytes embedded in collagen gels. *J Cell Physiol.* 1999;179:142–148.
 178. Ghosh P, Holbert C, Read R, Armstrong S. Hyaluronic acid (hyaluronan) in experimental osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl.* 1995;43:155–157.
 179. Balazs EA, Darzynkiewicz Z. The effect of hyaluronic acid on fibroblasts, mononuclear phagocytes and lymphocytes. *Biology and Fibroblasts.* 1973;66:237–252.
 180. Peluso GF, Perbellini A, Tajana GF. The effect of high and low molecular weight hyaluronic acid on mitogen-induced lymphocyte proliferation. *Curr Ther Res.* 1990;47:437–443.
 181. Synvisc-One Difference. Cambridge, MA: Genzyme Corp; 2010.
 182. Pavelka K, Uebelhart D. Efficacy evaluation of highly purified intra-articular hyaluronic acid (Sinovial((R))) vs hylan G-F20 (Synvisc((R))) in the treatment of symptomatic knee osteoarthritis. A double-blind, controlled, randomized, parallel-group non-inferiority study. *Osteoarthritis Cartilage* 2011; 19(11):1294-300.
 183. Milas M, Rinaudo M, Roure I, Al-Assaf S, Phillips GO, Williams PA. Comparative rheological behavior of hyaluronan from

- bacterial and animal sources with cross-linked hyaluronan (hylan) in aqueous solution. *Biopolymers*. 2001;59(4):191-204.
184. Ghosh P, Guidolin D. Potential mechanism of action of intra-articular hyaluronan therapy in osteoarthritis: are the effects molecular weight dependent? *Semin Arthritis Rheum*. 2002;32(1):10-37.
 185. Juni P, Reichenbach S, Trelle S et al. Efficacy and safety of intraarticular hylan or hyaluronic acids for osteoarthritis of the knee: a randomized controlled trial. *Arthritis Rheum* 2007; 56(11):3610-9.
 186. Rutjes AW, Juni P, da Costa BR et al. Viscosupplementation for osteoarthritis of the knee: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 2012; 157(3):180-91.
 187. Hochberg, Marc C., et al. "American College of Rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee." *Arthritis care & research* 64.4 (2012): 465-474.
 188. Jordan, K. M., et al. "EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT)." *Annals of the rheumatic diseases* 62.12 (2003): 1145-1155.
 189. Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. *Osteoarthritis Cartilage* 2008; 16(2):137-62.
 190. American Academy of Orthopaedic Surgeons, *Treatment of Osteoarthritis of the Knee*, 2nd edition, Summary of recommendations (2008)
 191. Dhurat, Rachita, and M. S. Sukesh. "Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: a review and author's perspective." *Journal of cutaneous and aesthetic surgery* 7.4 (2014): 189
 192. Graziani et al. The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clin Oral Implants Res*. 2006 Apr;17(2):212-9
 193. Hall, Michael P., et al. "Platelet-rich plasma: current concepts and application in sports medicine." *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 17.10 (2009): 602-608.
 194. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost*. 2004; 91(1):4-15.
 195. Anitua E, Andia I, Sanchez M, et al. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Orthop Res*. 2005; 23(2):281-286.
 196. Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, et al. Reciprocal actions of platelet-secreted TGF-beta1 on the production of VEGF and HGF by human tendon cells. *Plast Reconstr Surg*. 2007; 119(3):950-959.
 197. Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, et al. Autologous fibrin matrices: a potential source of biological mediators that modulate tendon cell activities. *J Biomed Mater Res A*. 2006; 77(2):285-293.
 198. Aspenberg P. Stimulation of tendon repair: mechanical loading, GDFs and platelets. A mini-review. *Int Orthop*. 2007; 31(6):783-789.
 199. Yu S, Wang Y, Dong Q. Platelet-rich plasma and its applications in orthopedics field [in Chinese]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2008; 22(7):880-883.
 200. Zhang Y, Zeng B, Zhang C, Yuan T. Effects of platelet-rich plasma on proliferation and osteogenic activity of marrow mesenchymal stem cells in vitro [in Chinese]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2005; 19(2):109-113.
 201. Marx, Robert E. "Platelet-rich plasma: evidence to support its use." *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 62.4 (2004): 489-496.
 202. Wojdasiewicz, Piotr, Łukasz A. Poniatowski, and Dariusz Szukiewicz. "The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis." *Mediators of inflammation* 2014 (2014).
 203. Sundman, Emily A., et al. "The anti-inflammatory and matrix restorative mechanisms of platelet-rich plasma in osteoarthritis." *The American journal of sports medicine* 42.1 (2014): 35-41.
 204. Wu, Jian, et al. "Platelet-rich plasma inhibits Wnt/ β -catenin signaling in rabbit cartilage cells activated by IL-1 β ." *International Immunopharmacology* 55 (2018): 282-289.
 205. Kon, Elizaveta, et al. "Platelet-rich plasma: intra-articular knee injections produced favorable results on degenerative cartilage lesions." *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 18.4 (2010): 472-479.
 206. Smith, Patrick A. "Intra-articular autologous conditioned plasma injections provide safe and efficacious treatment for knee osteoarthritis An FDA-sanctioned, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial." *The American journal of sports medicine* (2016): 0363546515624678.
 207. Filardo, Giuseppe, et al. "Platelet-rich plasma vs hyaluronic acid to treat knee degenerative pathology: study design and preliminary results of a randomized controlled trial." *BMC musculoskeletal disorders* 13.1 (2012): 229.
 208. Riboh, Jonathan C., et al. "Effect of leukocyte concentration on the efficacy of platelet-rich plasma in the treatment of knee osteoarthritis." *The American journal of sports medicine* 44.3 (2016): 792-800.
 209. Riboh, Jonathan C., et al. "Effect of leukocyte concentration on the efficacy of platelet-rich plasma in the treatment of knee
-

- osteoarthritis." *The American journal of sports medicine* 44.3 (2016): 792-800.
210. Mariani, Erminia, et al. "Leukocyte-rich platelet-rich plasma injections do not up-modulate intra-articular pro-inflammatory cytokines in the osteoarthritic knee." *PloS one* 11.6 (2016): e0156137.
 211. Virchenko, Olena, and Per Aspenberg. "How can one platelet injection after tendon injury lead to a stronger tendon after 4 weeks?: Interplay between early regeneration and mechanical stimulation." *Acta orthopaedica* 77.5 (2006): 806-812.
 212. Шейтанов, Йордан. Остеоартроза. София, 1996, 127 с. ISBN 954-8627-16-7
 213. Пехливанов, Димитър. Възможности и място на комплексното изследване в диагностиката на остеоартрозата и ревматоидния артрит: Дисертация за присъждане на научна степен "Доктор на медицинските науки". София, 1981
 214. Pham, T., et al. "OMERACT-OARSI initiative: Osteoarthritis Research Society International set of responder criteria for osteoarthritis clinical trials revisited." *Osteoarthritis and Cartilage* 12.5 (2004): 389-399.
 215. Tubach, Florence, et al. "Evaluation of clinically relevant changes in patient reported outcomes in knee and hip osteoarthritis: the minimal clinically important improvement." *Annals of the rheumatic diseases* 64.1 (2005): 29-33.
 216. Schiphof D, Boers M, Bierma-Zeinstra SM (2008) Differences in descriptions of Kellgren and Lawrence grades of knee osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 67(7): 1034-1036.
 217. Hunter, D. J., et al. "OARSI clinical trials recommendations: knee imaging in clinical trials in osteoarthritis." *Osteoarthritis and cartilage* 23.5 (2015): 698-715.
 218. Felson DT, Naimark A, Anderson J, Kazis L, Castelli W, Meenan RF (1987) The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis & Rheumatology* 30(8): 914-918.
 219. Anderson, Shane A, Richard FL (2010) Why is osteoarthritis an age-related disease? *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 24(1): 15-26.
 220. Srikanth, Velandai K., et al. "A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis." *Osteoarthritis and cartilage* 13.9 (2005): 769-781.
 221. Moreno, Raquel, et al. "Platelet-rich plasma: updating of extraction devices." *Farmacia hospitalaria: organo oficial de expresion cientifica de la Sociedad Espanola de Farmacia Hospitalaria* 40.5 (2016): 385-393
 222. Arendt-Nielsen, Lars, et al. "Sensitization in patients with painful knee osteoarthritis." *Pain* 149.3 (2010): 573-581.
 223. Finan, Patrick H., et al. "Discordance between pain and radiographic severity in knee osteoarthritis: findings from quantitative sensory testing of central sensitization." *Arthritis & Rheumatology* 65.2 (2013): 363-372.
 224. Bartley, Emily J., et al. "Enhanced pain sensitivity among individuals with symptomatic knee osteoarthritis: potential sex differences in central sensitization." *Arthritis care & research* 68.4 (2016): 472-480.
 225. Perrot, Serge, et al. "Correlates of pain intensity in men and women with hip and knee osteoarthritis. Results of a national survey: The French ARTHRIX study." *The Clinical journal of pain* 25.9 (2009): 767-772.
 226. Cimmino M, Sarzi-Puttini P, Scarpa R, et al. Clinical presentation of osteoarthritis in general practice: determinants of pain in Italian patients in the AMICA Study. *Semin Arthritis Rheum.* 2005;35(suppl 1):17-23.
 227. Paradowski PT, Bergman S, Sundén-Lundius A, et al. Knee complaints vary with age and gender in the adult population. Population-based reference data for the Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS). *BMC Musculoskelet Disord.* 2006;2:7-38
 228. Fillingim B. Sex, gender and pain: women and men really are different. *Curr Rev Pain.* 2000;4:24-30.
 229. Bolognese, J. A., T. J. Schnitzer, and E. W. Ehrich. "Response relationship of VAS and Likert scales in osteoarthritis efficacy measurement." *Osteoarthritis and cartilage* 11.7 (2003): 499-507.
 230. Hawker, Gillian A., et al. "Measures of adult pain: Visual analog scale for pain (vas pain), numeric rating scale for pain (nrs pain), mcgill pain questionnaire (mpq), short-form mcgill pain questionnaire (sf-mpq), chronic pain grade scale (cpgs), short form-36 bodily pain scale (sf-36 bps), and measure of intermittent and constant osteoarthritis pain (icoap)." *Arthritis care & research* 63.S11 (2011).
 231. Cole, Brian J., et al. "Hyaluronic acid versus platelet-rich plasma: a prospective, double-blind randomized controlled trial comparing clinical outcomes and effects on intra-articular biology for the treatment of knee osteoarthritis." *The American journal of sports medicine* 45.2 (2017): 339-346.
 232. Cerza F, Carni S, Carcangiu A, et al. Comparison between hyaluronic acid and platelet-rich plasma, intra-articular infiltration in the treatment of gonarthrosis. *Am J Sports Med.* 2012;40(12):2822-2827
 233. Wolfe F. Determinants of WOMAC function, pain and stiffness scores: evidence for the role of low back pain, symptom counts, fatigue and depression in osteoarthritis, rheumatoid arthritis and fibromyalgia. *Rheumatology (Oxford).* 1999;38(4):355-361.
 234. Wolfe F, Kong SX. Rasch analysis of the Western Ontario MacMaster questionnaire (WOMAC) in 2205 patients with osteoarthritis, rheumatoid arthritis, and fibromyalgia. *Ann Rheum Dis.* 1999; 58(9):563-568.
 235. Jolles BM, Bogoch ER. Quality of life after TKA for patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Clin Orthop.* 2008; 466(1):167-178.

236. Ito H, Matsuno T, Hirayama T, Tanino H, Minami A. Health-related quality of life in patients with systemic lupus erythematosus after medium to long-term follow-up of hip arthroplasty. *Lupus*: 2007; 16(5):318-232.
237. Alkan, Berat Meryem, et al. "Quality of life and self-reported disability in patients with knee osteoarthritis." *Modern rheumatology* 24.1 (2014): 166-171.
238. Konstantinidis, Georgios A., et al. "Comparative validation of the WOMAC osteoarthritis and Lequesne algofunctional indices in Greek patients with hip or knee osteoarthritis." *Quality of Life Research* 23.2 (2014): 539-548.
239. F. Tubach, P. Ravaud, E. Martin-Mola et al., "Minimum clinically important improvement and patient acceptable symptom state in pain and function in rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, chronic back pain, hand osteoarthritis, and hip and knee osteoarthritis: results from a prospective multinational study," *Arthritis Care and Research*, vol. 64, no. 11, pp. 1699–1707, 2012.
240. Sadabad, Hassan Niroomand, et al. "Efficacy of Platelet-Rich Plasma versus Hyaluronic Acid for treatment of Knee Osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis." *Electronic physician* 8.3 (2016): 2115.
241. Chang KV, Hung CY, Aliwarga F, Wang TG, Han DS, Chen WS. Comparative effectiveness of platelet-rich plasma injections for treating knee joint cartilage degenerative pathology: a systematic review and meta-analysis. *Arch Phys Med Rehabil*. 2014;95:562–75. doi: 10.1016/j.apmr.2013.11.006
242. White, Daniel K., et al. "Clinically important improvement in function is common in people with or at high risk of knee OA: the MOST study." *The Journal of rheumatology* (2010): jrheum-090989.
243. Atukorala, Inoshi, et al. "Is There a Dose-Response Relationship Between Weight Loss and Symptom Improvement in Persons With Knee Osteoarthritis?." *Arthritis care & research* 68.8 (2016): 1106-1114.
244. Calabro P, Chang DW, Willerson JT, et al. Release of C-reactive protein in response to inflammatory cytokines by human adipocytes: linking obesity to vascular inflammation. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:1112–13.
245. Rifai N, Paul MR (2001) High-sensitivity C-reactive protein: a novel and promising marker of coronary heart disease. *Clinical chemistry* 47(3): 403-411.
246. Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, Eda S et al (2004) C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *New England Journal of Medicine* 350(14): 1387-1397.
247. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW et al (2003) Markers of inflammation and cardiovascular disease. *Circulation* 107(3): 499-511.
248. Spector, T. D., et al. "Low-level increases in serum C-reactive protein are present in early osteoarthritis of the knee and predict progressive disease." *Arthritis & Rheumatology* 40.4 (1997): 723-727.
249. Jin, Xingzhong, et al. "Circulating C reactive protein in osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis." *Annals of the rheumatic diseases* 74.4 (2015): 703-710.
250. Kerkhof, Hanneke JM, et al. "Serum C reactive protein levels and genetic variation in the CRP gene are not associated with the prevalence, incidence or progression of osteoarthritis independent of body mass index." *Annals of the rheumatic diseases* (2010): annrheumdis125260.
251. Pearle AD, Scanzello CR, George S et al (2007) Elevated high-sensitivity C-reactive protein levels are associated with local inflammatory findings in patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 15(5): 516-523.
252. Sowers M, Jannausch M, Stein E, Jamadar D, Hochberg M, Lachance L. C-reactive protein as a biomarker of emergent osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10: 595–601.
253. Lee, Yvonne C., et al. "Pain sensitivity and pain reactivity in osteoarthritis." *Arthritis care & research* 63.3 (2011): 320-327.
254. Verma P, Dalal K (2013) Serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in knee osteoarthritis: a novel diagnostic and prognostic biomarker. *Journal of Orthopaedic Research* 31(7): 999-1006.
255. Garnero P, Peterfy C, Zaim S, Schoenharting M. Bone marrow abnormalities on magnetic resonance imaging are associated with type II collagen degradation in knee osteoarthritis: a three-month longitudinal study. *Arthritis Rheum*. 2005;52:2822–9
256. Naito K, Takahashi M, Kushida K, Suzuki M, Ohishi T, Miura M, Inoue T, Nagano A (1999) Measurement of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in patients with knee osteoarthritis: comparison with generalized osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford, England)* 38(6): 510-515.
257. Lohmander LS et al. (2005) Use of the plasma stromelysin (matrix metalloproteinase 3) concentration to predict joint space narrowing in knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 52: 3160–3167
258. Maksymowych, Walter P., et al. "Serum matrix metalloproteinase 3 is an independent predictor of structural damage progression in patients with ankylosing spondylitis." *Arthritis & Rheumatology* 56.6 (2007): 1846-1853.
259. Houseman M, Potter C, Marshall N et al: Baseline serum MMP-3 levels in patients with Rheumatoid Arthritis are still independently predictive of radiographic progression in a longitudinal observational cohort at 8 years follow up. *Arthritis Research & Therapy* 2012; 14: R30.
260. Roemer, Frank W., et al. "An illustrative overview of semi-quantitative MRI scoring of knee osteoarthritis: lessons learned

- from longitudinal observational studies." *Osteoarthritis and cartilage* 24.2 (2016): 274-289.
261. Hernandez-Molina G, Neogi T, Hunter DJ, Niu J, Guermazi A, Reichenbach S, et al. The association of bone attrition with knee pain and other MRI features of osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2008;67:43–47
 262. Roemer FW, Guermazi A, Javaid MK, Lynch JA, Niu J, Zhang Y, et al. Change in MRI-detected subchondral bone marrow lesions is associated with cartilage loss: the MOST Study A longitudinal multicentre study of knee osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2009;68:1461–1465.
 263. Lynch, John A., et al. "Comparison of BLOKS and WOMBS scoring systems part I. Cross sectional comparison of methods to assess cartilage morphology, meniscal damage and bone marrow lesions on knee MRI: data from the osteoarthritis initiative." *Osteoarthritis and cartilage* 18.11 (2010): 1393-1401.
 264. Felson, David T., et al. "The association of bone marrow lesions with pain in knee osteoarthritis." *Annals of internal medicine* 134.7 (2001): 541-549.
 265. Arnoldi CC, Djurhuus JC, Heerfordt J, Karle A. Intraosseous phlebography, intraosseous pressure measurements and 99mTc-polyphosphate scintigraphy in patients with various painful conditions in the hip and knee. *Acta Orthop Scand*. 1980;51:19-28.
 266. Murphy WA, Hardy DC, Totty WG. Transient osteoporosis: transient bone marrow edema? *Radiology*. 1988;167:757-60.
 267. Zhang, Yuqing, et al. "Fluctuation of knee pain and changes in bone marrow lesions, effusions, and synovitis on magnetic resonance imaging." *Arthritis & Rheumatology* 63.3 (2011): 691-699.
 268. Zanetti M, Bruder E, Romero J, et al. Bone marrow edema pattern in osteoarthritic knees: correlation between MR imaging and histologic findings. *Radiology* 2000; 215 : 835 – 40 .
 269. Yusuf, Erlangga, et al. "Do knee abnormalities visualised on MRI explain knee pain in knee osteoarthritis? A systematic review." *Annals of the rheumatic diseases* (2010): annrhumdis131904.
 270. Raynauld, Pierre, et al. "Quantitative magnetic resonance imaging evaluation of knee osteoarthritis progression over two years and correlation with clinical symptoms and radiologic changes." *Arthritis & Rheumatology* 50.2 (2004): 476-487.
 271. Raynauld, Jean-Pierre, et al. "Long term evaluation of disease progression through the quantitative magnetic resonance imaging of symptomatic knee osteoarthritis patients: correlation with clinical symptoms and radiographic changes." *Arthritis research & therapy* 8.1 (2005): R21
 272. Pelletier, Jean-Pierre, et al. "Risk factors associated with the loss of cartilage volume on weight-bearing areas in knee osteoarthritis patients assessed by quantitative magnetic resonance imaging: a longitudinal study." *Arthritis research & therapy* 9.4 (2007): R74.
 273. Cicuttini, F. M., et al. "Factors affecting knee cartilage volume in healthy men." *Rheumatology* 42.2 (2003): 258-262.
 274. Eckstein, Felix, et al. "One year change of knee cartilage morphology in the first release of participants from the Osteoarthritis Initiative progression subcohort: association with sex, body mass index, symptoms and radiographic osteoarthritis status." *Annals of the rheumatic diseases* 68.5 (2009): 674-679.
 275. Richter, Magdalena, et al. "The role of adipocytokines in the pathogenesis of knee joint osteoarthritis." *International orthopaedics* 39.6 (2015): 1211-1217.
 276. Sowers, MaryFran R., and Carrie A. Karvonen-Gutierrez. "The evolving role of obesity in knee osteoarthritis." *Current opinion in rheumatology* 22.5 (2010): 533.
 277. Halpern, Brian, et al. "Clinical and MRI outcomes after platelet-rich plasma treatment for knee osteoarthritis." *Clinical Journal of Sport Medicine* 23.3 (2013): 238-239.
 278. Drengk A, Zapf A, Sturmer EK, et al. Influence of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation and proliferation of chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs*. 2009;189:317–326
 279. Anitua E, Sanchez M, et al. Platelet-released growth factors enhance the secretion of hyaluronic acid and induce hepatocyte growth factor production by synovial fibroblasts from arthritic patients. *Rheumatology (Oxford)*. 2007;46:1769–1772
 280. Alami, Sophie, et al. "Patients' and practitioners' views of knee osteoarthritis and its management: a qualitative interview study." *PLoS One* 6.5 (2011): e19634.
 281. Dimauro, Ivan, et al. "Platelet-rich plasma and skeletal muscle healing: a molecular analysis of the early phases of the regeneration process in an experimental animal model." *PloS one* 9.7 (2014): e102993.
 282. Spaková, Tímea, et al. "Treatment of knee joint osteoarthritis with autologous platelet-rich plasma in comparison with hyaluronic acid." *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation* 91.5 (2012): 411-417.
 283. Filardo, Giuseppe, et al. "Platelet-rich plasma intra-articular knee injections for the treatment of degenerative cartilage lesions and osteoarthritis." *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 19.4 (2011): 528-535.
 284. Sampson, Steven, et al. "Injection of platelet-rich plasma in patients with primary and secondary knee osteoarthritis: a pilot study." *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation* 89.12 (2010): 961-969.