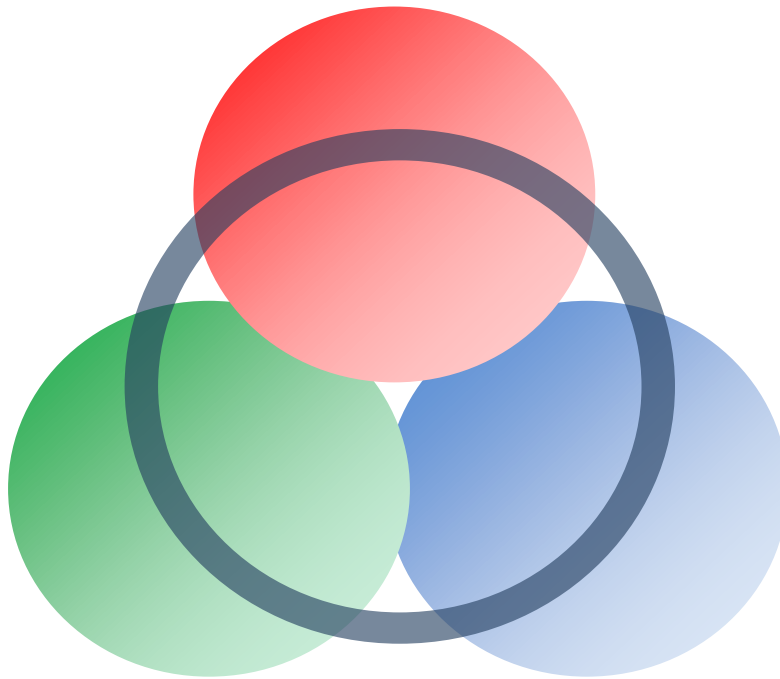


LAURA-CRISTINA RUSU
RAMONA AMINA POPOVICI
MIHAELA-CODRINA LEVAI
CRISTINA MARIA BORȚUN
OANA LOBONȚ



UMFT
Universitatea de
Medicină și Farmacie
„Victor Babeș”
din Timișoara



INTERDISCIPLINARITATEA ÎN CERCETAREA MEDICALĂ



Timișoara, 2015



Editura „Victor Babeș”

Piața Eftimie Murgu 2, cam. 316, 300041 Timișoara

Tel./ Fax 0256 495 210

e-mail: *evb@umft.ro*

www.umft.ro/editura

Director general: Prof. univ. emerit dr. Dan V. Poenaru

Colecția: HIPPOCRATE

Indicativ CNCIS: 324

© 2015 Toate drepturile asupra acestei ediții sunt rezervate.

Reproducerea parțială sau integrală a textului, pe orice suport, fără acordul scris al autorilor este interzisă și se va sancționa conform legilor în vigoare.

ISBN 978-606-8456-71-3

Cuprins

Cuvânt înainte	4
1. MANAGEMENTUL CUNOAȘTERII (KNOWLEDGE MANAGEMENT).....	5
<i>✍ Ramona Amina Popovici</i>	
2. MANAGEMENTUL PROIECTELOR	9
<i>✍ Ramona Amina Popovici</i>	
3. PROIECTELE DE CERCETARE.....	16
<i>✍ Ramona Amina Popovici</i>	
4. TIPURI DE CERCETĂRI	72
<i>✍ Ramona Amina Popovici</i>	
5. MANAGEMENTUL EDUCAȚIONAL ÎN PROMOVAREA SĂNĂTĂȚII.....	81
<i>✍ Ramona Amina Popovici</i>	
6. CERCETAREA CALITATIVĂ.....	129
<i>✍ Ramona Amina Popovici</i>	
7. MEDICINA BAZATĂ PE DOVEZI.....	133
<i>✍ Laura-Cristina Rusu, Andreea Iulia Dobrescu, Maria Puiu, Codrina Mihaela Levai, Cristina-Maria Borțun</i>	
8. GENETICA – de când și până când?.....	149
<i>✍ Laura Rusu, Andreea-Iulia Dobrescu, Maria Puiu</i>	
9. CONSIDERAȚII ASUPRA HETEROGENITĂȚII CLINICO-MORFOLOGICE, IMUNOHISTOCHIMICE ȘI GENETICE A LEZIUNILOR MAMARE MALIGNE	169
<i>✍ Adrian Dumitru, Mircea Tampa, Clara Matei, Simona-Roxana Georgescu, Anca Lăzăroiu, Mariana Costache, Maria Sajin</i>	
10. INSTRUMENTE CLINICE DE CERCETARE ÎN PSORIAZIS	191
<i>✍ Mircea Tampa, Madalina Irina Mitran, Cristina Iulia Mitran, Adrian Dumitru, Clara Matei, Isabela Sarbu, Simona-Roxana Georgescu</i>	
11. DEZVOLTAREA DE TERAPII CELULARE ÎN BOLILE OSTEOARTICULARE: CELULELE STEM..	210
<i>✍ Laura-Cristina Rusu, Simona Sanda Anghel, Florina Maria Bojin, Gabriela Tănăsie</i>	
12. STUDIU EXPERIMENTAL IN VITRO – POTENȚIALUL DE DIFERENȚIERE AL CELULELOR IZOLATE DIN DIFERITE SURSE.....	252
<i>✍ Laura-Cristina Rusu, Simona Sanda Anghel, Florina Maria Bojin, Gabriela Tănăsie</i>	
13. TERAPII CELULARE: STUDIU TERAPEUTIC PE ANIMAL PENTRU INVESTIGAREA EFICIENȚEI TERAPIEI CU CELULE STEM MEZENCHIMALE ÎN BOLILE OSTEOARTICULARE	274
<i>✍ Laura-Cristina Rusu, Simona Sanda Anghel, Florina Maria Bojin, Gabriela Tănăsie</i>	
14. FINANȚAREA CERCETĂRII	288
<i>✍ Laura-Cristina Rusu, Oana Lobonț</i>	

Cuvânt înainte

Interdisciplinaritatea este conceptul cheie al unei cercetări de excelență. Doar echipele multidisciplinare cunosc satisfacția reușitei cercetării la cel mai înalt nivel, cu rezultate excepționale. Cu cât este mai largă plaja domeniilor în care activează membrii unei astfel de echipe, cu atât mai bine sunt acoperite toate aspectele cercetării pe care aceștia o realizează.

Cartea de față își propune să aducă în fața cititorului piesele puzzle-ului unei cercetări de foarte bună calitate, fie că este vorba despre proiecte de cercetare cu toate detaliile lor, sau despre studii de diverse tipuri.

Drepturile de autor aparțin în mod individual autorilor fiecărui capitol din prezenta lucrare.

Fiecare din autorii care au participat la elaborarea acestui manuscris au punctat elementele cheie ale cercetării, în speranța ca tinerele generații vor avea astfel o imagine de ansamblu asupra cercetării și vor fi dornici să guste cât mai repede din pocalul acestui domeniu.

1. MANAGEMENTUL CUNOAȘTERII (KNOWLEDGE MANAGEMENT)

✍ *Ramona Amina Popovici*

1. Necesitatea managementului cunoașterii

Timp de sute de ani, cunoștințele au reprezentat principala sursă a avantajului competitiv pentru numeroase companii. Datele istorice referitoare la cunoștințe datează încă din vremea lui Platon și Aristotel, dar sensul modern de utilizare a acestora este acreditat unor oameni de știință ca: Daniel Bell, Michael Polanyi, Alvin Toffler și Ikujiro Nonaka.

Secolul XXI este secolul în care mediul afacerilor se schimbă rapid. Mediul competițional nu mai este previzibil, ci depinde în întregime de capacitatea organizației de a se adapta la dinamica mediului afacerilor. Modificările apărute în cadrul tehnologiei informației au condus la crearea unor neconcordanțe în accesul și controlul informației și a cunoștințelor.

Managementul cunoașterii (MC) este un model organizațional nou, interdisciplinar și în continuă perfecționare bazat pe cunoștințe. Acesta își are rădăcinile în numeroase discipline inclusiv economie, psihologie și managementul informațiilor. Managementul cunoașterii implică trei factori care se intersectează: oameni (forța de muncă), tehnologie (infrastructura IT) și procese organizaționale, în conformitatea cu modelul organizațional Oameni – Tehnologie – Organizare (OTO).

Managementul cunoștințelor este managementul operațional al procesului de colectare și utilizare a cunoștințelor colective ale unei organizații atât prin intermediul documentelor, a bazelor de date (ceea ce formează cunoștințele explicite) cât și prin intermediul oamenilor (ceea ce formează cunoștințele tacite).

2. Conceptul de cunoștințe

Cunoștințele

Cunoștințele se definesc ca fiind „capacitatea unei persoane de înțelegere a experienței acumulate”. Capacitatea unei persoane de a întreprinde o sarcină este determinată de cunoștințele acelei persoane și de modul în care le utilizează.

De asemenea, valorile și integritatea personală sunt legate de cunoștințele și se referă la modul de percepere, acceptare și interacționare a omului cu mediul.

Inteligența

Inteligența se referă la capacitatea unei persoane de a acumula și aplica cunoștințele. Este capacitatea de îmbunătățire a cunoștințelor, de transformare a cunoștințelor unei persoane în scopul luării celor mai bune decizii. O persoană inteligentă este cea persoană care este capabilă să gândească și să raționeze. Conversia cunoștințelor este în mare parte direct responsabilă pentru eficiența experților de a aplica aceste cunoștințe și pentru capacitatea de a le face explicite. Capacitatea de a înțelege și utiliza limbajul este un alt atribut al inteligenței.

Memoria reprezintă capacitatea de a stoca și reproduce experiențe relevante, fiind de asemenea o parte a inteligenței.

Capacitatea de învățate este o aptitudine care se dobândește prin instruire sau studiu și este o consecință a rezolvării problemelor într-un mod inteligent. Persoanele inteligente învață repede și pot utiliza cunoștințele astfel dobândite într-un mod eficient.

Experiența

Experiența se referă la ceea ce s-a întâmplat în trecut. În limba latină, experiența înseamnă „a testa”. Oamenii care dețin cunoștințe solide într-un domeniu au fost testați prin intermediul experienței. În decursul timpului, cunoștințele se transformă în experiență, acesta fiind acumulată de experți.

3. Date, informații, cunoștințe

Date

Datele sunt fapte neorganizate și neprelucrate referitoare la evenimente. Ele sunt statice, dar este important înțelesul dat de către o persoană evaluării datei respective, devenind ulterior informații. Toate organizațiile au nevoie de date, iar unele companii depind de acestea mai mult decât altele. Acestea se confruntă uneori și cu o cantitate prea mare de date care nu oferă nici un raționament și nici o bază pentru acțiune. De aceea, organizațiile trebuie să decidă asupra naturii și volumului de date necesar pentru crearea informațiilor.

Informații

Cuvântul „*informație*” derivă din „inform”, care înseamnă „a contura”. Deci, informația se referă la conturarea datelor pentru a avea un anumit înțeles în ochii celui ce o percepe.

Informațiile reprezintă o agregare de date cu ajutorul cărora se pot lua decizii mult mai ușor. De asemenea, informațiile se referă și la fapte bazate pe date procesate și formate. Spre deosebire de date, informațiile fac posibilă înțelegerea relațiilor. Acestea au înțeles, scop și relevanță și pot fi organizate, analizate din punct de vedere statistic pentru ca mesajele, rapoartele sau documentele să aibă înțeles. A avea tehnologie informațională performantă nu e o garanție pentru îmbunătățirea informațiilor. Informațiile sunt accesibile angajaților și managerilor prin intermediul rețelelor locale ale companiei, intranet-ului.

Cunoștințe

Cunoștințele sunt cea mai bună soluție pentru complexitate și incertitudine. Ele reprezintă un nivel superior de abstracție care rezidă în mințile oamenilor și sunt un termen mult mai larg, mai bogat și mai greu de colectat. Oamenii caută să dețină cât mai multe cunoștințe deoarece acestea îi ajută să aibă succes în munca lor.

Cunoștințele au numeroase înțelesuri diferite, în funcție de disciplina unde sunt utilizate. În acest caz, cunoștințele se referă la „modul în care oamenii înțeleg un domeniu de activitate specializat care a fost dobândit prin studiu și experiență”.

Informațiile sunt pretutindeni, dar numai o parte a acestora pot fi utilizate în rezolvarea problemelor. De aceea, cunoștințele trebuie asamblate și trebuie să interacționeze cu altele din același domeniu în cadrul aceleiași organizații. Cunoștințele implică interacțiunea oamenilor cu realitatea (cu informațiile sau cu informații referitoare la alte cunoștințe), aceștia devenind subiectul principal. Cunoștințele sunt cele care pot duce la obținerea unor avantaje competiționale în cadrul unei afaceri. Pe de altă parte, informațiile sunt mult mai legate de procesul decizional decât datele.

Instrumentele de luare a deciziilor care structurează informația se numesc **sisteme de suport a deciziilor** (DSS – Decision Support Systems). Acestea ajută la luarea unei decizii în vederea rezolvării unor probleme. Sistemele de suport a deciziilor procesează acel tip de informații necesar în vederea accelerării procesului de luare a deciziei.

Datele sunt materia primă în vederea procesării datelor. Accentul este pus pe partea cantitativă a faptelor capturate. Atunci când datele sunt organizate într-o formă care le dă un înțeles, ele devin *informații*. De aceea, informațiile sunt partea calitativă a faptelor.

Spre deosebire de informație, *cunoștința* reprezintă un grup de informații, procese și experiență care se focalizează pe un subiect particular. Cunoștința este o legătură pe care oamenii o fac între informație și cum aceasta este aplicată în practică într-un domeniu aparte.

Înțelepciunea este cel mai înalt nivel de abstractizare, înglobând viziune, prevedere și abilitatea de a vedea dincolo de orizont. Este cumulara experienței profesionale a unei persoane într-un domeniu de activitate.

Se poate vedea faptul că organizațiile bogate în înțelepciune au numeroase motive să adopte managementul cunoașterii în cadrul infrastructurii lor.

Managementul cunoașterii ajută organizația să treacă la un nou nivel de cantitate, calitate și avantaje competiționale susținute. Spre deosebire de tehnologie care dispare ca urmare a unui avantaj competițional mediu, avantajul cunoașterii e susținut deoarece pe termen lung generează avantaje continue. Pentru a asigura această continuitate, organizațiile trebuie să mențină și să sporească baza lor de cunoștințe.

4. Rolul și importanța managementului cunoașterii

Obiectul principal al managementul cunoștințelor sunt cunoștințele. De aceea, este necesar să se înțeleagă modul de gândire și de învățare al oamenilor. Memoria este o componentă esențială a procesului de învățare. Un aspect interesant referitor la memoria umană este acela că nu pare să ducă lipsă de spațiu de stocare a informațiilor. De asemenea, pe măsură ce oamenii acumulează cât mai multe cunoștințe, ei nu au probleme mari referitoare la apelarea acelor cunoștințe din memorie. Cu alte cuvinte, pe măsură ce oamenii învață lucruri noi, ei le integrează pe acestea alături de celelalte cunoștințe deja deținute, organizându-le în așa fel încât rezultatul să ducă la obținerea unor soluții și decizii în vederea rezolvării anumitor probleme.

Din punct de vedere istoric, organizațiile care nu se pot adapta la schimbările mediului socio-economic nu rezistă în timp. Inteligența umană poate aduce valoare organizației prin crearea unor cunoștințe noi. Un sistem de management al cunoștințelor poate capta aceste noi cunoștințe și le face disponibile într-o nouă formă prin punerea lor în sursa corespunzătoare.

Tehnologia informațiilor trebuie să joace un rol important în cadrul procesului de învățare organizațională și managerială, dar mai ales în cercetare și trebuie să pună accent pe această parte și să o dezvolte.

Atunci când membrii unei organizații colaborează, își comunică ideile și învață, cunoștințele sunt transformate și transferate de la individ la individ, aspect deosebit de important în cercetare. Managerii și-au dat seama că atunci când se practică învățarea organizațională, și ei o susțin, aceasta își pune amprenta într-un mod pozitiv asupra organizației, și mai ales în cele care se face cercetare.

În acest moment, succesul managementului cunoștințelor demonstrează că tehnologia și cultura organizațională pot fi utilizate pentru dezvoltarea cercetării și învățării organizaționale.

Bibliografie selectivă

1. Bibu N. - *Managementul cunoașterii în organizațiile moderne*, Curs Doctoral, Universitatea de Vest, 2006.
2. Bibu N.A., Foltean F. (coord.) - *Managementul organizațiilor publice*. Timișoara: CECMA Partner, 2005.
3. Dănăiață I., Bibu N. A, Mariana Predișcan - *Management. Bazele teoretice*, Ediția a II-a. Timișoara: Mirton, 2004.
4. Elena Sărătean - *Comportament organizațional* – Ed. Univ. de Vest, Timișoara, 2008.
5. Emilia Novac, Denisa Abrudan – *Management* – Timișoara, Editura Mirton, 1999.
6. Pantea I. M., *Analiza strategică – suport al deciziilor investiționale*, Timișoara, Editura Mirton, 2003
7. Predișcan, Mariana - *Schimbarea organizațională. Ce, când și cum să schimbăm?* Timișoara: Editura Universității de Vest, col. „Economica”, 2005.

2. MANAGEMENTUL PROIECTELOR

✍ Ramona Amina Popovici

1. Introducere

Originile conceptului și ale termenului de management:

Munca, activitatea orientată spre (cel puțin) un scop conștient urmărit de către un viețuitor, a devenit, în cadrul speciei umane, principalul motor al creșterii calității vieții și al construcției civilizațiilor. Din momentul în care activitatea deliberată depășește nivelul unui singur scop nemijlocit, presupunând o pluralitate de scopuri considerate ca obiectivare a unor valori pe care mintea umană și le reprezintă în corelație cu diferite paliere ale existenței, se pune problema organizării mijloacelor de a atinge scopurile urmărite și a adecvării acestor mijloace la fiecare scop propus. Experiența multimilenară a speciei umane a dus la constituirea unor reprezentări mentale transmise din generație în generație, prin procesul educației, cu privire la mijloacele și etapele inerente unor procese de muncă vizând diferite scopuri.

Activitatea de descoperire a celor mai adecvați algoritmi de muncă, de luare a deciziilor, de punere constantă în practică a acestora și de control al modului în care proiectele sunt traduse în fapte este veche de când există civilizația. Ea nu a purtat, însă, un *nume distinct* decât în perioada modernă, când a început să devină o *activitate umană distinctă*.

Denumirea de *management*, atribuită acestei activități, are la origine cuvântul italian *maneggiare*, derivat de la *mano* (mână). Semnificația verbului a evoluat de la semnificația specifică de *a prelucra manual* la aceea, mai generală, de *a mânui* (un instrument, o armă), apoi și-a extins sfera de înțeles la *a conduce* (o gospodărie, o afacere, o activitate oarecare). Împrumutat în limba franceză în timpul Renașterii, cuvântul italian a dat naștere verbului *ménager*, cu semnificații apropiate de ale etimonului italian și substantivelor *ménage* (*gospodărie*, prin extensiune *viață în comun*, resp. *viață de familie*) și *manège* (*manej*, loc unde se dresază caii). După scurtă vreme, în climatul cosmopolit al lumii post-renascentiste, elemente din familia de cuvinte apărută în limba franceză au pătruns și în alte limbi, printre care engleza. Astfel a apărut verbul *to manage*, cu sensul de *a dresa un cal*, apoi de *a conduce o gospodărie* și, prin extensiune, *a reuși*. Cuvântul *management* e un substantiv, derivat din verbul *to manage*, având sensul de *organizare și conducere a unei activități*.

Sensuri actuale ale conceptului de management. Definiții:

Managementul ca știință modernă de maximă actualitate, s-a dezvoltat într-un ritm alert, strict în consecință cu nevoile și rigorile impuse de modificările survenite în evoluția societății, preponderent începând cu ultima parte a secolului XIX.

În timp, au existat numeroase opinii în referință la conținutul și sfera de activitate a managementului, prin enunțarea unor definiții particulare sau generale, analitice sau sintetice, toate exprimând în fapt un proces sau o activitate, cu obiect, legitați și principii proprii.

Indiferent de forma de exprimare, esențial este faptul că managementul circumscrie obiectului de activitate maximizarea rezultatelor resurselor alocate, existente la dispoziție sau atrase, concomitent cu eforturile umane utilizate strict în scopul realizării scopurilor propuse.

Richard Draft apreciază că „*managementul presupune atingerea scopurilor organizaționale printr-o conducere efectivă și eficientă ca urmare a planificării, organizării, coordonării și controlului resurselor organizației*”.

Managementul este “procesul de atingere a obiectivelor organizației lucrând cu și prin oameni, precum și a altor resurse ale organizației” (Samuel Certo, 2002). În același sens este și definiția dată de către (Ionescu, Cazan, Negrușă, 2001), potrivit căreia managementul este “procesul de atingere a obiectivelor organizaționale prin angajarea și implicarea celor patru funcții principale: planificarea, organizarea, leading-ul (antrenarea și motivarea) și controlul”.

Ivancevich, Donnelly și Gibson au definit managementul în anul 1999 ca fiind “procesul întreprins de una sau mai multe persoane în vederea coordonării activităților altor persoane spre a obține rezultate pe care nu le-ar obține dacă ar acționa individual”. Tot în 1999 Kreitner definește managementul ca “o activitate cu și prin alte persoane în vederea atingerii obiectivelor organizației, folosind eficient resursele limitate, în condițiile unui mediu schimbător”.

Cercetătoarea americană Mary Parker Follet definește managementul ca fiind o artă, adică “arta de a determina realizarea unor lucruri cu ajutorul oamenilor”.

Unul din cei mai cunoscuți specialiști în management, Peter Drucker a propus trei postulate, reprezentând sarcinile majore ale managementului:

1. Stabilirea misiunii organizației;
2. Asigurarea funcționării productive;
3. Reglementarea responsabilităților implicațiilor asociate.

Asociația Americană de Management pune în evidență următoarele componente de stare și acțiune pragmatică:

- a obține rezultate prin alții, asumându-și responsabilități în acest sens;
- a fi orientat spre mediul înconjurător;
- a lua decizii vizând finalitatea firmei, la anumite momente sau orizonturi previzionate;
- a avea încredere în echipa managerială și personalul de execuție, încredințându-le responsabilități concrete în scopul obținerii rezultatelor scontate, a recepta favorabil inițiativa lor și a le recunoaște probabilitatea de a greși;

Deci, un proiect este o muncă de echipă. Deși puțini oameni recunosc, fără rețineri, că nu pot face totul singuri, aceasta este totuși realitatea. ”Dacă reușești să învârți mai multe farfurii, nu înseamnă că ai mai mult talent, ci că probabilitatea de a scăpa una dintre ele este mai mare” (Walls, apud Maxwell, 2003). Prin urmare, cu cât mai repede vă veți da seama că nu puteți face totul singuri, cu atât mai repede veți fi interesați de managementul proiectelor.

2. Definiție proiect

Cea mai evidentă trăsătură a unui proiect este faptul că acesta trebuie să atingă un anumit scop. Cel mai util este să definim proiectul *un instrument de schimbare*. Dacă proiectul se va încheia cu succes, el va avea un impact, prin schimbarea modului lor de lucru sau prin modificarea mediului lor. (Brown, 2004).

Principalele caracteristici ale unui proiect sunt (Brown, 2004):

- Este un instrument al schimbării
- Are un început și un sfârșit bine determinate
- Are un anumit scop
- Rezultatele sale sunt o livrare
- Este unic
- Este responsabilitatea unei singure persoane sau a unui singur organism
- Implică cheltuieli, resurse și timp
- Folosește o gamă largă de resurse și competențe

Ori de câte ori avem de-a face cu o acțiune de durată finită care produce un rezultat unic, înseamnă că avem un proiect. Deși termenul a pătruns deja în vorbirea curentă, puțini știu că există și un departament numit *Managementul de Proiect*, care cuprinde tehnicile, instrumentele și cunoștințele necesare pentru derularea cu succes a proiectelor de orice fel (Cazacu, 2007).

Există trei aspecte diferite, care vor fi abordate fiecare separat: în primul rând găsirea ideii și a finanțatorului potrivit pentru ideea noastră; în al doilea rând scrierea, elaborarea proiectului și, în cazul în care proiectul este finanțat, derularea proiectului și managementul său efektiv.

Se recomandă în elaborarea unui proiect o tehnică foarte simplă, tehnica celor 6 întrebări: CE?, DE CE?, CU CE?, PENTRU CE?, CUM?, CINE? (Onuț, 2005)

Ce vrem să facem în proiect? Care este ideea proiectului?

De ce vrem să facem ceea ce facem?

Cu ce resurse?

Pentru ce/cine sunt beneficiarii proiectului?

Cum vrem să facem ceea ce facem?

Cine va face?

După ce sunt foarte clare răspunsurile la aceste întrebări, doar atunci putem începe căutarea finanțatorilor.

Dacă avem ideea și finanțatorul potrivit putem elabora proiectul. Adică, să-l scriem, să umplem de conținut formularele, postate de obicei pe site-ul www.cnscis.ro. Este important ca ideea să ajungă la un finanțator interesat de ea. Idei excepționale se irosesc pur și simplu, deoarece nu se află în aria de interes pentru finanțare. De aceea, este important de parcurs cu mare atenție **criteriile de eligibilitate ale finanțatorilor**. Ele spun exact ceea ce este de făcut și, mai ales, ce nu trebuie făcut, ceea ce este la fel de important. Se pot elabora proiecte bune, dar care dacă nu respectă criteriile de eligibilitate, vor ajunge pur și simplu, să nu fie citite. Cred că nimeni nu dorește să irosească timpul, energia și creativitatea în acest fel.

3. Elaborarea proiectelor

Dacă veți lucra în domeniul managementului de proiect, veți descoperi o mare varietate de formulare, cam câți finanțatori, atâtea formulare de proiect, dar sub o formă sau alta, toate cuprind următoarele elemente:

Adresă însoțitoare

Titlul proiectului

Rezumatul proiectului sau descrierea generală

Scopul proiectului (eventual Misiunea organizației care depune proiectul)

Obiectivele proiectului (obiective generale și obiective specifice)

Conținutul proiectului

Beneficiarii proiectului (direcți și indirecti)

Activitățile și acțiunile proiectului

Rezultatele proiectului

Resursele necesare

Bugetul proiectului

Modalități de evaluare internă și externă, inclusiv monitorizarea proiectului

Alte surse de finanțare

Modalități de diseminare a rezultatelor obținute, continuare a proiectului

Titlul proiectului

Să ne gândim la modul în care citim ziarele, sau la modul în care alegem o carte. În general citim ceva *dacă* titlul trezește interes. Același lucru este și cu proiectul. Să ne punem în locul evaluatorilor care au de citit câteva zeci de proiecte, poate fi și acesta un criteriu de selecție în funcție de cât de interesant este titlul. Uneori se cer acronime și atunci va fi cazul să vă folosiți toată inventivitatea pentru a găsi un titlu care, prescurtat, să reprezinte ceva în acord cu ideea și conținutul proiectului.

Titlul proiectului trebuie să fie cât mai sugestiv și să nu fie prea lung, unii experți spun că nu trebuie să depășească 11 cuvinte. Un titlu scurt și bine ales va ușura înțelegerea și comunicarea cu toți participanții la proiect și va ajuta la crearea unei imagini favorabile în fața finanțatorilor.

Rezumatul proiectului

Se descrie succint situația existentă, contextul proiectului și motivația inițierii lui. De asemenea, se descriu beneficiile pe care le va aduce realizarea proiectului și se subliniază concordanța dintre proiectul și strategia generală a organizației. Este important să fie incluse suficiente informații, astfel încât celelalte secțiuni ale proiectului să fie ușor de înțeles. Totuși, este recomandabil ca această secțiune să nu depășească 1-3 paragrafe. Impresia în urma lecturării rezumatului proiectului este hotărâtoare pentru rezultatul evaluării.

Obiectivele proiectului

Obiectivele trebuie să îndeplinească criteriile SMART (Specific, Measurable, Achievable, Realistic, Time-based) și să fie aliniate la strategia generală a organizației care execută proiectul. Este recomandabil chiar să fie descrisă legătura dintre obiective și strategia organizației, pentru a putea menține și urmări această aliniere pe parcursul derulării proiectului. Obiectivele unui proiect reprezintă punctul de pornire în elaborarea planului și, în același timp, constituie referința față de care vom evalua succesul sau eșecul proiectului. În lipsa unei formulări clare a obiectivelor, proiectul nu poate avea succes, indiferent de eforturi și investiția făcută.

Argumente pentru fixarea obiectivelor (după Brown, 2004):

- Oferă o direcție
- Se concentrează pe rezultate
- Permit alcătuirea planurilor
- Stabilesc priorități și organizează activitatea
- Motivează persoanele implicate
- Comunică scopul proiectului
- Permit recunoașterea succesului.

Obiectivele unui proiect trebuie:

- Să fie în concordanță cu obiectivele organizației sub egida căreia se derulează
- Să poată fi măsurate în termeni de: calitate, cantitate, durată, cost, rezultat final definit
- Să fie realizabile
- Să fie ferme
- Să fie ușor de înțeles
- Să fie puține la număr
- Să aibă întregul sprijin și accept al managementului superior, al finanțatorului proiectului și utilizatorilor

Conținutul proiectului

Aici se vor descrie rezultatele proiectului, fie că acestea sunt produse, servicii, sau, pur și simplu, schimbări ale unei situații existente. Acestea trebuie să contribuie în mod direct la îndeplinirea obiectivelor enunțate anterior. Definierea conținutului proiectului este, practic, prima activitate specifică de management de proiect. Parcurgerea și includerea tuturor elementelor care servesc la atingerii obiectivelor, este esențială în cadrul descrierii conținutului proiectului și eliminarea acelor care nu contribuie la îndeplinirea lor, pentru a nu irosi resursele care sunt disponibile. Se pot include și alte elemente care ajută la o definiție clară a conținutului: organizațiile și departamentele implicate, activitățile implicate, tipurile de date și informații, funcționalitățile majore ale rezultatului proiectului. În definierea conținutului este recomandabil ca punctul de plecare să fie de la obiectivele definite anterior.

Planificarea în timp

Pentru a realiza acest lucru cel mai util este graficul Gantt, sau schema Gantt. De obicei, planificările în timp sunt asociate cu finalizarea unor faze majore ale proiectului, care, la rândul lor, depind de natura domeniului de activitate în care se desfășoară proiectul. Fiecare perioadă acordată unei etape trebuie să fie însoțită de activitățile aferente. Se poate crea un tabel cu 2 coloane: una cu data (perioada) și cealaltă cu etapa din proiect și activitățile aferente. Setul de jaloane va constitui un element de intrare important în elaborarea Planului de Proiect (Fig. 1).



Fig. 1 Exemplu de grafic Gant pentru o cercetare propusă

Organizarea proiectului și abordarea managerială

Este recomandabil să includeți în această secțiune orice aspect legat de modul în care va fi organizat proiectul. Se stabilesc și se precizează principalele roluri și responsabilități, relațiile de raportare și subordonare, organigrama proiectului și conexiunile cu restul organizației (parteneri, subcontractori, furnizori, beneficiari etc.). Abordarea managerială se poate referi la utilizarea unei metodologii de management de proiect (specificând documentele și procedurile cele mai importante), nivelul de autoritate al managerului de proiect, principalele căi de

comunicare cu beneficiarul, echipa de proiect, managerul executiv, etc. Se pot include orice elemente de organizare care ajută la clarificarea modului în care se va exercita managementul proiectului.

Responsabilitățile managerului de proiect

Un manager de proiect trebuie să conștientizeze că proiectul este responsabilitatea lui și că de cele mai multe ori va fi judecat în funcție de succesul sau eșecul său.

”Nu ar trebui să folosim doar creierele pe care le avem, ci toate creierele pe care le putem împrumuta”, spunea Woodrow Wilson. Decide ce trebuie să faci și fă acel lucru, decide ce nu trebuie să faci și nu face acel lucru.

Aceste două faze exprimă poate cel mai bine responsabilitățile managerului de proiect.

4. Concluzii

Experiența în elaborarea unui proiect, competența membrilor echipei de proiect își vor pune amprenta în derularea și finalizarea unui proiect, adică fezabilitatea și eligibilitatea sa. Competența membrilor echipei se poate remarca în mod deosebit atunci când apar obstacole în derularea proiectului, dar indiferent de natura problemelor sau de dimensiunea obstacolelor, problemele se rezolvă, într-un fel sau altul, iar, mai devreme sau mai târziu, dificultățile vor fi depășite. Sigur, întotdeauna, toate acestea au un ”cost” emoțional pe care cineva îl plătește.

Un alt element important pentru echipa de proiect este încrederea, sau mai bine spus puterea încrederii. Atunci când colaborezi în vederea derulării unui proiect în care sunt implicate resurse umane și financiare, lucrurile devin mult mai simple și plăcute atunci când la baza tuturor relațiilor este așezată **încrederea** (în caracterul și competența celuilalt). Însă, nu trebuie uitat reversul: atunci când încrederea se diminuează sau se pierde, apar cele mai neplăcute situații. Întotdeauna, pe cât de greu se construiește, pe atât de ușor se pierde.

Un alt element la fel de important pentru echipa de proiect este parteneriatul, puterea și responsabilitatea interdependențelor. Parteneriatul înseamnă respect față de sine și respect față de celălalt, respectarea promisiunilor, contractelor, termenelor și realism.

Succesul unui proiect se datorează în bună măsură *echipei și consecvenței*, să credem în ceea ce spunem, în ceea ce promovăm, în ceea ce facem. Succesul este garantat când există armonie între următoarele elemente indispensabile în reușita oricărei acțiuni: coordonare, competență, cooperare și continuitate.

Bibliografie selectivă

1. Androniceanu, A. (coord.) - *Managementul proiectelor cu finanțare externă*. București: Editura Universitară, 2004.
2. Belbin, M. - *Management Teams: Why they succeed or fail*. London: Heinemann, 1981.
3. Bibu N.A., Foltean F. (coord.), *Managementul organizațiilor publice*. Timișoara: CECMA Partner, 2005.
4. Bogathy Zoltan, Coralia Sultea – *Manual de tehnici și abilități academice*, Ediția a II-a, Timișoara, Ed. Univ. de Vest, 2008.
5. Brown, M. - *Învățã managementul proiectelor într-o săptămână*. București: Cosmos Viking Pinguin, 2004.
6. Chapman, A. (2001). *Time management techniques and systems*. Găsit la adresa: <http://www.businessballs.com/timemenagement.htm> la 12 noiembrie 2003.
7. Cazacu, S. - *Viață, personalitate, limbaj - analize contextual-dinamice*. București: Minerva, 2007.
8. Cojocaru, S. - *Elaborarea proiectelor*. București: Editura Expert Projects, 2004.
9. Covey, S.R. - *Managementul timpului sau cum ne stabilim prioritățile*. București: Ed. Alfa, 2000.
10. Cristea, H. - *Managementul proiectului - Sprijinirea, îndrumarea și controlul mersului proiectelor cu finanțare externă*, material pentru uz intern, Timișoara: Universitatea de Vest din Timișoara, 2001.
11. Cusworth, J. W., Franks, T. R.- *Managementul proiectelor în țările în curs de dezvoltare*. București: Editura All, 2002.
12. Dănăiață I., Bibu N. A, Mariana Predișcan, *Management. Bazele teoretice*, Ediția a II-a. Timișoara: Mirton, 2004.
13. Deep, S., Susmann, L. - *Secretul oricărui succes: să acționăm inteligent*. București: Polimark, 1996.
14. Lock, D. (2000). *Management de proiect*. București: Editura CODECS.
15. Maxwell, J. C. - *Cele 17 legi ale muncii în echipă*. București: Editura Amaltea, 2000.
16. McCollum, J. K. - *Management de proiect - o abordare practică*. București: Editura Universitară, 2005.
17. Miles, M. B., Huberman, A. M. - *Qualitative Data Analysis: An Expanded Sourcebook* (2nd ed). Thousand Oaks: Sage, 1994.
18. Mocanu, M., Schuster, C. - *Managementul proiectelor: Calea spre creșterea competitivității*. București: Editura All Beck, 2001.
19. Mochal, T., Mochal, J. - *Lecții de management de proiect*. București: Editura CODECS, 2006.
20. Newton, R. - *Managerul de proiect - măiestrie în livrarea proiectelor*. București: Editura CODECS, 2006.
21. Emilia Novac, Denisa Abrudan – *Management* – Timișoara: Editura Mirton, 1999.
22. Oprea, D.- *Managementul Proiectelor: teorie și cazuri practice*. Iași: Editura Sedcom Libris, 2001.
23. Pantea I. M., *Analiza strategică – suport al deciziilor investiționale*, Timișoara, Editura Mirton, 2003; Predișcan, Mariana, 2004. *Schimbarea organizațională. Ce, când și cum să schimbăm?* Timișoara: Editura Universității de Vest, col. „Economică”, 2005
24. Postavaru, N.- *Managementul proiectelor*. București: Editura Matrix Rom, 2002.
25. Elena Sărătean- *Comportament organizațional* – Ed. Univ. de Vest, Timișoara, 2008.
26. Turner, R., Simister, S., Nistor, S - *Manualul Gower de management de proiect*. București: CODECS, 2004.

3. PROIECTELE DE CERCETARE

✍ Ramona Amina Popovici

1. Cadrul general

Proiectul unei cercetări se referă la un plan general, la structura și strategia propusă pentru a răspunde la întrebările care decurg din cercetare. Proiectul unei cercetări trebuie să descrie pe scurt diferitele activități necesare atingerii obiectivelor cercetării, testării ipotezelor și obținerii răspunsului la întrebările care decurg pe perioada cercetării.

Proiectul unei cercetări conține detaliat planul operațional și are rolul de a asigura și demonstra validitatea metodologiei utilizate, acuratețea și corectitudinea rezultatelor.

Proiectul de cercetare trebuie să precizeze următoarele:

- Ce își propune să obțină?
- Cum își planifică acțiunile?
- De ce s-a ales o anumită strategie?

După aceste informații, proiectul trebuie să mai conțină următoarele informații referitoare la cercetare:

- Precizarea obiectivelor cercetării
- Lista ipotezelor (dacă există ipoteze ce urmează a fi testate)
- Designul cercetării
- Condițiile de desfășurare a cercetării
- Instrumentele ce urmează a fi folosite în cercetare
- Informații privitoare la subiecți și la maniera de selecție a acestora
- Informații vizând tehnicile și procedurile de analiză a datelor
- Raportul de cercetare
- O dezbateră a problematicii și limitelor impuse cercetării
- Termene și activități.

În proiectele de cercetare trebuie să existe o relație directă între scopul și planul cercetării astfel încât să-i permită cercetătorului să se ghideze și să se verifice în anumite momente ale cercetării, precum și să-l convingă pe coordonatorul cercetării (sau pe evaluatori) că metodologia propusă este adecvată, validă și utilizabilă pentru a obține răspunsuri la întrebările cercetării.

Proiectul unei cercetări trebuie să respecte standardele impuse și să fie scris într-un stil academic (referințe, bibliografie). Parcurgerea literaturii specifice trebuie să vizeze cele mai importante publicații de specialitate sau studii de actualitate în domeniul temei cercetate pentru a permite construirea unei baze teoretice solide. Evaluarea literaturii presupune construirea unui model conceptual care să includă informații teoretice și empirice despre principalele teme ale cercetării, și de asemenea să includă și câteva referiri la rezultate ale unor cercetări anterioare, în domeniul temei alese, a problemelor care există în domeniu, precum și a limitelor identificate de alți cercetători.

Consultarea literaturii vizează și chestiuni legate de metodologie, metode și tehnici. La metodologia cercetării se poate discuta despre felul în care alte cercetări au valorificat anumite tehnici; la capitolul subiecți/eșantioane se poate evalua măsura în care alte studii asemănătoare au folosit eșantioane adecvate etc.

2. Structura proiectului de cercetare

2.1. Introducere

Proiectul trebuie să înceapă cu o introducere care să includă informațiile prezentate la modul general despre tematica aleasă. Introducerea poate fi mai mult sau mai puțin extinsă în funcție de particularitățile studiului. De obicei, în această secțiune, trecerea în revistă a literaturii de specialitate are un rol deosebit de important, deoarece lărgeste baza de cunoștințe în domeniu și oferă informații cu privire la metodele și procedurile folosite de alții în situații asemănătoare, conturând o imagine a utilității acestora.

Tipul, dimensiunea, conținutul și calitatea acestei secțiuni depind atât de nivelul academic, la care este scrisă propunerea de cercetare, cât și de specificul cercetării.

Se poate începe cu o perspectivă generală asupra domeniului, restrângând pe parcurs discuția până la problema specifică a cercetării. În acest demers trebuie atinse următoarele puncte:

- O scurtă descriere a domeniului în care se înscrie cercetarea
- Argumentul pentru cercetare
- Prezentarea unui scurt istoric
- Prezentarea unor concepte filosofice sau ideologice legate de subiectul cercetării
- Precizarea tendințelor (dacă acestea există)
- Prezentarea riscurilor majore și evoluțiilor cercetării propuse
- Probleme teoretice și practice legate de tema studiului
- Principalele rezultate anterioare în legătură cu tema cercetării
- Caracterul inovativ al cercetării

2.2. Tema de cercetare

După realizarea unei introduceri generale, se trece la descrierea temei de cercetare, identificând potențialele direcții de cercetare. În această secțiune se formulează și se justifică întrebările la care studiul își propune să ofere răspunsuri. Aici are o importanță foarte mare informațiile obținute din alte studii și din literatura de specialitate.

În mod specific această secțiune ar trebui să conțină:

- Identificarea problemelor care motivează studiul
- Specificarea diferitelor perspective/aspecte ale acestor probleme
- Identificarea curențelor principale în domeniul cunoașterii acestor probleme
- Formularea întrebărilor principale ale cercetării
- Identificarea cunoștințelor disponibile în legătură cu problema abordată și discutarea diferențelor de opinie în literatura de specialitate (dacă acestea există)
- Justificarea studiului cu referințe specifice pentru ca cercetarea propusă să acopere unele curențe în cunoașterea problemei.

2.3. Obiectivele studiului

În această secțiune trebuie precizate obiectivele principale și specifice cercetării.

Prin **obiectiv** se înțelege „o sarcină care trebuie precizată în sensul identificării răspunsului la următoarele patru întrebări: *Ce trebuie făcut? Cine trebuie să facă? Când trebuie finalizată, realizată sarcina? Care este nivelul de performanță ce trebuie atins?*”.

Aceste caracteristici au fost sintetizate în cuvântul englez **SMART** (însemnând, deopotrivă, „deștept” și „elegant”), ale cărui litere coincid, întâmplător, cu literele inițiale ale adjectivelor prin care se exprimă **calitățile dorite ale obiectivului**:

- S** – SPECIFIC organizației respective;
- M** – MEASURABLE („măsurabil”, cuantificabil);
- A** – ACCURATE (clar formulat, precis);
- R** – REALISTIC („realist, realizabil”);
- T** – TIMED („legat de un termen de îndeplinire”)

Obiectivul principal al cercetării se referă la scopul central al studiului, în timp ce obiectivele specifice vizează detalii ale problemelor care urmează a fi cercetate.

Obiectivele cercetării trebuie formulate clar și concis. Fiecare obiectiv secundar trebuie să vizeze o singură problemă. Se folosesc verbe care indică o acțiune precum: „să determine”, „să găsească”, „să demonstreze” etc. Dacă obiectivul presupune testarea unor ipoteze, acesta trebuie formulat în concordanță cu standardul formulării ipotezelor.

2.4. Ipotezele care urmează a fi testate

O ipoteză presupune formularea unei presupoziii cu privire la caracteristicile unui fenomen sau la o relație dintre două variabile care urmează a fi testată în cadrul cercetării.

Odată cu formularea ipotezelor, apare obligativitatea da a trage o concluzie în legătură cu acestea în cadrul raportului. Ipotezele sunt formulate într-un stil particular, ceea ce presupune cunoașterea corectă a termenilor folosiți. În cadrul unei cercetări, pot fi testate mai multe ipoteze.

2.5. Designul cercetării

În această secțiune trebuie descris designul cercetării. În descrierea designului se urmărește identificarea punctelor tari și a celor slabe ale acestuia, o analiză SWOT.

SWOT reprezintă acronimul pentru cuvintele englezești „Strengths” (Puncte forte), „Weaknesses” (Puncte slabe), „Opportunities” (Oportunități) și „Threats” (Amenințări). Sunt prezentate detalii referitoare la tehnicile și procedurile pe care cercetătorul intenționează să le urmeze, astfel încât altcineva să poată realiza o replică a cercetării. Designul cercetării include răspunsurile la următoarele întrebări:

- Cine este implicat în studiu?
- Cum este selectat fiecare element implicat în studiu?
- Va fi folosit un eșantion?
- Cum se va construi eșantionul?
- Prin ce metodă vor fi colectate datele în funcție de tipul cercetării
- Care este procedura de colectare a datelor
- Cum va fi păstrată confidențialitatea?

2.6. Contextul cercetării

În această secțiune este descrisă organizația, instituția sau comunitatea în care se va desfășura cercetarea.

Dacă studiul se referă la un lot de subiecți umani, trebuie precizate unele caracteristici ale acestui lot și atenția trebuie orientată spre orice sursă de informație disponibilă.

Dacă studiul este condus într-o instituție sau organizație, trebuie precizate următoarele:

- Principalele activități ale instituției/organizației

- Structura administrativă
- Informații în legătură cu tema cercetării
- Dacă cercetarea vizează o comunitate, trebuie descrise câteva caracteristici ale acesteia, precum: mărimea comunității, un scurt profil social al comunității, alte informații în legătură cu tema cercetării

2.7. Tehnicile, metodele și instrumentele cercetării

În această secțiune sunt prezentate instrumentele cercetării și detalii referitoare la operaționalizarea principalelor variabile măsurate cu aceste instrumente.

Se începe cu motivarea alegerii metodei de cercetare, se descriu componentele instrumentelor de cercetare și relevanța lor în raport cu obiectivele cercetării. Dacă este folosit un instrument standardizat se discută indicii de validitate și fidelitate ale acestuia.

În această secțiune se discută și operaționalizarea principalelor concepte și felul în care acestea vor fi evaluate. Dacă este posibil, la propunerea de cercetare se anexează instrumentele de măsură.

2.8. Eșantionul

În unele proiecte de cercetare sunt folosite eșantioanele. Pentru eșantioane trebuie prezentate:

- Mărimea populației de eșantionare (dacă este cunoscută) și cum și de unde vin informațiile despre aceasta (statistici publice, documente etc.)
- Mărimea eșantionului proiectat și motivația alegerii acestei mărimi
- Descrierea tipului și structurii eșantionului (eșantion aleatoriu, stratificat, panel)

Definiții:

- Eșantion = mostră = colectivitate de selecție = o colectivitate parțială extrasă aleator dintr-o populație.

- Metoda eșantionajului = totalitatea tehnicilor și procedurilor statistice cu care se poate studia, analiza o colectivitate cercetând numai o parte a acesteia.

OBSERVAȚIE: nu orice cercetare parțială este în mod obligatoriu și o cercetare prin eșantionaj.

Exemplu: Bolnavii dintr-o clinică universitară nu constituie un eșantion din populația pe care o reprezintă bolnavii din întreaga țară, pentru că internarea în clinică nu a fost întâmplătoare, ci a existat un criteriu de selecție.

Teoria eșantionajului se bazează pe conceptele teoriei probabilităților.

Reprezentativitatea - un eșantion este reprezentativ pentru o populație dacă structura diverselor caracteristici se regăsește în eșantion (o copie la dimensiuni mai mici).

Reprezentativitatea este asigurată prin *alegerea întâmplătoare* a cazurilor.

Precizia. Un eșantion este suficient de precis, dacă rezultatele pe care le oferă nu diferă mult de rezultatele colectivității generale.

Cu cât este mai mare, cu atât este mai precis. Deci precizia este legată de *volumul* eșantionului.

Avantajele cercetării prin eşantionaj

- Operativitate (nr. mic de cazuri cercetate),
- Profunzime,
- Economicitate (de timp, de cadre, finanțe),
- Reducerea erorilor de observare și măsură,
- Reprezentativitate (prin alegerea aleatoare). Parametrii eşantionului (media, mediana, varianța etc.) sunt informații adevărate sau estimatori ai acelorași parametri din populație.

Dezavantajele cercetării prin eşantionaj

- Nu poate fi folosit dacă colectivitatea generală e mică,
- Introducerea unei erori aleatorii,
- Furnizarea unor rezultate probabile,
- Pentru asigurarea unui prag de siguranță este necesară mărirea excesivă a volumului eşantionului,
- Fenomenul studiat are limită mică de apariție.

Erorile în cercetarea prin eşantionaj

Sistematice - dificil sau chiar imposibil de recunoscut. Apar în cazul extragerii nealeatorii a cazurilor în constituirea eşantionului.

Deci un eşantion reprezentativ este un eşantion fără erori sistematice.

Exemplu: Într-o anchetă prin sondaj, în care sunt evitate locuințele îndepărtate, fără drum de acces, chiar dacă sunt luate 90-95% din cazurile posibile, eşantionul poate fi nereprezentativ, pentru că există un criteriu de selecție.

Întâmplătoare - pot fi recunoscute și cercetătorul poate modifica gradul de precizie al studiului, fie prin mărirea volumului eşantionului, fie alegând un plan de eşantionaj adecvat.

OBSERVAȚIE: există posibilitatea efectuării unor studii nereprezentative, dar precise.

Exemplu: se cântăresc toți copii la naștere, în condițiile în care s-au născut în maternitățile din marile orașe. Rezultatele sunt nereprezentative pentru nou născuții din întreaga țară, pentru că a existat un criteriu de selecție nealeator (maternități din marile orașe), dar sunt foarte precise (măsurători exacte și vaste).

Baza de sondaj cuprinde lista unităților ce corespund populației vizate.

Baza de sondaj se poate constitui în 3 moduri:

1. Aleator (cel mai bine),
2. În straturi (clasele într-o școală),
3. În cuiburi (gospodării, familii).

Baza de sondaj în straturi este caracterizată printr-o omogenitate internă și neomogenitate între straturi (în clasă sunt copii de aceeași vârstă)

Baza de sondaj în cuiburi este caracterizată prin neomogenitate în cadrul cuibului și asemănare între cuiburi (în familie avem persoane de vârste, sexe diferite)

Dacă baza de sondaj e constituită, există 3 modalități de realizare a eşantionului:

- a) Tragere la sorți - cu restituire
- fără restituire

b) Procedul utilizării tabelor de numere întâmplătoare

c) Procedul pasului mecanic (sau de numărare)

1, 2, 3.....N n - eşantion $N/n = K$

$n/N = 1/K \Rightarrow$ fracțiunea din eşantionaj (arată cât la sută din populație am luat în eşantion)

EROAREA MAXIMĂ LIMITĂ ACCEPTATĂ

Erorile de eșantionaj pot fi calculate cu ajutorul următoarelor expresii matematice:

1. Pentru caracteristici *cantitative*

$$e_x = \pm \frac{\sigma_x}{\sqrt{n}}$$

$$\sigma_x^2 = s_x^2 \frac{n}{n-1} \quad n \leq 30$$

$$\sigma_x^2 = s_x^2 \quad n > 30$$

σ_x^2 = varianța estimată din populație

s_x^2 = varianța în eșantion

n = volumul eșantionului

2. Pentru caracteristici *calitative*

$$e_p = \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$$

Înmulțind aceste erori de eșantionaj cu coeficientul de probabilitate corespunzător distribuției pe care caracteristica respectivă o are în colectivitatea generală se obține eroarea limită acceptată.

1. Pentru caracteristici *cantitative*

$$\Delta x = t_{\alpha, v} \cdot \frac{\sigma_x}{\sqrt{n}}$$

2. Pentru caracteristici *calitative*

$$\Delta p = t_{\alpha, v} \cdot \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$$

Dacă $n > 30$ $t_{\alpha, v}$ se înlocuiește cu U_α

Pentru: $\alpha = 0,05$ $U_{0,05} = 1,96$

$\alpha = 0,01$ $U_{0,01} = 2,58$

$\alpha = 0,001$ $U_{0,001} = 3,29$

α = riscul v = gradele de libertate

Gradele de libertate sunt date de numărul variantelor aleatorii independente de care depinde statistica considerată. Într-o serie cu "n" variante sunt "n-1" grade de libertate.

Expresia erorii maxime limite acceptate stă la baza determinării volumului eșantionului.

1. Pentru caracteristici *cantitative*

$$\Delta x = t_{\alpha, v} \frac{\sigma_x}{\sqrt{n}} \quad n = \frac{t_{\alpha, v}^2 \cdot \sigma_x^2}{\Delta x^2}$$

2. Pentru caracteristici *calitative*

$$\Delta p = t_{\alpha, v} \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}} \quad n = \frac{t_{\alpha, v}^2 \cdot p(1-p)}{\Delta p^2}$$

Dacă $n > 30$, $t_{\alpha, v}$ se poate înlocui cu U_α .

Biostatistica, pe baza unei fundamentări matematice solide, în special teoria probabilităților, ne permite să ne orientăm printre datele atât de diverse ca cele oferite de viața de zi cu zi. Caracterul probabilist al interpretărilor este oarecum contrastant cu modelul "exact" impus de educația uzuală din matematică; de aceea se susține că statistica nu este doar o știință, ci un mod de gândire.

Obiectivele centrale ale biostatisticii sunt determinarea caracteristicilor unei populații și/sau compararea a două sau mai multe populații. Metodele folosite pentru determinarea caracteristicilor populației sunt recensământul, screening-ul și eșantionarea (metoda folosită uzual în studiile medicale, oferind rezultate cu precizie satisfăcătoare pentru aplicațiile curente și un cost acceptabil. Din populație se selectează o submulțime numită eșantion sau lot, grup, iar măsurătorile se efectuează numai pe indivizii eșantionului). Pentru a obține rezultate la nivelul întregii populații se aplică operația de "inferență statistică" - este operația de generalizare (extindere) a concluziilor trase din studiul unui eșantion la nivelul întregii populații din care am extras eșantionul. Biostatistica ne oferă instrumentele cu care putem să apreciem cât de departe am putea fi față de valorile adevărate și care ar fi nivelul de încredere în afirmațiile pe care le facem. Să nu uităm că valorile adevărate ale caracteristicilor populației rămân necunoscute atâta timp cât noi am lucrat doar pe un eșantion, deci vedem doar o parte din "adevăr", poate mai bine zis "îl vedem cu anumită aproximație". Cu alte cuvinte, noi dorim să evităm măsurarea pe întreaga populație dar să obținem rezultate cât mai apropiate de valorile populației, pornind de la măsurătorile realizate pe un eșantion.

Mărimile pe care le analizăm în diferite studii pot fi fie independente între ele, fie legate prin diferite relații. Evidențierea unor relații între mărimi poate sugera fie o fenomenologie cauzală, fie o corelație mai complexă ce necesită studii aprofundate. Oricum, respingerea unei ipoteze de zero într-un test de independență dă în general de gândit cercetătorilor, care pot sesiza o serie de aspecte interesante din simpla analiză statistică a datelor.

2.9. Analiza datelor

În această secțiune se prezintă, în termeni generali, ce fel de analize vor fi efectuate asupra datelor obținute. În cazul analizei computerizate, trebuie precizate programele care vor fi utilizate precum și tehnicile statistice alese care ne vor ajuta să răspundem la ipotezele formulate anterior.

ANALIZA ȘI INTERPRETAREA MATERIALULUI STATISTIC

Analiza trebuie să scoată în evidență structura și dinamica fenomenelor cercetate, tendința acestor fenomene, legăturile funcționale de cauzalitate, ritmul de apariție, dezvoltare și stingere, concentrarea și dispersia lor, acolo unde este cazul.

Tot în cadrul analizei se verifică exactitatea, eficiența, metodele de cercetare, dacă ele au fost cele mai adecvate problemelor studiate.

Concomitent cu analiza se efectuează și sinteza cercetării, acesta fiind absolut necesară în toate cercetările, deoarece numai prin abstractizare, generalizarea rezultatelor parțiale, analizate în mod complex, se poate ajunge la evidențierea legăturilor cauzale, la descoperirea legăturilor existente în cadrul fenomenului studiat. Analiza și sinteza sunt inseparabile în orice cercetare științifică.

În etapa de adunare a materialului statistic lucrăm cu date statistice, care sunt expresia individuală a caracteristicilor statistice cercetate. După prelucrarea lor este necesar a se trece la

elaborarea unor indicatori, care sunt expresia numerică a laturii cantitative a fenomenelor cercetate și permit caracterizarea lor sub aspectul particularităților generale ale unităților statistice.

Indicatorii statistici pot fi redați prin mărimi absolute, relative și medii.

1. Mărimile absolute exprimă printr-un număr concret, mărimea sau simbolul caracteristicilor studiate. De asemenea reflectă volumul și structura fenomenelor distribuite în timp și spațiu.

Sunt cunoscute și sub denumirea de cifre “brute” sau “crude”.

2. Mărimile relative exprimă raportul dintre două mărimi absolute.

2.9.1. Metode de cercetare utilizate în biostatistică

Metodele de cercetare aplicate în biostatistică nu diferă cu mult de cele folosite în alte domenii, unele din ele au fost chiar împrumutate de la ele (cele matematice, economice). Utilizarea lor se va face însă ținând cont de specificul acesteia. De exemplu, specificul statisticii medicale în cadrul studiului sănătății publice constă nu numai în depistarea fenomenelor legate de ea, ci și a dinamicii lor, în evidențierea tendinței acestor fenomene, corelației lor cu factorii ce le provoacă etc. Cunoașterea acestor lucruri se poate efectua prin intermediul următoarelor metode:

1. Metoda observării

- constă în urmărirea desfășurării unor fenomene pentru a le putea analiza în dinamică, sau prin compararea lor, ca apoi să se realizeze sinteza caracteristicilor lor esențiale.

Cercetările efectuate cu folosirea acestei metode în studiul sănătății publice sau unor cazuri clinice se realizează pe diferite căi:

- *statistică* - când se acumulează informația sub formă de valori numerice despre schimbările fenomenului studiat sau activitatea organelor, instituțiilor sanitare și altor servicii pentru sănătate. Pe parcurs, observarea statistică după volum poate fi efectuată prin:
- *cercetarea integrală* (adică a întregului volum numeric al totalității) când avem de a face cu un fenomen de apariție rară, cu un număr mic de cazuri în legătură cu care se cere de luat măsuri urgente, sau când ne interesează determinarea stării întregii populații prin recensăminte;
- *cercetarea selectivă* - fata de cea integrală se folosește mai des și urmărește studiul unui fenomen cu o frecvență mai mare pe baza unei totalități selective. Dacă este nevoie de a studia aprofundat un aspect, un fenomen răspândit într-o localitate, un grup de populație, va fi folosită cercetarea monografică, prin cohortă, prin sondaj etc.
- *aprecierea prin expertiză* - prezintă un supliment, când fenomenul general e studiat pe fiecare aspect al lui în particular prin intermediul experților. De exemplu, dacă ne interesează morbiditatea spitalizată, atunci fiecare caz de boală tratat în staționar fie că va fi paralel studiat în decursul spitalizării, fie că după externare pe baza istoriei de boală. Experții se pronunță cu privire la termenele spitalizării bolnavului, dată fiind starea lui, apreciază calitatea investigațiilor, corectitudinea diagnosticului și tratamentului în fiecare caz concret de patologie. Același lucru se poate efectua în cadrul serviciului de ambulator, de urgență etc. Datele generalizate servesc la căpătarea unor coeficienți de corijare a indicilor obținuți pe cale statistică. Expertiza este o metodă mai mult calitativă de investigate, permițând elaborarea de măsuri concrete de ajustare a fenomenului studiat.

În funcție de **timpul** când se efectuează observarea delimităm:

- *cercetarea curentă* (permanentă, continuă) - se utilizează atunci când variabilitatea fenomenului studiat se poate schimba destul de des, iar aceste schimbări importante pot surveni zi de zi și chiar oră de oră. Astfel de cercetări se efectuează de regulă în clinică, mai ales în secțiile de reanimare sau în maternitate, secțiile de boli infecțioase, unde observarea trebuie să se facă de câteva ori pe zi sau peste un anumit interval de timp.
- *cercetarea periodică* (la anumite intervale de timp) - se utilizează atunci când fenomenul studiat are o variabilitate mult mai mică în timp, sau o apariție și evoluție periodică. De exemplu, se știe că o parte din boli pot da acutizări în anumite perioade ale anului (boala ulceroasă, reumatismul) sau evoluează în condiții atmosferice specifice ale anului (gripa, virozele organelor respiratorii, unele boli infecțioase etc.). Ca urmare, cercetarea poate fi efectuată numai pe parcursul acestor perioade de timp sau la sfârșitul lor. În alte cazuri se recurge la cercetări periodice o dată la 5-10 ani. Astfel de cercetare se impune în cazul unui volum mare al totalității (structura populației după sex, vârstă, ocupație, locul de trai, starea civilă etc.).
- *cercetare la un moment critic* - atunci când se fixează data și chiar ora de înregistrare a fenomenului studiat (recensământul populației, înregistrarea personalului medico-sanitar etc.).

După **frecvența** observărilor cercetările pot fi: de o singură dată sau repetate.

2. Metoda epidemiologică

- sintetizează cele evidențiate prin metoda observării și prezintă un studiu corelativ al fenomenelor din cadrul sănătății publice cu factorii (cunoscuți sau presupuși) de risc. Această metodă, ca și cea precedentă, folosește pe larg o serie de metode matematice pentru a găsi legitatea schimbărilor variabile, dinamice, structurii fenomenelor studiate în legătură cu factorii ce le determină (valorile medii, dispersia, corelația, regresia etc.).

3. Metoda istorică

- e strâns legată cu primele două metode fundamentând studiul sanitar al sănătății publice sau al activității serviciilor pentru sănătate în cadrul dezvoltării istorice a societății.

Este un fapt dovedit că gradul de dezvoltare a societății, orânduirea socială în trecut și în prezent determină nivelul de trai al populației, calitatea vieții, deci și sănătatea ei.

Aici mai des se folosește metoda comparării aceluiași fenomen raportat la diferitele categorii de populație (diferențiate după semne - sex, grupuri sociale, vârstă, ocupații etc.), teritorii (continente, țări, regiuni, localități) studiate acum și în trecut.

4. Metoda economică

- precizează starea de sănătate publică, determinată de prezența surselor bănești, materiale, economice etc.

Această metodă se folosește la aprecierea eficacității activității serviciilor pentru sănătatea populației (din punct de vedere social și economic) în cadrul medicinei de stat, prin asigurare, precum și celei private.

O varietate a acestei metode e *metoda economico-matematică* când se utilizează în combinație cu o serie de metode matematice ce ne permit să optimizăm acțiunile sanitare, rețelei sanitare legate de probleme de sănătate a populației cu analiza de sistem, de prognozare etc.

5. Metoda experimentală

- urmărește scopul de a elabora și aproba noi forme și metode de organizare a muncii, a asistenței medicale, aplicarea în practică a experienței înaintate, verificarea reciprocă a diferitelor proiecte, ipoteze, a noilor metode de diagnosticare și tratament etc. Specificul acestei metode constă în aceea că cercetătorul singur își „crează” obiectul și metoda de cercetare, reproducând astfel fenomenele sau aspectele ce-l interesează în condiții de laborator, iar mai apoi analizând totul în detaliu conform scopului stabilit.

Orice experiment nu depinde numai de dorința și năzuința savantului, ci e o problemă de ordin social. Rezolvarea lui va cere din partea acestuia îmbinarea mai multor metode de cercetare.

În genere, în orice studiu statistic cu scop de cunoaștere nu se folosește numai o metodă izolată de cercetare. Pentru o investigație multilaterală a fenomenului și ținând cont de scopul propus cercetătorul trebuie să decidă ce metode se impun și în ce etapă.

Etapa I este legată direct de metoda de observare epidemiologică, economică și de acumulare (culegere) a datelor informative.

În **etapa a II-a** se recurge la o serie de metode statistico-matematice de prelucrare a informației acumulate, de asemenea și la metode economice, economico-matematice.

În **etapa a III-a** vom folosi și metoda istorică comparând rezultatele curente ale studiului cu cele ce au fost înregistrate în trecut. Astfel cercetătorul poate să-și atingă scopul studiului și să analizeze în ansamblu toate caracteristicile de bază ale fenomenului trăgând concluzii corecte și elaborând măsurile practice necesare.

Metoda observării după modalitatea îndeplinirii poate fi: statistică și de expertiză. Iar după timpul îndeplinirii: curentă (pe parcursul anului), periodică (o dată la doi ani), la un moment critic (la finele anului calendaristic).

2.9.2. Metodele de colectare a datelor

Metodele de colectare a datelor pot fi divizate în două grupe mari: directă și indirectă:

La metoda **directă** se referă:

- Metoda observării
- Anchetare
- Interviu
- Monitorizare

1. Metoda indirectă

- reprezintă extragerea datelor din documentația medicală (ex. Foi de observație, fișa pacienților, arhivă statistică).

2. Metoda directă

Cel mai des în studiile statistice medicale sunt folosite următoarele metode de colectare a informației.

1. **Metoda observării (directă)** se utilizează de obicei în clinic sau cabinet, când medicul, după ce precizează anamneză bolnavului, face studiul obiectiv și investigațiile paraclinice ale pacientului, înregistrează în fișă aceste date. Analogic se procedează și în policlinică, și la deservirea chemărilor la domiciliu. Dacă cercetătorul statistic vrea să folosească această metodă, el trebuie să fie prezent alături de medic și să înregistreze datele de care are

nevoie. Sunt cazuri când pe cercetător îl interesează nu numai date legate de boală, dar și probleme de ordin personal și social, ca urmare înregistrarea directă poate fi făcută sub formă de anchetă. În acest caz cercetătorul trebuie să beneficieze de încrederea respondentului.

2. **Metoda extragerii informației dintr-un formular statistic (indirectă)** - fișa medicală a bolnavului de staționar, fișa medicală a bolnavului de ambulator, tichetul statistic de evidență a diagnosticului definitiv (precizat), epicriză, raport statistic privind numărul de maladii înregistrate la bolnavii domiciliați în teritoriul de deservire a instituției curative etc. Când se efectuează acest lucru se ține cont de programul de culegere a informației, unde trebuia să fie indicat concret care este unitatea de evidență, caracteristicile ei atributive și cantitative. Datele privind aceste caracteristici se extrag din documentele enumerate mai sus și se notează într-un registru special sau în mai multe fișe, pe fiecare semn aparte. Această metodă se folosește frecvent în studiile statistice și poate fi utilizată de însuși cercetătorul sau de persoane special instruite, în acest caz fiind necesar controlul logic al materialului cules.

3. **Metoda de anchetare** utilizează informația prin intermediul unor anchete, anterior pregătite, care includ întrebări speciale, la care respondenții trebuie să dea răspuns. Această metodă se folosește în studiile sociologice, dar poate fi aplicată și în orice studiu statistic sanitar în îmbinare cu alte metode de culegere a informației. Este foarte important ca întrebările incluse în anchetă să fie formulate clar și concret, în caz contrar respondenții nu vor ști ce să răspundă la ele. Totodată ancheta trebuie să fie anonimă, adică să nu cerem de la respondenți să ne comunice numele, adresa domiciliului ș.a., deoarece aceasta poate să-l facă pe cel anchetat să nu răspundă în genere la nici o întrebare.

Anchetele de informare se utilizează mai ales în cercetările stării de sănătate a populației și în cercetările epidemiologice. Întrebările din anchetă pot fi de tip:

- **deschis** - când la întrebare nu se dau variante de răspuns și respondentul trebuie să le formuleze singur;
- **semideschis** - se dau variante de răspuns, dar se lasă un rând liber pentru expunerea unor opinii personale ale respondentului;
- **închis** - când la întrebare sunt date două și mai multe variante de răspuns, iar respondentului i se propune să aleagă unul din ele. Datele acumulate pot fi analizate prin următoarele metode:
 - Metoda istorică
 - Metode epidemiologice
 - Metode economice
 - Metoda experimentală

2.9.3. Noțiuni de bază în biostatistică

În biostatistică sunt cunoscute următoarele noțiuni de bază:

- totalitatea statistică
- unitatea de observare
- caracteristică statistică
- indicatori statistici
- date statistice

1. Totalitatea (colectivitatea) statistică

Definiția: **totalitatea statistică** reprezintă un număr de elemente (unități de observare) omogene, luate împreună în baza unui factor comun în anumită perioadă de timp și spațiu.

Numărul de unități de observare determină volumul totalității supuse studiului și se notează prin litera „n”. După volum deosebim două tipuri de totalități statistice:

- Totalitatea integrală (generală, „univers statistic”)
- Totalitatea selectivă

Totalitatea selectivă are următoarele caracteristici de bază:

- trebuie să dețină caracteristici de bază de care dispune cea integrală;
- trebuie să dispună de un volum. Metodele de selectare a totalității selective:
 - cercetarea prin sondaj
 - cercetarea monografică
 - cercetarea selectivă:
 - aleatorie
 - mecanică
 - tipică.

Cercetarea prin sondaj se bazează pe o metodologie precisă, unitară, valoarea rezultatelor depinzând de efectuarea ei corectă științific. Această cercetare nu permite să se tragă concluzii generale, valabile pentru totalitatea integrală, fiind mai mult o metodă de investigație preventive unui studiu de mare volum. De obicei se efectuează pe baza unui eșantion mic.

Cercetarea monografică e un studiu selectiv în care limitarea volumului eșantionului e completată cu o aprofundare a cercetării caracteristicilor esențiale. Acest tip de eșantion poate fi limitat în cazul unui examen medical clinic cu un scop bine determinat (stabilirea gradului de răspândire al unei boli sau al unui grup de boli din aceeași clasă). Tot astfel de cercetări pot fi aplicate pe un eșantion mic după spațiu, dar majorat în volum după timp, adică în dinamică (studiul natalității, mortalității pe o perioadă de mai mulți ani într-o circumscripție rurală, dar într-o strânsă legătură cu factorii social-economici, sanitaro-igienici etc.).

Cercetarea selectivă - studiul selectiv reprezentativ pentru totalitatea integrală și care poate fi efectuat prin selecția:

- *aleatorie* (întâmplătoare, randomizată simplă) se efectuează prin extrageri din liste în care sunt înregistrate toate cazurile individuale fără nici o grupare sistemică prealabilă. O metodă frecventă de selecție aleatorie este tragerea la sorți;
- *mecanică* (sistemică) - este o metodă superioară celei aleatorii, deoarece fiecare unitate de observație are șanse egale să fie aleasă. Selecția eșantionului se face după modelul de șah sau cazurile de evidență sunt ordonate în ordine alfabetică sau localitățile sunt aranjate după hartă și se selectează fiecare a 4-a, a 6-a ori a 10-a, în funcție de pasul de numărare. În acest mod se obține o selecție teritorială uniformă. Intervalul se calculează astfel ca eșantionul să cuprindă de la 5 până la 10% din totalitatea integrală. De exemplu, 10% – atunci: fiecare al 10-lea; etc.

Calea aceasta de selectare, deși răspândită, este anevoioasă de înfăptuit. Avantajul constă numai în simplitatea selectării eșantionului, în timp ce exactitatea rezultatelor cercetării poate avea erori mari, fiindcă nu se ține cont de frecvența reală de răspândire a fenomenului, de dispersia lui în spațiu;

- *tipică (stratificată)* (proporțională cu mărimea eșantionului) - urmărește scopul selecției unităților de observație din grupurile tipice ale “universului statistic”. Pentru început, în cadrul “universului statistic” toate unitățile de observare se grupează după anumite caracteristici în grupuri tipice (de exemplu, vârstă, sex sau după intensitatea frecvenței fenomenului). Din fiecare grup, pe cale aleatorie sau mecanică, este

selectat un anumit număr de unități astfel ca raportul după caracteristici în eșantion să fie același ca și în totalitatea integrală.

Dacă e nevoie să se facă o nouă stratificare cu scopul obținerii unui grup și mai omogen, metoda în cauză se numește *tipică stratificată cu mai multe trepte*. Avantajul ei este că fenomenele studiate pot fi mai uniform reprezentate și deci și eșantionul va fi reprezentativ;

- *în cuiburi (în serii, în clastere)* - aici din totalitatea integrală se selectează nu unități individuale, ci serii (microzone), localități care sunt ulterior examinate în întregime.

Distribuția datelor în totalitatea selectivă poate fi:

- *alternativă* Da/ Nu
- *simetrică* (normală)
- *asimetrică*

Unitatea de observare

Reprezintă fiecare element component al colectivității statistice, care este purtătorul tuturor trăsăturilor comune ale colectivității supuse studiului.

Unitățile statistice pot fi simple, care nu mai suportă diviziune (persoana) și complexe, rezultate ale organizării sociale (familia).

Caracteristica sau variabila statistică

În cadrul unui studiu sau a unei anchete epidemiologice se măsoară diferite caracteristici ale indivizilor sau a populației. O caracteristică măsurată se numește variabilă. Valorile variabilelor pentru un individ se numesc date.

Exemplu de variabile: data nașterii, numărul de carii prezente la un individ, indicele de carie, prezența sau absența tartrului, greutatea, înălțimea.

Datele se definesc din punct de vedere informațional în:

- numerice
- calitative
- grafice
- imagini

În biostatistică se folosesc datele numerice și calitative, din grafice sau imagini se extrag parametrii ce pot fi cuantificați pentru a fi apoi prelucrați statistic.

Reprezintă trăsătura, proprietatea, însușirea comună unităților de observație, reținută în studiul statistic pentru a fi înregistrată și care variază ca valoare de la o unitate la alta.

Caracteristicile statistice pot fi clasificate după cum urmează:

➤ în funcție de modul de exprimare:

Variabilele numerice:

- variabile ale căror valori se exprimă prin numere
- au unități de măsură care trebuie precizate
- pot lua numai anumite valori, cel mai adesea numere întregi
- ex: numărul de pacienți examinați într-o zi, numărul de carii prezente la un pacient

Variabilele ordinale sau de tip rang:

- sunt exprimate tot prin numere, însă valorile sunt asociate după criterii sau conform unei scări convenționale

- nu au unitate de măsură
- ex: indicele de carie, note folosite în diverse forme de examinare.

Variabile calitative sau nominale:

- reprezintă o calitate
- de ex: sexul persoanei, mediul de proveniență, culoarea ochilor, prezența sau absența cariei, gingivitei etc.

➤ în funcție de numărul variantelor/valorilor de răspuns pe care le pot lua:

- caracteristici **alternative (binare sau dihotomice)**, acelea care pot lua doar două variante de răspuns: sex (M/F), starea civilă (căsătorit/necăsătorit), familie cu copii sau fără copii etc.;

Variabila dihotomică

- are numai două valori posibile
- de ex: prezența bolii parodontale = 1, absența bolii parodontale = 0.
- caracteristici **nealternative** - cele care pot lua mai multe valori/ variante de răspuns: salariu, profesie, localitate de domiciliu, numărul de obturații a unui bolnav, numărul de carii rămase etc.

➤ în funcție de natura variației caracteristicilor cantitative:

- caracteristici **continue**, care pot lua orice valoare din scara lor de variație: greutatea unei persoane, înălțimea, temperatura etc.;
- caracteristici **discrete** sau **discontinue**, care pot lua numai valori întregi: numărul de copii pe care îi are o familie, numărul de persoane dintr-o familie, număr de medici, număr de paturi, număr de vizite etc.

➤ în funcție de conținutul caracteristicii:

- caracteristici **de timp** (anul nașterii);
- caracteristici **de spațiu** (localitatea de domiciliu);
- caracteristici **atributive**, în care variabila reprezintă un atribut, altul decât spațiul ori timpul - cele calitative și cantitative.

➤ în funcție de modul de obținere și caracterizare a fenomenului:

- caracteristici **primare** (obținute, de regulă, în etapa de colectare a datelor statistice prin măsurare sau numărare);
- caracteristici **derivate**, obținute în procesul prelucrării datelor statistice.

➤ în funcție de modul de influență asupra fenomenului:

- caracteristici **factoriale**;
- caracteristici **rezultative**.

2.9.4. Statistica descriptivă

Conține:

- indicatorii statistici
- reprezentările grafice

1. Indicatori statistici

Indicatorul statistic este expresia numerică a unor fenomene, procese, activități sau categorii economice și sociale, definite în timp, spațiu și structură organizatorică.

Deosebim următoarele funcții ale indicatorilor statistici:

- funcția de măsurare;
- funcția de comparare;
- funcția de analiză;
- funcția de sinteză;
- funcția de estimare;
- funcția de verificare a ipotezelor și de testare a semnificației unor indicatori statistici calculați.

Indicatorii statistici pot fi prezentați prin valori absolute, relative și medii.

Către *valorile relative* pot fi atribuite: *rata, raportul și proporția*.

Rata ne arată cât de repede evenimentul (nașteri, îmbolnăviri, decese) apare în populație.

Componentele ratei sunt:

- **Numărător**: numărul de evenimente observate;
- **Numitor**: populația în care evenimentele au loc;
- **Timpu** specificat când au loc evenimentele;
- De obicei un **multiplicator** transformă rata dintr-o fracție incomodă sau decimală într-un număr întreg.

Tipurile de rate sunt:

- brute;
- speciale (specifice);
- standardizate.

Sinonimele pentru rată sunt: *frecvența, nivel, răspândire, intensitate*.

Raportul permite compararea unei populații cu alta.

Raportul este un număr împărțit la altul.

Raportul poate fi prezentat

astfel $x : y$ sau x/y ,

unde: „x” - numărul de cabinet medicale dentare, nr. de medici

„y” - numărul de populație.

Proporția ne arată ce fracțiune a populației este afectată. Caracteristicile lor de bază sunt:

- coeficientul a 2 numere;
- numărătorul *este inclus* în numitor;
- proporția întotdeauna deviază între 0 și 1 sau între 0 și 100%.
- Indicatorii de proporție nu pot fi comparați.
- Sinonimele indicatorului de proporție sunt *cota, ponderea, structura*.

2. Date statistice

Analiza datelor statistice se face în funcție de: timp; loc; persoană. Caracteristica de **timp** ne permite să stabilim:

- modificări pe termen scurt;
- modificări ciclice;
- modificări seculare (pe termen lung);
- poate fi aranjată în tabele și grafice.

Gruparea materialului statistic constă în aranjarea unităților statistice, în funcție de diferitele caracteristici sau variabile, în grupe cât mai omogene, pentru a le putea scoate cât mai ușor în evidență. Gruparea este operația statistică ce permite trecerea de la aspectele particulare, individuale ale unităților statistice la aspecte generale, comune pentru colectivitatea supusă studiului.

În funcție de numărul caracteristicilor de grupare se realizează:

- **grupări simple**, când la baza repartizării stă un singur criteriu
- **complexe**, când la baza repartizării stau două sau mai multe criterii.

După natura caracteristicii gruparea poate fi :

- **în timp**, când repartizarea materialului statistic are la bază anumite intervale de timp;
- **în spațiu**, când repartizarea materialului se face în raport cu locul sau teritoriul unde s-a examinat colectivitatea statistică, de exemplu mediu rural și mediu urban.

În funcție de variația caracteristicii de grupare se realizează grupări pe **variante** sau pe **intervale**.

Limitele grupării nu se stabilesc mecanic ci depind de natura fenomenului studiat și scopul cercetării. În principiu o grupare prea amănunțită a materialului statistic duce la o fărâmițare ce ne împiedică să observăm ce este caracteristic, esențial. De asemenea dacă o caracteristică are prea multe valori vom repartiza materialul statistic pe grupe de valori. Fiecare grupă de valori sau „clasa” are la rândul ei o limită inferioară, o limită superioară și un centru al grupei egal cu semisuma celor două limite.

În cadrul grupării trebuie să cunoaștem exact valorile extreme - maximă și minimă ale caracteristicii și trebuie să stabilim intervale de grupă egale, iar limitele claselor să fie distincte pentru a nu crea confuzii cu ocazia repartizării unităților de observare.

Prelucrarea materialului statistic nu se oprește la gruparea materialului deoarece datele brute obținute, de cele mai multe ori, nu permit aprecieri comparative. De aceea materialul statistic este supus în continuare unei prelucrări cu ajutorul metodelor de statistică matematică în vederea obținerii unor indicatori statistici ca: valori relative, valori medii, criterii de variație, corelație, veridicitate, ce vor permite aprecieri comparative, corecte și concluzii semnificative.

Urmare grupării datelor statistice rezultă serii statistice.

Seria statistică de variație este șirul de valori numerice ale caracteristicii, ordonate crescător sau descrescător în funcție de mărimea acestora.

Seria statistică reprezintă corespondența a două șiruri, cel al valorilor variantelor (x) și cel al frecvențelor (f), motiv pentru care se mai numește și serie de distribuție/serie de frecvențe. Suma frecvențelor variantelor corespunzătoare corespunde cu numărul de cazuri cercetate ($\sum f = n$).

Seriile statistice de variație pot fi de două categorii: **simple** și **grupate**. Când fiecărei valori a caracteristicii îi corespunde o singură frecvență vorbim de o serie statistică simplă, iar când fiecărei valori îi corespund mai multe frecvențe vorbim de o serie statistică grupată.

Unii autori definesc seria statistică în modul următor:

- **simplă** - de regulă se formează în cazul unui număr mic de cazuri cercetate - < 30
- **grupată** - care se formează în cazul unui număr mare de cazuri cercetate - > 30 .

Cerințele de bază pentru formarea seriei de variație:

1. Ordonarea valorilor variantelor;
2. Numărarea frecvențelor fiecărei variante;
3. Determinarea numărului de grupe și valorii intervalului;
4. Gruparea seriei de variație, utilizând intervalul cu respectarea continuității seriei;
5. Reprezentarea grafică a seriei de variație.

- Toate 5 cerințele sunt obligatorii pentru formarea seriei de variație grupate, cerințele 1, 2 și 5 - pentru formarea seriei de variație simplă.
- Numărul de grupe în serie se determină independent de numărul cazurilor cercetate

În cazul seriei de variație în care variantele sunt exprimate în intervale de grupă, pentru a le putea introduce în calculul statistic stabilim mijlocul fiecărei grupe, reprezentat printr-o singură valoare, care este centrul intervalului grupei obținut prin semisuma valorilor variantelor extreme ale fiecărui interval de grupă.

Cele trei proprietăți majore ale seriilor de variație, pe care le putem analiza folosind indicatorii statistici sunt cele privitoare **la tendința centrală, la variabilitatea și la forma distribuțiilor.**

O clasificare a indicatorilor tendinței centrale se poate face, în funcție de modul de determinare a lor, în:

- **indicatori (mărimi) medii de calcul:** media aritmetică, armonică, cronologică, pătratică, geometrică etc.;
- **indicatori medii de poziție:** modul, mediana.

Indicatorii **fundamentali** ai tendinței centrale sunt: **media aritmetică, modul și mediana**, dar în anumite cazuri speciale putem apela și la alte tipuri de medii.

Mărimile medii sunt mărimi tipice, caracteristice, ce definesc un fenomen variabil.

În general, în toate cercetările, dar în special cele care privesc starea de sănătate a populației, de un interes deosebit este cunoașterea comparativă a fenomenelor studiate față de un etalon, mărimea medie. Fără cunoașterea mărimilor medii, comparația nu este posibilă decât în mod imperfect: compararea dintre două sau mai multe fenomene pentru a constata diferența dintre ele, neputând concluziona dacă aceste fenomene sunt sau nu apropiate de o valoare etalon.

Mărimea medie are aceleași dimensiuni concrete cu ale variabilei a cărei repartiție de frecvențe o caracterizează. Astfel dacă variabila privește înălțimea în cm a noului născutului și mărimea medie va fi redată în cm.

Media este expresia care sintetizează într-un singur nivel reprezentativ tot ceea ce este esențial, tipic, comun, obiectiv în apariția, manifestarea și dezvoltarea unui fenomen.

Exemple: durata medie de utilizare a scaunului stomatologic pe an; durata medie de realizare a unei pulpectomii; nota medie la examen a unei grupe de studenți; numărul mediu de vizite la medicul dentist pe un an la 1 locuitor, care locuiește în teritoriul deservit.

Când este o medie reprezentativă?

Când calculul mediei se bazează pe folosirea unui număr mare de cazuri individuale:

Valorile medii pot fi exprimate prin cifre absolute sau prin indici. De exemplu, în cazul înălțimii sau greutateii medii la diferite vârste și sexe, valorile medii se exprimă în valori absolute (cm, kg).

În cazul morbidității sau mortalității generale sau specifice pe vârste sau sexe, cauze de boală etc., valorile medii se exprimă prin cifre relative (la 1000 sau 100000 de locuitori). Fac excepție cazurile foarte rare de boală sau deces care se exprimă mult mai corect prin cifra absolută (de exemplu un caz de difterie sau poliomielită).

Ce tipuri de mărimi medii se pot calcula?

- Media aritmetică
- Media armonică
- Media cronologică
- Media pătratică
- Media geometrică

Media aritmetică simplă

Media aritmetică simplă este valoarea medie care se obține din suma valorilor individuale dintr-o colectivitate omogenă, divizată la numărul total al cazurilor studiate. Media aritmetică simplă se utilizează pentru a stabili valoarea medie în seriile statistice în care fiecărei valori a varianței îi corespunde o singură frecvență. Formula de calcul:

$$\bar{X}_{as} = \frac{\sum x}{n}$$

Media aritmetică ponderată

Media aritmetică ponderată este valoarea medie care se obține din suma produsului valorilor dintr-o colectivitate omogenă, cu frecvențele corespunzătoare, divizată la numărul total al cazurilor studiate.

Media aritmetică ponderată se utilizează în calcularea valorii medii în cazul în care valorile individuale au frecvențe diferite. În acest caz media aritmetică simplă nu se poate utiliza.

Formula de calcul:

$$\bar{X}_{ap} = \frac{\sum xf}{\sum f(n)}$$

Exemple de calcul:

Într-o clinică, medicii prezintă următoarea distribuție conform vârstei: 6 persoane de 37 ani; 3 persoane de 31 ani; 6 persoane de 41 ani și 2 persoane de 44 ani.

Aplicând formula de calcul, vom obține vârsta medie a personalului, de 38,17 ani:

În cazul calculării mediei aritmetice ponderate în serii statistice în care valorile variantelor sunt mari (de ordinul sutelor, miilor sau zecilor de mii) și reprezentate de cifre zecimale, iar frecvențele corespunzătoare fiecărei variante sunt de asemenea numeroase, operația devine deosebit de dificilă. În acest caz recurgem la o metodă simplificată a calculării mediei aritmetice ponderate, și anume metoda momentelor.

Asupra mediei aritmetice sunt de făcut câteva observații și de subliniat câteva proprietăți:

1. Definiția dată mediei aritmetice este valabilă numai dacă valorile individuale înregistrate sunt numerice. Pentru o serie cu valori ne-numerice nu se poate calcula media aritmetică;
2. Mărimea mediei aritmetice calculate este unică; o serie nu posedă mai multe medii aritmetice distincte;
3. Mărimea mediei aritmetice poate sau nu să coincidă cu vreo valoare individuală înregistrată;
4. Media are întotdeauna valoarea cuprinsă între valoarea minimă din serie (X_{\min}) și valoarea maximă (X_{\max});
5. Suma abaterilor valorilor individuale de la media lor este întotdeauna egală cu zero (adică distanțele fata de centru se balansează, se compensează reciproc);
6. Media aritmetică este legată de toate valorile numerice înregistrate și, în consecință, este sensibilă la prezența valorilor aberante.
7. Dacă o serie este alcătuită din mai multe serii componente, pentru care s-au calculat medii parțiale, atunci media întregii serii poate fi calculată ca o medie ponderată din mediile parțiale.

Media armonică

Media armonică este o medie cu aplicație specială care se determine ca valoarea inversă a mediei aritmetice calculată din inversele valorilor seriei.

$$\bar{X} = \frac{\sum n}{\sum \frac{1}{X_i}}$$

\sum - suma;

X_i - valori individuale

$\frac{1}{x_i}$ - inversul valorilor individuale

n - numărul de valori.

În realitate, media armonică se utilizează rar, în special la stabilirea prețurilor medii.

Media pătratică

Este tot o medie de calcul cu aplicații speciale și reprezintă valoarea care, înlocuind termenii seriei, nu modifică suma pătratelor lor. Se folosește când fenomenul supus cercetării înregistrează modificări aproximativ în progresie geometrică.

$$\bar{X} = \sqrt{\frac{\sum x^2 f}{\sum f(n)}}$$

Moda

Este mărimea medie care corespunde valorii cu cele mai multe frecvențe (în seriile de variație simple). Calculul se efectuează deci simplu, luând valoarea cu frecvența maximă drept valoare medie. Rapiditatea cu care se stabilește modulul este singurul avantaj, deoarece el nu prezintă un etalon precis al valorii medii decât în cazul distribuțiilor normale (simetrice) de frecvențe.

Moda nu se determină în funcție de toate mărimile valorilor variantelor, ci de una singură, cea cu frecvența maximă (în repartițiile unimodale). Totuși el exprimă mărimea cu cea mai mare pondere, deci caracteristica determinantă.

Exemplu:

La un sir de valori: 1 2 3 4 3 2 5 6 7

Se ordonează 1 2 2 3 3 4 5 6 7, moda este $\frac{2+3}{2} = 2,5$

La șirul 1 2 2 4 3 4 4 5 – moda este 4

Observații:

1. Pe graficul repartiției statistice valoarea modală corespunde punctului în care graficul își atinge maximum;
2. Are avantajul principal față de medie și cuantile că se determină rapid și are o semnificație simplă;
3. Există în practică serii cu distribuții multimodale. În astfel de situații se determină mai multe valori modale.

Mediana (cuantila de ordinul 2)

Ca definiție, mediana, în serii statistice simple, este valoarea acelei variante care împarte în două jumătăți egale numărul variantelor, așezate în ordine crescândă sau descrescândă. În cazul unui număr impar de variante, mediana va corespunde exact valorii de la mijlocul seriei. În seriile cu număr par de variante mediana va corespunde mediei aritmetice simple a celor două valori de la mijlocul seriei.

Exemplu de calcul:

Înălțimea la naștere la un număr de 5 copii a fost: 47, 48, 49, 51, 52 cm. Mediana, corespunzând valorii de la mijlocul seriei va fi 49 cm.

În cazul unei serii de 6 valori, cum ar fi : 47, 48, 49, 51, 52, 53 cm, mediana va fi 50 cm $(49 + 51/2)$.

În serii statistice grupate, formula de calcul a mediane este mai complicată, valoarea mediane aflându-se în interiorul intervalului valoric, în care se găsește valoarea frecvenței ce împarte seria în două jumătăți egale.

Seriile cronologice

Un obiectiv important al medicinei și ocrotirii sănătății este studierea sănătății publice, analiza informației privind caracterul și volumul activității instituțiilor medico-sanitare sub aspectul modificărilor lor dinamice. Studierea acestor modificări este deosebit de importantă pentru prognozarea și planificarea măsurilor cu caracter organizațional, curativ-profilactic etc.

Pentru a analiza modificările dinamice a fenomenelor medico-sociale este necesar de a forma serii cronologice (dinamice), a cunoaște metodele de ajustare și analiză a lor.

Seria cronologică (serie de timp sau serie dinamică):

este seria formată din valori omogene comparabile, care caracterizează modificările unui anumit fenomen într-o perioadă de timp, vizează măsurarea creșterilor sau descreșterilor de nivel în evoluția unui fenomen. Fiecare valoare numerică a seriei se numește nivel. Nivelurile seriei cronologice pot fi prezentate prin valori absolute, relative și medii.

Seriile cronologice se disting printr-o serie de **particularități**, trăsături specifice ei, între care menționăm:

- a) **variabilitatea** termenilor SCR - Între valorile individuale care compun seria cronologică există diferențe de mărime explicate prin acțiunea comună a factorilor esențiali și întâmplători. Gradul de variabilitate a termenilor seriei cronologice depinde de forța cu care factorii aleatori produc abateri, dar și de tendința de variație impusă de factorii cu acțiune sistematică.
- b) **omogenitatea** termenilor unei SCR - seriile cronologice sunt omogene deoarece termenii seriei au în comun categoria economică sau socială pe care o reprezintă în momente sau intervale succesive de timp. **Omogenitatea** valorilor seriei este dată de faptul că acestea sunt supuse acțiunii sistematice a acelorași factori esențiali, iar termenii seriei cronologice sunt obținuți prin aceeași metodologie de calcul și folosesc aceeași unitate de măsură.
- c) **periodicitatea** termenilor unei SCR - o caracteristică specifică seriilor cronologice. Această trăsătură exprimă continuitatea datelor din punct de vedere al variației timpului. Termenii seriei reprezintă valori ale unui fenomen dinamic, înregistrate la momente sau intervale de timp de regulă egale, astfel încât să se asigure continuitatea seriei. În funcție de scopul concret al analizei efectuate, de natura fenomenului înregistrat și de posibilitățile de obținere a datelor, unitățile de timp pot fi mai mici sau mai mari: minut, oră, zi, săptămână, decadă, lună, trimestru, semestru, an, deceniu, secol.
- d) **interdependența** în timp a termenilor unei SCR - este determinate de modalitatea de construire a acestora prin înregistrarea nivelurilor succesive ale unui fenomen pentru aceeași unitate statistică precizată. Din această cauză, orice termen al seriei depinde de nivelurile precedente și influențează mărimile următoare ale termenilor seriei.

Având în vedere aceste particularități ale seriilor cronologice, analiza lor trebuie precedată de verificarea **comparabilității** valorilor individual înregistrate pentru fenomenul analizat. Pentru a asigura comparabilitatea termenilor seriei cronologice este necesar ca componenta seriei să fie identică pentru întreaga perioadă de timp, valorile seriei să fie exprimate în aceleași unități de măsură, iar intervalele de timp între valori să fie egale.

Tipuri de serii cronologice:

În funcție de modul de definire a timpului deosebim SCR de moment și SCR de interval.

Seriile cronologice de momente:

- sunt formate din mărimi care se referă la anumite momente de timp (sfârșitul sau începutul anului, trimestrului, lunii etc.).
- fiecare valoare individuală caracterizează numeric nivelul la care a ajuns fenomenul analizat într-un moment dat.

Observație:

- **nu permit cumularea valorilor termenilor, deoarece acestea reflectă, în mod repetat, elementele care coexistă în momente diferite de timp.**

Când intervalele dintre două momente succesive au lungime egală, atunci vom avea o SCR de momente cu intervale egale între momente, iar atunci când intervalele dintre două momente vecine au lungime ne-egală avem o SCR de momente, cu intervale neegale între momente.

Serii cronologice de intervale:

- sunt formate din mărimi care caracterizează fenomenul într-un interval de timp (zi, săptămână, lună, trimestru, an etc.);
- fiecare valoare individuală reprezintă rezultatul unui proces care se desfășoară pe un interval de timp.

Observație:

- **permit însumarea valorilor, obținându-se astfel un indicator totalizator pentru întreaga perioadă de analiză.**

Alegerea perioadei de timp pentru seria cronologică de interval este determinată într-o oarecare măsură de variabilitatea fenomenului. Cu cât mai lent se modifică fenomenul în timp, cu atât mai mari pot fi perioadele de supraveghere. În funcție de modul de exprimare a termenilor seriei deosebit serii cronologice formate din valori absolute, relative sau medii.

Seriile cronologice formate din valori absolute reprezintă situația cea mai frecvent întâlnită. Fiecare termen al seriei este în acest caz o mărime absolută exprimată în unități concrete de măsură. De exemplu: număr de populație, număr de paturi, număr de medici, număr de nou-născuți, număr de decedați, număr de nașteri, număr avorturi, nr. anomalii fetale, depistate ecografic, cheltuielile anuale în IMSP etc.

Seriile cronologice formate din valori relative. Termenii acestor serii pot fi reprezentați prin rate, proporții și raport. De exemplu: natalitatea, mortalitatea, morbiditatea, invaliditatea primară, asigurarea populației cu medici, paturi, ponderea populației în vârstă de peste 55 de ani. Baza de raportare trebuie să fie întotdeauna precizată.

Seriile cronologice formate din valori medii. De exemplu: numărul mediu de paturi, durata medie de spitalizare, durata medie de utilizare a patului pe an, salariul mediu al medicilor.

3. În funcție de numărul termenilor seriei deosebit serii cronologice de lungime mică, medie, mare.

2.9.5. Elemente de teoria probabilităților

Baza teoriei probabilităților este noțiunea de eveniment întâmplător (aleator). Apariția unui eveniment depinde de condițiile care îl generează. Dacă în condițiile date un eveniment trebuie să aibă loc în mod obligatoriu se numește eveniment sigur; dacă evenimentul, în mod obligatoriu nu poate avea loc, se numește eveniment imposibil. Un eveniment care, în condițiile date, poate să aibă loc sau poate să nu aibă loc, se numește eveniment probabil sau întâmplător.

Definiție: Probabilitatea unui eveniment este raportul dintre numărul mediu de apariție a cazurilor favorabile și numărul total de cazuri posibile, cu condiția ca toate cazurile să fie egal posibile.

$$P(A) = \frac{m}{n}$$

m – numărul de cazuri favorabile

n - numărul de cazuri posibile

Exemplu: Zarul. Șansa ca să iasă una din fețele zarului este egală pentru fiecare din fețe. Există 6 evenimente posibile. Deci avem probabilitatea de 1/6 pentru fiecare parte a zarului, care reprezintă evenimentul favorabil.

Numărul de cazuri favorabile nu poate fi mai mare decât cel al cazurilor posibile, deci valoarea lui P nu poate depăși cifra 1, echivalentă cu 100%. Dacă o anumită față a zarului nu apare la nici o aruncare, probabilitatea acestui caz se notează cu 0 (zero). Deci probabilitatea unui eveniment poate fi cuprinsă între 0 și 1, respectiv între 0% și 100%, probabilitatea 0 fiind echivalentă cu un eveniment imposibil, irealizabil, iar probabilitatea de 100% cu un eveniment cert, absolut sigur.

Probabilitatea contrară, sau probabilitatea evenimentului contrar, se notează cu $q = 1 - p$

Dacă este vorba de un eveniment A , putem scrie probabilitatea evenimentului contrar \bar{A} astfel: $P(\bar{A}) = q = 1 - p$

În cazul cu zarul: $P(A) = 1/6$ (ca să obținem o față)

$P(\bar{A}) = q = 1 - p = 1 - 1/6 = 5/6$ (probabilitatea evenimentului contrar)

Dacă însumăm șansa ($1/6$) cu neșansa ($5/6$) observăm că rezultă:

$1/6 + 5/6 = 6/6 = 1$. Ajungem tot la relația de mai sus:

$$p + q = 1 \Rightarrow p = 1 - q$$

$$q = 1 - p$$

Dacă dorim să facem o exprimare % înmulțim cu 100, $P = \frac{m}{n} \cdot 100$

Ex.: $P = \frac{1}{6} \cdot 100 = 16\%$

$$q = \frac{5}{6} \cdot 100 = 84\% \Rightarrow p + q = 16 + 84 = 100\%$$

O aplicație a acestei teorii este FORMULA LUI BAYS.

În mod obișnuit medicul cunoaște probabilitatea unui simptom sau a unui test pozitiv, condiționată de o anumită boală $P_S(B)$ sau $P_+(B)$, dar este important să se cunoască și probabilitatea bolii când testul este (+).

Ex.: prevalența unei boli = 0,002 (deci, dacă luăm o persoană la întâmplare, probabilitatea ca să aibă boala este de 0,002)

Dacă avem un test specific de laborator pentru această boală, aprecierile noastre, că persoana are boala, pot să se modifice.

Să presupunem că testul este real(+) în 80% din situații - adică la persoane bolnave. În 10% din situații este (+) la persoane nonbolnave (test fals pozitiv).

Putem înșira toate aceste probabilități astfel:

$P(B)$ - probabilitatea ca boala să fie prezentă la o persoană aleasă la întâmplare (corespunzător prevalenței de 0,002)

$P(\bar{B})$ - probabilitatea ca boala să nu fie prezentă la o persoană aleasă la întâmplare = 0,998

$P_+(B)$ - probabilitatea ca un test (+) să confirme boala

SENSIBILITATEA TESTULUI = 0,80

$P_+(\bar{B})$ - probabilitatea ca un test (+) să corespundă inexistenței bolii, fals(+) = 0,10

SPECIFICITATEA TESTULUI = $1 - 0,10 = 0,90$

$P_B(+)$ - probabilitatea bolii, când testul e (+)

FORMULA LUI BAYES:

$$P_{B(+)} = \frac{P(B) \cdot P_+(B)}{P(B) \cdot P_+(B) + P(\bar{B}) \cdot P_+(\bar{B})}$$

$$P_{B(+)} = \frac{(0,002) \cdot (0,80)}{(0,002) \cdot (0,80) + (0,998) \cdot (0,10)} = 0,158 \text{ sau } 1,6\%$$

valoare mai ridicată, comparativ cu 0,002

2.9.6. Analiza statistică a variabilității

Caracterizarea unei colectivități statistice prin indicatorii tendinței centrale ne ajută să depistăm ceea ce este comun, esențial în manifestarea unui fenomen. Orice colectivitate are o anumită organizare internă, definită prin felul în care valorile individuale se împrăștie sau se concentrează în jurul valorii centrale. Astfel se poate întâmpla ca două colectivități analizate după aceeași variabilă să fie diferite prin tendința centrală (a), prin dispersie (b) sau prin amândouă (c). În felul acesta o valoare centrală poate fi credibilă, o alta nu. Din acest motiv se impune ca analiza prin indicatorii tendinței centrale să fie completată cu indicatori ai variației și ai formei de distribuție.

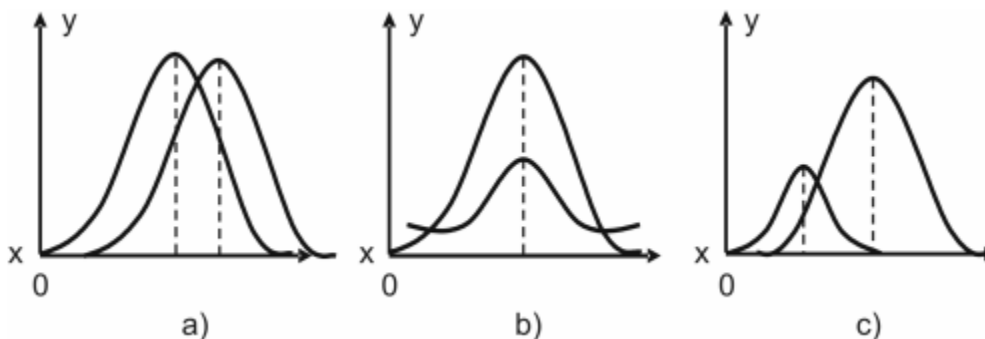


Fig. 1 a) Distribuții cu tendință centrală diferită; b) Distribuții cu variabilitate diferită; c) Distribuții cu tendință centrală și variabilitate diferite.

Calculul și analiza indicatorilor variației valorilor individuale față de medie oferă posibilitatea de rezolvare a unor probleme de cunoaștere statistică. Dintre acestea se disting:

- analiza gradului de omogenitate a datelor din care s-au calculat indicatorii tendinței centrale și verificarea reprezentativității acestora;
- compararea în timp și (sau) spațiu a mai multor serii de distribuție după caracteristici independente și (sau) interdependente;
- selectarea obiectivă a factorilor semnificativi de influență după care se structurează unitățile unei colectivități statistice;
- separarea acțiunii factorilor esențiali de factorii întâmplători;
- concentrarea valorilor individuale ale caracteristicilor și deplasarea acestora față de valorile tipice;
- aplicarea diferitelor teste ale statisticii matematice.

Indicatorii variației utilizați în analizele statistice sunt clasificați după mai multe criterii:

- după numărul variantelor luate în calcul există *indicatori simpli și indicatori sintetici*;
- după modul de sistematizare a datelor primare există *indicatori ai variației calculați pentru serii de distribuție unidimensionale și indicatori calculați pentru serii multidimensionale*;
- după modul de calcul și exprimare există indicatori ai variației calculați ca *mărimi absolute și ca mărimi relative*.

Indicatori simpli:

- amplitudinea variației;
- abaterea valorilor individuale de la medie; abaterea intercuantilică.

Indicatori sintetici:

- dispersia;
- abaterea medie pătratică;
- coeficientul de variație;

Quantilele

sau abaterea intercuantilică - separă seria statistică în “n” părți, cuprinzând același efectiv, egal cu 1/n din efectivul total.

a) Quartilele – Q ₁ , Q ₂ , Q ₃	n=4	Q ₂ =Me
b) Decilele – D ₁D ₉	n=10	D ₅ =Me
c) Centilele – C ₁C ₉₉	n=100	C ₅₀ =Me
d) Promile – P ₁P ₉₉₉	n=1000	P ₅₀₀ =Me

Indicatori de dispersie ai caracteristicilor cantitative

Amplitudinea este diferența dintre valoarea maximă și valoarea minimă din serie. Ne arată caracterul dispersiei, limitele ei maxime și minime.

$$A = X_{\max} - X_{\min}$$

Pentru serii de variație cu clase se ia limita superioară a clasei cu valorile cele mai mari, pentru X_{max} și limita inferioară a clasei cu valorile cele mai mici, pentru X_{min}.

$$\text{Amplitudinea relativă (A\%)} = \frac{A_{\text{abs}}}{\bar{x}} \cdot 100$$

Varianța (dispersia s_x²) este media aritmetică a pătratelor abaterilor dintre variante și media lor

$$s_x^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \cdot f_i}{n} \quad n > 30 \quad n = \sum f_i$$

$$s_x^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \cdot f_i}{n - 1} \quad n \leq 30$$

Deci pentru calculul varianței, întâi se calculează media aritmetică ponderată $\bar{x}_p = \frac{\sum x_i f_i}{\sum f_i}$

Tabelul 1. pentru calcularea varianței

	x	f _i	x _i	x	(x _i - \bar{x})	(x _i - \bar{x}) ²
total	T	=	Σ			Σ=

Tabelul 2. pentru calculul varianței prin metoda momentelor

i	x _i	f _i	(x _i - x ₀) f _i	(x _i - x ₀) ² f _i
total	T		Σ=	Σ=

$$s_x^2 = \frac{\sum (x_i - x_0)^2 f_i}{n} - \left[\frac{\sum (x_i - x_0) f_i}{n} \right]^2$$

$$\frac{\sum (x_i - x_0)^2 f_i}{n} \rightarrow M_2 = \text{momentul de ordinul II}$$

$$s_x^2 = M_2 - M_1^2$$

Abaterea standard (deviația standard, s_x)

$$s_x = \pm \sqrt{s_x^2} \qquad s_x = \sqrt{M_2 - M_1^2}$$

Abaterea standard păstrează unitatea de măsură a caracteristicii respective. Acest fapt este și un inconvenient, pentru că nu poate fi folosită la compararea dispersiei pentru două fenomene exprimate prin caracteristici cu unități de măsură diferite.

Deviația standard pune în evidență intervalul valoric, în jurul mediei, în care s-au distribuit valorile frecvențelor fenomenului cercetat. Cu cât are valori mai mici, cu atât există o distribuție mai strânsă a valorilor în jurul mediei și eșantionul este mai omogen.

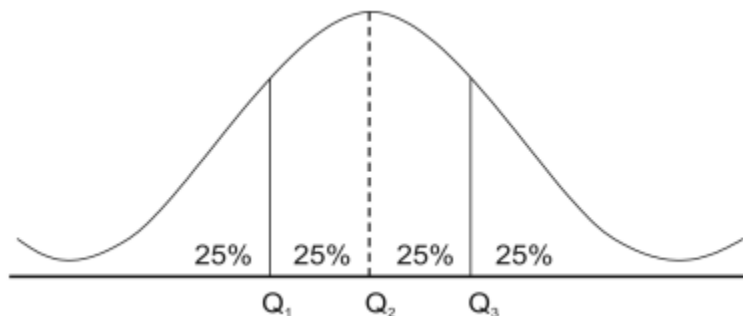


Fig. 2 Curba Gauss - Laplace

Coefficientul de variație (C.V.%) este raportul procentual între abaterea standard și valoarea medie a șirului.

Valoarea coeficientului de variație nu are unitate de măsură.

$$C.V.\% = \frac{\pm s_x}{\bar{x}} \cdot 100$$

Dă gradul de omogenitate:

CV < 10% => dispersie mică

10% < CV < 30% => dispersie mijlocie

CV > 30% => dispersie mare

Observație:

Se acceptă faptul că media este cu atât mai puțin reprezentativă pentru un șir de valori, cu cât acesta are o dispersie mai mare.

Indicatori de tendință centrală ai caracteristicilor calitative

Indici intensivi sau de frecvență

$$I.I. = \frac{\text{nr.cazuri} \cdot 10^2 (10^3) (10^4) (10^5)}{\text{nr.persoane din colectivitatea respectiva}}$$

$$\text{Exemplu: } N = \frac{nv}{L} \cdot 1000$$

Indici extensivi sau de structură (sau de greutate specifică). Arată greutatea specifică a unei părți a colectivității față de totalul colectivității.

$$I.E. = \frac{\text{nr.caz dintr - o componentă}}{\text{nr. total de cazuri}} \cdot 100$$

$$\text{Exemplu: } M_{\text{prop}} = \frac{D_{\text{cd}}}{D} \cdot 100$$

M_{prop} - letalitatea;

D_{cd} - decese printr-o boală;

D - total decese;

Indicatori de dispersie ai caracteristicilor calitative

p - proporția unei stări posibile a caracteristicii calitative

- varianța $\sigma_p^2 = p \cdot q$

- abaterea standard $\sigma_p = \pm \sqrt{\sigma_p^2}$

Aprecierea veridicității valorilor medii și relative

Constantele (medii sau de dispersie) obținute de noi pe eșantioane se numesc „statistici” și valorile lor sunt mai mult sau mai puțin apropiate de valorile constantelor colectivităților generale (parametrii) - în funcție de gradul de reprezentativitate (calitativă și cantitativă) al eșantioanelor, însă niciodată nu sunt identice.

Cu ajutorul acestor constante de eșantion, a „statisticilor”, se estimează constantele colectivităților generale, „parametrii”. Estimatul rezultat pe baza constantelor de eșantionare este aleator. Ca atare valorile exacte ale parametrilor colectivității generale rămân necunoscute, în schimb se poate preciza un interval valoric în care se va situa media colectivității generale (MA = media absolută), în jurul căreia, în acel interval valoric se vor distribui mediile de eșantion, cu o anumită probabilitate.

Dacă dintr-o colectivitate generală extragem mai multe eșantioane, valorile medii ale acestor eșantioane vor fi foarte apropiate de valoarea mediei absolute, distribuția acestora, în jurul mediei absolute, făcându-se conform aceleiași curbe Gauss-Laplace.

Eroarea standard sau eroarea medie a mediilor este constanta care ne permite să stabilim intervalul valoric în care se găsește media absolută și în jurul căreia se distribuie valorile medii de eșantion, cu o anumită probabilitate, se numește eroare standard (ES) sau eroare medie a valorilor medii de eșantion față de media universului.

1. Intervalul de siguranță

Intervalul valoric, determinat cu ajutorul erorii standard, în care se estimează a se afla media absolută, se numește interval de siguranță sau de încredere statistica, în acest interval de siguranță, determinat de media eșantionului plus/minus eroarea standard, media absolută se va găsi într-o proporție de 68,26%, deci probabilitatea ca media absolută să se găsească în interiorul acestui interval este de 68,26%.

$$M-ES < \mu < (M+ES) = 68,26\% \quad P-ES < \mu < (P+ES)$$

În exemplul nostru, media ponderată fiind de 5,84 dinți iar eroarea standard 0,14, intervalul de siguranță va fi $5,84 \pm 0,14$, deci cuprins între 5,70 și 5,98. $2 \times ES$ $3 \times ES$

2. Pragul de semnificație

Contraprobabilitatea sau probabilitatea ca mediile de eșantion să depășească limitele - maximă și minimă - intervalului de siguranță, situându-se în afara lor, se numește prag de semnificație, în cazul în care intervalul de siguranță este determinat de $M \pm ES$, atunci contraprobabilitatea (pragul de semnificație) se obține scăzând din 100 valoarea probabilității, deci:

$$q = 100 - 68,26\% = 31,74\%$$

Dacă vrem ca valoarea contraprobabilității, a posibilității de a greși, să fie mai mică, atunci trebuie să mărim intervalul de siguranță. Acest interval se mărește adăugând și scăzând din valoarea mediei de două ori valoarea erorii standard.

$$M \pm 2 \cdot ES = 5,84 + 2 \cdot 0,14 = 5,84 \pm 0,28$$

Intervalul de siguranță va fi cuprins deci între limitele de 5,56 și 6,12. În acest interval, ceva mai mare, valoarea mediei absolute se va găsi cu o probabilitate mai mare decât în primul caz, de 95,45%, iar posibilitatea de a se situa în afara acestui interval de siguranță se reduce la 4,55% ($100\% - 95,45\% = 4,55\%$). Dacă vrem să reducem și mai mult probabilitatea de a greși, atunci mărim intervalul de siguranță, adăugând și scăzând din valoarea mediei de trei ori valoarea erorii standard. Intervalul de siguranță va fi:

$$M \pm 3.E.S = 5.84 \pm 3.0.14 = 5.84 \pm 0,42$$

Intervalul de siguranță în acest caz va fi cuprins între 5,42 și 6,26. În acest interval de siguranță, mult mai mare, media absolută se va găsi cu o probabilitate de 99,73%, iar pragul de semnificație va fi de 0,27% ($100\% - 99,73\% = 0,27\%$).

Rezultă că intervalul de siguranță nu are limite fixe ci ele se modifică în funcție de dorința cu care vrem să asigurăm rezultatele noastre, în cazul în care acceptăm un prag de semnificație mai mare, deci o probabilitate mai mare de a greși, atunci intervalul de siguranță este mai mic. Cu cât vrem să lucrăm mai precis, deci să greșim mai puțin, cu atât intervalul de siguranță crește.

2.9.7 Testul de semnificație

Mărimea intervalului de siguranță depinde de faptul dacă în jurul mediei luăm o singură dată, de două sau de trei ori valoarea erorii standard. **Multiplul erorii standard (1, 2 sau 3), care determină mărimea intervalului de siguranță**, se numește test de semnificație și se notează cu litera „t”. Ca atare, la o probabilitate de 68,26% și un prag de semnificație de 31,74% valoarea lui $t=1$; la 95,45% probabilitate și 4,55% prag de semnificație, valoarea lui $t=2$; la o probabilitate de 99,73% și un prag de semnificație de 0,27% valoarea lui $t=3$. În mod obișnuit, noi nu garantăm rezultatele sau concluziile, obținute pe eșantion, cu probabilitatea cu care acestea se găsesc în interiorul intervalului de siguranță și cu contraprobabilitatea, cu probabilitatea de a greși, deci cu pragul de semnificație.

În medicină și biologie pragurile de semnificație de 31,74%, de 4,55% și de 0,27%, corespunzând valorilor lui t de 1,2 sau 3, nu se prea folosesc, în schimb, rezultatele se garantează cu pragurile de semnificație de 0,05 (5%), 0,01 (1%) și 0,001 (0,1%). Pe bază de calcule s-a stabilit că pentru aceste praguri de semnificație valorile corespunzătoare ale lui t sunt de 1,96, 2,58 și 3,29. Ca atare, la pragul de semnificație de 5%, valoarea lui t va fi 1,96, iar intervalul de siguranță va fi : $M \pm 1.96.E.S$. La 1% prag de semnificație valoarea lui t va fi de 2,58, iar mărimea intervalului de siguranță va fi dată de $M \pm 2,58.E.S$. La 0,1% prag de semnificație valoarea lui t va fi de 3,29, iar intervalul de siguranță va fi dat de $M: 3,29.E.S$.

Aceste valori ale lui t rămân neschimbate în situația în care lucrăm pe eșantioane al căror număr de frecvențe este mai mare de 120. În situația în care lucrăm pe eșantioane cu un număr de frecvențe mai mic de 120, atunci valoarea testului de semnificație se modifică și se ia din **tabelul testului t**, pe care o găsim în cărțile de statistica.

Compararea statistică

Am văzut că în medicină și biologie efectuăm cercetări pe eșantion și rezultatele obținute le extrapolăm la nivelul colectivității generale, acestea fiind valabile ca și când am fi efectuat cercetarea pe întreaga colectivitate. Rezultatele obținute pe eșantion diferă însă de la un eșantion la altul, fiind cu atât mai reprezentative cu cât eșantionul este mai omogen și mai bine reprezentat numeric.

Pentru a stabili dacă două sau mai multe rezultate obținute pe eșantioane sau dacă rezultatele obținute pe eșantioane și cele obținute pe colectivitatea generală sunt asemănătoare sau, din contră, diferă semnificativ între ele, ne folosim de comparația statistică.

IPOTEZE STATISTICE. TESTE DE COMPARARE

1. Prima etapă a comparării statistice constă în stabilirea “ipotezei nule” (H_0), ipoteză care afirmă că nu există diferențe semnificative statistic între eșantion și populație sau între două eșantioane selectate aleator.

Ipoteza nulă H_0 poate fi adevărată sau nu; înseamnă că mai există și o altă ipoteză H_a - “ipoteza alternativă”. În cazul respingerii ipotezei nule H_0 și acceptării ipotezei alternative H_a înseamnă că există o diferență semnificativă statistic, între indicatorii ce caracterizează eșantionul și cei din populația din care a fost extras eșantionul.

Exemplu: Dacă parametrul din colectivitatea generală este media μ putem formula H_0 astfel:

$$H_0: \mu = \mu_0 \text{ sau } H_0: \mu - \mu_0 = 0$$

Ipotezele statistice pot fi:

- *Ipoteze parametrice* - adică acele ipoteze formulate asupra valorilor numerice ale anumitor parametri, după admiterea naturii legii de distribuție în care ne aflăm;

- *Ipoteze neparametrice* - adică acele ipoteze formulate asupra valorilor numerice ale anumitor parametri, dar fără a fi precizată natura legii de distribuție în care suntem.

Pentru verificarea unei ipoteze statistice se folosesc testele statistice (parametrice și neparametrice), care constau din calcularea statistică și din stabilirea unor reguli precise de acceptare sau respingere ale ipotezei nule H_0 , cu o anumită probabilitate.

Pentru un anumit test statistic, valoarea probabilității cu care se respinge ipoteza nulă se numește prag (nivel) de semnificație și este stabilit, aprioric, de cercetător.

2. La testarea oricărei ipoteze se pot comite și erori:

- eroarea de speța (tip) întâia (I), care constă în decizia de a respinge ipoteza nulă când de fapt ea este adevărată și este notată cu α ;

- eroarea de speța (tip) a doua, care constă în decizia de a accepta ipoteza nulă când ea de fapt este falsă și se notează cu β .

În procesul de comparare se optimizează cele 2 tipuri de erori și rezultă necesitatea introducerii unui indicator: PUTEREA UNUI TEST STATISTIC. Asta înseamnă șansa de a respinge H_0 când ea este falsă.

Se dorește ca puterea unui test să fie cât mai mare, peste 80%. De regulă eșantioanele mari duc la creșterea puterii unui test.

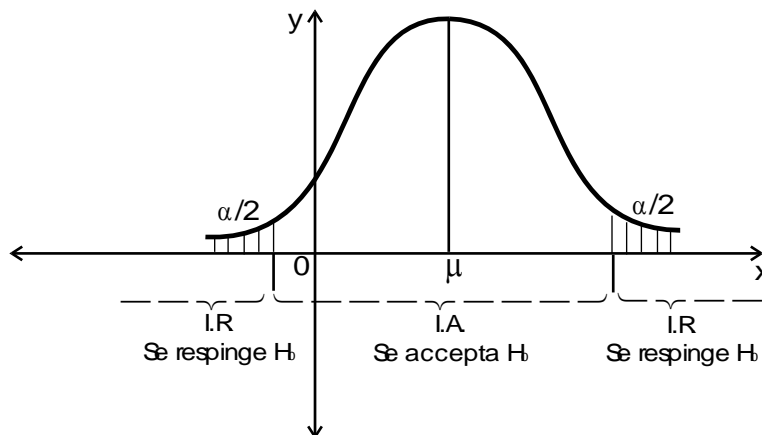
3. Ținând seama de cele afirmate anterior, rezultă că mulțimea valorilor posibile calculate se divide în două intervale sau regiuni complementare:

I.A. = Interval de acceptare - care constă din mulțimea valorilor pentru care o valoare a statisticii calculate prin test se înscrie printre acestea și atunci se acceptă ipoteza nulă H_0 .

I.R. = Interval de respingere - care constă din mulțimea valorilor pentru care o valoare a statisticii calculate prin test se înscrie printre acestea și atunci se respinge ipoteza nulă.

Acceptarea H_0 presupune că diferența testată este nesemnificativă statistic, iar respingerea ipotezei nule înseamnă că diferența este semnificativă statistic.

Distribuția mediilor eșantioanelor față de media populației generale (Legea Gauss-Laplace)



I.R.= intervalul de respingere

I.A.= intervalul de acceptare

Fig. 3 Curba Gauss Laplace și nivelul pragului de semnificație

În practică, în domeniul ocrotirii sănătății, un nivel (prag) de semnificație $\alpha = 0,05$ adică 5% este suficient de precis, probabilitatea (nivel de încredere) de 95% arătând că decizia luată este justă. În aceste cazuri afirmăm că H_0 a fost respinsă la un nivel (prag de semnificație) $\alpha = 0,05$, deci că s-ar putea să greșim cu o probabilitate de 0,05 (5%) și că putem avea încredere în decizia luată cu o probabilitate de 95% (nivel de încredere).

CRITERII DE ALEGERE A TESTELOR

1. În cazul în care avem caracteristici cantitative și calitative în cadrul unei populații gaussiene (în care există o distribuție normală de tip Gauss-Laplace) se utilizează un test de tipul:

- Testul "t" (al lui Student)
- Testul "F" (al lui Fischer) etc.

2. În cazul populațiilor negaussiene se folosesc teste neparametrice, în care valorile ca atare pot să nu existe, iar dacă există se înlocuiesc cu rangurile lor, rezultând o pierdere de informație, deci sunt teste mai slabe (putere mai mică):

- Testul chi pătrat (χ^2) - al lui Pearson
- Testul mediane
- Testul lui Mann și Withney
- Testul semnului
- Testul lui Wilcoxon
- Testul lui Kruskal și Wallis

Compararea mediei unei colectivități generale cu media unui eșantion prin criteriul diferenței și erorii diferenței

Când dispunem de o medie a colectivității generale cu care comparăm o medie de eșantion, se procedează la stabilirea diferenței între cele două medii scăzând valoarea cea mai mică din cea mai mare.

Se calculează după aceea valoarea erorii standard pentru eșantion. Cum se face interpretarea? Dacă diferența între cele două medii - absolută și de eșantion - este mai mare decât valoarea dublă sau triplă a erorii standard, atunci diferența este **semnificativă statistic**.

Acest lucru înseamnă că din colectivitatea din care am extras eșantionul există anumiți factori (de mediu fizic, de alimentație, de muncă, etc.) care au determinat această diferență de valori.

Dacă din contră, diferența între media universului și media eșantionului este mai mică decât valoarea dublă sau triplă a erorii standard, atunci diferența între cele două medii este ne semnificativă din punct de vedere statistic, este întâmplătoare și se datorește faptului că am efectuat cercetarea pe un număr limitat de frecvențe.

Compararea mediilor a două eșantioane diferite (testul t Student)

Când cele două medii care se compară sunt medii de eșantion, stabilim diferența dintre cele două medii:

$D = M_2 - M_1$. Calculăm apoi eroarea diferenței (a_D) dintre cele două valori medii:

$$\sigma_D = \pm \sqrt{ES_1^2 + ES_2^2}$$

în care: δ_D = eroarea diferenței ES_1^2 = eroarea standard a eșantionului unu la pătrat ES_2^2 = eroarea standard doi la pătrat.

Interpretarea se face astfel: dacă diferența între cele două medii de eșantion este mai mare decât valoarea dublă sau triplă a erorii diferenței atunci diferența între medii este semnificativă din punct de vedere statistic, deci cele două eșantioane luate în studiu, nu aparțin aceleiași colectivități generale. Unul din eșantioane a avut deci condiții diferite de celălalt. Ca atare în cadrul discutării rezultatelor trebuie să stabilim care au fost acele condiții care au făcut ca rezultatele să difere semnificativ

Dacă, din contră, diferența dintre cele două medii de eșantion este mai mică decât valoarea dublă sau triplă a erorii diferenței, atunci diferența este ne semnificativă din punct de vedere statistic, este întâmplătoare și se datorește diferenței de eșantionaj. Ca atare nu trebuie să căutăm neapărat o explicație a acestei diferențe.

Exemplu: Pe două eșantioane, extrase din două colectivități limitrofe, deci cu condiții asemănătoare (aceiași factori de mediu fizic, același mediu de alimentație, aceleași condiții de muncă, același nivel cultural-sanitar etc.), se stabilește media dinților absenți și se găsește că la primul eșantion, de 250 persoane (e_1) media (M_{e_1}) este de 5,5 dinți absenți, cu o eroare standard de $\pm 0,7$ iar la al doilea eșantion (e_2), de 200 de persoane, media M_{e_2} a dinților absenți este de 6,2 iar eroarea standard de $\pm 0,2$. Diferența între medii este:

$$D = M_2 - M_1 \quad D = 6,2 - 5,5 = 0,7 \text{ dinți absenți.}$$

$$a_D = \pm 0,72 \text{ dinți absenți.}$$

Diferența dintre medii (0,7) fiind mai mică decât valoarea diferenței ($\sigma_D = 0,72$) înseamnă că între cele două medii nu există o diferență semnificativă din punct de vedere statistic.

Compararea a două valori calitative prin criteriul diferenței și erorii diferenței (procentuale)

Când avem de comparat o probabilitate a colectivității generale cu o probabilitate de eșantion, pentru a stabili semnificația sau lipsa de semnificație a diferenței dintre aceste probabilități, procedăm în felul următor:

Stabilim diferența între cele două probabilități (probabilitatea în colectivitatea generală și probabilitatea eșantionului). Calculăm apoi valoarea erorii standard pentru eșantion, conform formulei:

$$ES = \pm \sqrt{\frac{P_e q_e}{n-1}}$$

Interpretarea se face astfel: dacă diferența dintre cele două probabilități este mai mare decât valoarea dublă sau triplă (U_a), a erorii standard, atunci diferența este semnificativă și trebuie să stabilim căror factori se datorează.

$D > U_a$ sau

$D > 2(3)ES$, atunci diferența este semnificativă statistic.

Dacă din contră, diferența dintre cele două probabilități este mai mică decât valoarea dublă sau triplă a erorii standard, atunci diferența este ne semnificativă, este întâmplătoare și se datorește diferenței de eșantionaj.

Exemplu: Dacă pe populația unui județ s-a stabilit că probabilitatea parodontopatiei parțiale este de 60% iar pe un eșantion de 350 de locuitori s-a stabilit că parodontopatia parțială este prezentă la 80% din populație, atunci diferența este:

$$D = 80\% - 60\%; \quad D = 20\%$$

Eroarea standard pentru eșantion va fi :

$$ES = \pm \sqrt{\frac{80 \times 20}{360}} = \pm \sqrt{\frac{1600}{360}} = \pm \sqrt{4,57} = \pm 2,13\%$$

$D (20\%) > 2 \times 2,13\%$ ($3 \times 2,13\%$) = diferența este semnificativă din punct de vedere statistic,

Între cele două probabilități există o diferență semnificativă din punct de vedere statistic, asigurând aceasta a fi rmație cu un prag de semnificație de 5%, respectiv 1%.

Când avem de comparat două probabilități obținute pe 2 eșantioane, procedăm în felul următor:

Stabilim diferența dintre cele două probabilități de eșantion: $D = P_{e1} - P_{e2}$

Dacă diferența dintre cele două probabilități de eșantion este mai mare decât valoarea dublă sau triplă a erorii diferenței, atunci diferența este semnificativă din punct de vedere statistic.

$D > 2(3) \delta_D$ = diferența semnificativă statistic.

Dacă din contră, diferența dintre probabilitățile de eșantion este mai mică decât valoarea dublă sau triplă a erorii diferenței, atunci diferența este ne semnificativă din punct de vedere statistic, este întâmplătoare și se datorește diferenței de eșantionaj. $D < 2(3) \delta_D$ = diferență ne semnificativă din punct de vedere statistic.

Atunci când, în cadrul eșantionării, am discutat și am definit testul t am spus că testul t este multiplul erorii standard și că cu ajutorul lui stabilim mărimea intervalului de siguranță. Acest test t a cărui valoare - în cazul în care lucrăm pe eșantioane cu un număr mai mic de 120 frecvențe - o luăm din tabela testului t, se numește “t tabelar”. Dar valoarea lui t o mai putem obține și prin calcul după formula:

$$t_{calc.} = \frac{D}{\sigma_D} = \frac{|M_1 - M_2|}{\sqrt{ES_1^2 + ES_2^2}}$$

în care:

t = testul de semnificație

D = diferența dintre valorile medii sau procentuale δ_D = eroarea diferenței.

Acest t obținut raportând valoarea diferenței la eroarea sa, se numește “t calculat”.

În cazul în care dorim să apreciem semnificația sau lipsa de semnificație a diferenței dintre două valori medii sau două probabilități, obținute pe eșantioane, procedăm în felul următor: calculăm valoarea lui t, raportând diferența dintre cele două medii la eroarea sa.

Stabilim apoi valoarea lui “t tabelar” în felul următor: dacă numărul frecvențelor celor două eșantioane depășește suma de 120 atunci valoarea lui “t tabelar” o cunoaștem ca fiind 1,96 pentru un p = 0,05 (5%); 2,58 pentru un p = 0,01 (1%) sau 3,29 pentru un p = 0,001 (0,1%).

Dacă numărul însumat de frecvențe al celor două eșantioane ce se compară este mai mic de 120 de frecvențe, atunci valoarea lui “t tabelar” o citim în tabela testului t în gradul de libertate dat de numărul însumat de frecvențe minus 2.

Interpretarea se face în felul următor: dacă valoarea lui “t calculat” este mai mare decât valoarea lui “t tabelar” atunci diferența între cele două valori medii sau între cele două probabilități este semnificativă din punct de vedere statistic.

“t calculat” > “t tabelar” = diferența **semnificativă** statistic. Dacă, din contră, valoarea lui “t calculat” este mai mică decât valoarea lui “t tabelar”, atunci diferența dintre cele două medii sau dintre cele două probabilități este nesemnificativă din punct de vedere statistic.

“t calculat” < “t tabelar” = diferență **nesemnificativă**. Pentru exemplificare și verificare, în același timp, vom lua aceleași exemple pe care le-am apreciat, sub aspectul semnificației diferenței și cu ajutorul erorii diferenței.

În cazul comparării a două medii obținute pe eșantioane diferența între medii a fost de 0,7 dinți absenți iar eroarea diferenței a fost de $\pm 0,72$ dinți absenți atestând o diferență nesemnificativă între medii, încercând să stabilim semnificația sau lipsa de semnificație pe calea testului t, obținem următoarele rezultate:

t tabelar, în cazul exemplului nostru - datorită faptului că numărul de frecvențe este mult mai mare decât 120, are valori constante (1,96; 2,58; 3,29).

t calculat având o valoare mult mai mică (0,09) decât valoarea lui t tabelar (1,96; 2,58; 3,29) testează, așa după cum am arătat, o diferență nesemnificativă din punct de vedere statistic între cele două medii de eșantion.

În cazul comparării a două valori **procentuale**, de eșantion cu ajutorul **testului “t”** stabilim valoarea lui “t calculat” și valoarea lui “t tabelar”.

Spre exemplu, s-a examinat un eșantion de 84 de elevi și s-a stabilit că frecvența cariei dentare este de 90%, iar examinarea unui alt eșantion de 60 de elevi, extrase dintr-o altă colectivitate școlară, a evidențiat prezența cariei dentare doar la 60% dintre aceștia. Spre a stabili

dacă diferența dintre cele două probabilități este semnificativă din punct de vedere statistic sau nu, stabilim mai întâi diferența dintre cele două probabilități:

$D = P_{e1} - P_{e2}$ în care;

D = diferența

P_{e1} = probabilitatea primului eșantion

P_{e2} = probabilitatea celui de al doilea eșantion

$D = 90\% - 60\% = 30\%$

Diferența este egală cu 30%, calculăm apoi eroarea diferenței conform formulei:

Diferența dintre cele două probabilități (30%) fiind mai mare decât triplul erorii diferenței ($3 \cdot 6,40\% = 19,20\%$) este semnificativă din punct de vedere statistic un prag de semnificație sub 1%.

$D(30\%) > a_D(19,20\%)$ = diferența semnificativă statistic pentru un $p < 0,01$.

Folosind metoda testului t evidențiem aceeași semnificație a diferenței:

Interpretarea "t calculat" (4,68) fiind mai mare decât oricare din valorile lui "t tabelar" evidențiază aceeași diferență semnificativă între cele două probabilități de eșantion.

Compararea valorilor absolute sau a distribuțiilor de frecvență: testul X^2

Când avem de comparat între ele valori absolute sau distribuții de frecvențe, folosim **testul X^2 (chi pătrat) al lui Pearson**. TESTUL CHI PĂTRAT este un test neparametric utilizat pentru deducțiile statistice, în cazul a 2 sau mai multe eșantioane extrase aleator dintr-o populație și care au o repartiție de frecvențe diferite între ele. Testul chi pătrat compară 2 sau mai multe repartiții de frecvențe, dintre care una de obicei se consideră ca lot martor și cealaltă lot experimental, provenite din aceeași populație, deci cu o repartiție de frecvențe similară, dar având totuși o caracteristică diferită.

Testul X^2 se obține însumând rapoartele dintre pătratul diferențelor stabilite între frecvențele colectivității generale (frecvențele teoretice) și frecvențele observate și frecvențele colectivității generale.

Formula de calcul:

$$X^2 = \sum \frac{(FT - FO)^2}{FT}$$

în care:

X^2 = testul de comparație sau de concordanță chi pătrat;

FT = frecvențele universului sau frecvențele teoretice obținute prin calcul;

FO = frecvențele observate sau frecvențele eșantionului nostru.

În situația în care avem o distribuție a colectivității **generale** pe care o comparăm cu **distribuția unui eșantion**, atunci introducem datele respective în formulă și calculăm valoarea lui X^2 , în situația în care nu avem datele colectivității generale, distribuția frecvențelor teoretice o obținem prin calcul - de aici denumirea de frecvențe teoretice - așa cum vom vedea ulterior.

Valoarea lui X^2 , obținută pe baza formulei de mai sus, se numește valoarea lui "X² calculat". Pentru a putea stabili dacă între distribuția colectivității generale și cea a eșantionului observat de noi este sau nu o diferență semnificativă din punct de vedere statistic, avem nevoie - ca și în cazul comparației cu ajutorul testului t - de valoarea lui "X² tabelar". Această valoare o luăm din **tabelul testului X^2** , care este asemănător cu tabelul „Testului t”.

Frecvențele teoretice le obținem prin calcul. Considerăm că între incidența cariei dentare la băieți și la fete nu există nici un fel de deosebire. Acceptăm, deci, de la început, principiul ipotezei nule și universul nostru este reprezentat de numărul total al frecvențelor.

2.9.9. Prezentarea materialului statistic

Prezentarea sub formă de tabele

Aceasta constituie o metodă simplă, comodă, sintetică și sistematică:

- *Comodă*: rezultatele cercetării sunt date sub forma unor date cifrice, putând fi ușor observate aspectele principale ale problemelor cercetate;
- *Sintetică* - datele cifrice redau aspectele esențiale ale fenomenului studiat
- *Sistematică*: - pentru că între diferitele date calitative sau cantitative prezentate în tabel există o înlănțuire logică, ușurând înțelegerea lor.

Pentru ca un tabel să corespundă cerințelor trebuie să cuprindă următoarele:

- *Titlul* - care să fie sugestiv; să redea printr-o frază clară conținutul tabelului, locul și perioada de timp la care se referă, precum și să conțină modul în care au fost culese datele. Trebuie să răspundă la 4 întrebări: ce?, unde?, când? și cum?
- *Rândurile și coloanele* - trebuie să fie așezate logic și notate corespunzător conținutului acestora

Exemplu:

Distribuția pe cauze, grupe de vârstă și sex a îmbolnăvirilor stomatologice a elevilor liceului X anul Y (Tab....).

Repartizarea pe cauze, grupe de vârstă și sex a îmbolnăvirilor stomatologice a elevilor liceului X anul Y

Nr. crt.	Afecțiunea	Număr elevi								
		Total	Grupe de vârstă		15-16		17-18		19-20	
			Sexul		Sexul		Sexul		Sexul	
			M	F	M	F	M	F	M	F
1.	Caria simplă	118	54	64	20	24	18	21	16	10
2.	Pulpită	15	7	8	3	4	3	2	1	2
3.	Gangrena	4	3	1	-	1	2	-	1	
4.	Extracții	18	10	8	5	2	1	3	4	3
	Total	155	74	81	28	31	24	26	22	24

Tipurile de tabele statistice:

Există în general o mare varietate de tabele statistice, de la cele mai simple care au un singur criteriu de clasificare până la cele mai complexe.

În scop didactic am împărțit tabelele în 3 tipuri:

- tabele pentru clasificare dichotomică;
- tabele pentru distribuția de frecvențe;
- tabele de corelație.

Tabelele pentru clasificarea dichotomică le utilizăm în situația în care cercetăm fenomene care se caracterizează prin însușiri sau caracteristici diametral opuse, excluzându-se unul pe altul. A dichotomiza, în limba greacă, înseamnă a divide, a împărți în două.

Tabele pentru distribuția de frecvențe le utilizăm atunci când dorim să prezentăm în tabele rezultatele grupării după anumite criterii.

Tabele de corelație le folosim pentru evidențierea corelației dintre două fenomene între care în mod logic există o legătură de dependență. Aceste tabele se caracterizează prin aceea că au două variabile: una determinantă (factorială) și cealaltă determinată (rezultantă), în cazul tabelului de corelație valorile înscrise în căsuțele tabelului corespund în același timp unei anumite grupe de valori a primului fenomen determinant și unei anumite grupe de valori a celui de-al doilea fenomen determinat de primul. Ca atare cele două variabile ale tabelului de corelație trebuie să fie împărțite într-un număr egal de grupe de valori pentru ca ele să se coreleze perechi.

Prezentarea sub formă grafică

Tabelele, deși redau foarte exact aspecte cantitative ale unui fenomen cercetat, fiind în același timp sintetice și sistematice, necesită totuși o anumită pregătire de specialitate pentru a putea fi urmărite și înțelese. Ca atare ele pot fi utilizate în lucrări de cercetare științifică prezentate sub formă de articole în reviste de specialitate care se adresează unui public cu pregătire corespunzătoare. Ele redau mai mult aspecte statice ale fenomenului cercetat, încărcarea tabelelor cu date referitoare la perioade lungi de timp îngreunează urmărirea și înțelegerea acestora.

Graficele, deși mai puțin exacte decât tabelele, au o arie de utilizare mai largă întrucât sunt mai intuitive, putând fi urmărite și înțelese mai ușor de către un public mai larg.

Componentele principale ale unui grafic

Graficul este de fapt o hartă care "vorbește" direct ochiului și este foarte eficientă în crearea unei imagini în mintea receptorului. Construirea unui grafic înseamnă atât știință, cât și artă; înseamnă cunoașterea grafiilor celor de bază, modalitatea de realizare din punct de vedere tehnic și mai ales cum se combină elementele de bază pentru a crea o hartă corespunzătoare; alegerea tipului de reprezentare grafică pentru situații dificile, complexe ale evoluției fenomenelor înseamnă de fapt artă. Persoana care realizează graficul își asumă o responsabilitate mare pentru că un grafic corect conduce la informare corectă iar un grafic gândit și construit incorect conduce la dezinformare (Anders Wallgren, Britt Wall-gre, Rolf Persson, 1990). Atunci când un grafic este privit, ochiul trebuie să înregistreze imediat caracteristicile principale precum și unele detalii; pentru aceasta persoana care construiește grafiul trebuie să realizeze un echilibru între detaliu și ansamblu. Un grafic stimulează receptorul să facă conexiuni și să observe imediat modelele care pot apărea în evoluția unui fenomen.

Rolul graficului:

- să orienteze utilizatorul în selectarea informațiilor importante din raportul statistic (“gateway”)
- să dezvolte idei ulterioare și să le explice
- să încurajeze utilizatorul să privească în profunzime problema prezentată în raportul statistic
- să încurajeze compararea și analiza informațiilor

Graficele sunt construite cu ajutorul unor elemente simple cum ar fi linii, arii, text etc. Toate aceste elemente simple trebuie combinate astfel încât grafi cul rezultat să aibă sens și să poată fi citit cu ușurință.

Persoana care are responsabilitatea reprezentării grafice trebuie să-și pună următoarea întrebare:

Care este tipul de grafic potrivit pentru reprezentarea grafică a datelor statistice?

- *Alegerea depinde în primul rând de problema pe care dorim să o punem în evidența prin reprezentarea grafi că.*
- *Nu există o regulă care să stabilească o corespondență între un anumit tip de relație între variabile și un anumit tip de grafic. Trebuie luați în considerare diferiți factori pentru fiecare situație în parte.*
- *Avem de ales uneori între:*
 - *grafice corespunzătoare și necorespunzătoare unei anumite situații sau,*
 - *între mai multe tipuri de grafice potrivite aceleiași situații. Trebuie să decidem în primul rând ce dorim să punem în evidența cu ajutorul acelu grafic: evoluția în timp, variațiile etc. Trebuie subliniate principalele caracteristici ale datelor și să ținem cont de limitele impuse de acestea. Caracteristicile importante în acest context sunt:*
 - structura datelor
 - tipul variabilelor
 - caracteristicile măsurătorilor.

Principalele componente ale unui grafic sunt:

1. *suprafața de reprezentare (“chart area”)*
2. *suprafața graficului mărginită de axe și cadran (“plot area”)*
3. *aria graficului*
4. *legenda graficului*
5. *rețeaua de axe - liniile orizontale și verticale (“gridlines”)*
6. *etichetele corespunzătoare axelor*

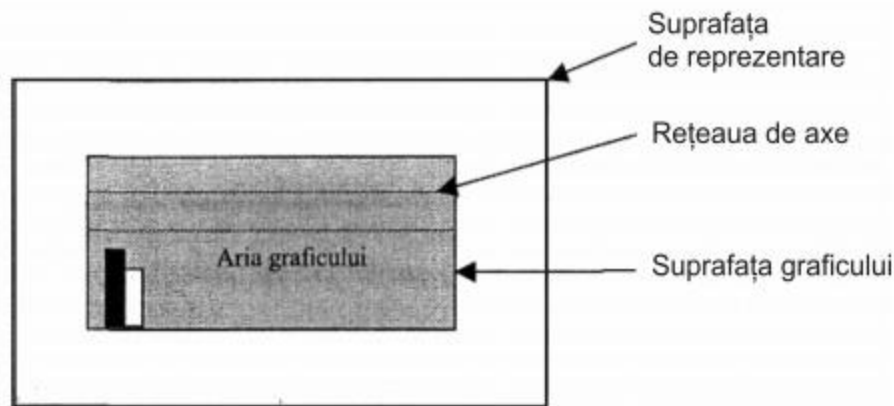


Fig. 4. Componentele principale ale unui grafic

Din punct de vedere al tehnicii de construire graficele pot fi grupate în mod neconvențional în două tipuri de grafi ce:

- **Grafice fundamentale**, de bază (histograma, poligonul, ogiva, diagrama lineară)
- **Grafice speciale** (diagrama prin coloane, piramida populației/vârstelor, graficele de structură care utilizează cercul („pie chart”), hărți statistice, cartograme cu diferite simboluri, grafi ce semilogaritmice etc.)

Grafice fundamentale

Seriile de variație pot fi reprezentate prin următoarele tipuri de diagrame de distribuție: histograma, poligonul, ogiva și diagrama liniară, printre aceste tipuri se vor descrie histograma și diagrama liniară care sunt frecvent utilizate în cercetarea din domeniul sănătății.

Histograma

Histograma este o reprezentare grafică, prin dreptunghiuri alăturate, a distribuției frecvențelor sau procentelor. Ea se utilizează când autorul graficului dorește să arate frecvența pentru o variabilă continuă (de exemplu vârsta). Histograma poate descrie și distribuția procentuală. Frecvența cazurilor (sau procentajul) pentru fiecare categorie este reprezentată de un dreptunghi. Aria dreptunghiului este proporțională cu frecvența cazurilor din categoria respectivă.

$$\text{Aria dreptunghiului} = \text{Baza} \times \text{înălțimea}$$

Scala categoriilor variabilei este reprezentată pe “axa X” prin distanțe egale. Scala frecvențelor este reprezentată pe “axa Y” prin distanțe egale corespunzătoare frecvențelor egale. Axa Y începe întotdeauna din punctul “0” pentru a evita problemele ce ar putea să apară în compararea bazelor. Axa X începe însă din orice punct convenabil (inferior) de pe axă. Obiectivul este acela de a obține o fi gură cu aria totală egală cu frecvența totală N (sau procentul total 100%).

Exemplu: În tabelul de mai jos sunt prezentate datele necesare pentru construirea unei histograme.

Frecvența în cadrul fiecărei categorii a persoanelor investigate (%)

Ani de școlarizare	Distribuția frecvențelor	Frecvența în cadrul fiecărei categorii a persoanelor investigate (%)
4 ani	21	9,4
5 ani	53	23,8
6 ani	69	30,9
7 ani	47	21,1
8 ani	33	14,8
	N = 223	100,0%

Histograma utilizează valori absolute sau relative.

Tehnica este aceeași, dar pe axa Y sunt reprezentate valori absolute sau relative în funcție de situație. Pe axa X este reprezentată variabila pe care o măsurăm (intervalul de clasă), iar pe axa Y este reprezentată frecvența pentru fiecare interval de clasă; înălțimea dreptunghiului este proporțională cu numărul de persoane din categoria respectivă.

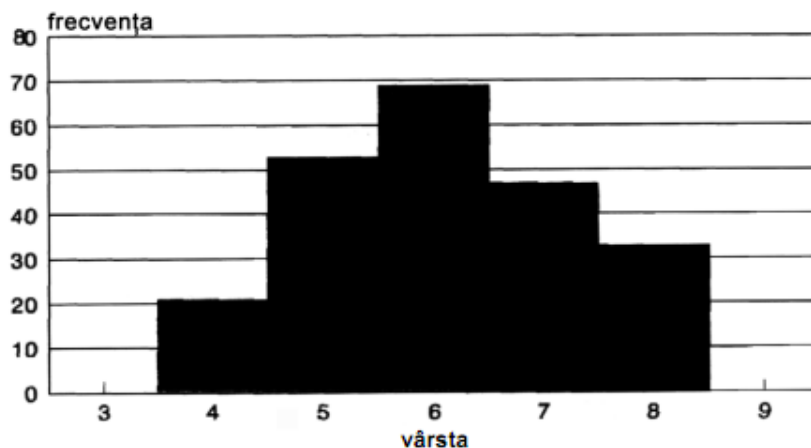


Fig. 5. Exemplant de histograntă

Unele variații ale histogramei de bază sunt folosite pentru a reflecta anumite caracteristici ale datelor. Spre exemplu, dacă variabila este “*nominală*” dreptunghiurile din histograntă pot fi separate astfel încât să vizualizeze separat și distinct categoriile. De obicei acest grafic mai este numit și diagrama prin coloane iar dreptunghiurile au lățimile egale

Pentru variabilele “*ordinale*”, unde nu sunt definite distanțe egale dreptunghiurile pot avea spații între ele pentru a evidenția acest lucru (în particular dacă variabila este discretă și mai puțin în cazul în care este continuă). În acest caz, histograntă poate fi de tip scară și dă impresia de ordonare a categoriilor (marcajul este în interiorul fiecărei coloane). Pentru variabilele ordinale există tradiția de a lua o lățime standard, deși distanțele nu sunt definite. Acest lucru duce la evitarea distorsiunilor aparente ce pot să apară datorită variației lățimilor.

Histograma este potrivită în cazul variabilelor de tip “*interval de variație*”, *discrete*. Dacă variabilele sunt de tip “*continuu*” există alte tipuri de grafi ce mai potrivite (exemplu, poligonul frecvențelor).

Poligonul frecvențelor

Poligonul frecvențelor sau al procentelor este o fi gură închisă ce unește punctele dintre centrele de interval și frecvențele lor. Este o alternativă la histogramă.

O altă modalitate de reprezentare grafică este distribuția cumulativă a frecvențelor sau procentelor. Acest tip de grafic arată frecvența, respectiv procentele cazurilor situate sub marginea superioară a fiecărei clase succesive.

Diagrama liniară (cronogramă sau historiogramă)

Reprezintă forma specifică pentru reprezentarea seriilor dinamice, cronologice. Este utilizată pentru descrierea evoluției în timp a unui fenomen (natalitate, fertilitate, mortalitate etc.).

Diagrama liniară prezintă valoarea anumitor variabile dependente (reprezentate pe axa Y) pentru fiecare categorie a variabilei independente (reprezentate pe axa X). Punctele de pe grafi c sunt unite printr-o linie dreaptă, iar fi gura nu este închisă cu axa X. Aria de sub curbă nu are un înțeles particular așa cum se întâmplă în cazul histogramei sau a poligonului.

În acest tip de grafic ochiul urmărește ușor curba de evoluție și sesizează imediat modificările care s-au produs în timp în evoluția fenomenului observat. Este frecvent utilizată în monitorizarea stării de sănătate a unei comunități (natalitate, mortalitate, morbiditate).

Figura de mai jos este un exemplu de diagramă liniară. Variabila independentă este timpul reprezentată pe axa X iar variabila dependentă este rata (reprezentată pe axa Y).

Acest tip de grafic este util atunci când una dintre variabile (de pe axa X) este continuă, este deci, variabilă de tip interval (exemplu vârsta și timpul).

Se poate folosi și o diagramă prin coloane în cazul în care variabile-le de pe axa X sunt *nominale* sau *ordinale*. În acest caz barele verticale sunt mai indicate pentru comparări. Pentru seriile cronologice urmări-rea vizuală a coloanelor în scopul observării evoluției este mai dificilă.

În diagrama liniară curbele pentru seriile cronologice sunt mult mai ușor de urmărit și în același timp oferă o descriere (un desen) a evoluției în timp a fenomenului observat.

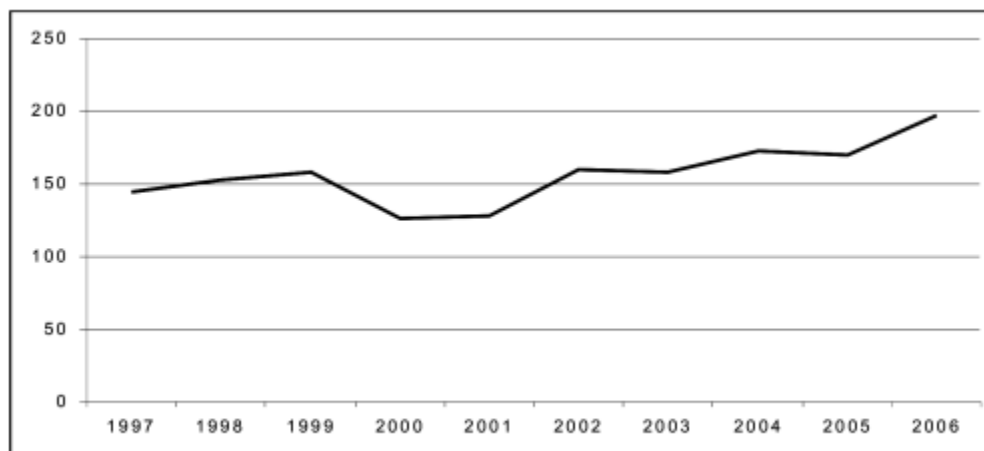


Fig. 6. Incidența gingivitei la persoanele de sex feminin, fumătoare în județul Timiș între anii 1997- 2006

Atenție

- Axa Y trebuie să fie $\frac{3}{4}$ din lungimea axei X (sau de aceeași lungime).
- Întotdeauna axele frecvențelor sau ale procentelor încep de la punctul 0 sau de la origine. Axele scorurilor pot începe de la orice scor convenabil pentru a obține o diagramă clară.
- Fiți siguri că diferențele numerice egale sunt reprezentate prin distanțe egale pe toate scalele.
- Etichetarea corectă a graficului - includerea scalelor, sursa datelor, titlul explicativ, note explicative, etc.
- Evitați confuziile: nu reprezentați mai multe grafice diferite utilizând aceleași sisteme de axe.

Grafice speciale

Diagrama prin coloane

Este cea mai simplă formă de grafic. Acest tip de diagramă este utilizat atunci când se urmărește:

- reprezentarea mai multor fenomene în același loc și în același timp, *sau*
- același fenomen în mai multe locuri dar în același timp.

Diagrama prin coloane este ușor de reprezentat grafic și ușor de citit. Se utilizează atunci când dorim să reprezentăm valori distincte ale variabilelor - variabile *calitative* sau *discrete*. Pentru ilustrarea acestui lucru coloanele sunt separate de spații.

Sunt utilizate pentru reprezentarea grafică a frecvențelor absolute sau a frecvențelor relative, a sumelor sau a mediilor.

Pe axa X sunt reprezentate variabilele, în timp ce pe axa Y sunt reprezentate frecvențele.

Utilizarea procentelor permite mult mai bine compararea mulțimilor de date de dimensiuni diferite.

Coloanele trebuie să fie mai late decât spațiile dintre ele, iar spațiile trebuie să fie bine definite, astfel încât graficul de tip coloană să nu poată fi confundat cu o histogramă.

Timpul alocat fiecărui periaj dentar

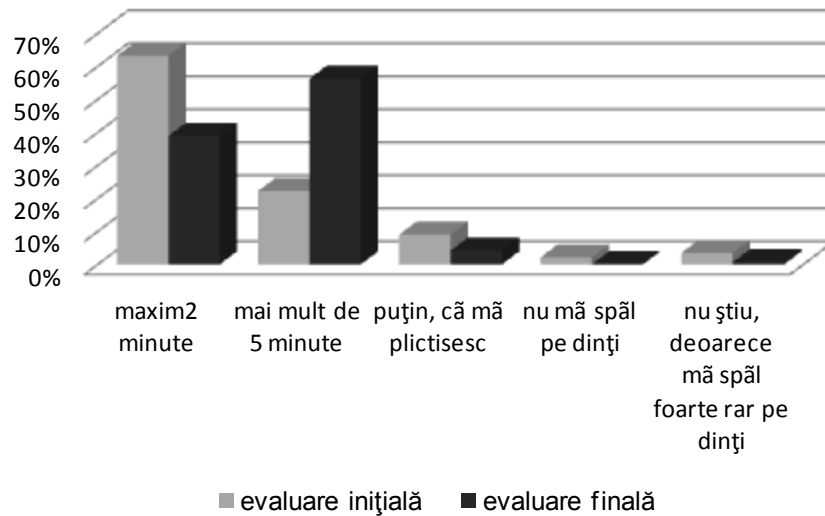


Fig. 7. Exemplu grafic cu bare verticale

Rețeaua de axe este utilă pentru comparații și pentru citirea aproximativă a valorilor. Dacă axele rețelei sunt în număr prea mare graficul este greu de citit, iar dacă sunt în număr prea mic prezența lor nu se justifică.

Din punct de vedere al orientării barele pot fi:

- verticale
- orizontale

Rezultatele evaluărilor orale la grupul țintă

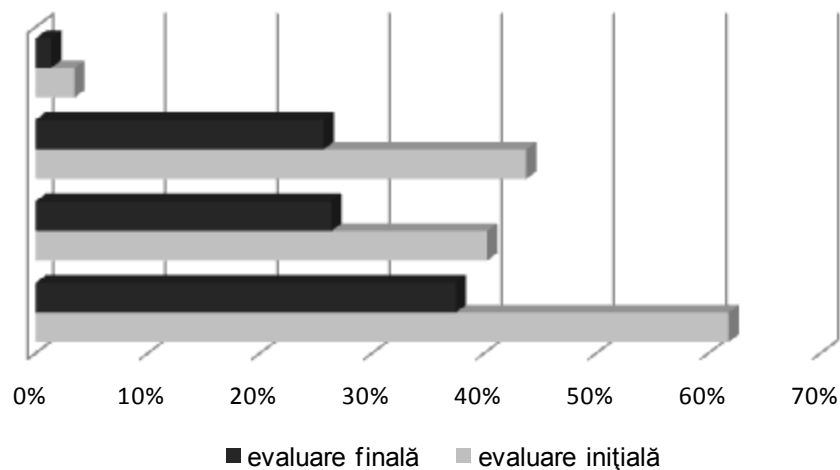


Fig. 8. Exemplu grafic cu bare orizontale

Pentru a pune în evidență conținutul graficului se vor respecta câteva principii.

Ordonarea barelor

- ordonarea adecvată a valorilor variabilei oferă un grafic mai bun
- pentru o variabilă calitativă există o libertate în ordonarea valorilor sale
- aranjarea valorilor în ordinea descrescătoare a frecvențelor creează un interes mai mare
- neordonarea valorilor conferă o imagine haotică

Gruparea barelor este recomandată în două situații:

- pentru a descrie simultan două sau mai multe categorii diferite categorii sunt reprezentate în același sistem de axe.
- pentru diferențierea categoriilor se folosesc hașurări sau culori diferite și se atașează graficului o legendă.

Se recomandă să nu se reprezinte mai mult de două-trei categorii, un număr mai mare va face dificilă înțelegerea graficului (de exemplu: masculin, feminin; urban, rural; salariat, patron, lucrător pe cont propriu).

Dacă există un număr mai mare de categorii se vor folosi mai multe grafice cu coloane obișnuite.

Coloanele grupate sunt reprezentate fie pe verticală fie pe orizontală. Cele două grafice produc efecte diferite, chiar dacă aria are aceeași dimensiune în ambele cazuri.

În cazul coloanelor orizontale, axa procentelor este lungă, astfel încât diferențele dintre valori pot fi observate mai clar.

O alternativă la coloanele grupate o reprezintă *coloanele suprapuse parțial* (“overlapping bars”). Avantajul în acest caz este dat de economisirea spațiului, iar reprezentarea grafică devine mai interesantă. Există totuși riscul ca suprapunerea să facă graficul greu de înțeles sau să conducă la neînțelegeri

Se recomandă în cazul în care:

- toate valorile unei categorii sunt mai mici decât valorile celeilalte categorii
- există posibilitatea de a reprezenta categoria cu valori mai mici în fata cu o culoare mai deschisă

O alternativă de grupare a coloanelor o reprezintă coloanele aranjate sub *formă de piramidă*, “*stivuite*” (“*stacked charts*”). Este cunoscută sub denumirea de diagramă de structură prin dreptunghiuri. Dreptunghiurile sunt reprezentate unul deasupra celuilalt. În acest caz, suprafața dreptunghiului care reprezintă întreaga colectivitate (100%) este divizată în părți proporționale cu ponderea specifică a fiecărei componente care alcătuiește întregul. Se recomandă un număr relativ mic de componente (variabile).

Pentru valoarea fiecărei variabile, înălțimea coloanei corespunde cu frecvența totală a categoriei respective. Cu precizie, poate fi citită numai dimensiunea categoriei de la bază; celelalte categorii pot fi apreciate cu aproximație.

Hașurările sau culorile diferite indică divizarea totalului în categoriile componente.

Coloane suprapuse vs. coloane “stivuite” ambele reprezintă situații similare

- alegerea se limitează la ceea ce dorim să subliniem cel mai mult
- în cazul coloanelor suprapuse este ușor să compari între ele categorii diferite dar mai dificil să înțelegi ce se întâmplă la nivelul întregii categorii
- în cazul coloanelor “stivuite” ansamblul este vizibil, în timp ce dimensiunea fiecărei categorii este secundară.

Aceeași informație poate fi reprezentată din două puncte de vedere utilizând două tipuri de grafice.

Diagrama de structură care utilizează ca reprezentare cercul (“pie chart”)

Aceasta este tipică pentru reprezentarea distribuției procentelor în cazul variabilelor calitative și constituie o alternativă la diagrama prin coloane. Acest tip de grafic permite să se stabilească în ce raport se găsesc grupele din cadrul colectivității față de colectivitatea în ansamblul ei.

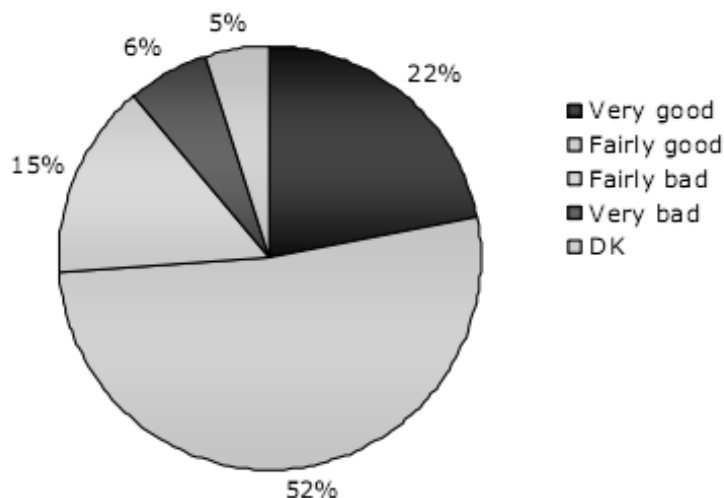


Fig. 9. Exemplu de diagramă de structură

Caracteristicile acestei diagrame sunt:

- totalul ariei reprezintă 100% iar 1% corespunde la 3,6 grade;
- în aria cercului se scriu procentele și nu gradele;
- diagrama se citește în sensul acelor de ceasornic începând cu punctul care poate fi asociat orei 12;
- cercul nu trebuie să aibă mai mult de 5-6 sectoare;
- culorile trebuie să fie atribuite începând cu cea mai închisă până la cea mai deschisă;
- cum această diagramă oferă o vedere de ansamblu, ultima categorie trebuie să fie “alte” și culoarea sau hașurările nu trebuie să fie dominante.

Diagrama prin benzi

Diagrama prin benzi reprezintă o alternativă a histogramei. În acest tip de grafic dreptunghiurile sunt foarte înguste și capătă aspectul de benzi. Benzile sunt orizontale. Se poate alege între numere și procente. Sunt două modalități de reprezentare a procentelor:

- procentele pot fi procente din total bărbați și separat procente din total femei
- procente din totalul populației

Un exemplu de diagramă prin benzi este *“piramida vârstelor”* (“populațion pyramid“) - Piramida vârstelor descrie populația unei țări sau regiuni pe sexe și grupe de vârstă. Constă din două histograme orizontale, una pentru bărbați și una pentru femei. Histogramele sunt așezate în oglindă pentru a se face compararea între sexe, în populația unei țări/regiuni. Pe axa orizontală putem reprezenta atât valori absolute cât și procente.

Lungimea benzilor este proporțională cu valorile reprezentate iar lățimea lor este aceeași pentru toate benzile.

Tehnica este utilizată și în alte situații, de exemplu:

- pentru a reprezenta proporția de fumători în diferite grupuri de vârstă la bărbați și respectiv la femei
- status marital etc.

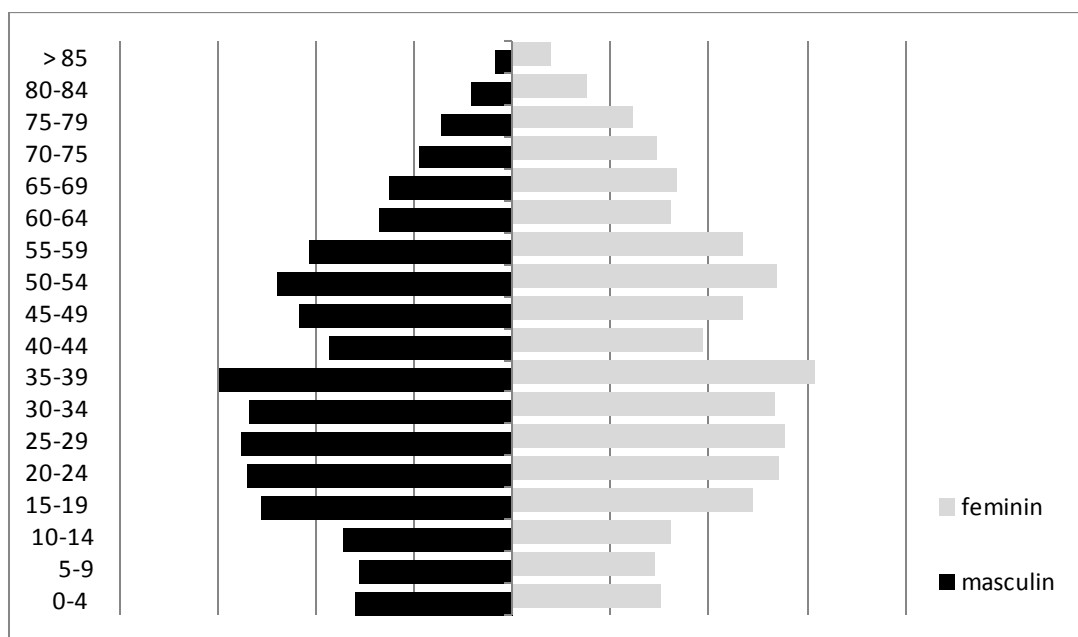


Fig. 10. Exemplu grafic de piramida vârstelor

Hărți statistice

Hărțile statistice ocupă un loc special în reprezentarea variațiilor spațiale (geografice) a diverselor fenomene sau probleme sociale de sănătate. Dintre acestea, în sistemul de sănătate sunt frecvent utilizate *cartogramele*, care reprezintă o combinație dintre grafic și hartă.

Cartogramele exprimă distribuția nivelelor unui fenomen într-o arie geografică (țară, raioane, regiuni). Diferențele dintre proporții, rate, medii etc., sunt puse ușor în evidență prin colorarea/hașurarea diferită a ariilor geografice. Permite compararea valorilor dintre diferitele zone în același timp; compararea pune în evidență atât zonele cu valorile cele mai ridicate, cât și zonele cu valorile cele mai scăzute. Se obține o vizualizare spațială a informațiilor despre fenomenul observat.



Fig. 11. Exemplu de hartă statistică

În tehnica de construire a unei cartograme pașii importanți sunt:

- se grupează pe intervale de mărime valorile fenomenului observat;
- se stabilește un cod de culori sau hașurări prin care vor fi exprimate valorile corespunzătoare fiecărui interval de mărime;
- se colorează sau se hașurează fiecare zonă conform grupului de valori din care face parte;
- în legendă se va explica codul utilizat.

În domeniul sănătății publice s-a dezvoltat, în ultimii ani, conceptul de HEGIS (Health Environment Geographic Information System) care are la bază GIS (Geographic Information Systems).

2.10. Structura raportului de cercetare

În această secțiune se prezintă, cât se poate de clar cum va arăta raportul de cercetare, aceasta fiind o modalitate de verificare a rezultatelor. În organizare acestei secțiuni, obiectivele cercetării sunt de o importanță foarte mare, deoarece raportul final al cercetării va fi organizat în jurul acestor obiective.

Fiecare capitol trebuie organizat în jurul unei teme principale, iar titlul capitolului trebuie să comunice clar această temă.

Ca model pentru structurarea raportului se poate folosi schema de alcătuire a unui articol științific: rezumat, introducere, metodologie, rezultate, discuții, concluzii, bibliografie.

2.11. Probleme și limitări

În această secțiune se prezintă posibilele probleme care pot apărea în realizarea cercetării în legătură cu obținerea datelor, a permisiunii din partea organizației în care se realizează cercetarea, construirea eșantionului ș.a.m.d.

Din cauza faptului că resursele alocate cercetării sunt limitate, iar proiectele de cercetare sunt mai degrabă un exercițiu academic, ele nu presupun o activitate ideală. Cu toate acestea, este important de precizat care sunt limitările care pot afecta validitatea concluziilor cercetării.

2.12. Programarea activităților

Cercetarea trebuie realizată într-un anumit termen. În această secțiune sunt indicate principalele activități și organizarea temporală a acestora. Este indicat să se aloce un timp mai mare, deoarece cercetarea poate să întâmpine dificultăți și respectiv există riscul să apară întârzieri.

Exemplu:

Urmează a fi realizate și terminate în săptămâna...															
Activități	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Scrierea propunerii de cercetare	■	■	■												
Construirea instrumentelor de cercetare		■	■	■	■										
Colectarea datelor						■	■	■	■						
Codificarea și construirea bazei de date										■					
Analiza datelor											■	■	■		
Raport final – editare													■	■	■
Tipărire															■

2.13. Anexe

În anexe pot fi prezentate:

- Lista obiectivelor
- Instrumentele cercetării (chestionarele, tabele, etc)
- Bibliografia

3. Recomandări generale

Ca sfat practic, pentru a realiza un proiect de cercetare, trebuie să completați toate secțiunile proiectului cu maximă atenție, fiind concisi dar fără a omite detalii esențiale. Dacă sunteți în ipostaza de a solicita o finanțare pentru cercetare, trebuie să respectați toate indicațiile finanțatorului în completarea și în construirea propunerii de cercetare. La secțiunile în care nu sunt precizate instrucțiuni precise, se aplică regulile generale de mai sus.

Această prezentare a modului de alcătuire a unui proiect de cercetare este orientativă, ceea ce este important ca părțile componente ale unui proiect de cercetare să fie prezentate, precum și informațiile cuprinse în secțiunile proiectului, pentru o redactare cât mai concisă și clară.

2.14. Corelația și regresia

2.14.1. Corelația

Când vrem să cunoaștem dacă există sau nu vreo legătură de dependență între seriile de variație a două sau mai multe fenomene, recurgem la calculul corelațiilor.

Definiție: Corelația este studiul legăturii dintre 2 variabile aleatoare.

Intensitatea legăturilor statistice este dată de coeficientul de corelație “r”. Acesta redă și sensul legăturii nu numai intensitatea.

$$-1 \leq r \leq +1$$

Interpretarea lui “r”

- r(+) și apropiat de 1 => corelație puternică directă (ambele variabile cresc);
- r(-) și apropiat de 1 => corelație puternică inversă (o variabilă crește și una descrește);
- r(±) și apropiat de 0 => corelație slabă;
- r = 0 => variabilele sunt independente-nu există corelație.

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) \cdot f_i}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \cdot f_i \cdot \sum (y_i - \bar{y})^2 \cdot f_i}}$$

x = variabila independentă (pe abscisă)

y = variabila dependentă (pe ordonată)

Metoda grafică de studiere a legăturii permite formarea unei imagini despre direcția, forma și intensitatea legăturii dintre fenomene. Se folosește sistemul cartezian de axe rectangulare, în care fiecare unitate observată se reprezintă printr-un punct, având drept coordonate valorile variabilelor independente (x) și dependente (y). Rezultă un nor de puncte ce ilustrează intensitatea și forma legăturii.

Cu cât legătura între cele două variabile este mai intensă, cu atât mai mult punctele se vor grupa în jurul unei anumite linii, care poate fi dreaptă (corelație liniară) sau curbă (corelație curbilinie).

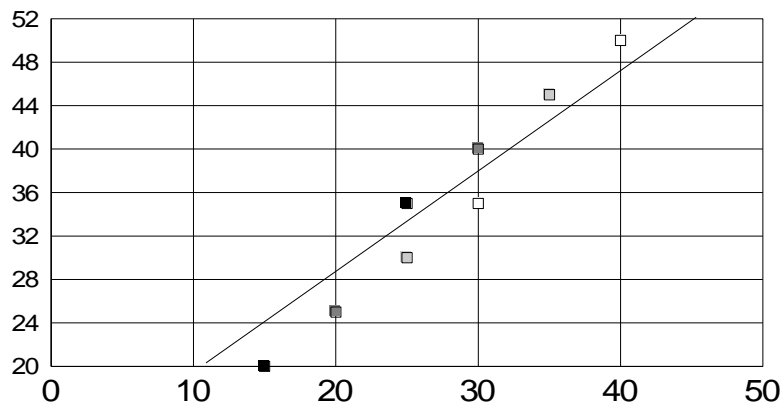


Fig. 12. Corelație puternică și directă

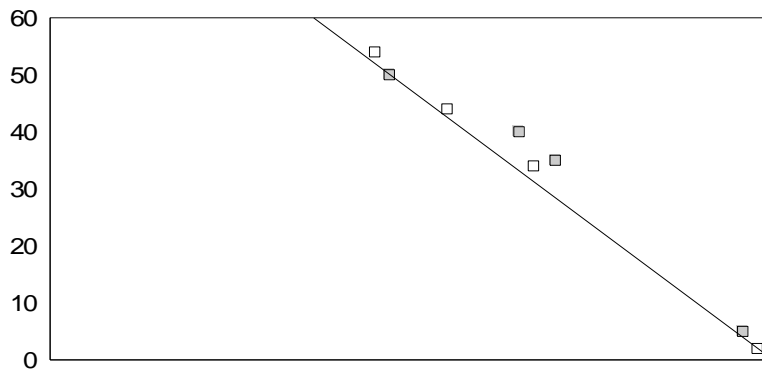


Fig. 13. Corelație puternică și inversă

Problema corelației acoperă orice tip de legătură statistică, fie că este cantitativă ori calitativă. În afară de corelație liniară și curbilinie, mai avem:

- corelație parțială
- corelație multiplă
- corelație de rang
- corelații temporale
 - autocorelație
 - sincronă
 - asincronă

Interpretarea coeficientului de corelație

Coeficientul de corelație poate fi cuprins între minus unu, zero și plus unu. Când valoarea coeficientului de corelație se apropie de +1, înseamnă că între cele două fenomene ce se corelează există o legătură foarte puternică. Semnul + al coeficientului de corelație denotă că legătura de dependență dintre fenomene este directă. Deci ambele fenomene evoluează în același sens, în aceeași direcție. Când valoarea coeficientului de corelație se apropie de -1, înseamnă că între cele două fenomene există o legătură foarte puternică, dar inversă, în sens opus: crește un fenomen, scade cel cu care se corelează.

În medicină, întâlnim de obicei valori ale coeficientului de corelație intermediare valorilor -1 și +1. Pentru interpretarea intensității legăturii de dependență dintre fenomene se utilizează următoarele **CRITERII**:

- valoarea coeficientului de corelație cuprinsă între ± 1 denotă o corelație foarte puternică între fenomene;
- valoarea coeficientului de corelație cuprinsă între $\pm 0,99$ și $\pm 0,70$ denotă o corelație puternică;
- valoarea coeficientului de corelație cuprinsă între $\pm 0,69$ și $\pm 0,30$ denotă o corelație medie între fenomene;
- valoarea coeficientului de corelație cuprinsă între $\pm 0,0$ și $\pm 0,29$ exprimă existența unei corelații slabe între fenomene;
- valoarea coeficientului de corelație 0 denotă că legătura dintre fenomene în mod practic o considerăm inexistentă. Cele două fenomene evoluează deci independent unul de altul.

Coeficientul de corelație între fenomene poate fi corect interpretat dacă se ține seama de următoarele **ASPECTE**:

- între fenomenele ce se corelează să existe, în mod logic, o legătură;
- cele două fenomene să fie cercetate pe eșantioane omogene;
- alegerea sau selecționarea frecvenței eșantioanelor să se facă la întâmplare.

Eroarea coeficientului de corelație lineară

Coeficientul de corelație, ce exprimă legătura de dependență dintre două fenomene, se obține de obicei pe eșantioane și nu pe univers. Valorile acestuia diferă mai mult sau mai puțin față de valoarea coeficientului de corelație pe care am fi obținut-o studiind fenomenele pe întreaga populație.

În seriile statistice grupate coeficientul de corelație se obține raportând suma produselor dintre abaterile valorilor variantelor de la media ponderată a celor două fenomene ce se corelează și frecvențele de perechi de valori ale variantelor la rădăcina pătrată din suma produselor dintre pătratele abaterilor valorilor variantelor de la media ponderată și frecvențele corespunzătoare fiecărei variante a primului fenomen, înmulțită cu suma produselor dintre pătratele abaterilor valorilor variantelor de la media ponderată și frecvențele corespunzătoare fiecărei variante a celui de al doilea fenomen, cu care se corelează.

Regresia

În cazul legăturii liniare, variabila dependentă se schimbă uniform sub influența variabilei independente. Această schimbare se poate exprima cu ajutorul ecuației liniare drepte:

$$y = a + bx$$

x - variabila independentă

y - variabila dependentă

a,b - coeficienții liniei de regresie

b - reprezintă geometric panta liniei drepte - și se numește coeficient de regresie. Reprezintă măsura după care se schimbă variabila y când x se schimbă cu o unitate. Acesta ia o valoare negativă în cazul corelației inverse.

$$y = a + bx$$

Suntem în situația regresiei liniare simple, în care dacă:

$b > 0 \Rightarrow$ dreapta e crescătoare

$b = 0 \Rightarrow$ dreapta e paralelă cu Ox

$b < 0 \Rightarrow$ dreapta e descrescătoare

$b = \operatorname{tg} \alpha =$ panta dreptei = coeficient de regresie

a = ordonata la origine - indică valoarea lui y când $x = 0$

Bibliografie selectivă

1. Albert, J. M., Yun, H., Statistical advances in AIDS therapy trials. *Statistical Methods in Medical Research*, 10:85–100, 2001.
2. Anca Tudor, Călin Muntean, Cosmin Ovidiu Cătu, Diana Lungeanu, Mircea Focşa, Corina Vernic, *Informatica farmaceutica*, Ed. Eurobit Timișoara, 2009
3. Andersen, P. K., Klein, J. P., Knudsen, K. M., Tabanera y Palacios, R., Estimation of variance in Cox's regression model with shared gamma frailties. *Biometrics* 53:1475–1484, 1997.
4. Androniceanu, A. (coord.) - *Managementul proiectelor cu finanțare externă*. București: Editura Universitară, 2004.
5. Babiker, A. G., Cuzick, J., A simple frailty model for family studies with covariates. *Statistics in Medicine*, 13:1679–1692, 1994.
6. Bailar JC III. The promise and problems of meta-analysis. *New England Journal of Medicine*, 337:559-560, 1997.
7. Bailey K. D. – *Method of social research* (3rd ed.), New York: The Free Press, 1978.
8. Bjorling, L. E., Hodges, J. S., Rule-based ranking schemes for antiretroviral trials. *Statistics in Medicine* 16:1175–1191, 1997
9. Bloom BS, et al. A reappraisal of hepatitis B virus vaccination strategies using cost-effectiveness analysis. *Annals of Internal Medicine* 118:298-306, 1993.
10. Bibu N.A., Foltean F.(coord.), *Managementul organizațiilor publice*. Timișoara: CECMA Partner, 2005.
11. Bogathy Zoltan, Coralia Sultea – *Manual de tehnici și abilități academice, Ediția a II-a, Timișoara, Ed. Univ. de Vest, 2008*.
12. Brown, M., - *Învață managementul proiectelor într-o săptămână*. București: Cosmos Viking Penguin, 2004.
13. Borzak S, Kidker PM. Discordance between metaanalyses and large-scale randomized controlled trials: examples from the management of acute myocardial infarction. *Annals of Internal Medicine* 123:873-877,1995.
14. Buyse, M., Molenberghs, G., Criteria for the validation of surrogate end-points in randomized experiments. *Biometrics* 54:1014–1029, 1998.
15. Ciobanu Virgil , Popovici Ramona: *Îndrumar de lucrări practice de Management și Organizare sanitară*- Editura Solness Timișoara, 2007.
16. Clayton, D., Cuzick, J., Multivariate generalizations of the proportional hazards model. *Journal of the Royal Statistical Society A* 148:82–117, 1985.
17. Clemens JD, et al. The BCG controversy: a methodological and statistical reappraisal. *Journal of the American Medical Association* 249:2362-2369, 1983.
18. Christensen L.B., - *Experimental Methodology*, Boston: Allyn&Bacon, 1997.
19. Cronbach L.J. – *Designing evaluations of educational and social programs*, San Francisco: Jossey-Bass, 1982.
20. Cusworth, J. W., Franks, T. R. - *Managementul proiectelor în țările în curs de dezvoltare*. București: Editura All, 2002.
21. Daniels, M. J., Hughes, M. D., Meta analysis for the evaluation of potential surrogate markers. *Statistics in Medicine* 16:1965–1982.
22. Dănăiață I., Bibu N. A., Mariana Predișcan, *Management. Bazele teoretice*, Ediția a II-a. Timișoara: Mirton, 2004.

23. Deep, S., Susmann, L.. *Secretul oricărui succes: să acționăm inteligent*. București: Polimark, 1996.
24. DeGruttola, V., Fleming, T. R., Lin, D. Y., Coombs, R., Validating surrogate markers – are we being naive? *Journal of Infectious Diseases* 175:237–246, 1997.
25. DeMasi, R. A., Babiker, A. G., Nonparametric estimation of the proportion of treatment effect explained by a surrogate marker. Presented at the 1998 ENAR conference, April 1, 1998.
26. Dempster, A. P., Laird, N.M., Rubin, D. R., Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society B* 39:1-38, 1977.
27. E Coiera: *Guide to Medical Informatics, the Internet and telemedicine*. Chapman Hall, London, 1997.
28. Efron, B., Logistic regression, survival analysis and the Kaplan Meier curve. *Journal of the American Statistical Association* 83:414-425, 1998.
29. EH Shortliffe, LE Perreault (eds). *Medical Informatics. Computer applications in healthcare and biomedicine* (2nd Edition). Springer Verlag, New York, 2001
30. FA, Beck JR. Markov models in medical decision making: a practical guide. *Medical Decision Making* 13:322-338,1993.
31. Finkelstein, D. M., A proportional hazards model for interval-censored failure time data. *Biometrics* 42:845–854, 1986
32. Finkelstein, D. M., Schoenfeld, D. A., Stamenovic, E., Analysis of multivariate failure time data from an AIDS clinical trial. *Statistics in Medicine* 16:951–961, 1997.
33. Foulkes, M. A.- Advances in HIV/AIDS statistical methodology over the past decade. *Statistics in Medicine* 17:1–25, 1998.
34. Freedman, L. S., Graubard, B. I., Schatzkin, A., Statistical validation of intermediate endpoints for chronic diseases. *Statistics in Medicine* 11:167–178, 1992.
35. G.I. Mihaș, Diana Lungeanu, *Informatică medicală și biostatistică*, Ed. Victor Babeș, 2009.
36. Gehan, E. A., A generalized two-sample Wilcoxon test for doubly censored data. *Biometrika* 52:620-653, 1965.
37. JG Brookshear. *Computer science: an overview* (9th Edition). Addison Wesley, Boston, 2007
38. Havârneanu C.- *Metodologia cercetării în științele sociale*, Iași: Erola, 2000.
39. JH van Bommel, MA Musen (eds). *Handbook of Medical Informatics*. Springer Verlag, Heidelberg, 1997
40. Klein, J. P., Moeschberger, M. L., *Survival analysis: techniques for censored and truncated data*. New York: Springer-Verlag, 1997.
41. Klein, J. P., Semiparametric estimation of random effects using the Cox model based on the EM algorithm. *Biometrics* 48:795-806, 1992.
42. Kulinskaya E.V., Satarov G.A. Testing the Hypotesis about the Quality of Classification in the Data-Analysis System Clams // *Statistical Data Analysis. Abstracts of International Conference*. Sofia, 1990.
43. Kumar R., - *Research Methodology* (2nd ed.), London: Sage, 1999.
44. McCollum, J. K. - *Management de proiect - o abordare practică*. București: Editura Universitară, 2005.
45. Miles, M. B., Huberman, A. M. - *Qualitative Data Analysis: An Expanded Sourcebook* (2nd ed). Thousand Oaks: Sage, 1994.

46. Mocanu, M., Schuster, C. - Managementul proiectelor: Calea spre creșterea competitivității. București: Editura All Beck, 2001.
47. Munink M, et al. Decision Making in Health and Medicine: Integrating Evidence and Values. Cambridge: Cambridge University Press, 2001.
48. Mureșan P. Manual de metode matematice în analiza stării de sănătate. București, 1989, - 574 pag.
49. Newcombe, R. G., Explanatory and pragmatic estimates of the treatment effect when deviations from allocated treatment occur. *Statistics in Medicine* 7:1179–1186, 1988.
50. O'Brien, P. C., Procedures for comparing samples with multiple endpoints. *Biometrics* 40:1079–1087, 1984.
51. Oral Health Eurobarometer 2009, Special Eurobarometer 330/ Wave 73.2- TNS Opinion & Social, February 2010, pag 7-15.
52. P Beynon-Davies. Database systems (2nd Edition). Macmillan Press, Houndmills UK, 2000.
53. Pangrazio-Kulbersh V, Berger JL, Chermak DS, Kaczynski R, Simon ES, Haerian A. Treatment effects of the mandibular anterior repositioning appliance on patients with Class II malocclusion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*; 123:286-295, 2003.
54. Pickles, A., Crouchley, R., A comparison of frailty models for multivariate survival data. *Statistics in Medicine*, 14:1447–1461, 1995.
55. Prentice, R. L., Williams, B. J., Peterson, A. V., On the regression analysis of multivariate failure time data. *Biometrika*, 68:373–379, 1981.
56. Smith, P. J., Thompson, T. J., Jereb, J. A., A model for interval-censored tuberculosis outbreak data. *Statistics in Medicine*, 16:485–496, 1997.
57. Silverman D. – *Doing Qualitative Research: A practical Handbook*, Thousand Oaks and London: Sage, p 221-253, 2000.
58. Sonnenberg FA, Beck JR. Markov models in medical decision making: a practical guide. *Medical Decision Making*, 13:322-338., 1993.
59. Spinei Olga, Biostatistică, Chișinău 2009;
60. Sun, J. Regression analysis of interval-censored failure time data. *Statistics in Medicine*, 16:497–504, 1997.
61. Stainback S., Stainback W. – *Understanding and Conducting Qualitative Research*, Dubuque, Iowa: Kendall/Hunt, 1988
62. T Spircu, S. Țigan: Informatica în Medicină. Ed. Teora, București, 1995
63. Thall, P. F., Cheng, S. C. Treatment comparisons based on two-dimensional safety and efficacy alternatives in oncology. *Biometrics*, 55:746–753, 1999.
64. Theodore H. Tulchinsky, Elena A. Varavikova, Noua Sănătate Publică. Introducere în secolul XXI, Ed. Ulysse, Chișinău, 2003.
65. Touloumi, G., Pocock, S. J., Babiker, A. G., Darbyshire, J. H. Estimation and comparison of rates of change in longitudinal studies with informative drop-outs. *Statistics in Medicine*, 18:1215–1233, 1999.
66. Touloumi, G., Pocock, S. J., Babiker, A. G., Darbyshire, J. H. Impact of missing data due to selective drop-outs in cohort studies and clinical trials. *Epidemiology*, 13:347–355, 2002.
67. Tubert-Bitter, P., Bloch, D. A., Raynauld, J. P.. Comparing the bivariate effects of toxicity and efficacy of treatments. *Statistics in Medicine*, 14:1129–1141, 1995.

68. Vlădescu, Cristian (coord.). Sănătate publică și management sanitar. Editura Cartea Universitară, București: 2004.
69. Volberding, P. A., Lagakos, S. W., Koch, M. A., Pettinelli, C. B., et al, Survival Analysis: State of the Art. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1990, pp. 99–120.
70. Wang, S. T., Klein, J. P., Moeschberger, M. L.. Semi-parametric estimation of covariate effects using the positive stable frailty model. Applied Stochastic Models and Data Analysis, 11:121–133, 1995.
71. Wei, L. J., Glidden, D. V.. An overview of statistical methods for multiple failure time data in clinical trials. Statistics in Medicine, 16:833–839, 1997.
72. Wei, L. J., Lin, D. Y., Weissfeld, L.. Regression analysis of multivariate incomplete failure time data by modelling marginal distributions. Journal of the American Statistical Association, 84:1065–1073, 1998.
73. Weinstein MC, Fineberg HV. Clinical Decision Analysis. Philadelphia: Saunders, 1980.
74. White, I. R., Babiker, A. G., Walker, A. S., Darbyshire, J. H., Randomization-based methods for correcting for treatment changes: examples from the Concorde trial. Statistics in Medicine 18:2617–2634, 1999.

4. TIPURI DE CERCETĂRI

✍ Ramona Amina Popovici

1. Introducere

Cunoașterea oferită de disciplinele academice reprezintă cunoașterea obținută cu metodele științifice.

Metoda științifică este cea mai bună metodă de achiziție a cunoștințelor pentru că informațiile descoperite se bazează pe cât posibil pe realitate. În literatura de specialitate mulți autori definesc știința ca un corp paradigmatic întemeiat pe metode specifice ce trebuie urmate pentru a rezolva probleme și a construi un plus de cunoaștere. O știință poate fi definită ca o disciplină care utilizează un demers științific cu scopul de a descoperi reguli în obiectul său de studiu, de a le descrie, de a le explica, pentru înțelegerea determinismului, a mecanismelor specifice și eventual utilizarea acestor cunoștințe pentru identificarea realității, predicție, control și chiar modificarea realității. Educația, componentă de bază în promovarea sănătății, de exemplu, ca știință, are ca obiect de studiu (activitatea internă subiectivă și activitatea externă observabilă), legi proprii activității educaționale și psihice și a comportamentului în mod deosebit, și metode de cercetare.

Prin metoda științifică, cercetătorii încearcă să achiziționeze informații care pot evalua și obiceiurile, comportamentele, cunoștințele legate de conduita sanogenă, stilul de viață, erorile, atitudinile și emoțiile, metoda având și capacitatea de autocorectare, aceasta fiind dimensiunea sa critică (Hăvârneanu, 2000).

Cercetarea științifică este o activitate desfășurată în domeniul unei discipline științifice sau în cel interdisciplinar și prezintă calitățile specifice științei, adică rigoare, exigență și obiectivitate. Scopul fundamental al unei cercetări științifice este de a aduce dovezi empirice (adică date provenite din experiență, observații sau experimente) pentru a consolida sau schimba o idee teoretică (o ipoteză, un model explicativ, o interpretare sau o lege). Cercetarea științifică pornește de la o idee teoretică, pe care, cu ajutorul datelor adunate din realitatea concretă o verifică, urmând ca, în final, să o accepte sau să o reformuleze, îmbinând aspectele teoretice cu cele practice.

2. Tipuri de cercetări

Cercetările se pot clasifica din cel puțin patru perspective (Kumar, 1999):

- după aplicabilitatea cercetării:
 - cercetare fundamentală
 - cercetare aplicativă
- după obiectivele asumate de cercetare:
 - cercetare descriptivă
 - cercetare corelațională
 - cercetare explicativă
 - cercetare exploratorie
- după tipul informației:
 - cercetare calitativă
 - cercetare cantitativă

- după natura investigației:
 - cercetare experimentală
 - cercetare non-experimentală
 - cercetare cvasi-experimentală

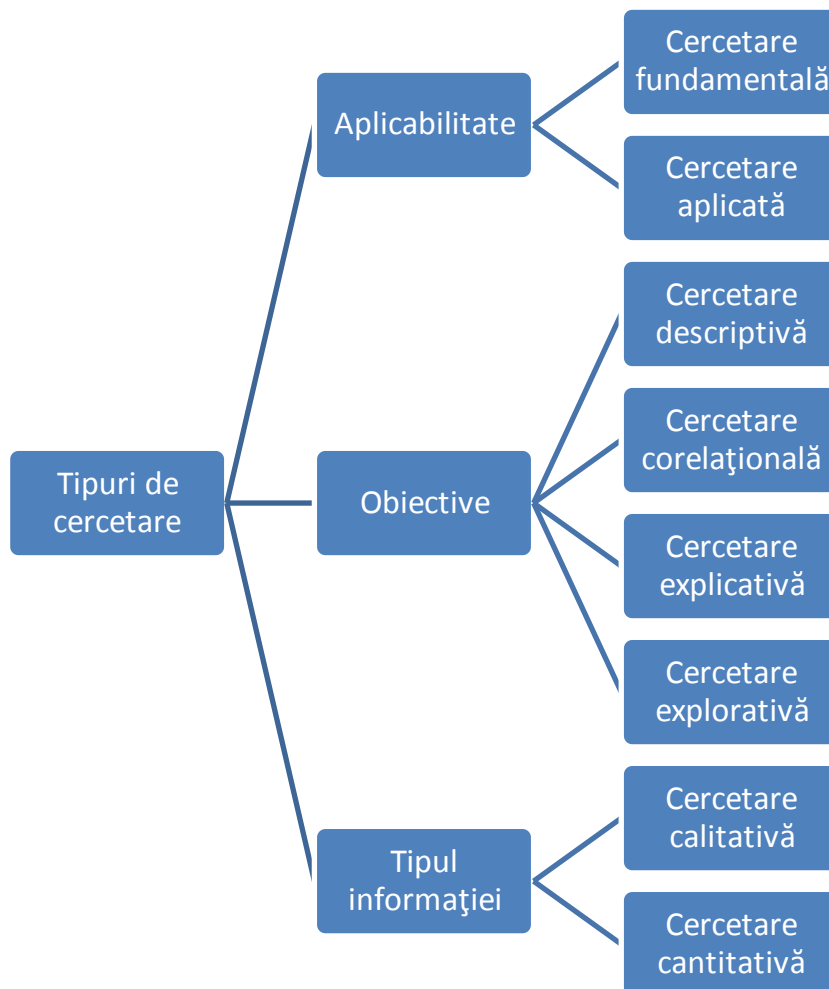


Fig. 1. Tipuri de cercetări

2.1. Cercetarea fundamentală și aplicată

Din punct de vedere al aplicabilității, avem două tipuri de cercetări: *cercetare fundamentală* și *cercetare aplicată*.

Cercetarea fundamentală presupune dezvoltarea și testarea teoriilor și a ipotezelor provocatoare din punct de vedere intelectual pentru cercetător, care poate fi cu sau fără aplicabilitate practică imediată sau într-un moment viitor (Bailey, 1978). Astfel de cercetări presupun testarea unor ipoteze care sunt exprimate în termeni abstracți sau în care se folosesc concepte specializate.

În plus, cercetarea fundamentală vizează dezvoltarea, examinarea, verificarea și rafinarea metodelor, a procedurilor, tehnicilor și instrumentelor care alcătuiesc metodologia de cercetare.

Majoritatea cercetărilor din domeniul educației sunt *aplicate*. Altfel spus, metodele, procedurile și tehnicile de cercetare sunt aplicate unui set particular de informații despre diferite aspecte ale unor situații, probleme sau fenomene, astfel încât informațiile rezultate să poată fi folosite în alte moduri (elaborarea unui program de prevenire a factorilor de risc în sănătatea orodentară).

2.2. Cercetarea descriptivă, corelațională, explicativă și explorativă

Dacă privim cercetarea din perspectiva obiectivelor urmărite, o putem clasifica ca: *descriptivă, corelațională, explicativă și explorativă*.

Un studiu clasificat drept *descriptiv* își propune fie să descrie sistematic o situație, o problemă, un fenomen sau un sistem, fie să ofere informații despre un anumit context, fie să descrie cât mai cuprinzător un comportament, atitudine. De exemplu evaluarea comportamentelor sanogene legate de igiena orală.

În studiile *corelaționale* accentul cade pe descoperirea sau stabilirea unei interdependențe între două sau mai multe aspecte ale unei situații.

De exemplu: ”Care este relația dintre conduita pentru o igienă orală corectă și incidența cariei dentare?” sau ”Care va fi impactul unei campanii de promovare a produselor pentru igienă orală asupra îmbunătățirii sănătății orale la nivelul unei comunități?”.

Cercetarea *explicativă* își propune să clarifice de ce și cum se manifestă o relație între două aspecte ale unei situații sau ale unui fenomen. O astfel de cercetare va încerca să afle ”De ce o igienă orală deficitară și o alimentație cariogenă generează o creștere a incidenței bolilor din cavitatea orală?”.

Studiile *exploratorii* sunt realizate pentru a descoperi noi posibilități de acțiune, noi metode de cercetare, într-un domeniu în care sunt puține informații sau despre care nu știe prea multe. Astfel de cercetări iau forma studiilor pilot, în care cercetătorul realizează un studiu la scară mică și apoi decide cum anume va realiza investigația detaliată.

Deși teoretic putem diferenția cele patru tipuri de cercetare, în practică cercetările sunt o combinație a primelor trei, adică conțin elemente specifice cercetărilor descriptive, corelaționale și explicative.

2.3. Cercetarea calitativă și cantitativă

Din punctul de vedere al informației căutate pe parcursul realizării cercetării, studiile pot fi *calitative* sau *cantitative*. Caracterul cantitativ sau calitativ al unui studiu depinde de trei elemente:

1. scopul cercetării
2. felul în care sunt evaluate variabilele cercetării
3. modul de prelucrare a informațiilor

Cercetarea este *calitativă* dacă scopul principal este descrierea unei situații, fenomen, probleme sau eveniment. Informația este obținută folosind variabile măsurate pe scale nominale sau ordinale (evaluări calitative), iar analiza este făcută pentru a stabili variații ale situației, ale fenomenului sau problemei fără a le cuantifica. Descrierea unei situații observate, enumerarea istorică a unor evenimente, colectarea diferitelor opinii privind o problemă specifică într-un grup de indivizi sunt exemple de cercetări calitative.

Pe de altă parte, dacă dorim să cuantificăm variațiile unui fenomen, ale unei situații sau ale unei probleme și colectăm informații folosind predominant variabile cantitative, iar analiza își propune să precizeze magnitudinea acestor variații, putem spune că realizăm un studiu

cantitativ. Folosirea statisticii nu este partea cea mai importantă a unui studiu cantitativ. Principalul motiv al folosirii statisticii este de a confirma sau infirma concluziile extrase, pe baza unei anumite înțelegeri a datelor, informațiilor colectate. Statistica ne ajută să cuantificăm magnitudinea unei asocieri sau relații, ne oferă indicii privind măsura în care ne putem încrede în anumite concluzii și ne ajută să identificăm și să izolăm efectele specifice ale diferitelor variabile urmărite. Ambele perspective au propriile lor avantaje și limite și este important ca în cercetările concrete să căutăm să realizăm cea mai bună combinație de cantitativ-calitativ, astfel încât să reușim să realizăm obiectivele pe care ni le-am propus.

2.4. Studii experimentale, nonexperimentale, cvasiexperimentale

Din punctul de vedere al designului cercetării avem:

- Studii experimentale
- Studii nonexperimentale
- Studii cvasiexperimentale

Cel mai adesea, în cazul unei cercetări se presupune existența unei relații de tip *cauză-efect*. Putem studia această relație din două perspective. Pe de o parte, cercetătorul produce intervenția pe care o presupune ca fiind *cauză* și așteaptă până când se produce o schimbare (efect). Pe de altă parte, cercetătorul poate investiga ceea ce anume a cauzat producerea unui eveniment, sau a unei situații (efect), încercând să descopere *cauzele* și să demonstreze relația causală. Primul design este unul experimental, în timp ce cel de-al doilea este unul non-experimental (Kumar, 1999).

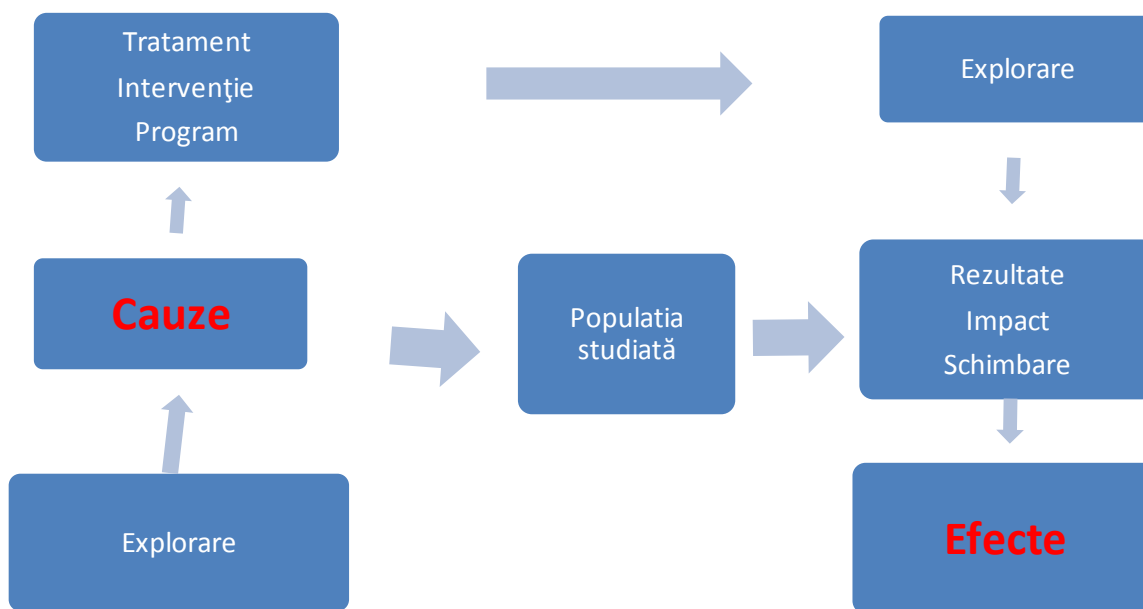


Fig. 2. Studii experimentale și non-experimentale

În studiile experimentale, variabila independentă poate fi observată, introdusă, controlată sau manipulată, în timp ce în studiile nonexperimentale acest lucru nu este posibil, deoarece nu putem modifica o cauză a stării prezente, dar cercetătorul stabilește și demonstrează legătura între cauză și rezultat. Studiile nonexperimentale pun în evidență legătura de covariație dintre două sau mai multe variabile.

Studiile cvasiexperimentale prezintă atât caracteristici ale studiilor experimentale, cât și ale celor non-experimentale. Selecția subiecților în studiile experimentale este aleatoare, iar în studiile cvasi-experimentale selecția subiecților se face după anumite criterii, de obicei după variabile de tip etichetă: sex, vârstă, nivel de pregătire, nivel de anxietate, ș.a.

Studiile experimentale pot fi realizate în condiții de *mediu natural* sau în condiții de *laborator (de mediu controlat)*. Pentru un experiment într-un mediu controlat, populația studiată trebuie să se afle în condiții controlate, în timp ce în experimentele derulate într-un mediu natural populația studiată se află în mediul propriu.

În practică, aceste tipuri de cercetare se găsesc adeseori în formule combinate, o cercetare poate fi caracterizată după mai multe criterii. De exemplu, o cercetare poate fi: nonexperimentală, cantitativă, corelațională și aplicată; nonexperimentală, calitativă, descriptivă, aplicată, etc.

3. Etapele cercetării științifice

Orice cercetare științifică parcurge mai multe etape, astfel ea putându-se autocorecta prin aproximări successive (Christensen, 1997):

3.1. Identificarea obiectivelor și formularea ipotezelor

Punctul de pornire în orice demers științific implică identificarea obiectivelor. Cariile dentare, cancerul, care au o incidență tot mai crescută, de asemenea un stil de viață nesănătos, cu abuz de alcool, ce pot duce la instalarea unor boli ce pun în pericol viața, sunt câteva din problemele existente. Toate aceste boli au factori etiologici, clasificați în contextul actual ca factori de risc direcți, dar pe lângă aceștia sunt și alți factori de risc indirecți, care trebuie identificați și preveniți. Stilul de viață depinde de comportamente și atitudini care la rândul lor sunt condiționate de nivelul de educație, factori sociali, adică stilul de viață este rezultatul factorilor sociali și al comportamentelor. Dar nu este suficient să identificăm problema de cercetare. Înainte de a fi investigată, problema trebuie să fie redefinită și transformată într-o temă de cercetare.

Odată ce problema este exprimată în termeni de cercetare (respectiv sunt operaționalizate conceptele teoretice în termeni observabili și măsurabili), ipotezele sunt formulate astfel încât să exprime relațiile anticipate dintre variabile. Ipotezele trebuie formulate în așa fel încât să fie testabile și demonstrabile.

3.2. Planul cercetării

Acest stadiu al designului cercetării este important și necesită competență din partea echipei de cercetare, pentru a se asigura că demersul cercetării este ales corect, astfel încât să poată testa ipotezele formulate. Designul cercetării este un plan care ne ajută să colectăm cele mai adecvate și corecte date, care să susțină sau să argumenteze ipotezele ce urmează a fi testate. Tot în această etapă sunt stabilite modalitățile de control ale variabilelor studiate, se verifică dacă

variabilele experimentale, sunt corect specificate. Aceste tehnici sunt importante, ele trebuie selecționate corespunzător deoarece această etapă reprezintă conduita directoare a întregii cercetări. Construirea designului cercetării ne ajută să depășim eventualele dificultăți care pot distorsiona rezultatele și să ne asigurăm că datele vor fi corect analizate și interpretate.

După ce a fost realizat designul, cercetătorii trebuie să ia o serie de decizii foarte importante în raport cu modul de desfășurare a cercetării propriu-zise. Înainte de a fi colectate datele, ei trebuie să decidă ce participanți sunt incluși în cercetare, să-și contureze echipa de cercetare, ce instrucțiuni sunt necesare și de ce echipament și materiale este nevoie. Întocmirea acestui necesar trebuie să țină cont de contextul actual al cercetării și să fie ancorat în realitate. Aceste decizii sunt luate pe baza experienței de cercetare și a obiectivelor cercetării. După ce aceste decizii au fost luate, cercetătorii sunt gata pentru a trece la colectarea datelor, după procedurile prestabilite și prin înregistrarea exactă a răspunsurilor participanților.

După ce datele au fost colectate, cercetătorii trebuie să analizeze și să interpreteze datele pentru a determina viabilitatea ipotezelor. Cu ajutorul calculatorului și a programelor statistice se prelucrează datele obținute. Dar tot cercetătorul decide care este cea mai adecvată procedură statistică pentru testarea ipotezelor, în funcție de datele colectate. După prelucrarea datelor, se trece la interpretarea rezultatelor, precizând cu exactitate ceea ce semnifică acestea.

3.3. Diseminarea rezultatelor cercetării

După proiectarea și realizarea unei cercetări, demersul științific și aplicativ realizat trebuie transpus într-un raport de cercetare. Acesta are rolul de a structura și sintetiza materialul informativ utilizat, de a releva rezultatele obținute, precum și întreg traiectul de realizare al cercetării.

Elaborarea raportului de cercetare face parte din etapa de diseminare a rezultatelor cercetării. Astfel, cercetătorul nu are doar responsabilitatea realizării și conducerii cât mai adecvate a studiului, ci și pe aceea de a disemina rezultatele obținute celorlalți membrii ai comunității științifice.

După ce datele sunt analizate și interpretate, cercetătorii vor disemina rezultatele, cel mai frecvent sub formă de articole în reviste de specialitate, la manifestări științifice sub forma de prezentări sau postere.

Metoda științifică abordată în cercetare este important să pornească de la observații obiective, independente de opinii personale, erori și prejudecăți.

Cercetările calitative ce presupun un demers inductiv urmează un format asemănător dar, uneori, nu au ipoteze specifice de cercetare. Oricum, și în aceste cercetări se formulează obiective clare. O altă diferență majoră este că secțiunea de "rezultate" tinde să fie transformată în discuții. În ambele tipuri de cercetări trebuie prezentată însă cât mai precis procedura de lucru și trebuie evaluate rezultatele, chiar dacă designul și metodele sunt diferite.

Prezentarea rezultatelor (interpretare cantitativă)

a) Descrierea

Scopul acestei secțiuni este de a informa ce date au fost colectate, cum au fost analizate și ce a rezultat în urma analizei acestor date. Cea mai mare parte a datelor sunt însă prezentate sub formă de tabele și grafice, în anexe. Un tabel sumar cu date este prezentat și în secțiunea destinată rezultatelor, incluzând frecvențe, medii, abaterea standard. Orice tabel și grafic care apare în raport (în această secțiune sau în anexe) trebuie numerotat și denumit. Datele pot fi

prezentate și sub formă de reprezentări grafice, corect denumite, iar axele verticală și orizontală au precizate unitățile de măsură (legenda). Tabelele și figurile trebuie numerotate pentru a putea face referiri la ele în text.

b) Analiza

Dacă sunt mai multe ipoteze testate sau diferite tratamente, se descriu pe rând și se împarte această secțiune în mai multe subsecțiuni, fiecare ipoteză fiind enunțată la începutul subsecțiunii. Aici sunt precizate și ce teste statistice au fost utilizate și se justifică alegerea lor. Rezultatele sunt prezentate clar și se pot face și comparații cu cea mai apropiată valoare critică. Se justifică alegerea valorii critice prin numărul de subiecți, grade de libertate, sau pragul de probabilitate corespunzător. Astfel, valorile semnificative ale oricăruia dintre testele utilizate (exemplu testul t) trebuie însoțite de mărimea acelei mărimi, precum și de gradele de libertate, nivelul de probabilitate și direcția efectului. Testul t arată că această diferență este semnificativă, sau se pot utiliza testele de corelație puternică între două variabile. Dacă rezultatele la teste sunt numeroase, ele pot fi prezentate clar într-un tabel sintetizator. Se precizează dacă ipoteza nulă este respinsă sau acceptată. Calculele testelor, pot fi incluse în raport, sau pot apărea doar în anexe. La ora actuală există multe programe specializate în prelucrarea statistică a datelor științifice.

Discuții (interpretarea calitativă)

În această secțiune este explicat într-un limbaj nonstatistic ce s-a descris în secțiunea „Rezultate”. Aceste rezultate trebuie discutate în raport cu ipotezele testate și cu obiectivele cercetării (Cronbach, 1982). Practic, în această secțiune a raportului de cercetare, se face interpretarea și evaluarea rezultatelor obținute, acordând o mare atenție relației dintre rezultate și ipotezele studiului. Se începe discuția precizând măsura în care ipotezele studiului sunt sau nu confirmate. În acest demers, sunt integrate rezultatele obținute prin cercetare în contextul rezultatelor cercetărilor anterioare. Aici este singurul loc din raportul de cercetare unde există posibilitatea să fie expuse propriile opinii și limitele studiului de cercetare realizat.

În general, secțiunea discuții trebuie să fie redactată astfel încât să răspundă la următoarele întrebări (Christensen, 1997):

- a) Care este contribuția studiului la dezvoltarea cunoașterii?
- b) Cum ați rezolvat problemele apărute pe parcursul cercetării?
- c) Ce concluzii și implicații teoretice derivă din studiu?

De asemenea, trebuie discutate și rezultatele neașteptate (Christensen, 1997). Din când în când aceste „bizarerii” ne conduc spre noi direcții de cercetare. Rezultatele pot să indice o confirmare a teoriilor și a cercetărilor anterioare, o completare sau aprofundare a acestora, dar pot să determine chiar modificarea teoriei de la care s-a pornit în lumina contradicțiilor sau ambiguităților descoperite.

Un cercetător conștiincios întotdeauna își evaluează designul și metoda, relevând punctele slabe sau pe cele discutabile (Ader, 1999). Cercetătorul poate anticipa acest criticism prin prezentarea unor argumente serioase prin care să releve de ce aceste puncte slabe nu au influențat în mod serios rezultatele cercetării.

Bibliografie selectivă

1. Ader H.J., Mellenbergh G.J.- *Reserch Methodology in the social, behavioral and life sciences*- London: Sage Publ., 1986.
2. Androniceanu, A. (coord.). - *Managementul proiectelor cu finanțare externă*. București: Editura Universitară, 2004.
3. Bailey K. D. – *Method of social research* (3rd ed.), New York: The Free Press, 1978.
4. *Belbin, M.- Management Teams: Why they succeed or fail*. London: Heinemann, 1981.
5. Bibu N.A., Foltean F. (coord.), *Managementul organizațiilor publice*. Timișoara: CECMA Partner, 2005.
6. *Bogathy Zoltan, Coralia Sultea – Manual de tehnici și abilități academic, Ediția a II-a, Timișoara, Ed. Univ. de Vest, 2008.*
7. Brown, M. - *Învață managementul proiectelor într-o săptămână*. București: Cosmos Viking Pinguin, 2004.
8. Chapman, A. (2001). *Time management techniques and systems*. Găsit la adresa: <http://www.businessballs.com/timemenagement.htm> la 12 noiembrie 2003.
9. *Cazacu, S. - Viață, personalitate, limbaj - analize contextual-dinamice*. București: Minerva, 2007.
10. *Christensen L.B., - Experimental Methodology, Boston: Allyn&Bacon, 1997.*
11. Cojocaru, S. - *Elaborarea proiectelor*. București: Editura Expert Projects, 2004.
12. *Covey, S.R. - Managementul timpului sau cum ne stabilim prioritățile*. București: Ed. Alfa, 2000.
13. *Cristea, H. - Managementul proiectului - Sprijinirea, îndrumarea și controlul mersului proiectelor cu finanțare externă, material pentru uz intern, Timișoara: Universitatea de Vest din Timișoara, 2001.*
14. *Cronbach L.J. – Designing evaluations of educational and social programs, San Francisco: Jossey-Bass, 1982.*
15. Cusworth, J. W., Franks, T. R.- *Managementul proiectelor în țările în curs de dezvoltare*. București: Editura All, 2202.
16. Dăniața I., Bibu N. A, Mariana Predișcan, *Management. Bazele teoretice*, Ediția a II-a. Timișoara: Mirton, 2004.
17. Deep, S., Susmann, L. - *Secretul oricărui succes: să acționăm inteligent*. București: Polimark, 1996.
18. Havârneanu C.- *Metodologia cercetării în științele sociale*, Iași: Erola, 2000.
19. Kumar R., - *Research Methodology* (2nd ed.), London: Sage, 1999.
20. Lock, D. - *Management de proiect*. București, Editura CODECS, 2000.
21. Maxwell, J. C. - *Cele 17 legi ale muncii în echipă*. București: Editura Amaltea, 2003.
22. McCollum, J. K. - *Management de proiect - o abordare practică*. București: Editura Universitară, 2005.
23. Miles, M. B., Huberman, A. M. - *Qualitative Data Analysis: An Expanded Sourcebook* (2nd ed). Thousand Oaks: Sage, 1994.
24. Mocanu, M., Schuster, C. - *Managementul proiectelor: Calea spre creșterea competitivității*. București: Editura All Beck, 2001.
25. Mochal, T., Mochal, J. - *Lecții de management de proiect*. București: Editura CODECS, 2006.
26. Newton, R. - *Managerul de proiect - măiestrie în livrarea proiectelor*. București: Editura CODECS, 2006.

27. Emilia Novac, Denisa Abrudan – *Management* – Timișoara: Editura Mirton, 1999.
28. Oprea, D. - *Managementul Proiectelor: teorie și cazuri practice*. Iași: Editura Sedcom Libris, 2001.
29. Pantea I. M. - *Analiza strategică – suport al deciziilor investiționale*, Timișoara, Editura Mirton, 2003
30. Predișcan, Mariana, - *Schimbarea organizațională. Ce, când și cum să schimbăm?* Timișoara: Editura Universității de Vest, col. „Economică”, 2005
31. Postavaru, N. - *Managementul proiectelor*. București: Editura Matrix Rom, 2002.
32. Elena Sărățean - *Comportament organizațional* - Ed Univ.de vest, Timișoara, 2008.
33. Turner, R., Simister, S., Nistor, S. - *Manualul Gower de management de proiect*. București: CODECS, 2004.

5. MANAGEMENTUL EDUCAȚIONAL ÎN PROMOVAREA SĂNĂTĂȚII

✍ *Ramona Amina Popovici*

1. Introducere

În societățile moderne, învățarea noțiunilor de anatomie și fiziologie umană ca parte a educației curriculare, are un loc bine definit în practica instituțională. Ea asigură o minimă pregătire pentru înțelegerea conceptului de sănătate din perspectiva biologiei umane, dar de cele mai multe ori ratează componente esențiale, precum aceea comportamentală (sănătatea ca rezultat al unor comportamente sanogene) și aceea socio-ambientală (sănătatea ca dimensiune esențială a calității vieții, determinată de factori de mediu, economici și socio-culturali). Din aceste motive, educația pentru sănătate nu se poate limita la statutul de componentă a educației formale (prin intermediul școlilor de toate gradele, inclusiv învățământul superior), ci **trebuie să devină parte a educației permanente**, adresându-se deopotrivă copiilor și adulților (ca indivizi și ca părinți), dar și bătrânilor; de asemenea, unei părți a persoanelor cu dizabilități (excluzi fiind doar cei asistați din motive de dizabilități locomotorii, cei cu deficiențe severe de comunicare, respectiv de comprehensiune și utilizare a exprimării, cei având coeficientul de inteligență sub 35.

Întrucât comportamentele sanogene, în particular deprinderile igienice, sunt comportamente învățate ca parte a setului de deprinderi ce asigură supraviețuirea, ele trebuie introduse încă din etapa socializării primare. Învățarea periajului dentar și automatizarea deprinderii de curățare a dinților de cel puțin două ori pe zi ar trebui să fie parte a vieții de familie, să se consolideze în grădiniță prin aportul formatorilor de opinie și să se mențină ca atare de-a lungul întregii vieți.

Politica de sănătate din România prezintă, la ora actuală, semne contradictorii, firește într-o etapă de remodelare, care trebuie considerate din perspectiva unui management al schimbării organizaționale, dar și al unei dinamici accelerate a schimbărilor de mentalitate la nivelul grupurilor și chiar la nivel individual.

Potrivit Cartei de la Ottawa, acțiunile definite ca specifice promovării sănătății sunt:

1. desfășurarea de *politici publice* vizând promovarea *stilurilor de viață sanogene*;
2. crearea *mediilor favorabile menținerii sănătății*;
3. *susținerea acțiunilor comunității* în vederea implementării unor măsuri de asanare a mediului și a unor stiluri de viață sanogene;
4. *dezvoltarea abilităților personale* prin acțiuni de *educație pentru sănătate*;
5. *reorientarea serviciilor de sănătate*, în sensul transformării lor din servicii strict terapeutice în centre de acțiune preventivă și de educare a membrilor comunității în vederea menținerii și îmbunătățirii stării de sănătate.

Obiectivul de bază al educației pentru sănătate constă în formarea și dezvoltarea în rândul populației, începând de la vârstele cele mai fragede, a unei concepții și a unui comportament igienic, sanogen, în scopul apărării sănătății, al dezvoltării armonioase și al fortificării organismului, al adaptării lui la condițiile mediului ambiant (natural și social), precum și al participării active a populației la opera de asigurare a sănătății publice.

Obiectivele educației pentru sănătate sunt:

- să determine acceptarea faptului că sănătatea este utilă pentru societate ;
- să informeze populația despre tot ce i-ar fi necesar și util să cunoască pentru ocrotirea propriei sănătăți;
- să contribuie la crearea unui comportament, a unei atitudini ferme în sensul ocrotirii propriei sănătăți;
- să încurajeze crearea și utilizarea rațională a serviciilor medicale;
- să contribuie la formarea unei conștiințe privind educația pentru sănătate, în sensul că fiecare individ să fie convins că nu există dezvoltare socio-economică fără sănătate;
- încurajarea creșterii adresabilității către serviciile preventive și curative;
- influențarea factorilor politici, sociali, decizionali și economici, în sensul de a îmbunătăți condițiile de viață și mediu și asigurarea unei relații sociale pentru schimbarea și, mai ales, susținerea schimbării comportamentelor.

După I.I. Gall (1988), în domeniul sănătății oro-dentare, educația pentru sănătate are următoarele obiective :

- conștientizarea populației asupra necesității îngrijirii sistematice a dinților încă din copilărie și de-a lungul întregii vieți;
- cunoașterea cauzelor cariei dentare, a bolii parodontale și a anomaliilor dento-maxilare, precum și a modalităților de prevenire a acestora;
- cunoașterea de către populație a principalelor boli oro-dentare și a influenței lor asupra sănătății generale a organismului;
- informarea populației asupra valorii reale a costului îngrijirilor curative oro-dentare, în raport cu eficacitatea relativă a acestor îngrijiri.

Popularizarea faptului că bolile oro-dentare sunt caracteristice evoluției vieții și că limitarea lor și mai ales a consecințelor lor nu se poate obține decât cu condiția cunoașterii și respectării unor reguli de igienă oro-dentară, de alimentație și de viață.

Educația pentru sănătate se raportează la conținuturile informaționale de transmis prin intermediul aceluiași modele pe care le adoptă activitatea de promovare a sănătății, în general. Dintre modelele de abordare a promovării sănătății, în educația pentru sănătate oro-dentară prevalează modelul bazat pe înțelegerea etiologiei bolilor și acela al etapelor vieții, modelul epidemiologic fiind adecvat numai unor cazuri particulare de patogenie.

Modelul bazat pe înțelegerea etiologiei bolilor se aplică la boala carioasă și afecțiunile parodontiului, în sensul evidențierii rolului pe care îl joacă factorii de risc (igiena alimentară, alcoolism, fumat), potențat de igiena orală defectuoasă, în instalarea afecțiunilor. Realizarea activităților educative bazate pe acest model cunoaște o pluralitate de forme (cu adresabilitate individuală sau publică), unele presupunând comunicarea în doi timpi: 1. introducerea noțiunilor / comunicare univocă; 2. dialog pe marginea noțiunilor prezentate / comunicare biunivocă. Multitudinea și varietatea formelor și mijloacelor prin care se pot îndeplini sarcinile educative abordate prin prisma acestui model se explică prin autonomia informației în raport cu publicul-țintă.

Modelul etapelor vieții diferențiază informația de transmis în funcție de nevoile educaționale definite în raport cu condițiile biologice, medicale, ocupaționale și educaționale specifice populației-țintă, careia i se adresează acțiunea desfășurată. Specificitatea acestor determinații impune criteriile de selecție a informației de transmis, precum și a mijloacelor de

comunicare, inclusiv a nivelului de limbaj ce se adoptă în comunicare. În vederea implementării măsurilor de promovare a sănătății au fost elaborate *strategii bazate pe demersuri individuale* și *strategii populaționale*. Acestea se aplică și în cazul educației pentru promovarea sănătății orale, după cum urmează:

- *Strategiile bazate pe demersuri individuale* (explicația etiologică, demonstrația practică, consilierea) se aplică în cabinetul de medicină dentară, în condițiile contactului nemijlocit dintre medicul dentist și pacient, raportându-se la afecțiunile specifice ale pacientului. Sunt strategii de mare eficacitate, deoarece permit transgresarea rapidă a barierelor psihologice și intelectuale dintre participanții la comunicare și abordarea ținută a obiectivelor educaționale, fără cantonarea în generalități.

- *Strategiile populaționale* se aplică în instituțiile de medicină comunitară, în instituțiile școlare și în cele de ocrotire a minorilor fără probleme de sănătate (centre de plasament), dar se pot realiza și în instituții organizate prin liberă inițiativă (cluburi pentru tineri, pentru bătrâni, etc.), la solicitarea membrilor acestora. Distincția, care se face în literatura de specialitate, între *cauzele* și *incidența* bolii ne obligă să remarcăm că, pentru numeroase afecțiuni oro-dentare printre care *boala carioasă*, incidența tot mai crescută a cazurilor este legată de quasi-generalizarea stilului de viață urban, caracterizat prin consumul mare de carbohidrați și în special de zahăr dublu rafinat, prin munca în afara propriului cămin, care tulbură ritmicitatea consumului de hrană și nu asigură condiții pentru igienizarea cavității bucale după mese, prin stresul care induce graba și neglijarea igienei personale. De asemenea, incidența crescută a afecțiunilor parodonțiului este direct dependentă de alterarea calității țesuturilor supuse constant acțiunii alcoolului, respectiv a nicotinei și gudroanelor rezultate din arderea tutunului; drept urmare, se poate vorbi aproape de o suprapunere între incidența bolilor endodonțiului și ale parodonțiului, pe de o parte, și factorii patologici exogeni, asupra cărora populația trebuie informată. De aceea, cel puțin pentru aceste afecțiuni, strategiile populaționale sunt foarte adecvate, putând fi realizate fie de către medici de sănătate publică, fie de către medicii dentiști. Selecția temelor de informare poate combina criteriul “etapelor vieții” cu cel al riscului crescut, atunci când nu există posibilitatea identificării populației-țintă prin screening.

2. Mijloace și metode de educație pentru sănătate

2.1. Definiție, scop, obiective

Educația pentru sănătate se poate defini ca fiind un sistem ce include:

- conștiința stării de sănătate;
- procesul de predare/învățare;
- participare.

Scopurile educației pentru sănătate sunt:

- Informarea-educarea populației în domeniul medical;
- Dobândirea unor atitudini și deprinderi favorabile sănătății;
- Implicarea activă a populației în domeniul păstrării sănătății.

Obiectivele principale ale educației trasate de OMS sunt următoarele:

- sănătatea trebuie să devină este un capitol util pentru societate;
- să informeze populația asupra a tot ce i-ar fi necesar și util să cunoască în ceea ce privește ocrotirea propriei sale sănătăți;
- să contribuie la crearea unui comportament, a unei atitudini ferme și hotărâte în acest sens;
- să contribuie la formarea unei conștiințe de educație pentru sănătate, cu o cultură sanitară optimă, în sensul că fiecare din componenții unei colectivități să fie convins că nu există dezvoltare socio-economică fără sănătate;
- stimularea adresabilității pentru serviciile medicale.

Impactul educației pentru sănătate asupra grupurilor populaționale este diferit în funcție de:

- vârsta pacientului;
- nivelul lui de trai;
- bagajul de cunoștințe acumulate;
- perceperea informației și înțelegerea necesității sale de a practica cele învățate.

Programul educativ cuprinde 4 etape:

- a) constatarea;
- b) luarea la cunoștință;
- c) demonstrațiile in vivo sau pe macromodel;
- d) întărirea noțiunilor teoretice și practice.

Comunicarea către pacient implică anumite elemente prin a căror conjuncție se asigură realizarea sa. Acestea sunt: sursa de emisie (emițătorul), receptorul (destinatarul), mesajul de transmis (conținutul comunicării) și feed-back-ul, în cadrul căruia, pe seama schimbării rolurilor (persoana care a fost emițător devine destinatar, iar fostul destinatar își asumă rolul de emițător, participanții la actul de comunicare verifică eficiența acestuia și/sau îl dezvoltă.

Pentru a avea succes, medicul trebuie să își adapteze limbajul vârstei și gradului de cultură al pacientului, altfel riscând să vorbească în gol.

Pentru a face față acestor cerințe, orice medic trebuie să posede o serie de cunoștințe de psihologie care pot să îl ajute la evitarea unor conflicte inutile, stresante și dăunătoare pentru ambele părți ale comunicării.

Medicul, în ipostaza de educator, trebuie să aibă simț pedagogic, psihologic și oratoric, respectând anumite principii psihologice.

2.2. Metodele educației pentru sănătate

Educația pentru sănătate nu se face la întâmplare. Înainte de a începe o acțiune, o campanie de educație pentru sănătate trebuie elaborat un program care poate fi pe termen scurt, mediu sau lung.

Obiectivele programului definesc, în sens larg, intenția acestuia. Apoi, următorul pas constă în transformarea obiectivelor programului în obiective ale campaniei de promovare a sănătății.

Pentru realizarea obiectivelor propuse, trebuie să se țină cont cărui grup de populație i se adresează, care este nivelul de cultură sanitară al grupului respectiv, stabilindu-se strategiile cele mai bune.

Utilizarea mecanică a unor forme educativ – sanitare (conferințe, lecții, convorbiri, etc.) fără a ține seama **unde? când? cui?** i se adresează, constituie un mod nerealist și ineficient de a aborda culturalizarea sanitară a populației.

Metodele educației pentru sănătate sunt de corectare și de acțiune.

2.2.1. Metode de cercetare

Abordarea științifică a educației pentru sănătate nu poate fi concepută fără cercetare. Scopul cercetării este de a afla care este nivelul de cultură sanitară al populației, atât înainte de demararea campaniei, cât și la sfârșitul campaniei, fiind și o modalitate de control a eficienței acțiunii.

Metodele de cercetare pot fi:

A) – cantitative

- analiza datelor statistice existente
- anchete prin chestionar
 - metode rapide

B) – calitative

- observația (directă sau participativă);
- interviul (semistructurat, anamneza, în grup);
- conversația (individuală, « focus group »).

Anchetele prin chestionare sunt utile și în selecționarea canalelor de comunicație și activităților rețelelor instituționale care sunt preferate de grupurile țintă și care au cea mai mare audiență.

Chestionarul este un set de întrebări adresate elevilor sau adulților, verbal sau în scris, pentru ca ei să răspundă, de asemenea, verbal sau în scris.

Ce este întrebarea? Prin definiție, întrebarea este o solicitare a unui răspuns.

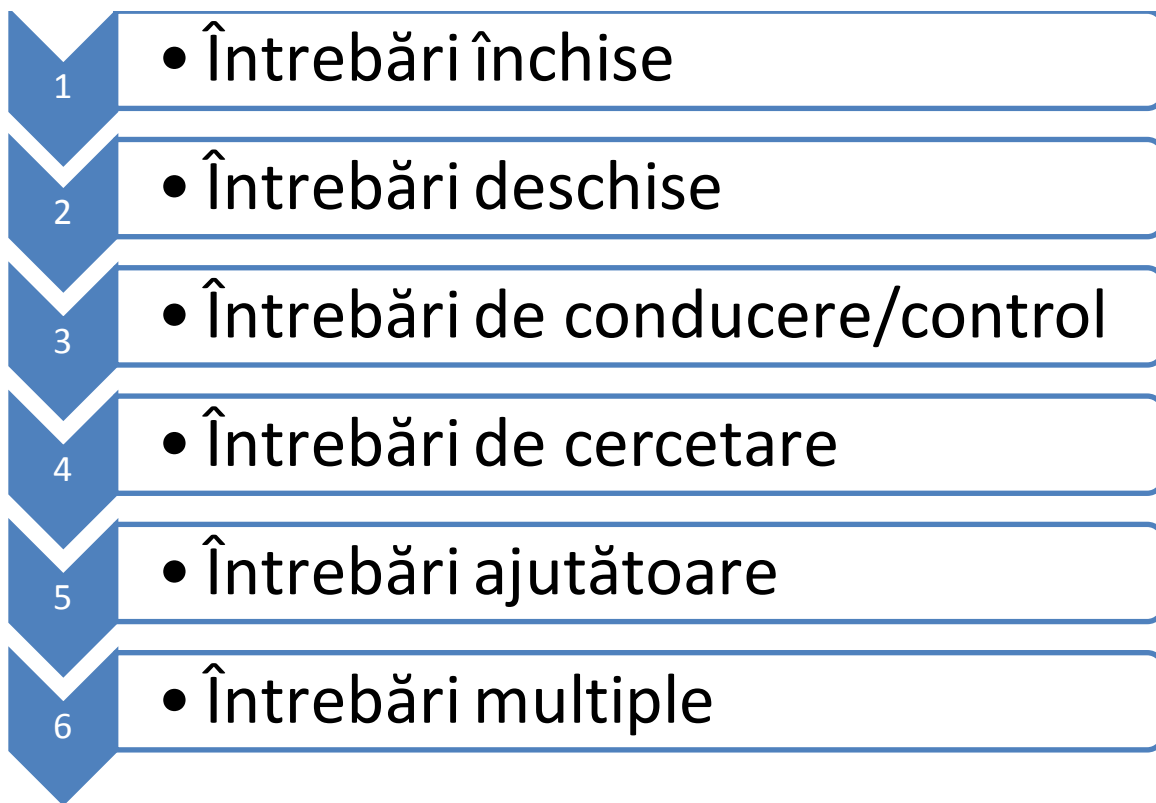


Fig. 1. Tipuri de întrebări care pot fi utilizate în chestionare.

În proiectele educaționale se pot folosi chestionarele scrise pentru un lot de elevi de ciclu elementar și gimnaziu.

De asemenea, se pot utiliza chestionare scrise pentru părinții copiilor evaluați și cadrele didactice care au colaborat în vederea consolidării informației sanogene și a motivației elevilor de a o adopta. Pentru a facilita formularea răspunsurilor și a crește relevanța acestora, reducând posibilitatea apariției unor răspunsuri inadecvate, se pot utiliza **testele bazate pe alegeri multiple**, în special pentru școlarii mici. Aceste teste constau din întrebări la care se dau mai multe variante de răspuns posibile, dintre care respondentul trebuie să o aleagă pe cea care i se potrivește sau este cea mai apropiată de situația valabilă în cazul său.

Câteva exemple de chestionare ce pot fi folosite în proiectele de promovare a sănătății oro-dentare:

CHESTIONAR 1 (ȘCOLARI MICI)

1. Câți ani ai?

.....

2. Ce ești?

a. Fetiță

b. Băiat

3. Unde locuiești?

a. La oraș

b. La sat

4. Unde lucrează mama?

.....

5. Unde lucrează tata?

.....

6. Câți frați mai ai?

.....

7. Când te speli pe dinți?

a. niciodată

b. când îmi spune cineva să mă spăl

c. dimineața și seara

d. după fiecare masă

e. înainte de culcare

8. Folosești vreodată scobitori?

a. după fiecare masă

b. când simt că am resturi de mâncare între dinți

c. niciodată

9. Folosești vreodată ață de curățat dinții?

- a. niciodată
- b. ori de câte ori mă spăl pe dinți
- c. seara, când mă spăl pe dinți înainte de culcare
- d. din când în când

10. Între mesele principale, mănânci ceva?

- a. nimic
- b. fructe
- c. o gustare
- d. o prăjitură sau o ciocolată
- e. ronțâi ceva tot timpul

11. Bei lapte?

- a. niciodată
- b. din când în când
- c. câte o cană dimineața și seara
- d. o cană seara, înainte de culcare
- e. în loc de apă

12. Care dintre alimentele de mai jos îți plac cel mai mult? Aranjează-le în ordinea preferințelor, de la locul 1 la ultimul loc:

- a. brânzeturi
- b. fructe
- c. legume
- d. prăjituri
- e. gemuri
- f. miere de albine
- g. iaurturi
- h. ciocolată

13. Când mergi la medicul dentist?

- a. niciodată
- b. când mă doare vreun dinte
- c. când mi se clatină vreun dinte
- d. o dată pe an
- e. o dată la șase luni

14. De ce mergi la dentist?

- a. pentru că nu mai suport durerea
- b. ca să-mi scoată dinții de lapte
- c. pentru că mă duce mama/tata/altcineva din familie
- d. pentru că vine medicul dentist la școală și controlează pe toată lumea
- e. ca să fiu sigur(ă) că nu mi se strică dinții

15. De unde știi cum trebuie să-ți îngrijești dinții?

- a. din familie
- b. de la școală
- c. de la medicul dentist / asistenta medicului dentist
- d. din emisiunile medicale de la TV
- e. din clipurile publicitare care prezintă paste , perii de dinți
- f. de pe internet

16. Ce simți tu față de medicul dentist?

.....

.....

CHESTIONAR 2 (GIMNAZIU)

1. Câți ani ai?

.....

2. Ce ești?

- a. Fetiță
- b. Băiat

3. Unde locuiești?

- a. La oraș
- b. La sat

4. Unde lucrează mama?

.....

5. Unde lucrează tata?

.....

6. Câți frați mai ai?

.....

7. Când te speli pe dinți?

- a. niciodată
- b. când îmi spune cineva să mă spăl
- c. dimineața și seara
- d. după fiecare masă
- e. înainte de culcare

8. Folosești vreodată scobitori?

- a. după fiecare masă
- b. când simt că am resturi de mâncare între dinți
- c. niciodată

9. Folosești vreodată ață de curățat dinții?

- a. niciodată
- b. ori de câte ori mă spăl pe dinți
- c. seara, când mă spăl pe dinți înainte de culcare
- d. din când în când
- e. nu știu ce este

10. Între mesele principale, mănânci ceva?

- f. nimic
- g. fructe
- h. o gustare
- i. o prăjitură sau o ciocolată
- j. ronțai ceva tot timpul

11. Bei lapte?

- a. niciodată
- b. din când în când
- c. câte o cană dimineața și seara
- d. o cană seara, înainte de culcare
- e. în loc de apă

12. Care dintre alimentele de mai jos sunt mai dăunătoare danturii? Aranjează-le în ordine, de la locul 1 la ultimul loc:

- a. brânzeturi
- b. fructe
- c. legume
- d. prăjituri
- e. gemuri
- f. miere de albine
- g. iaurturi
- h. ciocolată

13. Când mergi la medicul dentist?

- a. niciodată
- b. când mă doare vreun dinte
- c. când îmi sângerează gingia
- d. o dată pe an
- e. o dată la șase luni

14. De ce mergi la dentist?

- a. pentru că nu mai suport durerea
- b. ca să-mi scoată dinții cariati
- c. ca să-mi obtureze cariile dentare
- d. pentru că vine medicul dentist la școală și controlează pe toată lumea
- e. ca să fiu sigur(ă) că nu mi se strică dinții

15. De unde știi cum trebuie să-ți îngrijești dinții?

- a. din familie
- b. de la școală
- c. de la medicul dentist / asistenta medicului dentist
- d. din emisiunile medicale de la TV
- e. din clipurile publicitare care prezintă paste, perii de dinți
- f. de pe internet.

16. Ce te atrage și ce te respinge în relația cu medicul dentist?

.....
.....

CHESTIONAR PENTRU FORMATORII DE OPINIE: PĂRINTE (MAMA/TATA)

EDUCATOR

ÎNVĂȚĂTOR

MEDIUL DE PROVENIENȚĂ: URBAN/RURAL

1. În ce constă igiena dentară?

.....
.....

2. Cum se efectuează un periaj dentar corect?

.....
.....
.....

3. De câte ori pe zi este necesar să ne spălăm pe dinți?

.....

4. La ce intervale e bine să efectuăm controale dentare, pentru o bună stare de sănătate orală?

.....

5. Care sunt alimentele care favorizează dezvoltarea unei danturi sănătoase?

.....

6. Care sunt alimentele dăunătoare sănătății dentare?

.....
.....

7. Care este rolul fluorului și cum poate fi aplicat acesta?

.....
.....

2.2.2. Metode de acțiune

Metodele de acțiune constau din sensibilizarea populației (grupului țintă) și penetrarea informației.

Sensibilizarea – se adresează unor mase largi de populație pe un interval scurt de timp și are ca scop sporirea receptivității populației asupra unor probleme de sănătate. Substratul acestei acțiuni este informarea și implică furnizarea de date despre un subiect, fără a se asuma responsabilitatea modului în care oamenii se hotărăsc să folosească această informație.

Acțiunile de sensibilizare se pot realiza prin multiple modalități: postere, filme scurte, conferințe, sloganuri, etc. Acestea au un caracter mobilizator și reușesc să creeze, în rândul populației, un climat favorabil desfășurării activităților ulterioare.



Fig. 2. Copii în timpul unei acțiuni de sensibilizare

Penetrarea informației – continuă sensibilizarea pe un interval de timp mai lung și se adresează unei populații țintă. În acest caz, pe lângă informare, se are în vedere educarea și chiar consilierea pentru a determina populația sau individul (după caz) să se comporte într-un anumit fel – deci să-și modifice stilul de viață, luând deciziile corespunzătoare vizavi de problemele sale prioritare.

Deci, acțiunile de educație pentru sănătate încep cu sensibilizarea și se termină cu penetrarea informației.



Fig. 3. La sfârșitul acțiunii educative după primirea premiilor

2.2.3. Metode de pregătire pentru formatorii de opinie în educație

Cursurile se adresează atât cadrelor medico – sanitare cât și altor persoane care vor să desfășoare voluntar o activitate de educație pentru sănătate : cadre didactice, sociologi, psihologi sau alte persoane care au un anumit bagaj de cunoștințe de cultură generală, sau în domeniul respectiv, și care dovedesc aptitudini de predare.

Aceste cursuri reprezintă o formă organizată a participării active a populației la rezolvarea propriilor ei probleme de sănătate. Scopul este de a forma educatori de sănătate, care după absolvirea acestor cursuri să desfășoare o activitate eficientă de promovare a sănătății prin educație pentru sănătate.

Ei pot fi formați și în cadrul unor asociații, ligi sau alte organizații cu caracter non-guvernamental și non-profitabil, la care pot adera și sub auspiciile cărora să-și desfășoare activitatea ulterior.

2.3. Mijloace utilizate în educație

Acestea se referă la transmiterea mesajului între cei doi interlocutori: *comunicator* și *receptor*. Comunicatorul sau emițătorul este reprezentat de medicul dentist, iar receptorul de către pacient. În procesul de feed-back, însă, rolurile se schimbă, pacientul formulând întrebări în conținutul cărora se conjugă mesajul sanogen înțeles de la medic și nevoile sale specifice de cunoaștere, legate de contextul sanitar pe care se fundamentează comunicarea. După cum se poate constata, responsabilitatea asupra mesajului o poartă întotdeauna medicul, pentru că el este deținătorul competenței, pe baza căreia direcționează comunicarea.

Practicile cu care trebuie să se obișnuiască pacienții sunt:

- măsurile de igienă;
- vizite periodice de control;
- regim dietetic corespunzător;
- folosirea rațională a fluorului.

Mijloacele de educație pentru sănătate sunt foarte variate și numeroase, iar o clasificare a acestora este mai mult didactică, deoarece în majoritatea cazurilor, două sau mai multe mijloace se folosesc simultan, altele devin paralele, se suprapun sau interferează.

Aceste mijloace se clasifică în 2 grupuri mari: mijloace tradiționale și mijloace moderne, fiecare cu subdiviziunile sale.

2.3.1. Mijloacele tradiționale includ:

a) Mijloacele verbale (cuvântul vorbit) - acestea sunt cele mai ușoare și mai răspândite mijloace, având rolul de a stabili contacte directe între emițător și receptor. Ele cuprind:

1. *Conferința* – este un mijloc în prezent controversat, unii considerând-o foarte utilă, iar alții ca fiind depășită. Se consideră folositoare dacă se respectă anumite condiții:

- subiectul să intereseze auditoriul (publicul);
- să fie scurtă (25-30 de minute);
- auditoriul (publicul) să fie relativ omogen din punctul de vedere al capacității de receptare (normalitate psihică, nivel de educație, de familiaritate cu problematica abordată);
- emițătorul să asocieze utilul cu plăcutul (dacă ne adresăm unor adulți vom însoți conferința cu un film, iar dacă ne adresăm unor tineri, vom completa conferința cu o audiție muzicală sau/și dans).

2. *Convorbirea* – poate fi efectuată în grup sau individual, cea individuală fiind mai eficientă.

3. *Lecția* – constă în transmiterea, după un plan bine stabilit, a unor cunoștințe igienico-sanitare. Este utilizată de preferință în unități de învățământ, dar poate fi utilizată și pentru alte grupuri (ex: într-un azil de bătrâni).

Lecția în cadrul școlii

- ✓ este o activitate desfășurată de elevi sub conducerea cadrului didactic, prin care aceștia își însușesc o temă din programa școlară educativ-sanitară, într-un timp limitat (maximum 50 de minute);
- ✓ presupune recapitularea cunoștințelor din lecția precedentă (5-10 minute);
- ✓ necesită recapitularea și fixarea cunoștințelor predate prin întrebări sau prin reluarea și clarificarea unor aspecte incomplet urmărite (5-10 minute);
- ✓ se organizează în modul colectiv al procesului de învățământ, pe clase sau grupe de clase, constituind o formă importantă de educație sanitară școlară. Se consideră că succesul educației sanitare școlare este asigurat numai prin includerea ei în cadrul procesului de învățământ, al programei analitice școlare.

Condițiile pe care trebuie să le îndeplinească o lecție sunt:

- claritatea scopului urmărit: în prealabil trebuie urmărit scopul lecției: acumularea sau completarea cu noi cunoștințe, formarea de deprinderi și obișnuințe sanogene, motivarea necesității asigurării igienei buco-dentare etc.;
- alegerea judicioasă a conținutului lecției, adică a temei în funcție de vârsta elevilor, de interesele și necesitățile lor;
- alegerea metodelor și procedeele celor mai indicate pentru realizarea scopului urmărit (lecția activă, demonstrația practică, proiecții de filme, casete video sau diapozitive etc.);
- organizarea metodică a lecțiilor pe baza unei planificări semestriale sau anuale bine întocmite în prealabil.

Tipuri de lecții

- ❖ lecții de dobândire (asimilare) de noi cunoștințe;
- ❖ lecții de recapitulare, de fixare și de sistematizare a cunoștințelor dobândite anterior (lecții de sinteză, de repetare a noțiunilor predate);
- ❖ lecții de formare de noi deprinderi, precum și de aplicare a acestora în practică (lecția-demonstrație practică; ex: periajul dentar);
- ❖ lecția de verificare a cunoștințelor, obișnuințelor și priceperilor însușite anterior (lecții de control);
- ❖ lecții mixte, combinate.

b) Mijloace scrise sau tipărite sunt foarte variate și reprezintă cele mai utilizate forme de ridicare a nivelului de cultură sanitară a populației. Completează foarte bine mijloacele vorbite și sunt foarte comode, deoarece aflate în posesia celor în cauză, pot fi oricând consultate. Sunt reprezentate de: simple afișe, pliant ilustrat, fluturașe până la broșuri sau volume cu conținut educativ sanitar.

c) Mijloace vizuale sunt bine reprezentate, prezentând avantajul că pot transmite mesajul, mult mai bine și mai eficient decât alte mijloace. Ele includ: grafice, planșe, fotografii, prezentări power point, scurte filme documentare, expoziții, etc. Sunt ideale mai ales pentru categoriile de populație cu un nivel mai scăzut de școlarizare.

De obicei mijloacele vizuale se asociază atât cu mijloacele verbale, cât și cu cele scrise, permițând o mai bună fixare a noțiunilor și favorizând înțelegerea acestora.

Putem face o clasificare a mijloacelor vizuale după forma lor astfel:

- a) – *forme plane* – afișul, cartea de colorat, panoul, planșa, fotografia, diapozitivul, diafilmul ;
- b) – *tridimensionale* – modelul, macheta, mulajul, preparatul natural, articole cu inscripții (tricouri, fulare, sacoșe etc.);
- c) – *forme combinate* – colțul sanitar, expoziția.

Mijloacele vizuale, dacă sunt bine realizate, pot transmite mesajul mult mai ușor și mai eficient decât alte mijloace, mai ales spre acea categorie de populație cu un grad mai redus (scăzut) de școlarizare.

În realizarea acestora, trebuie să se țină seama de câteva elemente:

- să nu fie prea încărcate;
- să fie clare;
- informația să fie corectă;
- textul, dacă există, să fie scurt, concis, țintit.

„Dințișorul cel curat” - autor dr. Ramona Amina Popovici.



Fig. 4. Coperta cărții de colorat față/verso

În cartea de colorat imaginile sunt statice, dar par să “surprindă” un moment semnificativ “din mișcare” (instantaneu).

Opțiunea de a folosi imagini statice pentru a împărtăși cunoștințe referitoare la determinanții sănătății orale s-a bazat pe relația particulară pe care acestea o au cu conținutul educațional transmis.

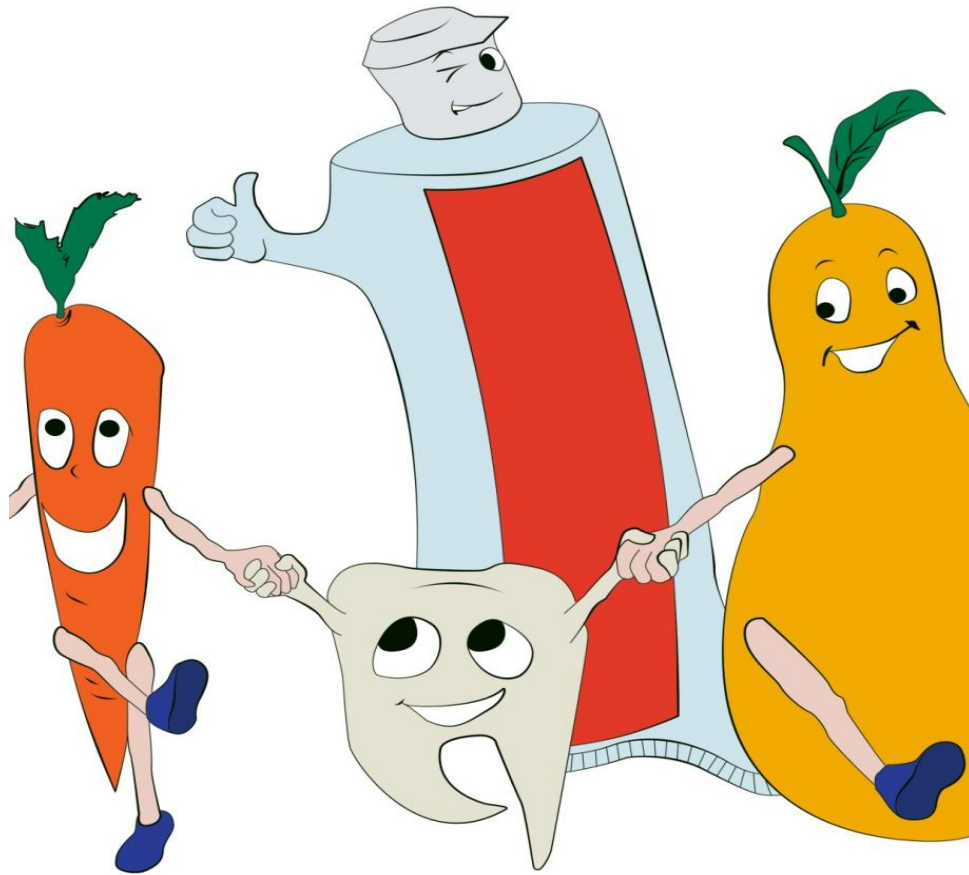


Fig. 5. Planșă din cartea de colorat „Dințișorul cel curat”

d) Mijloacele demonstrative completează și explică încă mai aprofundat noțiunile prezentate verbal sau în scris. Acestea includ: macromodelul, macheta, mulajul și preparatul natural.

Se recomandă combinarea mijloacelor vizuale cu cele demonstrative, sub formă de expoziții și colțuri sanitare, plasate strategic în școli, grădinițe, în săli de așteptare, în cabinete de stomatologie sau în alte locuri frecventate de persoane numeroase. Acestea pot avea un caracter temporar sau permanent, cu condiția de a fi mereu schimbate și reactualizate – parțial sau total – pentru a capta atenția.

1. **Macromodelul** pentru demonstrații practice a tehnicii de periaj corect



Fig. 6. Demonstrații pe macromodel privind tehnica de periaj corect



Fig. 7. Demonstrații pe macromodel pentru tehnica de periaj corectă



Fig. 8. Demonstrații interactive pe macromodel pentru tehnica de periaj corectă

2. Utilizarea substanțelor revelatoare pentru placa bacteriană de pe suprafețele dentare pentru demonstrații în cavitatea bucală

Substanțele revelatoare reprezintă un mijloc demonstrativ foarte util, deoarece vizualizează placa bacteriană pe suprafețele dentare. Aceste substanțe trebuie să îndeplinească anumite caracteristici pentru a fi utilizate ca agenți de evidențiere:

- **Intensitatea culorii** : trebuie să apară o colorare distinctă a depozitelor. Culoarea trebuie să contrasteze cu culorile normale ale cavității bucale.
- **Durata intensității**: culoarea nu trebuie să fie îndepărtată prin clătire, prin metode obișnuite sau să poată fi înlăturată de salivă pentru perioada de timp necesară pentru instruirea sau serviciul clinic complet.
- **Gustul**: folosirea agentului trebuie să fie plăcută și să încurajeze cooperarea.
- **Iritația mucoasei**: să nu producă leziuni la nivelul mucoasei
- **Difuzibilitatea**
- **Proprietăți astringente și antiseptice.**



Fig. 9. Substanțe revelatoare

Cea mai utilizată substanță revelatoare este Albastrul de metil, există însă și sisteme mai performante cum este sistemul Mira 2 Ton, care evidențiază diferențiat placa bacteriană recentă de cea constituită cu mai mult timp în urmă.



Fig. 10. Vizualizarea plăcii bacteriene cu revelatorul Mira 2 Ton

Indiferent care din aceste mijloace este folosit există câteva aspecte comune de care trebuie să se țină seama:

- tema prezentată să fie una de interes pentru auditoriu;
- modul de prezentare al problemelor să fie de așa manieră încât să capteze atenția;
- limbajul utilizat va ține seama de capacitatea de înțelegere a auditoriului;
- comunicatorul să aibă o ținută decentă, să-i privească în față pe cei cărora le vorbește, să zâmbescă, să reziste la distragerea atenției, să fie maleabil și să fie un bun ascultător;
- expunerea propriu-zisă, acolo unde este cazul, să nu depășească 30 de minute.

Pentru crearea unui climat de încredere și a unei apropieri între comunicator și grup, câteva “*repere*”, care să ne ajute în realizarea acestor deziderate:

- Grupul e de preferat să fie sub 15 persoane;
- Grupul să fie cât mai omogen;
- Reuniunile se vor ține acolo unde oamenii se simt bine, în siguranță și intimitate, fără riscul de a fi întrerupți;
- Așezarea să se facă astfel încât fiecare membru al grupului să se simtă egal, să aibă contact vizual cu ceilalți și să poată vorbi fără greutate (exemplu: în cerc);
- Puneți întrebări deschise, care să stimuleze discuția;
- Nu forțați participarea la discuție, dacă membrii grupului nu doresc;
- Încurajați participanții să pună întrebări. Nici o întrebare nu este “deplasată” și toate merită un răspuns;
- Respectați dreptul fiecăruia de a avea o opinie, chiar dacă sunt diferite;
- Confidențialitatea discuțiilor, dacă e cazul.

4.3.2. Mijloacele moderne se referă la implicarea în activitatea de educație pentru sănătate a mass-mediei. Cuprind: *presa, radioul, filmul, reprezentările scenice, televiziunea, internetul*. Ele reprezintă mijloace pe cât de utile, pe atât de interesante, în difuzarea informațiilor și mesajelor cu caracter educativ-sanitar către toate categoriile de grupe de populație. Reprezintă mijloace cu mare audiență și receptivitate crescută la cea mai mare parte a populației.

1. *Presa* – prin diferite articole, reportaje, interviuri cuprinzând evenimente medicale, succese de natură terapeutică, dar și criticând aspectele negative.

2. *Radioul* – prin realizarea unor emisiuni cu caracter educativ–sanitar difuzate la ore de maximă audiență, poate fi un factor esențial în ridicarea nivelului de cultură sanitară a populației. Aceste emisiuni pot fi sub forma unor expuneri scurte, sfaturi medicale, răspunsuri la întrebări pe teme medicale sau concursuri. Radioul educă, acțiunea lui este constantă în funcție de conținutul programelor.

Datorită faptului că este mai accesibil, din punct de vedere material, are avantajul unei audiențe mai mari decât televiziunea, cuprinzând și categoriile sociale care au un nivel de educație sanitară mai scăzut.

3. *Filmul* – reprezintă o componentă importantă în munca de educație pentru sănătate. El aduce o contribuție originală și unică la memorarea și fixarea cunoștințelor. Copiii și tinerii rețin mai bine faptele și noțiunile transmise prin film. Un criteriu fundamental al realizării unei bune eficiențe este condiționat de auditoriul cărui i se adresează. Filmul de educație pentru sănătate trebuie să se adreseze unui public bine definit. Pentru unul și același subiect, în funcție de colectivitatea cărui ne adresăm, se pot realiza două sau mai multe versiuni.

4. *Televiziunea* poate fi considerată un factor decisiv în transmiterea unor mesaje, ținând cont că este recepționată de milioane de telespectatori. Modalitățile de folosire a TV sunt multiple:

- prezentarea de filme documentare cu caracter instructiv-educativ;
- difuzarea repetată a unor spoturi educative la oră de maximă audiență;
- realizarea de emisiuni cu invitați (personalități) care să prezinte anumite probleme și să răspundă întrebărilor telespectatorilor.

5. *Reprezentările scenice* pot fi folosite cu succes în ridicarea nivelului de cultură sanitară a populației (pentru preșcolari și școlari – teatrul de păpuși și marionete). Aceste mijloace sunt mai dificil de folosit pentru că implică colaborarea cu instituțiile respective.



Fig.11. Imagine din sceneta didactică

6. *Internetul* – Tehnologia informației a evoluat rapid de la modelul simplu de descărcare-utilizare (*download-and-play*) la modelul complex de cursuri pe Internet, care poate include teste în direct și monitorizarea completă a întregii activități de învățământ (*over-the-Web-just-in-time*), site-uri pentru pacienți. Există o mulțime de posibilități de implementare a educației la distanță prin mijloace electronice, care, generic, sunt denumite e-Learning.

Marea majoritate a instituțiilor care în ziua de azi folosesc învățământul la distanță se concentrează asupra training-ului (instrucția în scopul unei activități specifice) și nu își îndreaptă atenția asupra noilor tendințe din educație:

- tranziția de la training la educația continuă, de la instrucția specifică unei anumite activități (unui loc de muncă) la educația înțeleasă ca o activitate continuă în cadrul unei cariere;
- e-Learning se extinde rapid datorită concentrării actuale asupra domeniului tehnologiei informației (TI) și programelor de certificare la nevoile educaționale care se impun pentru ocuparea cât mai eficientă a forței de muncă;
- e-Learning are o mare FLEXIBILITATE în organizarea conținutului și în managementul procesului de învățământ la distanță, putând fi implementată rapid în orice tip de instituție care necesită o astfel de activitate.

Aceasta reușește în ultima perioadă să se impună tot mai puternic, în mai toate ariile geografice, deoarece permite realizarea educației permanente a populației indiferent de zona de proveniență (urbană sau rurală), vârstă sau ocupație. Se recomandă o puternică acțiune prin acest mijloc de informare (ex.: prin realizarea de site-uri pentru pacienți care să conțină informații, exemple, imagini despre întregul proces de protejare, îngrijire a aparatului dento-maxilar).

Concluzii

Feedback-ul este un element deosebit de important în cadrul interacțiunii dintre educator și indivizi. Se recomandă ca după fiecare sesiune de educație să se recunoască ce impact a avut lecția asupra participanților, ce părere au avut despre modul de desfășurare, ce îmbunătățiri ar trebui aduse și care ar fi în opinia lor punctele slabe și tari ale sesiunii de educație. Prin aceasta receptorii se simt implicați în procesul de educație și le crește motivația și respectul de sine.

Pacientul, persoana implicată în procesul de schimbare a comportamentului, transcende convingeri și mentalități, redefinindu-se. Limbajul verbal și nonverbal care însoțesc imaginea, trebuie să sugereze pacientului că nu este singur în acest proces și că este permanent supravegheat cu calm și cu profesionalism de către medicul dentist.

Pentru a avea deci succesul scontat, trebuie ca tema prezentată să fie una de interes pentru auditoriu. Apoi, conținutul și modul de prezentare a problemelor trebuie să fie de așa manieră încât să capteze atenția.

De asemenea, limbajul folosit va ține seama de capacitatea de înțelegere a auditoriului. Un element important îl reprezintă comunicatorul, atât prin aspectul fizic, cât și prin atitudinea din timpul comunicării : ținută decentă, să-i privească în față pe cei cărora le vorbește, să zâmbescă cât mai mult, mimica, gestica și intonația vocii să capteze atenția – să reziste la distragerea atenției, să fie maleabil și să știe să fie și un bun ascultător.

Discuția în grup este o modalitate de lucru în care educatorul (liderul, consilierul) dialoghează cu participanții sau participanții dialoghează între ei. Liderul discuției îndeplinește rol direct în continuitatea și orientarea discuției.

Grupurile cărora li se adresează această formă de educație pot fi din cele mai variate : cu aceeași afecțiune, cu aceleași preocupări la locul de muncă sau în timpul liber (asociații, etc.), grupuri de tineri sau vârstnici, de femei sau de bărbați, etc.

Pentru crearea unui climat de încredere și a unei apropieri între comunicator și grup, vă oferim câteva « *reper* » care să vă ajute în realizarea acestor deziderate:

- grupul e de preferat să fie sub 15 persoane;
- grupul să fie cât mai omogen;
- reuniunile se vor ține acolo unde oamenii se simt bine, în siguranță și fără riscul de a fi întrerupți;
- așezarea să se facă astfel încât fiecare membru al grupului să se simtă egal, să aibă contact vizual cu ceilalți și să poată vorbi fără greutate (exemplu: în cerc).
- puneți întrebări deschise, care să stimuleze discuția;
- nu forțați participarea la discuție dacă membrii grupului nu doresc;
- încurajați participanții să pună întrebări. Nicio întrebare nu e « *deplasată* » și toate merită un răspuns;
- respectați dreptul fiecăruia de a avea o opinie, chiar dacă sunt diferite;
- confidențialitatea discuțiilor, dacă e cazul.

3. Răspunderile promotorilor de sănătate (formatori de opinie)

Promotorii de sănătate au câteva obligații:

- Să fie informați.

Datele informaționale se schimbă mereu, iar noile descoperiri produc noi comentarii, noi termeni, noi speranțe. Promotorii de sănătate trebuie să fie în pas cu noile date, să cunoască suficient de bine ansamblul problemelor, să poată explica oamenilor noutățile în domeniu, în așa fel încât ele să poată fi înțelese și acceptate.

- Să fie îndrăzneți.

Promotorii de sănătate trebuie, să-și depășească slăbiciunile să-și învingă propriile prejudecăți, să descopere noi resurse și să lucreze împreună cu oameni pe care înainte nu-i considerau importanți.

- Să fie expliciți.

Oamenii nu trebuie derutați, folosind un limbaj ambiguu, cu jumătăți de adevăr sau un jargon tehnic. Limbajul folosit trebuie să fie clar, sincer și direct, spre a fi înțeles de cei care trebuie să-și modifice comportamentul obișnuit.

- Să evite stereotipia și blamarea, mai ales dacă este vorba de o afecțiune transmisibilă. Bolile nu au preferințe rasiale, religioase, etnice sau de sex.

- Să-și concentreze eforturile pentru a schimba comportamentul în grupurile țintă.
- Să activeze pe un front larg.

Numai o atitudine pozitivă față de schimbarea comportamentului nu se dovedește eficientă. Omenirea este plină de fumători, care știu că fumatul dăunează sănătății și totuși continuă să fumeze. Modificarea comportamentului cere o ofensivă mult mai amplă; promotorii de sănătate trebuie să înțeleagă motivele care îi fac pe oameni să continue să se poarte la fel, să găsească alternative acceptabile și apoi să furnizeze resursele și sprijinul necesar pentru acceptarea alternativelor. Numai frica, după cum se vede, nu aduce schimbările dorite.

4. Abordări și direcții de orientare ale educației pentru sănătate

Abordările posibile în educația pentru sănătate sunt:

- medicală;
- educațională;
- orientată spre individ (personalizare);
- schimbare socială.

Direcțiile de orientare ale educației pentru sănătate se referă la:

- dezvoltarea educației pentru sănătate a familiei, punându-se accentul pe pregătirea copiilor și în mod aparte a tinerilor pentru căsătorie și viața de familie; consolidarea unei opinii corecte de planificare a familiei; promovarea cunoștințelor cu privire la îngrijirea sănătății femeilor, copiilor, adolescenților;

- antrenarea populației în activități privind asanarea mediului fizic extern, igienizarea și înfrumusețarea localităților, locurilor de muncă și de viață, evitarea poluării aerului, apei și solului;

- îmbunătățirea, dezvoltarea și modernizarea educației pentru sănătate în cadrul colectivităților pentru copii și tineret, în raport cu particularitățile de vârstă, sex, activitate, pentru formarea și consolidarea deprinderilor unui comportament igienic și pentru prevenirea îmbolnăvirilor;

- extinderea și modernizarea educației pentru sănătate a personalului din organizații, instituții de stat și particulare, din asociațiile rurale, în scopul evitării îmbolnăvirilor profesionale, a păstrării integrale a capacității de lucru și stimulării inițiativei personale privind participarea acestora la aplicarea măsurilor de promovare a sănătății;
- încurajarea acțiunilor de prevenire și combatere a bolilor transmisibile cu accent pe bolile sociale (tuberculoza, bolile venerice);
- susținerea acțiunilor de prevenire și combatere a bolilor cronice prin sporirea aportului educației pentru sănătate în influențarea deprinderilor și comportamentului igienic corect, organizarea regimului de viață, promovarea unei alimentații echilibrate, combaterea abuzului de toxice uzuale;
- intensificarea educației pentru sănătate în problemele de prevenire a accidentelor (mai ales a accidentelor de circulație), la domiciliu și la locul de muncă și instruirea populației în acordarea primului ajutor;
- integrarea educației pentru sănătate în cadrul programelor cultural – artistice pentru populație ;
- propagarea cunoștințelor pentru îngrijirea elementară a bolnavilor, pentru respectarea indicațiilor de regim igienic – dietetic, în vederea refacerii sănătății, a capacității de muncă, a reabilitării și a unei cât mai bune reintegrări sociale;
- popularizarea sistemului de asigurare de servicii medicale pentru populație, a noilor metode și mijloace pe care medicina le pune la dispoziția reintegrării sociale;
- considerarea educației pentru sănătate ca cea mai puternică armă în promovarea sănătății, având totodată un caracter public, cetățenesc și reprezentând un factor important în ridicarea nivelului general de cultură și civilizație a populației;
- dată fiind orientarea profilactică în ocrotirea sănătății și a măsurilor de sanogeneză, o direcție importantă a educației pentru sănătate constă în dezvoltarea interesului pentru practicarea sportului și pentru folosirea factorilor naturali în scopul călirii și întăririi organismului și a creșterii duratei medii de viață;
- dezvoltarea răspunderii pentru sănătatea proprie, familială și colectivă, parte integrantă din preocupările ocrotirii sănătății publice.

Activitatea de educație pentru sănătate trebuie să fie fundamentată pe date științifice, verificate, să aibă un conținut optimist, să promoveze formele și mijloacele moderne de comunicare, cu largă accesibilitate și mare putere de penetrație în colectivitățile umane.

Numeroasele direcții de orientare ale educației pentru sănătate scot în evidență complexitatea acestei activități, și totodată atrag atenția asupra unor posibile dificultăți în ceea ce privește obținerea unor rezultate eficiente. Abordarea oricărei direcții impune respectarea unei anumite conduite fără de care atingerea obiectivelor de bază ale educației pentru sănătate sunt greu de îndeplinit. Nu trebuie uitat că în fond orice acțiune de educație pentru sănătate, indiferent de direcția de orientare, urmărește realizarea mai multor obiective.

5. Particularități ale managementului proiectelor în evaluarea acțiunilor educaționale

5.1. Introducere

Conducerea activității (managementul) rețelei de medicină dentară urmărește atingerea unor standarde înalte de *efectivitate* (definită ca grad optim de corespondență între obiectivul înființării unității și rezultatele muncii desfășurate acolo, în termeni de calitate) și *eficiență economică* (în termenii raportului dintre resursele investite și beneficiile obținute,) respectiv performanță ca efect sinergic între eficiență și eficacitate.

Rețeaua este compusă din **organizații**, care pot avea dimensiuni, funcții și obiective specifice.

Din perspectivă managerială, „*organizația este un aranjament sistematic de resurse, în primul rând umane, dar și materiale, financiare, informaționale, aranjament având un scop clar, respectiv realizarea unui scop primar, a unui obiectiv sau set structurat de obiective, sau realizarea unei activități cu finalitate*”. În cazul serviciilor de sănătate, avem de-a face cu:

1. organizații publice, precum spitalele, policlinicile, cabinetele subvenționate prin Casa Asigurărilor Sociale de Sănătate, care constituie, împreună, rețeaua de sănătate publică, condusă de Ministerul Sănătății ca organ al administrației publice centrale de specialitate, ce aplică strategia de dezvoltare și politicile Guvernului României în domeniul asigurării sănătății populației și al realizării procesului de reformă în sectorul sanitar;
2. organizațiile non-guvernamentale, precum asociațiile profesionale (de exemplu, AMSPPR, ANRO, CMDR, SRS, UNAS etc.), cu personalitate juridică, apolactice și fără scop patrimonial; organizațiile private, cum sunt cabinetele medicilor cu liberă practică autorizate potrivit legii nr. 96 / 2007 privind exercitarea profesiei de medic și altor reglementări în vigoare.

Toate aceste organizații au fost înființate și funcționează în virtutea unui **scop** clar, **asigurarea serviciilor de sănătate către populație** în condiții compatibile cu Carta Europeană a Drepturilor Omului, Constituția României și legislația de profil votată în Parlament, apoi promulgată de Președintele României.

5.2. Obiectivele, din perspectivă managerială

Fiecare dintre aceste organizații, la rândul său, își stabilește **obiectivele de activitate** în limitele cadrului legal instituit.

Prin **obiectiv** se înțelege „*o sarcină care trebuie precizată în sensul identificării răspunsului la următoarele patru întrebări: Ce trebuie făcut? Cine trebuie să facă? Când trebuie finalizată, realizată sarcina? Care este nivelul de performanță ce trebuie atins?*”.

În contextul materialului de față, singurul obiectiv care va fi tratat este educația pentru sănătate, urmărindu-se direcțiile realizării ei în cele trei tipuri de organizații, cu focalizare asupra rolului jucat de medic, ca liant între obiectivele structurilor organizaționale și nevoile populației.

Înainte de a o face, este binevenită o trecere în revistă a exigențelor la care trebuie să răspundă un obiectiv managerial pentru a putea fi asumat ca parte esențială a conducerii științifice a activității. Aceste caracteristici au fost sintetizate în cuvântul englez **SMART** (însemnând, deopotrivă, „deștept” și „elegant”), ale cărui litere coincid, întâmplător, cu literele inițiale ale adjectivelor prin care se exprimă **calitățile dorite ale obiectivului**:

S – SPECIFIC organizației respective;

M – MEASURABLE („măsurabil”, cuantificabil);

A – ACCURATE (clar formulat, precis);

R – REALISTIC („realist, realizabil”);

T – TIMED („legat de un termen de îndeplinire”).

5.3. Managementul ca proces

Tot ca preambul al dezvoltării subiectului legat de managementul proiectelor de educație pentru sănătate orală, ne vom referi, pe scurt, la etapele sau activitățile fundamentale din care constă orice activitate de management, așa-numita „bucă a managementului”. Acestea sunt:

- 1. Identificarea obiectivelor generale ale organizației**
- 2. Stabilirea obiectivelor pe termen scurt**
- 3. Elaborarea planurilor de acțiune**
- 4. Organizarea resurselor**
- 5. Comunicarea**
- 6. Motivarea**
- 7. Controlul**
- 8. Acțiuni corective corespunzătoare”.**

Între aceste etape există o succesiune logică: pentru a se demara o acțiune, este necesar să se știe precis ce se urmărește prin ea, adică să se definească un obiectiv general reprezentând finalitatea acțiunii și o mulțime de scopuri, sau obiective pe termen scurt, care decurg din obiectivul general și îl defalcă pe aspecte și etape. În raport cu aceste scopuri se elaborează planurile de acțiune pentru fiecare scop în parte, apoi, în vederea coordonării eforturilor simultane de a le atinge, se organizează resursele umane, informaționale, financiare și materiale, se ia legătura cu autoritățile pentru avizarea proiectului, cu furnizorii de resurse, se stabilește o relație durabilă de lucru în interiorul echipei, între coordonatorii proiectului și executanți. Pentru ca activitatea să continue și să se finalizeze, toți participanții la proiect trebuie să fie motivați, iar coordonatorii să controleze execuția astfel încât, în funcție de condițiile concrete, uneori imprevizibile, de îndeplinire a sarcinilor, obiectivul proiectului să fie realizat întocmai sau cu o minimă diferență, fără a se depăși intervalul de timp alocat.

În practică, ceea ce apare, simplificat, în această prezentare schematică, se complică din diferite motive: este posibil, de pildă, ca nu toate resursele necesare să fie disponibile cu aceeași ușurință sau – un alt exemplu – atingerea obiectivului strategic propus să necesite stabilirea și atingerea unor *obiective intermediare*, cu *caracter tactic*, fără a căror îndeplinire în realizarea obiectivului strategic să fie imposibilă. În funcție de natura obiectivelor propuse, în conducerea efectivă a activităților, munca va fi organizată în *etape* care, la rândul lor, se vor defini prin *obiective și procedee specifice*. Pentru buna stăpânire a complexității proiectului, este, de asemenea, util să se realizeze cartografierea gândirii strategice subiacente acestuia. În acest scop se vor realiza scheme generale și scheme detaliate, pe etape, stabilindu-se obiectivele-cheie (noduri) și relațiile lor cu obiectivele secundare inerente procesului, precum și sensul relațiilor dintre ele (unidirecționale sau biunivoce (feed-back)).

5.4. Programe și proiecte – definiții

Majoritatea definițiilor date *proiectelor/programelor* converg către menționarea principalelor *elemente specifice* ale acestora: obiective date, resurse special alocate, activități planificate, echipă dedicată, durată determinată.

OECD (în *Methods And Procedures In Aid Evaluation*, 1986) operează cu definiția: „proiect – un set de activități integrate, menite să atingă un obiectiv prestabilit, într-o perioadă de timp determinată și urmând un plan de acțiune stabilit”. O **distincție mai clară** asupra proiectelor și programelor o reprezintă cea făcută de Comisia Europeană în Manual for the FARE Decentralized Implementation System - proiect – un grup de activități, care trebuie realizate într-o secvență logică pentru a atinge un set de obiective prestabilite, într-o perioadă de timp determinată și urmând un plan de acțiune stabilit; ***proiectul este prima subdiviziune a programului.***

Cea dată de guvernul României în ordonanța nr. 8: un scop bine definit, care este prevăzut a fi realizat într-o perioadă determinată și în limita resurselor alocate și căruia îi este atașat un set de reguli, obiective și activități.

Conform DEX al limbii române, proiectul reprezintă un plan sau o intenție de a organiza, a întreprinde, într-o formă inițială, care urmează a fi discutat și aprobat pentru a primi un caracter oficial și a fi pus în aplicare. În aceeași sursă găsim programul definit ca un plan de activitate în care sunt stabilite, în ordinea desfășurării lor, etapele propuse pentru o perioadă dată.

Definițiile de mai sus fac evidente elementele comune ale programelor și proiectelor, cel puțin din perspectiva programelor sociale.

Un proiect este definit ca un set de sarcini având următoarele caracteristici:

- a. Este **unic** – setul de activități este complet individualizat și se desfășoară în secvența prescrisă și cu resursele respective o singură dată.
- b. Este **complex** – finalizarea proiectului presupune desfășurarea unei mulțimi de activități, sarcini, operații care sunt interdependente.
- c. Este **finit în timp și conținut** – proiectul are un termen limită pentru fiecare activitate și pentru ansamblu, de asemenea nr. de activități care îl formează este finit, pentru fiecare activitate specificându-se un scop și modul în care se desfășoară rezultatele.

În tabelul de mai jos sunt prezentate elementele distinctive ale proiectelor și programelor.

NR. CRT.	CARACTERISTICI	PROIECTE	PROGRAM
1	Relatia de incluziune	Parte	Întreg
2	Amplourea domeniului vizat	Distinctă	De ansamblu
3	Poziționarea în cadrul procesului	Componente ale programului	Instrument al strategiei și politicii de dezvoltare
4	Durată	Clar definită	Vag definită, ciclică
5	Rolul echipei	Planificare și implementare	Planificare, coordonare, supervizare
6	Buget	Fix	Global și modificabil
7	<i>Focusul analizei de fezabilitate</i>	<i>Performanță</i>	<i>Performanță și impact</i>

Tabel 1 – Elementele distinctive ale proiectelor și programelor

Aceste diferențe trebuie luate în considerare nu în mod absolut, ci doar ca o *regulă cu caracter general*. În practică, însă, au loc destul de frecvent suprapuneri ale respectivelor caracteristici și de aceea este utilă o delimitare, cel puțin cu *caracter general*, a diferențelor dintre programe și proiecte, ca un prim pas în analiza fezabilității programelor.

5.5. Fezabilitatea și analiza de fezabilitate

Fiecare proiect comportă o *analiză* și o *planificare* minuțioase, care poartă numele de **analiză de fezabilitate**. Fezabilitatea (de la cuvântul francez *faisable* = care se poate face) definește **calitatea unei activități de a se putea îndeplini, în anumite condiții date ca proprii mediului în care se dorește desfășurarea activității în discuție**. Prin urmare, analiza de fezabilitate pornește de la *analiza caracteristicilor mediului* în care se va desfășura activitatea, continuă cu aceea a *resurselor umane și materiale* necesare, a posibilităților de a le procura și a costurilor corespunzătoare, a *resurselor informaționale* în corelație cu *timpul necesar pentru integrarea lor* în activitate, urmărește, mai departe, *etapele procesului de muncă* în corelațiile lor, potrivit criteriilor de eficiență a acestora în atingerea obiectivului strategic.

Toate aceste analize au un *caracter proiectiv și estimativ*, în sensul în care anticipează evenimente posibile (în raport cu normele imaginar-sociale de definire a realității) între anumite *limite de predictibilitate, înainte de a se trece la acțiunea efectivă*.

Acțiunea mentală de stabilire a obiectivelor și analiză a fezabilității acestor obiective se concretizează scriptic sub forma unor proiecte. Rezultatele calculelor pe care le comportă analiza de fezabilitate a oricărui proiect dau măsura eficienței probabile a acestuia.

Pentru *activități complexe*, desfășurate pe o *arie geografică largă* (la nivel național, continental sau global), activitatea proiectiv-estimativă capătă forma programelor. **Programele** sunt constituite din *obiective strategice* în care sunt angajate *macrostructuri* (instituții europene, naționale, sectoare de activitate, ramuri industriale etc.), nu unități minimale. Ele *definesc mai ales obiectivele finale și limitele resurselor utilizabile* pentru atingerea acestor obiective, lăsând la latitudinea forurilor ce le implementează modalitățile în care se va acționa. În fapt, *implementarea programelor* se realizează prin **proiecte**, care defalcă directivele constitutive programelor în *obiective particulare*, nuclee ale unor acțiuni ce urmează să se articuleze în cadrele statuate prin intermediul fiecărui program.

Creativitatea umană este o resursă nelimitată, de aceea societatea civilă, ca și instituțiile oricărui stat, pot elabora un număr nelimitat de proiecte vizând dezvoltarea activităților de orice fel. Comparate cu cadrul statuat prin programele de dezvoltare, în special în ceea ce privește resursele disponibile, unele dintre aceste proiecte vor fi *eligibile* (= vor putea fi alese pentru a fi implementate) în cadrul programului, altele nu.

5.5.1. Analiza de fezabilitate a proiectelor de educație pentru sănătate

Analiza de fezabilitate a proiectelor privind activitatea oricărei unități medicale, din rețeaua națională sau privată, comportă următoarele componente:

- *studiul mediului intern* (nevoile, resursele, relațiile din interiorul unității sanitare) și extern (al stării de sănătate și al tendințelor mediului medical) ;
- *analiza de prefezabilitate* (strategică, tehnică, economică);
- *analiza detaliată a fezabilității* (orientare strategică, politică, economică, juridică, tehnică, operațională, economică);
- *analiza fezabilității programului de ansamblu*, rezultând din sinteza datelor obținute prin analiza detaliată a fezabilității la toate nivelurile programului.

Etapele analizei de fezabilitate:

- identificarea oportunităților – studiul mediului intern și a stării tendințelor mediului extern (megamediul – mediul general și mediul de sarcină – specific), mediul extern caracterizându-se prin complexitate, dinamism, incertitudine, dar și așa-numita generozitate a mediului.
- selecția preliminară – studiul de prefezabilitate;
- formularea proiectului – studiul de fezabilitate.

Elaborarea studiului de fezabilitate include colectarea datelor, analize și evaluarea necesară pt. pregătirea concepției proiectului.

Cele mai abordate 4 categorii ale fezabilității sunt:

- strategică;
- tehnică;
- operațională;
- economică.

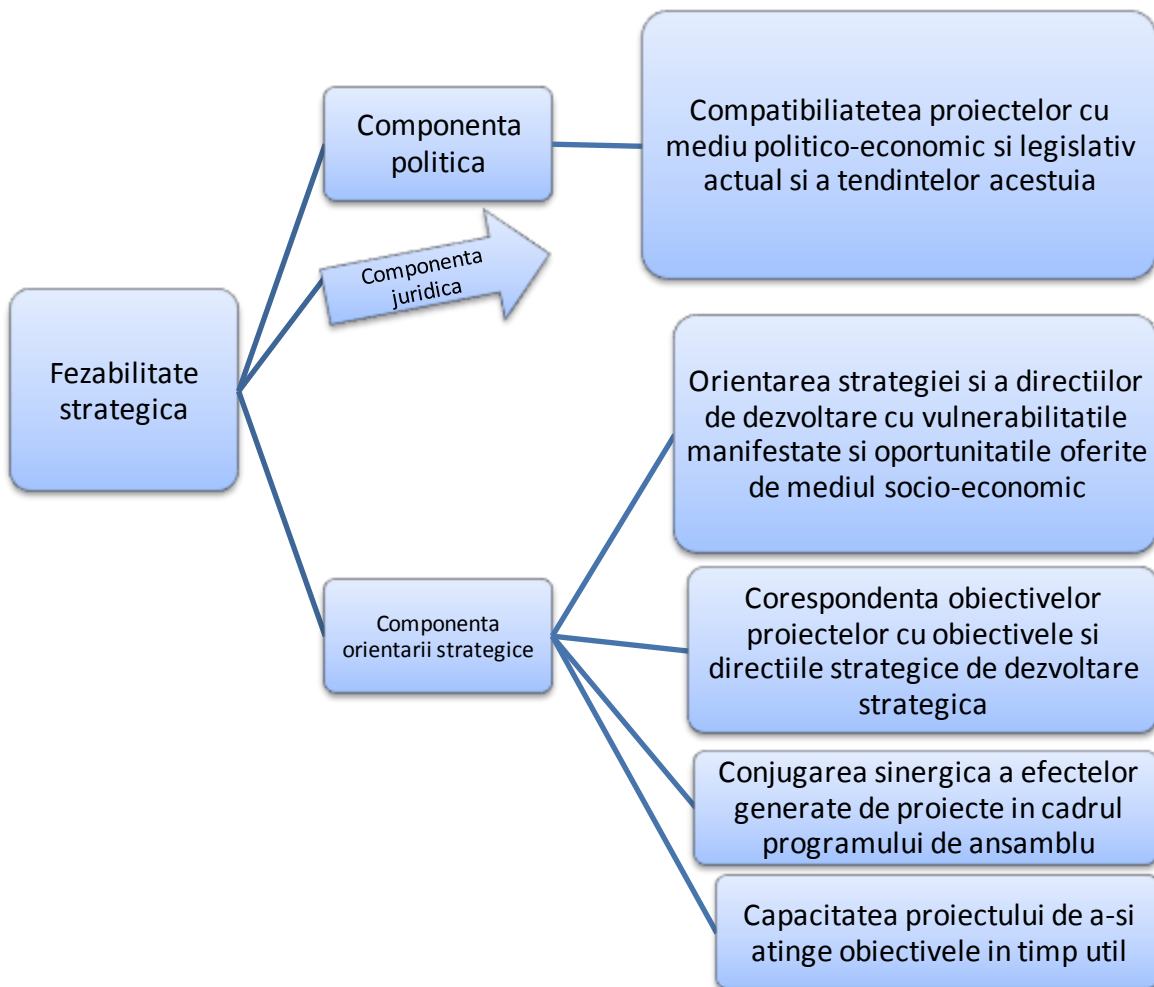


Fig. 12. Componentele fezabilității strategice

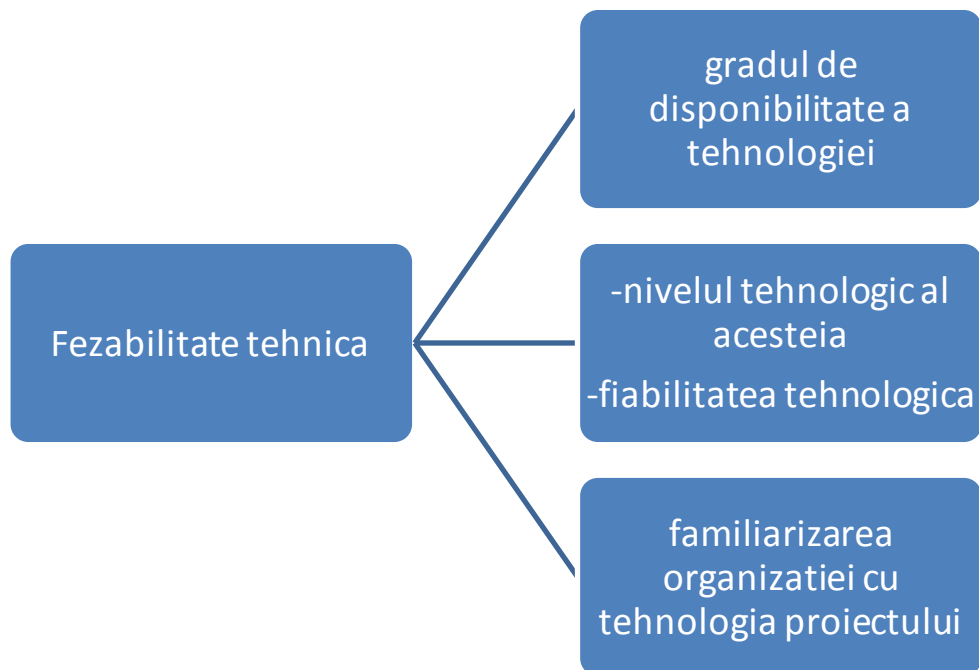


Fig. 13. Fezabilitatea tehnică

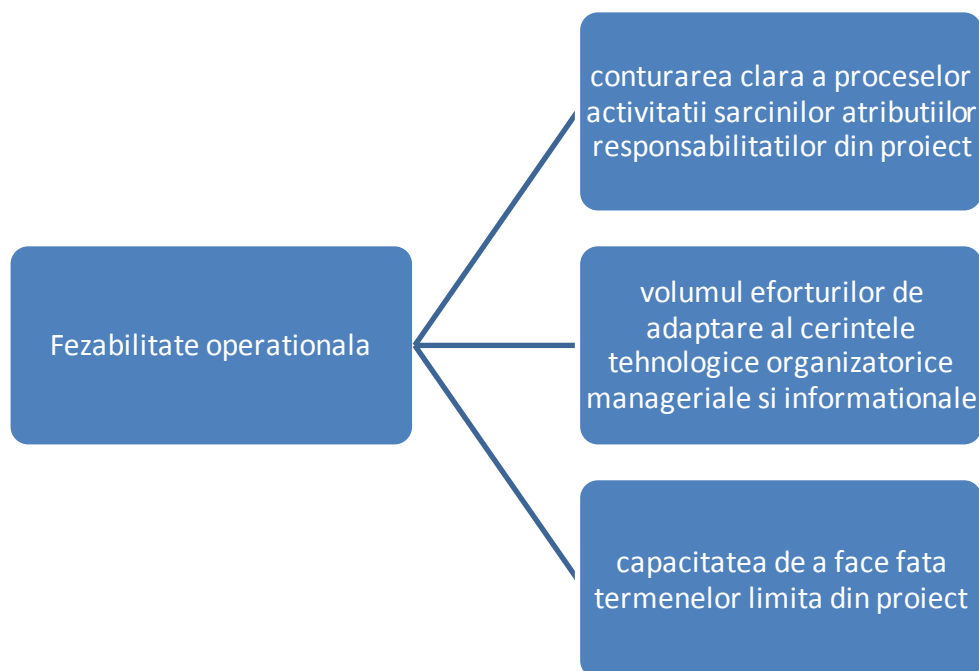


Fig. 14. Fezabilitatea operațională

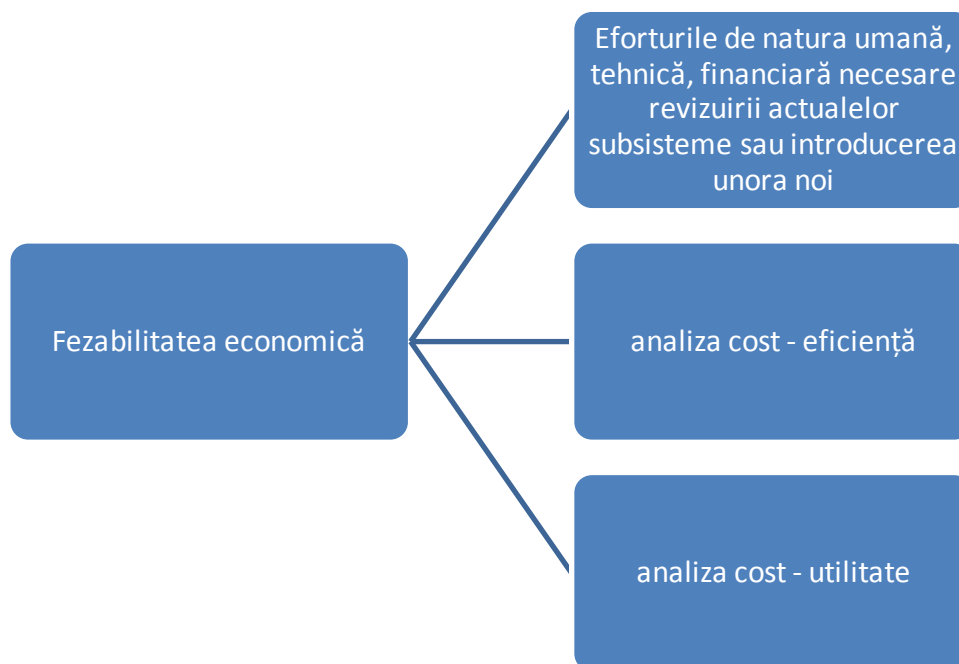


Fig. 15. Fezabilitatea economică

Aceste analize de fezabilitate sunt importante, în sensul că dacă proiectul/programul este fezabil șansele sunt mult mai mari de a fi eligibil.

În analiza de fezabilitate a proiectelor educaționale, însă, nu sunt de interes toate aceste tipuri de fezabilitate. De pildă, fezabilitatea strategică nu interesează, deoarece ea este clar definită ca parte a programului de educație pentru sănătate, în cadrul căruia se proiectează desfășurarea proiectului, deci constituie deja un dat. Componenta politică și cea juridică sunt luate în calcul de macro-organizațiile sau autoritățile care lansează și susțin programul, deci informația cu privire la cadrul politic și legislativ are numai un rol consultativ pentru cel ce elaborează un proiect medical și/sau educațional.

În schimb, fezabilitatea tehnică este demnă de a fi luată în considerare. Același lucru este valabil în ceea ce privește fezabilitatea operațională. Într-un proiect de promovare a sănătății orale adresat neprofesioniștilor nu se vor putea prezenta pe viu proceduri de lucru care comportă o etapizare în timp îndelungat sau care sunt observabile numai în condiții de laborator și presupun familiarizarea prealabilă cu aspecte de biochimie, instrumentar specializat etc. Proiectarea de filme sau prezentarea de imagini în Power Point sunt de luat în considerare ca mijloace tehnice de educație numai în măsura în care factorii educaționali sunt în măsură să opereze cu aceste facilități video sau dispun de auxiliari specializați.

Cât privește fezabilitatea economică, în sfera educației pentru sănătate orală ea are o componentă financiară imediată, care vizează costurile resurselor materiale necesare desfășurării activității (în termeni de buget pentru resursele materiale și umane angajate în proiect) și una pe termen mediu, referitoare la modalitățile de amortizare a costurilor respective și refinanțare a activității. După cum se poate deduce, fezabilitatea economică a proiectelor educaționale este una dintre etapele cele mai dificile ale analizei, deoarece comportă raportarea la un segment consistent din legislația economico-financiară și la resursele de bani ale mai multor componente din rețeaua de sănătate, de care depinde bugetul organizației în sânul căreia se elaborează proiectul, iar, pe de altă parte, necesită o gândire creativă, în sensul descoperirii unor surse și modalități de cooperare economică.

5.6. Principii actuale privind conceperea și implementarea programelor din sănătate

Programele pentru promovarea sănătății reprezintă o **succesiune de activități ce au drept scop îmbunătățirea unuia sau mai multor aspecte ale stării de sănătate la nivelul unui grup populațional.**

Strategiile de prevenție și control ale afecțiunilor trasate de O.M.S. au ca și abordare centrală conceptul de factori de risc. Strategia O.M.S. de promovare a sănătății se bazează pe sloganul „gândește global –acționează local” acțiunile fiind focalizate pe : identificarea determinantilor sănătății, implementarea de proiecte comunitare de promovare a sănătății, crearea unor baze de date care să permită evaluarea programelor aflate în derulare.

Fiecare program de sănătate trebuie să cuprindă:

- o etapă de cercetare : descrierea, evaluarea și explicarea științifică a unui aspect privind sănătatea orală a unui grup populațional;
- stabilirea designului unui program și inițierea acestuia;
- implementarea programului;
- extinderea și adaptarea programului la noile cerințe.

În cadrul etapei de cercetare se culeg date epidemiologice care apoi se prelucrează statistic, date demografice, date privind statusul educațional (cunoștințe, stil de viață).

Punctul central al unui program de sănătate îl reprezintă definirea grupului țintă, care poate fi reprezentat de preșcolari, școlari din clasele primare, adolescenți, liceeni, adulți, vârstnici, gravide, mamele copiilor mici, copii cu dizabilități, bătrâni instituționalizați etc. În cazul programelor naționale sunt incluși toți membrii societății care fac parte din grupul țintă (de exemplu : elevii claselor primare din întreaga țară), iar în cazul programelor regionale se alege un lot mai restrâns. Stabilirea obiectivelor, a strategiei, duratei de desfășurare, a metodelor de implementare reprezintă etape importante în derularea programului. Este necesară elaborarea mai multor strategii alternative, comparabile din punct de vedere al costurilor și al eficienței pentru ca în final, prin comparare să fie aleasă strategia optimă din punct de vedere al raportului eficiență – costuri dar și cost-utilitate (fezabilitatea economică). Unul din principalele aspecte în implementarea programelor de sănătate este cel financiar. Costurile intervențiilor depind de resursele umane, capitalul fizic și consumabilele necesare, dar și de evaluarea raportului cost-eficiență.

În planul de desfășurare al programului trebuie să fie clar specificate activitățile, momentul și perioada de desfășurare, locul de desfășurare, echipa care răspunde și este implicată în fiecare activitate și resursele tehnico-materiale necesare (fezabilitatea tehnică).

Odată aplicat, programul necesită o supraveghere continuă a activităților. Succesul depinde de monitorizarea: activităților - dacă sunt eficace, în sensul că obiectivele au fost atinse (fezabilitatea strategică), termenul pentru finalizarea a fost respectat (fezabilitatea operațională), echipei, echipamentelor, facilităților. Programul dacă este fezabil, șansele de a fi eligibil sunt mult mai mari.

Rezultatele finale se analizează, se prelucrează statistic și se obține variația în procente față de starea de la debutul programului.

Implementarea unui program de sănătate este însoțită de succes dacă există o îmbinare clară între următorii factori : coordonare, competență, cooperare și continuitate.

5.7. Proiectarea unui program de promovare a sănătății

Elementele esențiale care trebuie avute în vedere în momentul în care se elaborează un program în domeniul promovării sănătății sunt următoarele:

1. Motivația programului.
2. Obiectivele generale ale proiectului.
3. Stabilirea grupului (grupurilor) țintă.
4. Caracteristicile grupului țintă:
 - a. Demografice: vârstă, sex, mediu, stare civilă, etnie, religie și altele.
 - b. Sociale: familie, comunitate, acces la transport, comunicații și altele.
5. Cunoștințe, atitudini, credințe și practici necesare rezolvării problemei.
6. Stabilirea de metode de cercetare pentru identificarea cunoștințelor, atitudinilor, credințelor și practicilor actuale ale grupului țintă:
 - a. Cantitative - Analiza datelor statistice existente - Anchete prin chestionar
 - b. Calitative - Metode rapide (R.A.P.)
 - Observația: directă, participativă.
 - Interviu: anamneza, semi-structurat, în grup.
 - Conversația: individuală, în grup ("Focus grup").
7. Identificarea cunoștințelor, atitudinilor, credințelor și practicilor actuale ale grupului țintă.
8. Stabilirea diferențelor existente între cunoștințele, atitudinile, credințele și practicile pe care le are grupul țintă și cele ce îi sunt necesare rezolvării problemei.
9. Elaborarea mesajelor informaționale și motivaționale ce trebuie transmise grupului țintă pentru eliminarea lacunelor depistate.
10. Stabilirea obiectivelor măsurabile specifice proiectului.
11. Stabilirea duratei de execuție a programului.
12. Revenirea asupra grupului țintă, obiectivelor, mesajelor și revizuirea lor pe parcursul programului dacă este necesar.
13. Strategiile de comunicare optime pentru realizarea obiectivelor proiectului:
 - a. Conștientizarea (sensibilizarea)
 - b. Informarea
 - c. Motivarea
14. Canalele de comunicații (accesibile, disponibile, credibile) și rețelele de instituții:
 - a. Mass-media
 - b. Canalele interpersonale
 - c. Mijloace informative de format mic
 - d. Rețele de instituții
 - unități ale diverselor ministere (spitale, școli, unități militare, poliție, etc.)
 - organizații voluntare nonguvernamentale
15. Elaborarea de materiale informaționale și motivaționale și pretestarea lor.
16. Utilizarea sistemului feed-back pentru a urmări și monitoriza implementarea pas cu pas a programului.
17. Derularea de mini-programe de pregătire a educatorilor și a voluntarilor participanți la program.
18. Promovarea participării la program:
 - a. prin mass-media
 - b. stimularea morală și materială

19. Urmărirea și evaluarea programului:
 - a. Pe parcurs
 - b. Finală
20. Stabilirea calendarului activităților.
21. Se va stabili cine va crea, produce, implementa și conduce fiecare din părțile proiectului
22. Bugetul programului calculat pe fiecare an pentru:
 - personal
 - echipament
 - deplasări
 - producerea materialelor audio-vizuale și tipăriturilor
 - cercetări
 - evaluări
 - comunicații
 - întâlniri, conferințe, cursuri
 - cheltuieli indirecte
 - cheltuieli neprevăzute

5.8. Aplicație practică: Exemlu de Proiect de educație pentru promovarea sănătății oro-dentare

Proiectele pentru promovarea sănătății orale reprezintă o **succesiune de activități ce au drept scop îmbunătățirea unuia sau mai multor aspecte ale stării de sănătate orală la nivelul unui grup populațional.**

Strategiile de prevenție și control ale afecțiunilor orale trasate de O.M.S. au ca și abordare centrală conceptul de factori de risc. Strategia O.M.S. de promovare a sănătății orale se bazează pe sloganul „gândește global –acționează local” acțiunile fiind focalizate pe : identificarea determinantilor sănătății, implementarea de proiecte comunitare de promovare a sănătății, crearea unor baze de date care să permită evaluarea programelor aflate în derulare.

Fiecare proiect de promovare a sănătății orale trebuie să cuprindă :

- o etapă de cercetare : descrierea, evaluarea și explicarea științifică a unui aspect privind sănătatea orală a unui grup populațional;
- stabilirea designului și inițierea acestuia;
- implementarea proiectului;
- extinderea și adaptarea proiectului la noile cerințe.

În cadrul etapei de cercetare se culeg date epidemiologice reprezentate de indice DMF (Decayed Missing Filled), indici de carie, indici de placă bacteriană, indici gingivali, indici parodontali care apoi se prelucrează statistic, date demografice, date privind statusul educațional (cunoștințe, stil de viață).

Punctul central al unui program de sănătate îl reprezintă definirea grupului țintă, care poate fi reprezentat de preșcolari, școlari din clasele primare, adolescenți, liceeni, adulți, vârstnici, gravide, mamele copiilor mici, copii cu dizabilități, bătrâni instituționalizați etc. În cazul programelor naționale sunt incluși toți membrii societății care fac parte din grupul țintă (de exemplu : elevii claselor primare din întreaga țară), iar în cazul programelor regionale se alege un lot mai restrâns. Stabilirea obiectivelor, a strategiei, duratei de desfășurare, a metodelor de implementare reprezintă etape importante în derularea programului. Este necesară elaborarea mai multor strategii alternative, comparabile din punct de vedere al costurilor și al eficienței

pentru ca în final, prin comparare să fie aleasă strategia optimă din punct de vedere al raportului eficiență – costuri dar și cost-utilitate (fezabilitatea economică). Unul din principalele aspecte în implementarea programelor de sănătate este cel financiar. Costurile intervențiilor depind de resursele umane, capitalul fizic și consumabilele necesare, dar și de evaluarea raportului cost-eficiență.

În planul de desfășurare al proiectului trebuie să fie clar specificate activitățile, momentul și perioada de desfășurare, locul de desfășurare, echipa care răspunde și este implicată în fiecare activitate și resursele tehnico-materiale necesare (fezabilitatea tehnică).

Scopul urmărit în general în proiectele de promovare a sănătății orale este educarea prin informare pentru dobândirea unor atitudini și deprinderi favorabile sănătății oro-dentare și creșterea nivelului de igienă oro-dentară la diferite eșantioane de copii, uzând de mijloacele specifice educației pentru sănătatea oro-dentară.

Obiectivele

1. identificarea gradului de igienă și a statusului dentar a unor loturi de copii de vârstă cuprinsă între patru și șaisprezece ani într-o fază preliminară, înainte de a începe un program de educație pentru sănătate oro-dentară.

2. identificarea nivelului de cunoștințe în ceea ce privește sănătatea oro-dentară la loturile de copii studiate.

3. identificarea nivelului de cunoștințe în ceea ce privește sănătatea oro-dentară la potențialii „formatori” de opinie în educația pentru sănătate oro-dentară: părinții copiilor implicați în studiu, educatori, învățători.

4. identificarea gradului de igienă la copiii din lotul studiat la un an după finalizarea programului de educație pentru sănătate.

5. transmiterea de informații asupra a tot ce este necesar și util să cunoască în ceea ce privește ocrotirea propriei sănătăți oro-dentare;

6. crearea unui comportament, a unei atitudini ferme și hotărâte în acest sens;

7. formarea unei conștiințe de educație pentru sănătate ordentară, cu o cultură pentru sănătate optimă.

Exemplu de studiu în cadrul unui proiect de promovarea sănătății:

Evaluarea eficacității unor acțiuni de educație pentru sănătate oro-dentară la un eșantion de 172 elevi de la o școală generală

În acest sens activitatea de cercetare poate avea ca obiect de studiu evoluția numărului de carii, dinți extrași, obturații la un lot de 172 elevi dintr-o școală, pe parcursul a doi ani școlari (2006-2007).

Metodologia de cercetare a studiului:

Într-o fază inițială copiii din acest lot au fost evaluați pentru a se stabili statistic

1. statusul general dentar prin stabilirea unui:

- nivel al leziunilor carioase, dinți extrași ca urmare a complicațiilor carioase, al obturațiilor.

2. aprecierea nivelului de cunoștințe privind stilul de viață, igiena alimentației și individuală oro-dentară a copiilor prin:

- completarea chestionarelor cu întrebări închise de tip IQ dentar pentru elevi de la 9-12 ani.

Chestionarele distribuite elevilor de gimnaziu se bazează pe noțiunea de IQ dentar, noțiune derivată din psihologie și aplicată competențelor din educația pentru sănătate oro-dentară. Coeficientul de inteligență (IQ) este un coeficient numeric, care se stabilește prin teste, cu condiția ca subiecții cărora acestea li se aplică să aibă vârste de peste 9 ani. Testele constau dintr-o succesiune de întrebări simple, la care subiecții pot răspunde cu DA sau NU, urmărindu-se volumul, calitatea și diversitatea informațiilor pe care subiectul le deține într-un anumit domeniu.

IQ-ul dentar se definește drept suma cunoștințelor, informațiilor și experiențelor individului cu privire la propria stare oro-dentară. Este un indice variabil, în continuă formare, prezentând de regulă etape de creștere în funcție de episoadele orale și dentare care interesează individul.

Fiecare individ, în orice moment al vieții, are un anumit grad de IQ dentar. Nu există doi indivizi cu un IQ dentar identic; acesta poate fi, eventual, asemănător, dar va prezenta deosebiri față de al oricărui alt individ în amănuntele de finețe.

Elementele componente ale noțiunii de IQ dentar sunt:

- starea de normalitate psihică și intelectuală conform vârstei; testarea IQ dentar presupune modificarea chestionarelor în funcție de aceste criterii și a scării valorice în cazul indivizilor cu handicap psihic și intelectual;
- componenta experimentală: trăirile personale împreună cu suma episoadelor conștiente sau inconștiente în legătură cu sănătatea orală;
- componenta educațională: informații sanitare generale și specifice orale.

CHESTIONARE PENTRU EVALUAREA IQ DENTAR

Se va răspunde exclusiv cu DA sau NU.

Sex: M/F

Vârsta:

Mediul: urban/rural

1) Știi ce este o periută de dinți?

DA NU

2) Știi la ce se folosește periută de dinți?

DA NU

3) Știi ce conține pasta de dinți?

DA NU

4) Știi la ce se folosește pasta de dinți?

DA NU

5) Ai obiceiul să te speli pe dinți?

DA NU

6) Te speli pe dinți dimineața și seara?

DA NU

7) Știi ce este o carie dentară?

DA NU

8) Ști ce este placa bacteriană dentară?

DA NU

9) Știi că măseua care ți-a crescut în jurul vârstei de șase ani nu se mai schimbă?

DA NU

10) Mergi la dentist când te dor dinții?

- DA NU

11) Dacă NU te dor dinții, mergi la dentist?

- DA NU

12) Ai dinți stricați și neobturați (neplombați)?

- DA NU

13) Părinții tăi merg la dentist?

- DA NU

14) Mănânci produse lactate zilnic?

- DA NU

15) Mănânci fructe și legume crude zilnic?

- DA NU

16) Mănânci multe dulciuri și bei sucuri acidulate zilnic?

- DA NU

17) Mesteci gumă de mestecat sau pastile pentru curățirea dinților?

- DA NU

18) Știi la ce se folosește ața dentară?

- DA NU

19) Folosești ață dentară?

- DA NU

20) Folosești apă de gură?

- DA NU

Datele obținute au fost introduse în format electronic în programul Excel și s-a ajuns la următoarele rezultate:

Poz	Întrebare	Procent Răspunsuri Eronate
1.	Mănânci multe dulciuri și bei sucuri acidulate zilnic?	87,5%
2.	Folosești ața dentară?	88,9%
3.	Știi ce este placa bacteriană dentară?	67,2%
4.	Ai dinți stricați și neobturați (neplombați)?	59,4%
5.	Știi că măseua care ți-a crescut în jurul vârstei de 6 ani nu se mai schimbă?	46,9%
6.	Dacă nu te dor dinții, mergi la dentist?	39,1%
7.	Folosești apa de gură?	39,0%
8.	Mănânci fructe și legume zilnic?	37,5%
9.	Știi ce conține pasta de dinți?	28,1%
10.	Știi la ce se folosește ața dentară?	26,6%
11.	Știi ce este o carie dentară?	17,2%
12.	Mesteci gumă de mestecat sau pastile pentru curățirea dinților?	15,6%
13.	Părinții tăi merg la dentist?	12,5%
15.	Mergi la dentist când te dor dinții?	7,102%
15.	Ai obiceiul să te speli pe dinți?	6,25%
16.	Te speli pe dinți dimineața și seara?	6,25%
17.	Mănânci produse lactate zilnic?	1,56%
18.	Știi la ce se folosește pasta de dinți?	0,0%
19.	Știi ce este o periuță de dinți?	0,0%
20.	Știi la ce se folosește periuța de dinți?	0,0%

Tabelul 2. Rezultatele obținute în urma anchetei prin chestionarele tip IQ dentar

Se observă din tabelul 2 că pentru lotul analizat la acest tip de chestionar noțiunile elementare în general se cunosc, ca de exemplu: ce este periuța de dinți, la ce se folosește pasta de dinți, la ce se folosește pasta de dinți. Un rezultat foarte bun s-a obținut pentru consumul zilnic de produse lactate. La întrebările legate de periajul zilnic, dimineața și seara, și obiceiul de a se spăla pe dinți, contrar așteptărilor a existat un procent de 6,25% și la o întrebare și la cealaltă care au răspuns *NU*.

Un loc fruntaș din păcate îl are consumul zilnic de multe dulciuri și sucuri acidulate. Există curențe în informații legate materialele auxiliare de igienizare a cavității bucale, și prea puțin se vehiculează noțiunea de placă bacteriană dentară în mediile de la școlile generale.

	Nr. mediu de carii	Nr. mediu de obturatii	Nr. Mediu dinti absenti (extrasi)	% raspunsuri corecte
9 ani	1,79	0,60	0,21	70%
10 ani	1,26	0,26	0	96%
11 ani	0,2	0,05	0,01	80%
12 ani	0,65	0,16	0,04	102%

Tabelul 3. Tabel cu numărul mediu de carii, dinți extrași, obturații și procentul de răspunsuri corecte în funcție de anii de vârstă

Nu a fost niciun chestionar cu răspunsuri de 100% corecte.

Procentul de obturații este mult mai mic decât cel al cariilor ceea ce înseamnă o adresabilitate către serviciile stomatologice destul de scăzută.

O calitate scăzută a asistenței medicale dentare duce la scăderea adresabilității populației către serviciile stomatologice și, implicit la o creștere a morbidității.

Nivelul scăzut de cultură pentru sănătate face ca adresabilitatea către serviciile de sănătate să fie scăzută sau tardivă, ceea ce atrage după sine o creștere a nivelului de morbiditate.

În etapa a doua au urmat acțiunile educative conform planului bine stabilit, după care în a treia etapă, adică după un an de zile de la primele evaluări, au urmat reevaluările pentru a se putea stabili eficacitatea studiului.



Fig. 16. O sală de clasă din incinta școlii unde s-a susținut o conferință educațională

S-a desfășurat și acțiunea de reevaluare a statusului dentar prin cuantificarea gradului de igienă orală, a cariilor, a dinților extrași, obturațiilor.

Datele obținute se introduc în format electronic și apoi prelucrate statistic, după cum urmează:

Nr. Cariii	2006	2007
Volu eșantion	172	172
Număr mediu carii	1,87	0,92
Abaterea standard	1,87	1,35

Tabel 4 – Comparația statistică a numărului de carii la eșantioane de copii

Valoarea pozitivă a statisticii sugerează că reducerea numărului de carii este semnificativă din punct de vedere statistic.

Nr. Obturații	2006	2007
Volum eșantion	172	172
Număr mediu obturații	0,35	0,42
Abaterea standard	0,96	1,38

Tabel 5 – Comparația statistică a numărului de obturații la eșantioane de copii

Aplicând testul Student pentru a verifica ipoteza: “H0: numărul de obturații s-a modificat semnificativ de la un an la altul” se obține pentru statistică t valoarea 1.63 care este în regiunea de respingere a testului corespunzătoare nivelului de semnificație 0.05. Aceasta sugerează ca din punct de vedere statistic creșterea numărului mediu de obturații (de la 0.35 la 0.42) este semnificativă din punct de vedere statistic.

Nr. Carii	2006	2007
Volum eșantion	172	172
Număr mediu dinți extrași	0,44	0,7
Abaterea standard	0,98	1,09

Tabel 6 – Comparația statistică a numărului de dinți extrași la eșantioane de copii

Aplicând testul Student pentru a verifica ipoteza: “H0: numărul de dinți extrași nu s-a modificat semnificativ de la un an la altul” se obține pentru statistica t valoarea -2.235 care nu este în regiunea de respingere a testului corespunzătoare nivelului de semnificație 0.05. Aceasta sugerează faptul că creșterea numărului de dinți extrași nu este semnificativă din punct de vedere statistic.

Din analiza statistică se observă comparativ cu anul precedent după toate acțiunile de sensibilizare și penetrare a informațiilor sanogene că numărul de carii a scăzut aproximativ la jumătate față de anul precedent, a crescut numărul de obturații și a crescut și numărul de extracții.

Se consideră acțiunea o reușită în favoarea asistenței stomatologice, atunci când crește numărul de obturații, iar procentul de carii scade semnificativ.

Prin îmbunătățirea nivelului educațional se poate obține scăderea morbidității pentru o afecțiune, în studiul prezent caria dentară, prin creșterea adresabilității către serviciile de stomatologie. Lotul de copii fiind din mediul urban nu au fost probleme deosebite în privința accesibilității. În urban față de rural există chiar o abundență de cabinete private de stomatologie, iar la sate acoperirea cu cadre medicale și unități sanitare este deficitară.

Morbiditatea unei afecțiuni este influențată și de adresabilitate, la rândul ei influențată puternic de nivelul de cultură pentru sănătate.

Pentru acest lot de elevi morbiditatea la carie a scăzut, prin îmbunătățirea nivelului de cultură pentru sănătatea oro-dentară ceea ce a dus la creșterea adresabilității acestor copii către serviciile de asistență stomatologică.

CONCLUZII

Nivelul de educație pentru sănătate oro-dentară se reflectă în creșterea sau scăderea morbidității cariei. Morbiditatea constituie un criteriu important de apreciere al stării de sănătate pentru o anumită afecțiune a unei colectivități. Morbiditatea unei afecțiuni este influențată și de adresabilitate, la rândul ei influențată puternic de nivelul de cultură pentru sănătate. Implementarea unui proiect de educație este important să fie realizat conform unui plan bine stabilit pentru a fi fezabil operațional. Acțiunile de sensibilizare reprezintă metodele de bază, inițiale în activitatea educativă cu rol în creșterea receptivității copiilor iar prin caracterul mobilizator creează, la nivelul grupului țintă, un climat favorabil desfășurării activităților ulterioare. În cadrul acestui proiect au fost de tipul: conferințe, lecții, convorbiri de la individ la individ, dar și în cadrul grupului, în care recapitularea și fixarea cunoștințelor au fost nelipsite. Penetrarea informației, continuă sensibilizarea, pe parcursul ei se constituie și se consolidează comportamentele sanogene, precum și crearea motivației, luând deciziile corespunzătoare privind sănătatea oro-dentară.

În aceste acțiuni este important să se țină cont de capacitatea de percepție a auditoriului, ca modul de prezentare a problemelor să fie de așa manieră încât să se beneficieze de atenția auditoriului, o ținută decentă, se încearcă ca prin mimica, gestică și intonația vocii să se capteze atenția. Mijloacele utilizate trebuie combinate și asociate cu demonstrații pe macromodel pentru exemplificări ale tehnicii de periaj corect, prezentare Power Point, stimularea interesului pentru examenul autoscopic.

Finalul demersului educativ trebuie să ducă la obținerea *feed-back-ului* aspect de maximă importanță, în reușita acțiunii. Evaluarea eficacității (de rezultat) studiului de educație pentru sănătatea oro-dentară la acest eșantion de elevi, dovedește că în urma comparării statistice: valoarea pozitivă a statisticii sugerează că reducerea numărului de carii este semnificativă din punct de vedere statistic, valoarea pozitivă a statisticii sugerează că mărirea numărului de obturații este semnificativă din punct de vedere statistic.

Este importantă schimbarea prin educație a atitudinii pacientului față de medicul stomatolog, față de îngrijirea de sănătate oro-dentară și față de propria sănătate.

Prin transmiterea informației educaționale corect adaptată vârstei și capacității de percepție se constituie și se consolidează o atitudine corectă față de sănătate, precum și crearea motivației, luând deciziile corespunzătoare privind comportamentele sanogene.

Bibliografie selectivă

1. Ackerman, F., Eden, C., Crooper, S., 1995. *Getting Started with Cognitive Mapping*. Web-site : <http://www.banxia.co.uk>.
2. Ader H.J., Mellenbergh G.J.- *Reserch Methodology in the social, behavioral and life scienes*- London: Sage Publ, 1986.
3. Alhurt, M.,1997. « *The Science of the Mind* », in *Science*, vol.275, No.5306, 1547.
4. *Antologie semantică și semiotică*. București, Ed. Științifică și Enciclopedică , 1981; p.69.
5. Amariei Corneliu - *Introducere in managementul stomatologic*, Ed Viața Medicală Românească, Bucuresti, 1998.

6. Andre de Peretti, Jean Marie Legand, Jean Boniface - „*Tehnici de comunicare*”, Ed. Polirom, Iași, 2001
7. Băileșteanu, Gheorghe : *Semiotică Economică : bazele teoretice*. Timișoara : Editura Mirton, 2005.
8. Bibu N., -*Managementul cunoașterii în organizațiile moderne*, Curs Doctoral, Universitatea de Vest, 2006.
9. Bibu N.A., Foltean F. (coord.), *Managementul organizațiilor publice*. Timișoara: CECMA Partner.
10. Ciobanu V, Ursoniu S. – *Îndrumar de lucrări practice de Sănătate publică* – Timișoara: Editura Solness, 2005.
11. Ciobanu V., Ramona Popovici, *Îndrumar de lucrări practice de Management și organizare sanitară*, Ed. Solness, Timișoara, 2007.
12. Cliford G.C., Fazler M., Rotzoll K.B., Brittain McKee K. ; trad. coord. De Ruxandra Boicu .*Etica mass-media*. Iași : Ed. Polirom, 2002.
13. Cliford G.C., Fazler, M., Rotzoll, K.B., Brittain McKee, K. ; trad. coord. de Ruxandra Boicu. *Istoria comunicării*. Iași : Ed. Polirom, 2001.
14. Cronbach L.J. – *Designing evaluations of educational and social programs*, San Francisco: Jossey-Bass, 1982.
15. Dănișia I., Bibu N. A, Mariana Predișcan, *Management. Bazele teoretice*, Ediția a II-a. Timișoara: Mirton, 2004.
16. Daniel Bougnoux - „*Introducere în științele comunicării*”, Ed. Polirom, București, 2000
17. Dănilă I, Amariei C- *Orientări profilactice în stomatologie*, Ed. Syrinx- Med, Constanța, 1997.
18. Dark K., Phipps K., *An evaluation report of the children's dental health initiatives school based dental program*. The Dental Health Foundation, Sacramento, 2000.
19. David A. Mitchell, Laura Mitchell - „*Ghid clinic de stomatologie*” - Ed. BIC ALL, București, 1999
20. Dinu Mihai- „*Comunicarea*”, Ed. Algos, București, 2000
21. Dumitru, Alexandru, 2003. *Psihologia învățării*. Timișoara: Editura Universității de Vest.
22. Elena Sărătean- *Comportament organizațional* - Ed Univ.de vest, Timișoara, 2008.
23. Elisabeta Bratu, Florica Glăvan, *Practica pedodontică* (Ediția III), Editura Orizonturi Universitare, Timișoara, 2005
24. Emilia Novac, Denisa Abrudan – *Management* – Timișoara: Editura Mirton, 1999.
25. Fîru P., Rusu M., Svetlana Apostolescu , *Stomatologie preventivă*, Facultatea de Stomatologie, Universitatea „Titu Maiorescu „, București 2003.
26. Florian Lucian Ene- *Managementul Serviciilor* - Ed. Mirton, Timisoara,2007.
27. Foltean F., Lădar L.(coord.), *Marketing* , Timișoara: Editura Brumar,2000.
28. Havârneanu C.- *Metodologia cercetării în științele sociale*, Iași: Erola, 2000.
29. Kumar R., - *Research Methodology* (2nd ed.), London: Sage, 1999.
30. Institutul de Lingvistică București, *Dicționarul explicativ al limbii române*, București: Editura Academiei, 1975.
31. Ionescu, Traian, Mureșan, Petre, Popescu, Alexandru, 1993. *Management și marketing sanitar, asistență și protecție socială*, sub redacția Dr. ec. Alexandru Popescu. București: Editura Medicală.
32. Mircea Ancușa, Virgil Ciobanu - „*Probleme de sănătate publică*”, vol. I-II, Editura Mirton Timișoara, 1997

33. Moraru R, Dumitrache A, *Sănătate Orală și Comunicare*. București, Editura Cerma, 2003.
34. Pantea I. M., *Analiza strategică – suport al deciziilor investiționale*, Timișoara, Editura Mirton, 2003
35. Petersen, Poul Erik, 2005. *Sociobehavioural Risk Factors in Dental Caries – International Perspectives*, in “Community Dent Oral Epidemiology”, 2005; 33; pag. 274-279.
36. Pease A., *Limbaajul trupului*. Editura Polimark, f.l., 2002.
37. Podariu Angela., Jumanca Daniela., Gălușcan Atena., Văcaru Roxana., Muntean Ramona. *Stomatologie comunitară-curs*. Timișoara : Editura Waldpress, 2002.
38. Podariu, Angela Codruța, Jumanca, D., Gălușcan, A., Văcaru, R., Muntean, Ramona, 2003. *Tratat de prevenție oro-dentară*. Timișoara: Editura Waldpress.
39. Popovici Ramona Amina - *Educația pentru sănătate oro-dentară. Managementul proiectelor educaționale*, Timișoara, Ed. Mirton, 2007.
40. Popovici Ramona Amina – *Conexiunea Educație-Comunicare în managementul activităților de promovare a sănătății*, Lugoj, Ed. Nagard, 2009.
41. Popovici RA, Ciobanu V, Podariu AC, Pacurar M, Sava-Rosianu R – *Sănătate public orală. Management, epidemiologie și biostatistică medicală*, Timișoara, Ed. Mirton, 2014.
42. Predișcan, Mariana, 2004. *Schimbarea organizațională. Ce, când și cum să schimbăm?* Timișoara: Editura Universității de Vest, col. „Economica”, 2005.
43. Ramona Amina Muntean, *Educația pentru sănătate în cabinetele de medicină dentară – componentă a prevenției în procesul de integrare a României în Politicile de sănătate ale Uniunii Europene*, *Viața stomatologică*, 2005 ; 5 (41): 29-30.
44. Schiller E. *Psihologie și management relațional în stomatologie pediatrică*. Timișoara : Editura Aura, 2002.
45. Secretariatul de Stat pentru persoane cu handicap. Institutul național de studii și strategii privind problematica persoanelor cu handicap, 1998. *Handicap, Readaptare, Integrare*. Coordonatori: Dr. Gabriela Popescu, Dr. Ovidiu Pleșa. F.L. Editura „Pro Humanitate”.
46. Silverman D. – *Doing Qualitative Research: A practical Handbook*, Thousand Oaks and London: Sage, 2000.
47. Stainback S., Stainback W. – *Understanding and Conducting Qualitative Research*, Dubuque, Iowa: Kendall/Hunt, 1988
48. Ursoniu S., *Management sanitar*, Timișoara : Editura de Vest, 2000.
49. Vasile Sebastian Dancu - „*Comunicarea în managementul instituțional*”, Ed. Gewalt, Cluj-Napoca, 2000
50. Vinereanu, Arina, 2005. *Preocupări de evaluare a stării de sănătate orală la pacienții cu nevoi speciale*, în “MedicDentist.ro”, nr.2, Decembrie 2005, p.20.
51. Virgil Ciobanu, Ferdinand Nistor - „*Ghid în educația pentru sănătate*”, ed.a II-a revizuită, Timișoara, 1996
52. Vlădescu, Cristian (coord.),. *Sănătate publică și management sanitar*. București: Editura Cartea Universitară, 2004.
53. Vlădescu, Cristian, *Politici de sănătate publică*. București: Editura Cartea Universitară, 2005.

6. CERCETAREA CALITATIVĂ

✍ *Ramona Amina Popovici*

1. Ce este cercetarea calitativă

Un studiu calitativ pornește de la întrebări deschise, anumite ipoteze putând fi generate în timpul cercetării. Spre deosebire de cercetarea cantitativă, care presupune testarea de ipoteze și folosește raționamente deductive, cercetarea calitativă pornește de la raționamente de tip inductiv, situație în care ipotezele și concluziile se conturează pe baza informațiilor și faptelor adunate.

Metoda predilectă de adunare a datelor în cercetarea calitativă este interviul, spre deosebire de cercetarea cantitativă, în care se folosește experimentul. Analiza statistică a datelor este indispensabilă în cercetarea cantitativă, în timp ce în cercetarea calitativă, care este cu precădere descriptivă, analiza datelor se bazează pe interpretare (Băban, 2002). Cele două paradigme deși aparent atât de diferite, sunt complementare mai ales în studierea fenomenelor psiho-educative. Noul curent metodologic în psihologie pune accent pe *mixtul metodologic*, care îmbină metode de cercetare de factură cantitativă și calitativă, atât în culegerea datelor, cât și în interpretarea acestora. Această paradigmă de cercetare are drept finalitate o mai bogată înțelegere, o mai mare nuanțare și o creștere a autenticității în studierea fenomenelor psiho-educative și sociale. Cercetarea calitativă presupune interacțiunea directă cu participanții, datele adunându-se din mediul natural. Cercetarea calitativă se bazează pe explorarea percepțiilor participanților, fiind utilă în investigarea fenomenelor complexe. Acest tip de cercetare adună date verbale și nonverbale, într-o manieră flexibilă, pe care le putem cuantifica și analiza statistic. În cercetarea calitativă se folosește o paletă largă de strategii și metode de cercetare, cum ar fi: anamneza, studiul de caz, observația participativă, studiul de teren, studiul fenomenologic, cercetarea prin acțiuni educative. Pe de altă parte, calitatea cercetărilor calitative depinde de gradul de cooperare al participanților, iar datele pot fi interpretate în mai multe moduri. Pentru realizarea unor cercetări calitative pertinente e nevoie de o pregătire de specialitate riguroasă a cercetărilor, iar datele pot fi influențate de către cercetător.

1.1. Principiile metodologiei în cercetarea calitativă

Succesul cercetării empirice a comportamentelor umane, la nivel individual și de grup, depinde de respectarea unor principii fundamentale. Și în cercetarea calitativă au fost formulate principii metodologice (Lamneck, 1988, apud Dincă, 2003):

Principiul deschiderii: cercetarea calitativă nu are o structură predeterminată, în sensul că ipotezele reprezintă un scop al cercetării, nu o condiție.

Principiul comunicării: studiile calitative presupun interacțiunea directă între participanți și cercetător, realizat pentru a obține un maxim de informații despre realitate. Participanții definesc, explică și interpretează realitatea, în timp ce cercetătorul selectează ceea ce este esențial, comun, definitiv pentru cercetare.

Principiul realității ca proces: scopul cercetării calitative este de a descoperi modul de constituire al modelelor comportamentale și de a defini sensul acțiunilor umane.

Principiul reflexivității și analizei: analiza fiecărui simbol sau semn se face prin metode flexibile, care să surprindă schimbările contextuale.

Principiul explicației: pe de o parte, cercetătorul explică participanților ce se așteaptă de la ei și care este procedura de lucru, pe de altă parte, analiza datelor are scopul de a scrie și de a teoretiza un proces psiho-educational și social.

Principiul flexibilității: metodologia calitativă este flexibilă în alegerea metodelor și procedeele, iar designul se poate schimba în funcție de cerințele contextului.

Cercetările calitative trebuie să demonstreze rigoare în întregul demers de cercetare, care presupune parcurgerea unor stadii generale de cercetare, cum ar fi: stadiul reflectării, stadiul planificării, stadiul pilot, stadiul colectării datelor, analiza și interpretarea datelor, redactarea raportului de cercetare, ce presupune transpunerea narativă a rezultatelor cercetării.

2. Raportul cercetării calitative

În privința formatului rapoartelor cercetărilor calitative, nu există un consens la nivelul publicațiilor care includ astfel de cercetări. Revistele care promovează cercetările calitative au o politică explicită de încurajare a formatelor alternative.

Cercetătorii argumentează necesitatea unor descrieri profunde și valide, precum și a unor teorii puternic ancorate în realitate, derivate dintr-o mare varietate de date (Stainback și Stainback, 1988).

Componentele unui raport derivat dintr-o cercetare calitativă (Silverman, 2000, p. 221-253):

1. **Primele pagini** – o secțiune scurtă, dar foarte importantă a raportului, care trebuie să conțină:
 - a. *Titlul* – Nu este foarte ușor de stabilit inițial un titlu, de aceea se obișnuiește ca titlul să fie revizuit pe parcurs. O structură a titlului în două părți este destul de utilizată: prima parte (titlul) atrage atenția, în timp ce a doua (subtitlul), oferă o descriere mai detaliată.
 - b. *Rezumatul* – acoperă problematica cercetării, de ce merită să fie cercetată, ce date au fost obținute, metodele folosite, principalele rezultate și implicațiile lor. Dacă se specifică o limitare a cuvintelor folosite, această limită trebuie respectată. Dacă nu, se consideră că 150 de cuvinte sunt de ajuns.
 - c. *Cuprinsul* – dacă este dezorganizat, semnaleză faptul că raportul este cam la fel. Trebuie să fie organizat clar și logic. Există mai multe opțiuni referitoare la numărul nivelelor și a numerotării, însă este important ca subcapitolele să indice o imagine a conținutului unui capitol.
 - d. *Introducerea* – explică la ce anume se referă raportul, de ce a fost aleasă această problemă și ce abordare a fost utilizată. Sunt prezentate pe scurt ipotezele, însoțite de o scurtă explicație a structurii raportului.
2. Capitolul de **trecere în revistă a literaturii** (engl. **literature review**)

Este important deoarece demonstrează calitatea academică a lucrării (este mult mai puțin important pentru publicul nonacademic). În scrierea acestui capitol este important un efort inițial, care să fie corectat pe măsură ce sunt obținute și procesate datele. Ne asigurăm astfel că toate aspectele cuprinse în acest capitol au o legătură clară și relevantă cu obiectivele propuse cercetării. Trebuie să includă:

- a. ceea ce se știe în legătură cu subiectul studiat
- b. evaluarea proprie asupra a ceea ce s-a scris până acum
- c. relația dintre cercetarea curentă și studiile anterioare

3. Capitolul **metodologic** - Există mai multe abordări ale prezentării metodologiei cercetării. Capitolul despre metodologie trebuie să ofere informații despre:
 - a. Tipul de date obținute
 - b. Motivele pentru care aceste date au fost selectate
 - c. Cum au fost obținute datele, inclusiv problemele de acces și consimțământ
 - d. Metodele folosite pentru colectarea datelor
 - e. Motivarea alegerii acestor metode
 - f. Abordarea folosită în analiza datelor
 - g. Discutarea validității, încrederii și generalizării datelor
 - h. Deciziile luate pe parcursul cercetării, inclusiv schimbarea direcției
 - i. Probleme etice întâmpinate pe parcursul cercetării determinate de procedurile utilizate și felul în care au fost rezolvate
4. Capitolul referitor la **date** - În cazul cercetărilor aplicative, acest capitol este cel mai consistent din întregul raport, scopul central al acestor cercetări fiind de a colecta și interpreta date. Trebuie să se țină cont de faptul că, în cazul cercetărilor calitative, culegerea și analiza datelor se întâmplă în același timp. Astfel, datele și analiza lor fiind atât de strâns legate, nu este indicat să se separe capitolele în date și analiza datelor. Pot fi structurate mai multe subcapitole, care includ:
 - a. *Introducerea* – se explică subiectul capitolului, cum este legat de ipotezele cercetării, cum este organizat capitolul.
 - b. *Secțiunea principală* – conține o succesiune logică de puncte pentru care sunt prezentate date relevante. Se prezintă clar cum și de ce sunt produse anumite interpretări.
 - c. *Concluzii* – încheie capitolul, trecând în revistă ceea ce s-a obținut, cum și unde au apărut probleme și cum au fost acestea rezolvate.
5. Capitolul **final**

Este important ca raportul să fie terminat printr-o analiză reflexivă, acoperind aspecte ca acestea:

 - a. *Lecții de învățat din realizarea cercetării* – nu numai referitoare la conținutul cercetării, ci și la maniera de realizare a cercetării.
 - b. *Implicații pentru practică.*
 - c. *Sugestii specifice pentru cercetări viitoare.*

Ca orice alt raport de cercetare și cel calitativ trebuie să includă lista **referințelor bibliografice**. Raportul poate să conțină și **anexe** unde se includ detalii care nu au putut fi cuprinse în textul propriu-zis, cum ar fi structura interviului, chestionarelor sau detalii despre studiul pilot. Stilul de redactare al raportului de cercetare trebuie să fie clar, cu exprimare academică și cursivitate. În cercetarea calitativă trebuie să existe o relație flexibilă între paradigma teoretică, strategiile de abordare, colectarea datelor și maniera redactării raportului. Combinarea într-un singur studiu a multiplelor metode, surse și perspective adaugă rigoare și profunzime unei investigații, recunoscând complexitatea și diversitatea realității nivelului psihologic și socio-cultural.

Bibliografie selectivă

1. Ader H.J., Mellenbergh G.J.- *Reserch Methodology in the social, behavioral and life scienes*- London: Sage Publ., 1986.
2. Androniceanu, A. (coord.). - *Managementul proiectelor cu finanțare externă*. București: Editura Universitară, 2004.
3. Bailey K. D. – *Method of social research* (3rd ed.), New York: The Free Press, 1978.
4. Belbin, M.- *Management Teams: Why they succeed or fail*. London: Heinemann, 1981.
5. Bibu N.A., Foltean F. (coord.), *Managementul organizațiilor publice*. Timișoara: CECMA Partner.
6. Bogathy Zoltan, Coralia Sultea – *Manual de tehnici și abilități academic*, Ediția a II-a, Timișoara, Ed. Univ. de Vest, 2008.
7. Brown, M. - *Învață managementul proiectelor într-o săptămână*. București: Cosmos Viking Pinguin, 2004.
8. Cazacu, S. - *Viață, personalitate, limbaj - analize contextual-dinamice*. București: Minerva, 2007.
9. Christensen L.B.- *Experimental Methodology*, Boston: Allyn&Bacon, 1997.
10. Cojocaru, S. - *Elaborarea proiectelor*. București: Editura Expert Projects, 2004.
11. Cronbach L.J. – *Designing evaluations of educational and social programs*, San Francisco: Jossey-Bass, 1982.
12. Havârneanu C.- *Metodologia cercetării în științele sociale*, Iași: Erola, 2000.
13. Kumar R., - *Research Methodology* (2nd ed.), London: Sage, 1999.
14. Lock, D. - *Management de proiect*. București: Editura CODECS, 2000.
15. Maxwell, J. C. - *Cele 17 legi ale muncii în echipă*. București: Editura Amaltea, 2003.
16. Postavaru, N.- *Managementul proiectelor*. București: Editura Matrix Rom, 2002.
17. Silverman D. – *Doing Qualitative Research: A practical Handbook*, Thousand Oaks and London: Sage, p 221-253, 2000.
18. Stainback S., Stainback W. – *Understanding and Conducting Qualitative Research*, Dubuque, Iowa: Kendall/Hunt, 1988

7. MEDICINA BAZATĂ PE DOVEZI

*✍️ Laura-Cristina Rusu, Andreea Iulia Dobrescu, Maria Puiu,
Codrina Mihaela Levai, Cristina-Maria Borțun*

Istoria medicinei menționează practici de natură magică, descântece, cu rolul de a invoca anumite spirite sau zei pentru a îndepărta boala. Aceste “terapii” au fost utilizate mulți ani până în momentul în care medicina a fost transformată într-o practică științifică.

Hipocrate a reușit să introducă atitudini terapeutice noi, să schimbe atitudinea și gândirea personalului implicat, revoluționând astfel sistemul de sănătate și fiind supranumit “părintele medicinei”. Perioada Renașterii a reprezentat etapa cea mai importantă în dezvoltarea medicinei moderne, un nou început în ceea ce privește tehnicile de diagnostic și tratament. Astfel, boli care în trecut erau considerate incurabile, au primit medicație adjuvantă sau chiar curativă. Aparatele din ce în ce mai performante au permis medicilor o cunoaștere tot mai amănunțită a corpului uman, a funcționării sale, a fiziologiei și fiziopatologiei precum și a mecanismului de apariție a bolilor. Descoperirea cauzelor etiologice a facilitat obținerea tratamentului curativ, creșterea calității vieții pacienților precum și creșterea încrederii în sistemul de sănătate. Medicina a ajuns în acea perioadă la un nivel de dezvoltare fără precedent, unic, înregistrând un avânt nesperat.

Au apărut generații noi de medicamente ceea ce a determinat o înflorire a industriei farmaceutice. Investiții mari au fost făcute pentru dezvoltarea a noi generații de medicamente, urmărindu-se diminuarea pe cât posibil, până la dispariție chiar, a efectelor adverse. Progresul medicinei a adus cu sine un volum uriaș de informații unele dintre ele însă fiind contradictorii și necesitând teste suplimentare pentru stabilirea autenticității lor. Tratamente curative acceptate și aplicate la nivel mondial, vaccinuri recunoscute pentru valoarea profilactică deosebită asupra unor boli infecțioase, au devenit controversate impunând teste suplimentare pentru stabilirea eficienței și necesității lor. Chiar și intervenții chirurgicale, ortopedice, cardiace sau de orice altă natură, au fost controversate și au impus testări suplimentare. Au apărut testele pe subiecți umani, cu un grad de acuratețe ridicat, cu specificitate și sensibilitate mare.

Inițial, studiile au fost făcute pe loturi mici, individuale, obținându-se rezultate fără semnificație clinică. În acest mod nu s-a putut oferi o imagine de ansamblu asupra unei anumite teorii legate de tratament sau efecte adverse ci doar o oarecare orientare pentru clinicianul care a efectuat studiul. De multe ori, experiența clinică a fiecărui medic a fost mai presus decât studiile izolate. Aceasta este medicina clasică, bazată pe experiența proprie a clinicianului, pe studii proprii, pe propriul fler. Studiile clinice s-au extins, ca număr de participanți, ca amplitudine, ca obiective, devenind semnificative pentru patologia studiată. Rezultatele lor au putut fi centralizate și au putut oferi o orientare clinică, un rezultat obiectiv și semnificativ. A apărut un concept nou, **medicina bazată pe dovezi (EBM)**. În 1972, profesorul Archie Cochrane, în cartea sa “Effectiveness and Efficiency: Random Reflections on Health Services”, a descris EBM.

EBM este centrată pe mai multe studii clinice similare, pe meta-analiză, pe obiectivitate. Ea folosește toate ramurile medicinei pentru a putea formula în final ghiduri clinice clare, concrete și eficiente, realizând un raport cost-beneficiu optim. EBM compară rezultatele obținute prin aplicarea unui anumit tratament la un lot de pacienți cu cele obținute de la alt lot de pacienți, cu aceeași afecțiune dar fără nici un tratament sau un tratament diferit. Normele legislative și medicale impuse de aceste testări sunt extreme de riguroase.

Principalele caracteristici ale EBM sunt:

- Este o știință strategică;
- tactică;
- individuală.

Universitatea Alberta, în cartea "Introduction to Evidence-Based Medicine", descrie EBM.

"Practica medicinei bazate pe evidență cuprinde următoarele componente:

- Identificarea problemei sau a zonei de dubiu, de lipsă de certitudine.
- De pus numai întrebări relevante, concentrate pe subiect, coerente, într-un limbaj clar și pe înțeles, la care pacientul poate să răspundă. Greutatea de a formula o întrebare clinică precisă, centralizată poate constitui un impediment major în EBM.

- De selectat resursele cele mai potrivite de cercetare (spre exemplu, de evitat recomandarea unei infinități de examene de laborator în speranța că va apărea un rezultat pozitiv).

- De cercetat și evidențiat fondul de evidență (dovezile, faptele).

- Aprecierea importanței clinice a faptelor, a evidenței.

- Aprecierea aplicabilității clinice a evidenței.

- De acționat și de aplicat evidența.

- De apreciat avantajele efortului depus.

- De adunat, de conspectat și de notat activitatea pentru a o folosi în viitor".

"What is evidence based medicine?" subliniază de asemenea etapele care trebuie parcurse în utilizarea datelor și dovezilor:

- Datele trebuiesc căutate și identificate,
- Evaluate,
- Interpretate în context,
- Implementate,
- Stocate și prelucrate,
- Actualizate,
- Comunicate.

Dovezile sau rezultatele se găsesc în literatura de specialitate sub mai multe forme. Studiile prezentate și publicate respectă în mai mare sau mai mică măsură normele impuse. În funcție de acestea, există mai multe nivele de apreciere a datelor identificate.

Scottish Intercollegiate Guidelines Network folosește următoarea scală de notare a nivelului de încredere al studiilor:

1 ++ înaltă calitate a meta-analizelor, review-urilor sistematice (SR), a RCT-urilor sau studiilor clinice randomizate cu un risc foarte mic de apariție a erorilor,

1+ meta-analize, SR, sau studii clinice randomizate bine efectuate cu un risc scăzut de eroare,

1- Meta-analize, SR sau studii clinice randomizate cu un risc ridicat de apariție a erorilor,

2 - ++ SR de înaltă calitate a prezentărilor de caz sau studiilor de tip cohortă.

Prezentări de caz sau studii cohortă de înaltă calitate cu riscuri foarte mici și o mare probabilitate că relația este de cauzalitate

2+ - Prezentări de caz sau studii cohortă de înaltă calitate cu riscuri foarte mici și o probabilitate moderată că relația este de cauzalitate

2 - Prezentări de caz sau studii cohortă cu un risc ridicat de confuzie sau eroare și un risc semnificativ că relația nu este cauzală

3 Studii Non-analitice; de exemplu, prezentări de caz

4 Opinia expertului.

Riscul de apariție al erorilor reprezintă, conform definiției preluate din Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions, "o eroare sistematică sau abatere de la adevăr, în rezultate sau concluzii", "măsura în care proiectarea și desfășurarea unui studiu împiedică apariția riscului de eroare " sau" măsura în care rezultatele unui studiu sunt corecte pentru circumstanțele în care au fost studiate".

Există mai multe tipuri de erori:

- **Eroare de selecție și confuzie** - diferențe sistematice între caracteristicile inițiale ale grupurilor de studiu, indiferent de natura lor;
- **Eroare de executare** - diferențe între protocolul inițial al studiului și tratamentul și îngrijirile aplicate pacienților;
- **Eroare de folosire, implementare** - include diferențele dintre numărul de pacienți raportați în cadrul rezultatelor și numărul inițial de pacienți, fără includerea cazurilor pierdute din diverse motive (dorința pacientului, a aparținătorilor de a se retrage din studiu, deces);
- **Eroare de detecție** - include importante diferențe în evaluarea rezultatelor, metode inadecvate de măsurare și interpretare a rezultatelor, subiectivitate, încadrare necorespunzătoare a subiecților în cadrul grupurilor de studiu.

Pentru evitarea apariției acestor erori, se recomandă:

- a) respectarea strictă a protocolului stabilit inițial, în ceea ce privește randomizarea pacienților, repartitia lor în unul dintre grupuri, de control sau intervenție,
- b) păstrarea obiectivității prin metoda "dublu-orb" atât din partea pacienților cât și a personalului medical,
- c) înregistrarea și raportarea fiecărui pacient, indiferent dacă acesta a finalizat sau nu studiul,
- d) înregistrarea și raportarea tuturor efectelor adverse apărute.

Riscul de apariție al erorilor poate fi ilustrat grafic în mai multe forme (figura 1 și figura 2).

	Random sequence generation (selection bias)	Allocation concealment (selection bias)	Incomplete outcome data (attrition bias)	Selective reporting (reporting bias)	Other bias	Blinding (participant)	Blinding (assessor)	Comparability of exercise and controlgroup at entry	Appropriateness of duration of surveillance
Bemben 2000	?	?	-	?	+	-	?	+	-
Bergstrom 2008	+	?	+	?	+	-	?	?	-
Cheng 2002	?	?	?	?	+	-	?	+	-
Chilibeck 2002	?	+	?	?	+	?	+	+	-
Kerr 2001	+	?	?	?	+	-	?	+	-
Korpelainen 2006	+	+	+	?	+	-	+	+	+
Maddalozzo 2007	?	?	?	?	+	-	?	+	-
Newstead 2004	?	?	?	?	+	-	?	?	-

Fig. 1: Riscul de apariție a erorilor - apreciat de autorii studiilor

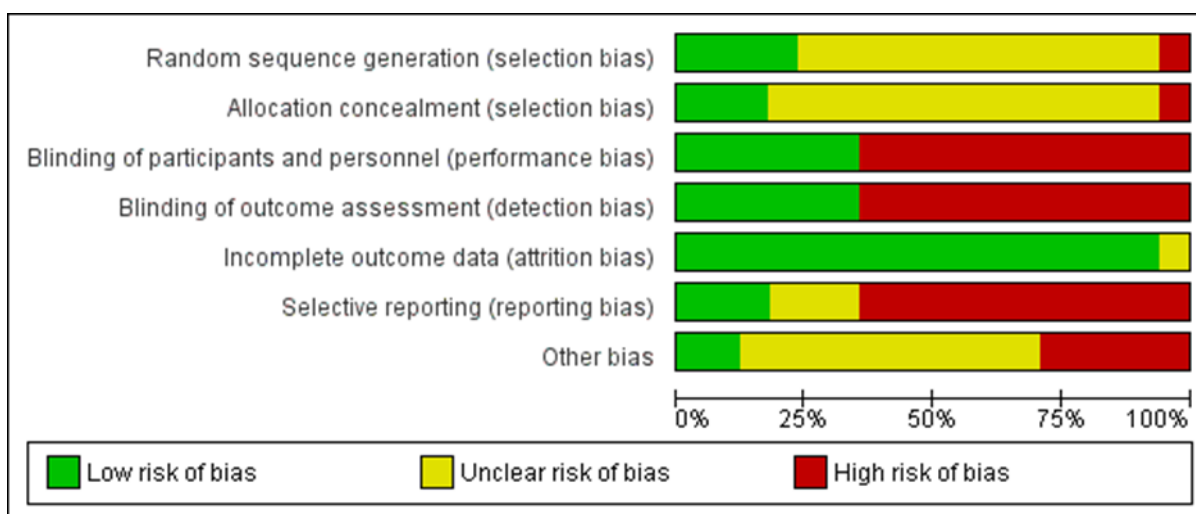


Fig. 2: Riscul de apariție a erorilor

El poate fi evaluat pentru fiecare rezultat dar de cele mai multe ori este aplicat celor mai importante rezultate prezentate în cadrul studiului. Astfel, evaluatorii trebuie să ia în considerare toate elementele definitorii ale studiului (randomizarea, obiectivitatea, respectarea etapelor și protocolului) și să încadreze riscul ca fiind scăzut, neclar sau ridicat. Un studiu este considerat cu risc scăzut de eroare dacă rezultatele obținute în urma aplicării unui tratament pe un lot de studiu sunt autentice, reprezintă adevăratele efecte ale respectivei terapii și nu pot fi modificate de alți factori. În cazul unui risc neclar, rezultatele sunt autentice, însă pot fi ușor modificate de alți factori, fără a le anul. Risks ridicat de eroare înseamnă că rezultatele raportate nu reprezintă cu exactitate efectele tratamentului studiat.

Studiile clinice se pot realiza doar dacă oferă beneficii net superioare efectelor adverse care pot apărea.

Relevanța studiilor clinice și importanța rezultatelor obținute sunt influențate de respectarea anumitor criterii, etape și reguli, imperios necesare:

- elaborarea protocolului de studiu, prezentarea clară a obiectivelor precum și a criteriilor de includere și excludere din studiu;
- înaintarea protocolului către Comisia Națională de Etică în vederea aprobării acestuia;
- desfășurarea studiului prin respectarea întocmai a prevederilor incluse în protocol;
- cele mai importante sunt drepturile și siguranța subiecților, înaintea interesului științific;
- subiecții trebuie informați cu exactitate despre ce presupune cercetarea la care vor participa și vor semna un consimțământ informat, înainte de începerea studiului;
- trebuie păstrată confidențialitatea datelor pacienților;
- Persoanele implicate în studiile clinice trebuie să fie calificate pentru munca pe care urmează să o desfășoare, astfel că, orice decizie va fi luată de o persoană avizată;
- Rezultatele obținute trebuie manipulate corespunzător, stocate și prelucrate, pentru a putea fi raportate întocmai;
- Medicamentele evaluate în cadrul studiului trebuie să respecte perioada de valabilitate, să fie păstrate în locuri corespunzătoare respectând indicațiile producătorului și administrate conform protocolului;
- Procedurile medicale trebuie să respecte regulile de asepsie.

În cazul unui medicament sau tratament nou, **prima etapă** constă în testarea acestuia în laborator. Utilizând culturi celulare sau animale de laborator, se testează eficiența și se urmăresc beneficiile precum și apariția efectelor adverse. **Următoarea etapă (Faza I)** presupune testarea medicamentului pe oameni. Utilizând un număr restrâns de persoane sănătoase, se urmărește stabilirea unei doze eficiente și sigure pentru organism. Prin teste specifice, se evaluează procesul de metabolizare al medicamentului și gradul de toxicitate al acestuia. **Faza II** a studiului implică un număr mai mare de persoane, suferind de boala căreia se adresează medicamentul testat. Se urmărește atât eficiența cât și posibilele reacții adverse apărute. În **faza III**, medicamentul este administrat unui număr mare de bolnavi. În cadrul acestei faze, se pot face comparații cu alte tratamente pentru demonstrarea eficienței. **Ultima fază** a studiului reprezintă utilizarea tratamentului pentru obținerea beneficiilor dorite (ameliorarea simptomelor sau vindecare), durabilitatea efectelor și reacțiile adverse.

Clasificarea studiilor clinice se realizează în raport cu mai multe aspecte legate de natura acestora.

În funcție de obiectivele studiului, acesta poate fi:

- Descriptiv - prezintă o realitate medicală;
- Analitic - impune o comparație a cel puțin două grupuri de pacienți, cu definirea clară a criteriilor de includere/excludere.

În funcție de rezultatele urmărite:

- Studiu observațional - nu furnizează o relație directă cauză-efect;
- Experimental - singura metodă care furnizează o relație cauză-efect; necesită alcătuirea grupurilor de pacienți ce urmează a fi evaluate, cu respectarea strictă a criteriilor de includere/excludere din lot.

Pe baza acestor clasificări precum și luând în considerare design-ul studiului, s-a creat o ierarhie a studiilor clinice, în funcție de calitatea datelor oferite (figura 3).

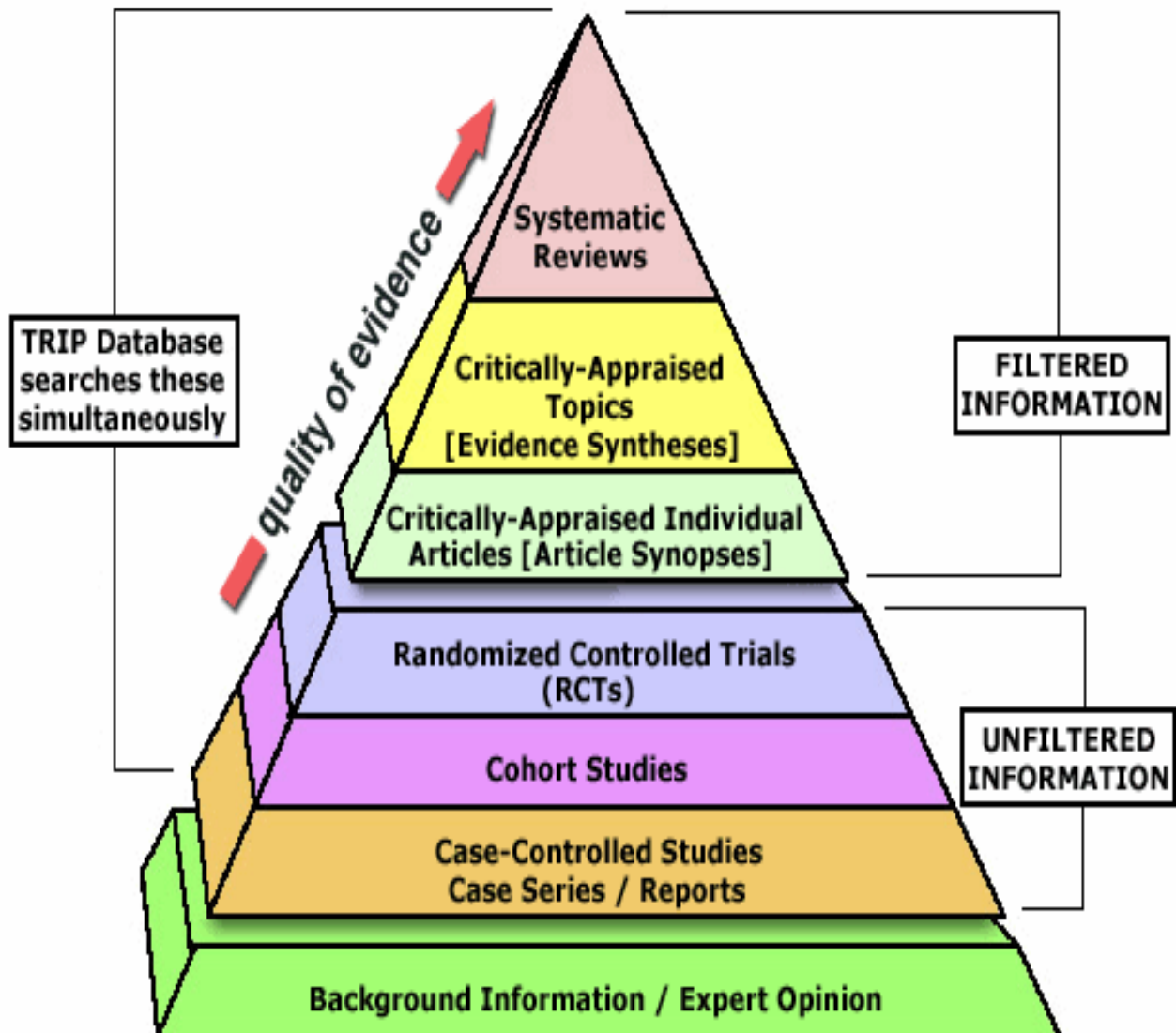


Fig. 3: Tipuri de studii clinice

Astfel, dovezile cele mai puternice sunt oferite de analizele sistematice ale studiilor randomizate, triplu-orb, în care comparația se face cu placebo și care includ pacienți cu patologie omogenă.

Prezentările de caz, părerile experților sau mărturiile pacienților oferă cel mai scăzut nivel de încredere datorită numeroaselor erori care pot apărea.

Analiza sistemică (SR) a apărut ca o nevoie a personalului medical, medici, medici rezidenți, chiar și studenți, asistente, infirmiere de a primi dovezi solide în ceea ce privește diverse tratamente sau proceduri medicale. Literatura de specialitate poate oferi sute sau chiar mii de articole pe o anumită temă, uneori cu rezultate contradictorii și derutante. Studiile mici, izolate, cu numeroase erori sistemice sau chiar fără un protocol prestabilit nu reușesc să răspundă întrebărilor specialiștilor, nu au capacitatea de a clarifica și de a direcționa un act terapeutic, medical sau chirurgical.

Studiile caz-martor presupun selectarea unui grup de pacienți care au suferit un anumit efect și a altui grup de pacienți fără efectul căutat. Cele două grupuri vor fi comparate pentru existența unui factor de risc. Identificarea acestuia mai frecvent la grupul de studiu comparativ cu grupul martor, îl încadrează ca factor de risc.

Aceste tipuri de studii sunt cel mai des întâlnite în cazul bolilor rare în care este foarte dificil, chiar imposibil de realizat un eșantion mare de bolnavi datorită numărului scăzut de cazuri. Un alt avantaj îl reprezintă rapiditatea desfășurării precum și costurile reduse; studiile caz-martor pot evalua mai mulți factori de risc în același timp.

Reprezintă unele dintre cele mai expuse tipuri de studii la erorile sistemice. Aceste studii nu pot stabili o relație temporală între momentul expunerii și apariția bolii ci doar încadrarea unui eveniment ca fiind factor de risc.

Studiile de cohortă sunt studii prospective, longitudinale, de urmărire. Sunt singurele studii care pot aprecia incidența unei boli. Ele presupun urmărirea a două sau mai multe grupuri de pacienți. Un grup (cohorta) este expus iar cel de-al doilea nu; evaluatorul urmărește apariția bolii sau a efectelor adverse la lotul expus. Există două tipuri de studii de cohortă.

În **tipul I**, există un factor de risc larg răspândit în populația generală. Se va împărți populația în două cohorte în funcție de prezența sau absența factorului de risc, expuși și martori (figura 4).

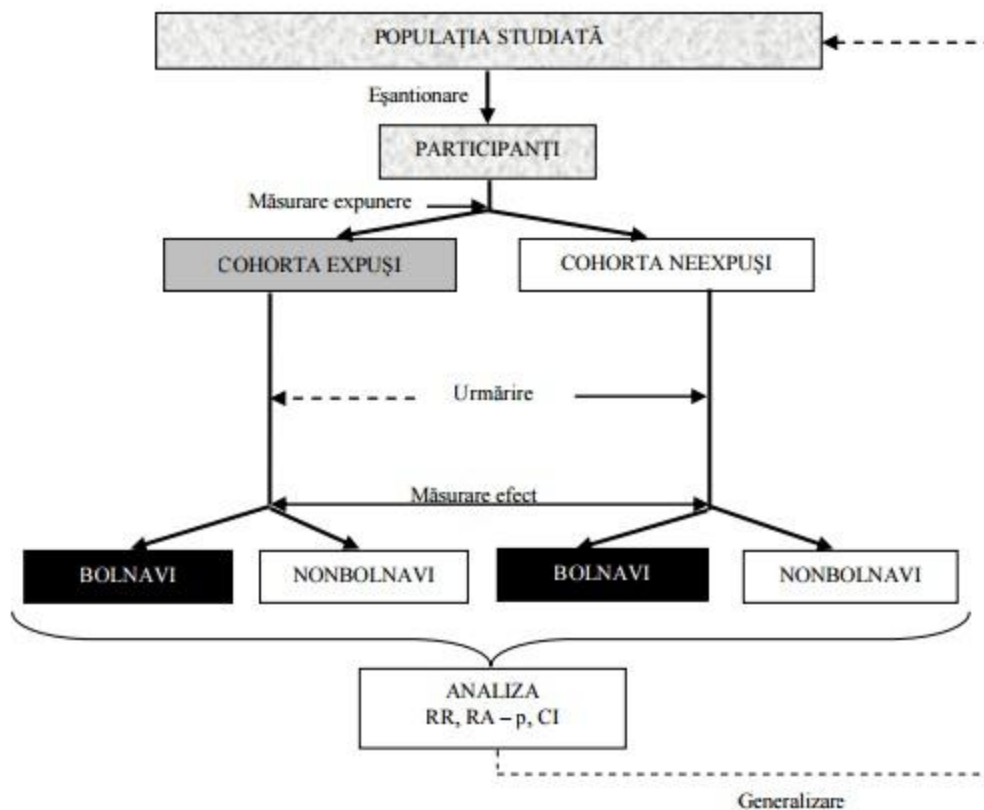


Fig. 4: Studii de cohortă tip 1

RR= riscul relativ
 RA= riscul atribuibil

În cazul **studiilor de cohortă tip II**, factorul de risc nu este la fel de des întâlnit în populația generală ca în tipul I și nu se poate realiza un grup de studiu; este nevoie de o selecție, pe baza criteriilor de includere și excludere pentru încadrarea lor în studiu. Cu excepția acestei proceduri, cele două tipuri de studii se desfășoară în același mod (figura 2). Spre deosebire de tipul I, tipul II este predispus apariției erorilor sistemice datorită diferențelor dintre cele două cohorte.

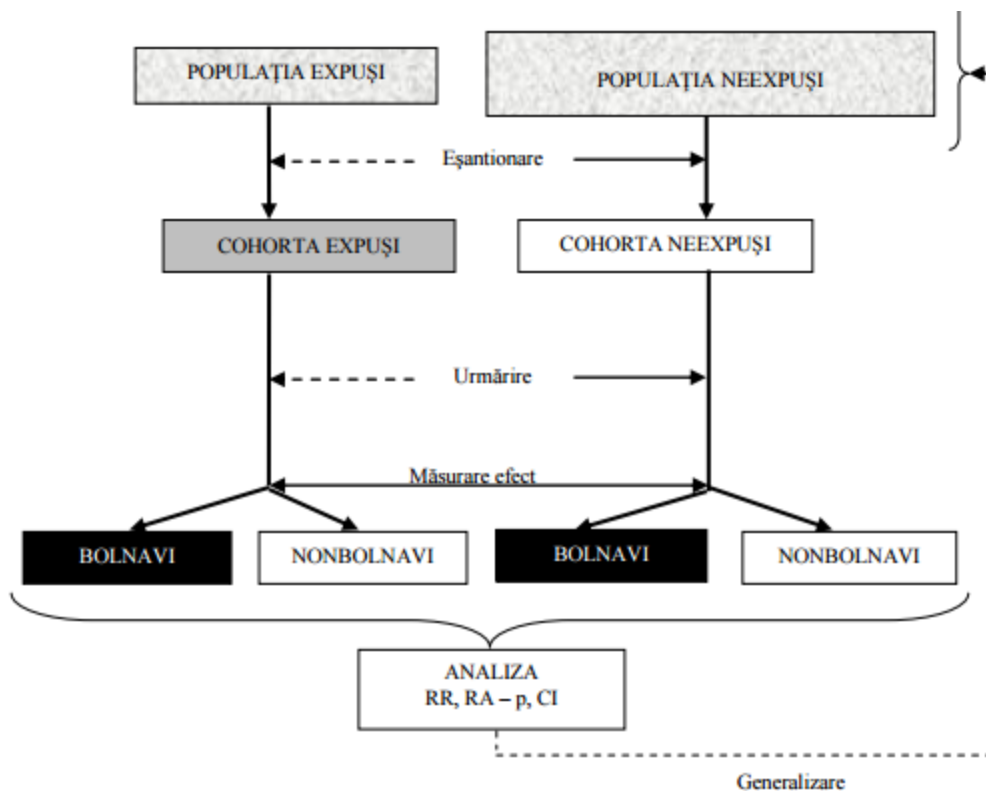


Fig. 5: Studii de cohortă tip II

RR= riscul relativ

RA= riscul atribuibil

RR arată de câte ori este mai mare riscul la persoanele expuse față de cele neexpuse. Cu cât RR este mai mare cu atât este mai mare și riscul de apariție al efectului evaluat (relație direct proporțională).

RA arată câte persoane pot fi salvate dacă se oprește expunerea la factorul de risc evaluat. Cu cât RA este mai mare cu atât beneficiul este mai mare.

Există și studii de cohortă retrospective; din punct de vedere al design-ului studiului, al etapelor și al desfășurării, acesta este identic cu cel prospectiv, diferența este că toate acestea s-au desfășurat în trecut, anterior efectuării studiului.

Avantajele studiilor de cohortă:

- Apreciază incidența unei boli la persoanele expuse și neexpuse,
- Realizează corelații între expunerea la un factor de risc și apariția bolii,
- Evaluează efectele adverse ale unui tip de expunere,
- Forma prospectivă reduce semnificativ gradul de apariție al erorilor sistemice.

Principalele dezavantaje ale acestui tip de studiu sunt necesitatea unui număr mare de participanți, ceea ce îl face imposibil de aplicat în cazul bolilor rare precum și perioada lungă de timp necesară obținerii rezultatelor. În cazul studiilor retrospective, sunt necesare documente medicale de mare calitate, care să includă o evaluare clinică și paraclinică riguroasă.

Studiile randomizate (RCT) sunt studii prospective controlate care testează efectul unui tratament asupra unei boli. Dacă în trecut, studiile clinice presupuneau existența unui grup de pacienți și evaluarea stării de sănătate înainte și după administrarea terapiei testate, în prezent, RCT impun existența a două grupuri, grupul de intervenție și grupul de control. Grupul de

intervenție presupune pacienți cărora li se administrează o medicație specifică; grupul de control primește un alt tratament (când se dorește compararea a două terapii) sau medicație tip placebo (pentru testarea efectelor benefice precum și a efectelor adverse ale unei singure terapii).

De exemplu, compararea unor combinații de chemoterapice incluzând transtusumab cu aceeași combinație fără transtusumab în cancerul de sân. Pacienții, femei diagnosticate cu cancer de sân, au fost randomizați în unul dintre cele două grupuri fără a cunoaște cu exactitate apartenența exactă. Perioada de urmărire a fost de 36 de luni.

În efectuarea unui RCT, trebuie să urmeze anumite etape:

- *Constituirea cohortei* - formarea celor două loturi, descrierea caracteristicilor fiecăruia, criteriile de includere/excludere.

Criteriile de includere vor fi reprezentate de date clinice, tipul și gradul patologiei (diverse stadii de boală) în funcție de scopul tratamentului studiat - să vindece sau doar să amelioreze boala, de vârsta pacienților (populație adultă sau copii), sexul, criteriile geografice.

Criteriile de excludere urmăresc eliminarea din studiu a pacienților care pot compromite rezultatele finale. De asemenea, cazurile particulare precum sarcina nu sunt incluse; refuzul pacientului de a participa la studiu reprezintă unul dintre cele mai importante criterii de excludere.

Fiecare pacient eligibil va citi și, în cunoștință de cauză, de bună voie, va semna consimțământul informat.

- *În etapa a doua*, se întocmește o fișă a fiecărui pacient ce va fi inclus în studiu, care va conține datele personale (nume și prenume, vârstă, sex, locul de proveniență), măsurători antropometrice, date legate de boală, precum și o serie de analize inițiale pentru cunoașterea exactă a stării inițiale de sănătate a pacienților.
- *Randomizarea* reprezintă împărțirea absolut aleatorie a pacienților în unul dintre grupuri (de intervenție sau control). Cele două grupuri trebuie să fie identice cu excepția medicației administrate. În acest fel, se evită apariția erorilor. Pacienții nu vor cunoaște în care dintre grupuri au fost repartizați (orb). De asemenea, este indicat ca nici personalul medical care participă la studiu să nu cunoască apartenența pacienților la grupuri pentru a putea fi pe deplin obiectivi. Medicația administrată celor două grupuri este identică din punct de vedere al aspectului, indiferent dacă este vorba de tratament medicamentos, tratament injectabil, intervenții chirurgicale; în cazul medicației placebo, culoarea, aspectul, mirosul sunt identice dar lipsește substanța activă. Deși subiectivitatea poate determina apariția erorilor, există rezultate care nu pot fi influențate. De exemplu, mortalitatea nu poate fi influențată de cunoașterea apartenenței la unul dintre grupuri, în vreme ce durerea este unul dintre cele mai subiective simptome.
- *Administrarea medicației* se face de către personalul avizat, la intervale de timp bine stabilite și definite în cadrul protocolului inițial al studiului. Pacienții sunt evaluați clinic și paraclinic cu regularitate, putându-se identifica apariția efectelor adverse sau a ameliorărilor.
- *Urmărirea pacienților* ar trebui să se poată aplica tuturor bolnavilor incluși în studiu. Un procent mai mic de 5% al celor "pierduți" nu afectează rezultatele finale în vreme ce mai mult de 20% anulează studiul.
- *Măsurarea rezultatelor*.
- *Analiza datelor* - această etapă finală stabilește cu exactitate eficiența tratamentului, efectele adverse apărute, apreciază dacă doza administrată a fost sau nu corespunzătoare.

RCT reprezintă cele mai valide dintre toate tipurile de studii clinice, rezultatele lor furnizând date extrem de valoroase, clare și sigure cu privire la medicațiile testate. Parcurgând etapele enunțate anterior, se reușește evitarea apariției erorilor sistemice.

Erorilor sistematice de selecție sunt evitate prin randomizare. Obținându-se două grupuri identice, la finalul studiului, se poate concluziona că ameliorarea sau dispariția simptomelor și semnelor de boală se datorează medicației administrate și nu gradului de afectare mai scăzut, a vârstei mai tinere sau altor factori independent de tratament.

Erorile sistematice de execuție și de detecție se evită prin dubla-orbire. Astfel, pacienții pot fi îngrijiți în egală măsură și pot fi evaluați egal de personalul responsabil. Există șansa ca medicul, știind apartenența unui pacient la unul dintre grupuri, să acorde o mai mare atenție pacienților din grupul de intervenție comparativ cu cei din placebo, existând șanse mai mari de apariție a efectelor adverse/ beneficii în acest grup.

Analiza în intenție de tratament (intention to treat analysis) presupune analiza a tuturor pacienților împreună, indiferent de grupul în care au fost randomizați și se utilizează pentru prevenirea erorilor sistematice de uzură, migrare și pierdere din vedere.

Formula scurtă care definește RCT este **PICO**:

P - populație - pacienții care au fost incluși în studiu,
I - intervenție - medicația sau orice altă terapie aplicată,
C - control - grupul de comparație (placebo sau altă terapie aplicată),
O - efectul studiului (outcomes) - rezultatele finale ce urmează a fi evaluate (de exemplu, mortalitate, dispnee, hipertensiune arterială).

De exemplu, compararea combinațiilor de chemoterapice incluzând transtuzumab cu alte combinații fără transtuzumab la femeile cu cancer de sân.

P - femei cu cancer de sân,

I - combinație de chemoterapice incluzând transtuzumab,

C - combinație de chemoterapice fără transtuzumab,

O - mortalitate.

Subiectele evaluate critic reprezintă resurse care pun la dispoziția evaluatorului o serie de întrebări și modalități actuale de formulare a acestora pentru evaluarea și parcurgerea literaturii de specialitate. Dintre acestea, cele mai utilizate și cunoscute sunt Best Evidence Topics, Evidence-Based Journal Club Reviews, Evidence-Based On-Call, Evidence Based Medicine.

SR sunt necesare în numeroase situații medicale, uneori, de rezultatul lor, putând fi vitale:

- Stabilirea unei atitudini terapeutice în anumite patologii rămase fără tratament sau cu numeroase tratamente ambigue, nesistemizate, neclare din punct de vedere al raportului riscuri/beneficii.

Compararea a două sau mai multe tratamente între ele sau cu placebo permite alegerea atitudinii terapeutice optime, cu minimizarea efectelor adverse și optimizarea costurilor în sistemul sanitar.

- Scrierea unor proiecte specifice pentru finanțare a diverselor acte medicale, terapii noi, proceduri și aparaturi inovatoare, urmărindu-se creșterea calității vieții pacienților cu diverse patologii;
- Scrierea națională și internațională a protocoalelor clinice, cu stabilirea clară a efectelor benefice precum și a celor adverse, stabilirea în măsura posibilităților a prognosticului, alegerea terapiei optime pentru pacient în funcție de particularitatea cazului;
- Lucrări de licență, dizertație, doctorat;
- Orice patologie cu rezultate contradictorii și derutante.

Un exemplu elocvent pentru necesitatea unui SR este reprezentat de o lucrare publicată în 1998 de către Wakefield AJ et al, în The Cochrane Library intitulată “Ileal-lymphoid-nodular hyperplasia, non-specific colitis, and pervasive developmental disorder in children”. Studiul efectuat pe 12 copii, susține asocierea dintre vaccinul ROR și apariția autismului și a bolii Crohn la copii. Acesta încearcă dovedirea unei relații directe de cauzalitate între vaccin și cele două patologii. Articolul a fost retras de pe piață datorită numeroaselor erori sistemice prezente care îl încadrau ca având un grad foarte scăzut de încredere al rezultatelor însă a reușit să scadă semnificativ rata de vaccinare a copiilor, să creeze panică în rândul părinților și chiar să favorizeze apariția unei epidemii de rujeolă, oreion sau rubeolă. Demicheli Vet al au realizat un SR, “Vaccines for measles, mumps and rubella in children”, care infirmă prin dovezi solide orice asociere dintre vaccinul ROR și autism sau boala Crohn.

Rămânând un subiect controversat, în 2014, a fost publicată o meta-analiză, efectuată de Luke E. Taylor. În urma unei căutări sistemice în unele dintre cele mai importante baze de date (MEDLINE, PubMed, EMBASE, Google Scholar), au fost selectate 10 studii care au întrunit criteriile de includere, însumând 1.2 milioane de copii. Aceștia au demonstrat că nu există nici o relație de cauzalitate între nici un fel de vaccin, inclusiv ROR, și autism.

Pentru efectuarea corectă a unui SR este necesară parcurgerea unor etape esențiale:

- a) Stabilirea unei teme clare, a unei întrebări ce necesită răspuns;
- b) Căutarea studiilor elocvente în literatura de specialitate - pentru bazele de date online se folosesc strategii de căutare, bazate pe cuvinte cheie, urmărindu-se selectarea tuturor studiilor care ar putea contribui la stabilirea unei concluzii clare; “literatura cenușie” cuprinde acele lucrări care în mod obișnuit nu sunt supuse evaluării (postere, rapoarte tehnice etc.) și va fi căutată cu ajutorul site-urilor și bazelor de date specializate sau a strategiilor de căutare specifice. Uneori este necesară căutarea manuală a anumitor reviste precum și evaluarea referințelor în vederea identificării tuturor lucrărilor reprezentative.
- c) Evaluarea studiilor - prima etapă constă în evaluarea eligibilității pe baza criteriilor de includere/ excludere; dintre studiile selectate, vor fi eliminate cele care, în urma evaluării metodologiei, sunt considerate a avea calitate scăzută; extragerea datelor raportate de fiecare studiu, realizarea bazei de date.
- d) Prelucrarea datelor selectate.
- e) Concluzii - evaluarea studiilor incluse din punct de vedere al heterogenității și calității, riscurile posibile și aplicabilitate.

Deși diferite din punct de vedere al design-ului, toate studiile sunt supuse evaluării în vederea stabilirii unui nivel de siguranță al rezultatelor. Criteriile de evaluare sunt comune, iar confirmarea lor crește gradul de încredere al dovezilor oferite de studiu (Tabel 1).

Erori	Criteriu	RCTs	CCTs sau cohorta	Studii Caz-martor	Serii de cazuri	Secțiuni transversale
	A fost secvența de alocare generată corespunzător?(de exemplu randomizarea în funcție de număr sau randomizarea computerizată)?	x				
	A fost ascunsă corespunzător administrarea tratamentului - orbirea?	x				
	Participanții la studiu au fost încadrați și analizați în cadrul grupului în care au fost inițial randomizați?	x	x			
	Au fost respectate și aplicate criteriile de includere și excludere?		x			x
	Subiecții incluși în grupul de intervenție precum și cei din grupul de control au fost similar selectați? (de exemplu, criterii de diagnostic adecvate, aplicarea corectă și în egală măsură a criteriilor de excludere la toți pacienții, randomizarea neinfluențată de nivelul de expunere)			x		
	Strategia de recrutare a pacienților a fost diferită în funcție de grupuri?		x			
Eroare de selecție	Controlul studiului sau analizei ia în calcul confuzii importante și modificarea variabilelor prin potrivire, stratificare, analiza multivariabilelor, sau alte abordări?	x	x	x*	x	x
Eroare de execuție	Cercetătorii au exclus orice intervenție din afară care ar putea afecta rezultatele?	x	x	x	x	x
	Studiul a respectat cu fidelitate protocolul inițial?	x	x	x	x	

Erori	Criteriu	RCTs	CCTs sau cohorta	Studii Caz-martor	Serii de cazuri	Secțiuni transversale
Eroare de selecție	Dacă execuția a fost îngrijorătoare, datele care au lipsit au fost manipulate corespunzător?	x	x	x	x	x
Eroare de detecție	În cazul studiilor prospective, perioada de urmărire a cazurilor a fost diferită între grupuri, sau în studiile de tipul caz-martor, perioada dintre expunere/ intervenție și evaluarea rezultatelor a fost similară pentru cazuri și pentru grupul de control?	x	x	x		
	Evaluatorii rezultatelor au fost "orbi" în ceea ce privește statusul pacienților? (intervenție sau control)	x	x	x	x	x
	Au fost intervențiile/ expunerile evaluate sau definite prin măsuri valide și de încredere, aplicate similar tuturor participanților la studiu?	x	x	x	x	x
	Rezultatele au fost evaluate/ definite prin măsuri valide și de încredere, puse în aplicare în egală măsură tuturor participanților la studiu?	x	x	x	x	x
	Variabilele au fost evaluate prin măsuri valide și fiabile, aplicate similar tuturor participanților la studiu?		x	x	x	x
Eroare de raportare	Potențiale rezultatele au fost prespecificate de cercetători? Sunt raportate toate rezultatele prespecificate?	x	x	x	x	x

Tabel 1. Evaluarea erorilor sistemice

Evaluarea rezultatelor și probelor obținute în cadrul diverselor tipuri de studii se face cu ajutorul sistemelor de evaluare.

Agenția Governamentală pentru Politici de Sănătate și Cercetare (AHCPR) recomandă sistemul **ABC** pentru evaluarea dovezilor oferite de studiile clinice:

- A-** Necesită includerea a cel puțin un RCT între studiile evaluate
 - B-** Necesită includerea datelor oferite de studii clinice bine realizate cu excepția RCT
 - C-** Necesită dovezi din rapoartele comisiilor de specialitate sau opinii și/ sau experiența clinică a specialiștilor. În această categorie nu există studii aplicabile de bună calitate din punct de vedere al dovezilor.
- Gradul de aplicabilitate poate fi apreciat astfel:
- A-** Recomandare- dovezile prezentate sunt solide pentru recomandarea unei conduite terapeutice
 - B-** Recomandare provizorie- atitudinea terapeutică este recomandată dar cu prudență
 - C-** Dovezi neclare, atitudinea terapeutică se recomandă în funcție de necesitate.

Bibliografie selectivă

1. Vilceanu Ovidiu- Cabinet medical de cardiologie. Medicina bazată pe dovezi. <http://www.romedic.ro/cardio/articol/7514>
2. Cochrane A.L. (1972). Effectiveness and Efficiency: Random Reflections on Health Services. Nuffield Provincial Hospitals Trust.
3. Sackett DL, Straus SE, Richardson WS, et al. Evidence-based medicine: how to practice and teach EBM. 2nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2000.
4. Jonathan Belsey, Tony Snell . What is evidence-based medicine? 2nd ed. Hayward Medical Communications, a division of Hayward Group Ltd, May 2009.
5. The University of Alberta, <http://www.ebm.med.ualberta.ca/intro.htm>
6. Scottish Intercollegiate Guidelines Network. SIGN 50: A guideline developer's handbook. www.sign.ac.uk/pdf/sign50.pdf
7. Hemmingway P, Brereton N. What is a systematic review? London: Hayward Medical Communications, 2009.
8. Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions Version 5.1.0. In: Higgins JPT, Green S, eds. The Cochrane Collaboration; 2011.
9. Cochrane Collaboration Glossary Version 4.2.5. 2005. Available at: <http://www.cochrane.org/sites/default/files/uploads/glossary.pdf> Exit Disclaimer; <http://effectivehealthcare.ahrq.gov/>.
10. Juni P, Altman DG, Egger M. Assessing the quality of controlled clinical trials. In: Egger M, Davey SG, Altman DG, eds. Systematic reviews in health care. Meta-analysis in context. 2001/07/07 ed. London: BMJ Books; 2001. p. 87-108.
11. Harris RP, Helfand M, Woolf SH, et al. Current methods of the US Preventive Services Task Force: a review of the process. Am J Prev Med 2001 Apr;20(3 Suppl):21-35. PMID: 11306229.
12. Asociația Pacienților cu Afecțiuni Autoimune APAA- Materiale informative: Studii clinice <http://www.apaa.ro/MaterialeInformative/StudiiClinice.pdf>
13. Sackett DL, Straus SE, Richardson WS, et al. Evidence-based medicine: how to practice and teach EBM. 2nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2000.
14. C. Băicuș - "Medicina bazată pe dovezi. Cum înțelegem studiile?". Editura Medicală, București, 2007.
15. C. Băicuș - "Dicționar de epidemiologie clinică și medicină bazată pe dovezi ". Editura Medicală, București, 2002.

16. Robert NJ, Eiermann W, Pienkowski T, Crown J, Martin M, Pawlicki M, et al. BCIRG 006: Docetaxel and trastuzumab based regimens improve DFS and OS over AC-T in node positive and high risk node negative HER2-positive early breast cancer patients: Quality of life (QOL) at 36 months follow-up. Proceedings of ASCO Meeting; 2007; USA. *Journal of Clinical Oncology*. Vol. 25 (June 20 Supplement):2007:19647.
17. Moja L, Tagliabue L, Balduzzi S, Parmelli E, Pistotti V, Guarneri V, D'Amico R. Trastuzumab containing regimens for early breast cancer (Review). Published by John Wiley & Sons, Ltd. 2012.
18. Sauve S, Lee HN, Meade MO, Lang JD, Farkouh M, Cook DJ, Sackett DL. The critically appraised topic: a practical approach to learning critical appraisal. *Ann Roy Soc Phys Surg Canada* 1995;28:396-398.
19. Dong P, Wong L L, Ng S, Loh M, Mondry A. Quantitative evaluation of recall and precision of CAT Crawler, a search engine specialized on retrieval of Critically Appraised Topics. *BMC Medical Informatics and Decision Making* 2004;4:1-7. Available from: URL <http://www.biomedcentral.com/1472-6947/4/21>.
20. BestBETS Best Evidence Topics [online]. BestBETS. Available from: URL: <http://bestbets.org/>.
21. PedsCCM Evidence-Based Journal Club [online]. The Pediatric Critical Care Website Evidence-Based Journal Club; © 1997-2005. Available from: URL: http://pedscm.wustl.edu/EBJournal_club.html.
22. Evidence-Based On-Call database [online]. ©1997-2002; EBOC [about 5 screens]. Available from: URL: <http://www.eboncall.org>.
23. Evidence Based Medicine [online]. © 2005 BR MED J Publishing Group. Available from: URL: <http://ebm.Br Med Jjournals.com>.
24. The Cochrane Library. The Cochrane Library publishes the most thorough survey of MMR vaccination data which strongly supports its use. www.cochrane.org/press/MMR_final.pdf
25. Wakefield AJ, Murch SH, Anthony A et al. Ileal-lymphoid-nodular hyperplasia, non-specific colitis, and pervasive developmental disorder in children. *Lancet* 1998;351: 637–641.
26. Murch SH, Anthony A, Casson DH et al. Retraction of an interpretation. *Lancet* 2004; 363: 750.
27. Demicheli V, Jefferson T, Rivetti A, Price D. Vaccines for measles, mumps and rubella in children. *Cochrane Database Syst Rev* 2005: CD004407.
28. Luke E. Taylor, Amy L. Swerdfeger, Guy D. Eslick. Vaccines are not associated with autism: An evidence-based meta-analysis of case-control and cohort studies. *ELSEVIER* Volume 32, Issue 29, 17 June 2014, Pages 3623–3629.
29. Hartling L, Bond K, Harvey K, et al. Developing and testing a tool for the classification of study designs in systematic reviews of interventions and exposures. Prepared by the University of Alberta Evidence-based Practice Center under Contract No. 290-02-0023. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality: June 2009. AHRQ Publication No. 11-EHC007-EF.
30. Burns PB, Rohrich RJ, Chung KC; The levels of evidence and their role in evidence-based medicine. *Plast Reconstr Surg*. 2011 Jul;128(1):305-10. doi: 10.1097/PRS.0b013e318219c171.
31. Patient.Trusted medical information and support: Different Levels of Evidence. <http://patient.info/doctor/different-levels-of-evidence>

8. GENETICA – de când și până când?

✍️ *Laura Rusu, Andreea-Iulia Dobrescu, Maria Puiu*

Genetica reprezintă una dintre principalele aplicații ale medicinei bazate pe dovezi. Deși desconsiderată pentru o lungă perioadă de timp, se poate afirma cu certitudine că genetica este implicată în toate patologiiile indiferent de natura lor.

Studiul factorilor genetici, modalitățile de transmitere a bolilor ereditare, natura unei mutații (de novo sau moștenită) precum și evaluarea riscului de recurență al unei boli în cadrul unei familii pot preveni apariția unor afecțiuni complexe, sindroame genetice, de cele mai multe ori cu afectare multisistemică.

Factorii genici stau la baza dezvoltării și evoluției umane, natura omului depinde de aceștia.

Deși studiată cu mult timp în urmă, începutul geneticii este marcat de anul 1866, când Gregor Mendel, om de știință de origine austriacă, a publicat o lucrare în care descria modalitatea prin care sunt moștenite caracterele ereditare de la părinți la copii. Folosind boabe de mazăre, acesta a descris mecanismele prin care se transmit trăsături fenotipice precum culoarea și aspectul (netezimea) de la o generație la alta, introducând termeni precum transmitere dominantă sau transmitere recesivă. Deși lucrarea sa nu a fost apreciată la momentul acela, Mendel a fost supranumit “părintele geneticii moderne”.

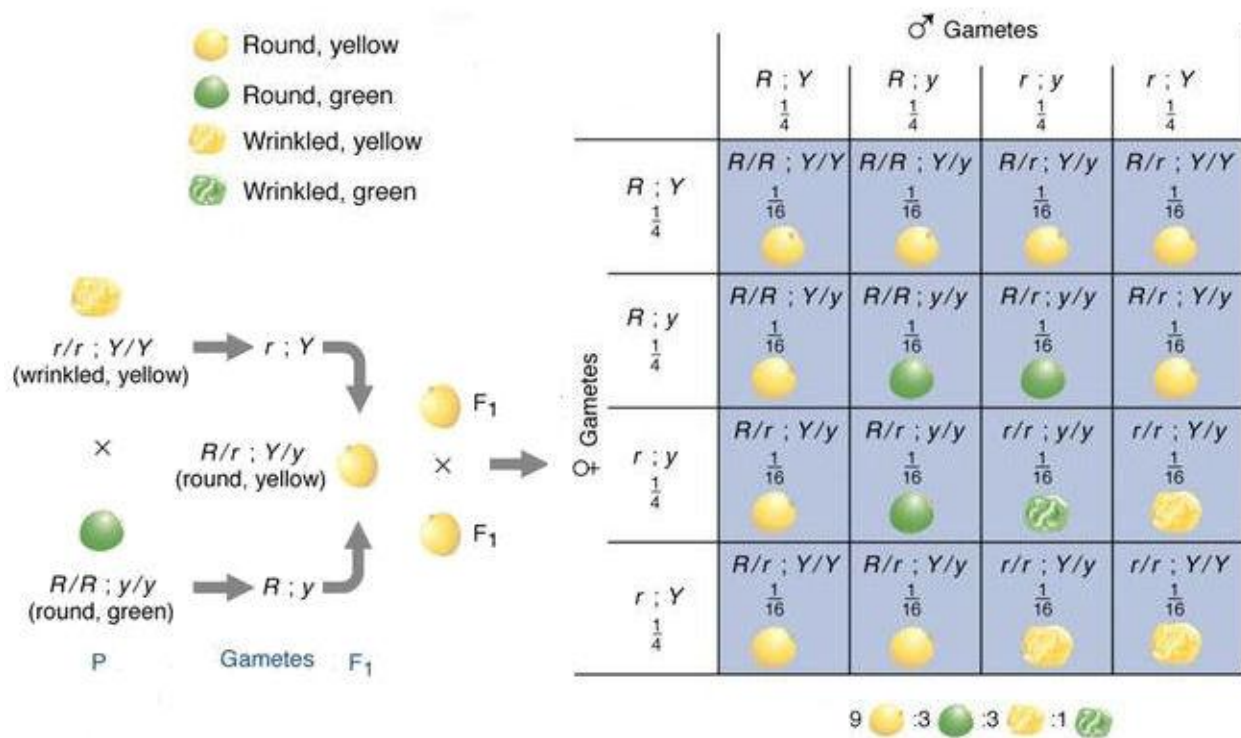


Fig. 1. Transmiterea mendeliană

Pătratul lui Punnett este o reprezentare vizuală a legilor lui Mendel, o diagramă folosită pentru a putea afla probabilitatea apariției unui rezultat ca urmare a unui experiment sau a unei încrucișări. Este folosit de cercetători pentru a stabili șansa descendenților de a moșteni un anumit genotip sau fenotip (Fig. 2).

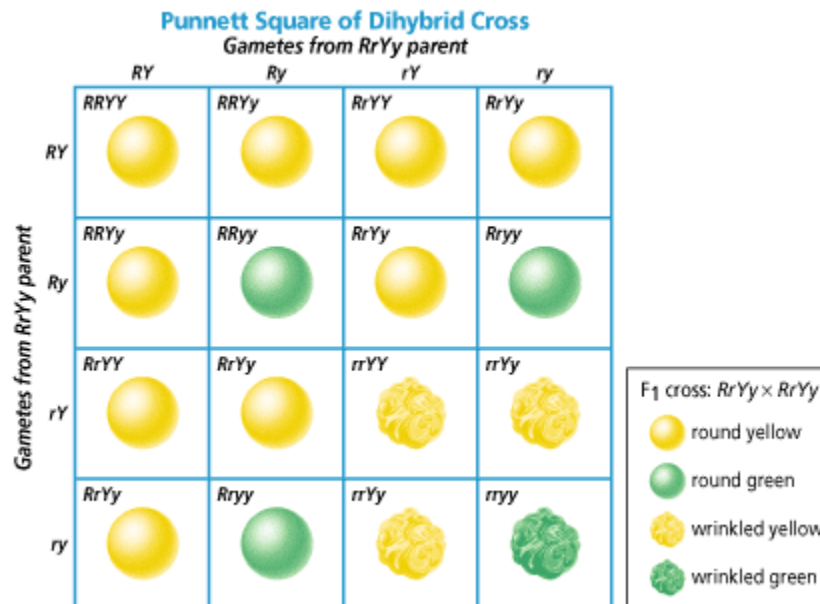


Fig. 2. Pătratul lui Punnett

Anul 1869 este reprezentativ pentru genetica medicală. El este marcat de descoperirea ADN-ului de către Johannes Friedrich Miescher. Deși inițial interpretat ca un “acid slab identificat în nucleul leucocitelor”, studii ulterioare au demonstrat importanța și rolul acestuia în ereditate, ca purtător al informațiilor genetice.

20 de ani mai târziu, unul dintre primii geneticieni ai lumii, botanistul de origine germană, Hugo de Vries, a descoperit genele, ca fiind niște particule de material genic. Tot el a introdus și definit termenul de “mutație”. Studiile sale s-au bazat pe observația unei specii de flori, descoperită accidental pe un câmp de cartofi. Plantând semințele în propria grădină, el a remarcat că planta produce mai multe tipuri de flori. Hugo de Vries a sugerat pentru prima dată existența recombinărilor între cromozomii omologi, crossover cromozomial, în 1903.



Fig. 3. Hugo de Vries

În 1902- 1903, Walter Sutton și Theodore Boveri, lucrând independent, au elaborat teoria cromozomială, încadrând cromozomii ca purtători ai materialului genic. Ei au definit cromozomii ca fiind structuri similare, alcătuite din gene, situate în anumite locuri la nivelul cromozomilor, loci. Pentru studiul lor, aceștia au folosit coloranți obținuți în industria germană de chimie organică.

În 1903, Nettie Stevens a studiat o specie de gândaci, *Tenebrio*, și a observat că perechile de cromozomi omologi sunt identice din punct de vedere al dimensiunilor și formei, cu excepția a doi cromozomi, X și Y, denumiți heterozomi. Deși controversată și pusă sub semnul întrebării, teoria cromozomială a fost susținută de studii suplimentare efectuate de Eleanor Carothers în 1913.

Thomas Hunt Morgan, împreună cu studenții săi, folosindu-se de diferite metode chimice, fizice și radiatii, au încercat să obțină mutații genice pe *Drosophila melanogaster*. Ei au observat un mascul cu ochi albi, printre celelalte insecte cu ochii roșii. Acest mascul, combinându-se cu o femelă cu ochii roșii, a dat naștere la progenituri cu ochii roșii, însă generația următoare includea și alți masculi cu ochi albi. Ei au încadrat această trăsătură ca fiind recesivă X-linkată. De asemenea, au descoperit o insectă mutantă cu ochii roz. Experimentul său, efectuat în 1910, a fost făcut public într-o lucrare publicată în 1911. Principalele concluzii au fost că:

- Unele trăsături fenotipice sunt legate de sex;
- Aceste trăsături sunt probabil transmise prin cromozomii sexuali;
- Alte trăsături fenotipice sunt "purtate" pe cromozomi specifici

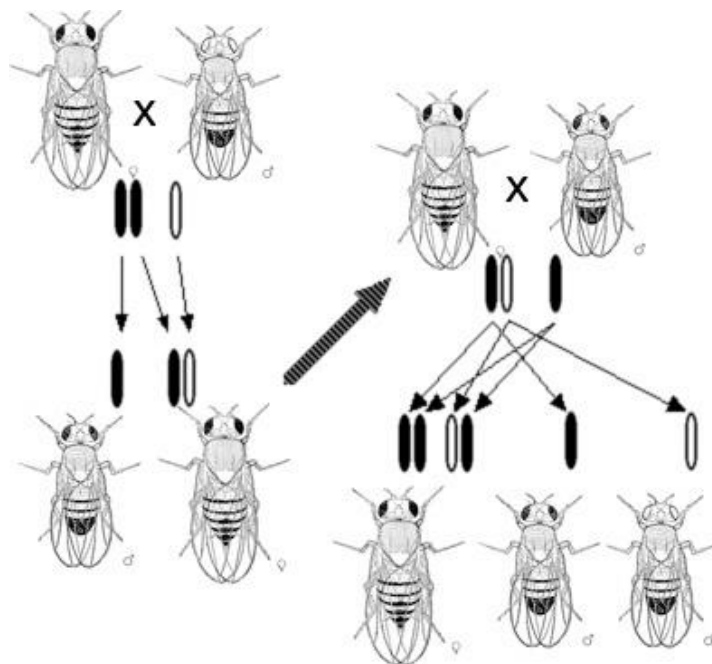


Fig. 4. Modelul de transmitere a culorii ochilor, descoperit de Morgan

Studiind și alte mutații, pe același model de insectă, Morgan și echipa sa au identificat și aripile scurte, mutație legată tot de heterozomi dar uneori transmisă independent față de ochii albi. El a introdus termenul de "crossing over".



FIG. 64. Scheme to illustrate a method of crossing over of the chromosomes.

Fig. 5. Modelul de crossing over al lui Morgan

Geneticianul American, Alfred Henry Sturtevant, a fost primul cercetător care a realizat o “hartă genetică a unui cromozom” (1913). Conform descoperirilor sale, genele sunt aranjate linear la nivelul unui cromozom iar o genă specifică unui anumit aspect fenotipic ocupă un loc fix.

Experimentele sale s-au concretizat într-o lucrare cu trei volume, “Genetic Studies on *Drosophila simulans*” în anul 1920.

În 1944, Oswald Avery, a descoperit ADN-ul a fiind purtător al informației genetice.

Inițial, se credea că proteinele sunt moleculele care poartă caracterele ereditare însă datorită muncii sale, Avery a reușit să demonstreze contrariul și astfel să dea o altă direcție medicinei moderne.

Structura dublu helix a acestuia a fost descoperită 9 ani mai târziu de către Rosalind Franklin și Maurice Wilkins. Acesta din urmă a primit premiul Nobel în Fiziologie și Medicină pentru descoperirea sa.

Barbara McClintock a contribuit la progresul geneticii ca știință prin descoperirea telomerelor și centromerelor ca părți ale cromozomului cu rol deosebit de important în transmiterea informației ereditare. Contribuția sa cea mai importantă la dezvoltarea geneticii a constat în definirea procesului de transpoziție, inițial pe specii de plante (porumb) și ulterior pe bacterii și animale și introducerea termenului de “elemente mobile”.

Conform teoriei elaborate între 1948 și 1950, elementele mobile reglează expresia genică, prin inhibarea sau modularea acesteia.

Anul 1953 reprezintă un punct extrem de important în istoria geneticii moleculare. Cercetătorii Francis Crick și James Watson au descoperit structura “dublu helix” a moleculei de ADN. Acesta a reprezentat rezultatul multor cercetări și studii care urmăreau deslușirea structurii ADN-ului care permite procesul de duplicare și transmitere a informațiilor genetice de la părinți la descendenți.

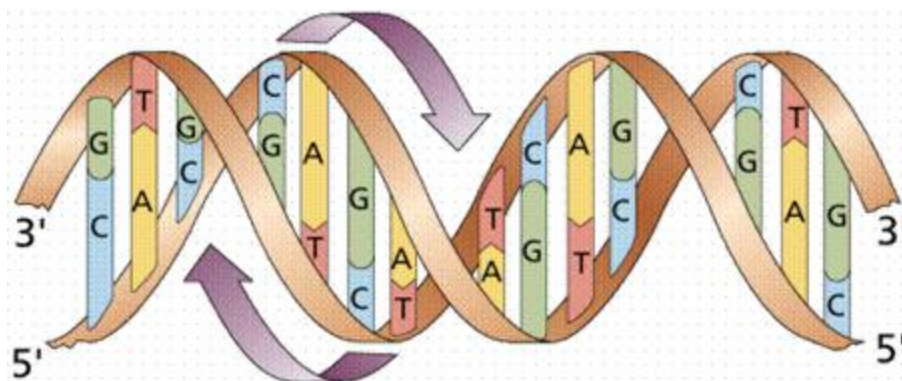


Fig. 6. Structura ADN

A - Adenină
 G - Guanină
 C - Citozină
 T - Timină

În 1970, Temin și Balitimore au primit premiul Nobel pentru descoperirea revers transcriptazei, o enzimă care permite sintetizarea ADN-ului complementar pornind de la ARN, la retrovirusuri.

Deși dificilă, evoluția geneticii a înregistrat etape importante. Studii observaționale realizate pe insecte sau diverse specii de plante au permis identificarea și definirea unor termeni extrem de importanți în dezvoltarea cercetării geneticii umane.

Dezlegarea treptată a misterelor unor gene sau ale unui mecanism de transmitere al caracterelor ereditare, a condus în 1977 la apariția primelor metode de secvențiere.

Metoda Maxam–Gilbert reprezintă prima generație de secvențiere a ADN-ului; principiul de bază al acestei metode constă în transformarea chimică parțială a nucleobazelor ADN și scindarea acestuia la nivelul nucleobazelor modificate. Substanțele chimice aplicate, de tipul acidului formic pentru purine, hidrazina pentru pirimidine sau sulfatul dimetilic pentru guanine, generează rupturi la nivelul nucleoidelor. Astfel modificată, molecula de ADN este scindată cu ajutorul piperidinei fierbinte rezultând fragmente de ADN. Următoarea etapă este electroforeza particulelor obținute și vizualizarea lor cu ajutorul radiografiilor.

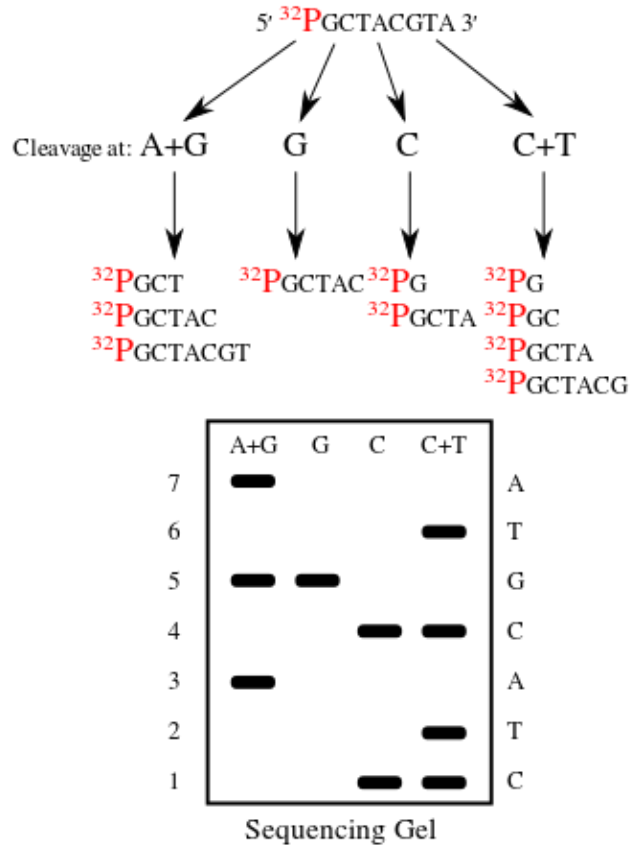


Fig. 7. Metoda de secvențiere Maxam–Gilbert

A - Adenină
 G - Guanină
 C - Citozină
 T - Timină

Aprofundarea fiziologiei și fiziopatologiei umane a făcut posibilă diagnosticarea unor boli noi precum și înțelegerea unor afecțiuni deja cunoscute. Boli fără tratament au reușit să fie deslușite din punct de vedere medical și ameliorate sau chiar vindecate.

Progresul medicinei a reprezentat o etapă importantă pentru omenire. Cu toate acestea, volumul mare de informații noi obținute datorită mijloacelor moderne de investigare și diagnostic a condus la noi necunoscute. Cauzele genetice au început să fie din ce în ce mai des incriminate ca fiind etiologice pentru anomalii cu diverse grade de gravitate. Necesitatea investigării genomului uman a dus la apariția unei noi tehnici, reacția de polimerizare în lanț (PCR).

PCR a fost descoperită de Kjell Kleppe și a adus nominalizare la premiul Nobel pentru H. Gobind Khorana. Deși recunoscută ca și metodă inovativă, PCR nu a fost implementată până în anul 1983 când biochimistul american Kary Banks Mullis a adus îmbunătățiri semnificative acestei proceduri, reușind să “împartă biologia în două epoci: înainte și după PCR”.

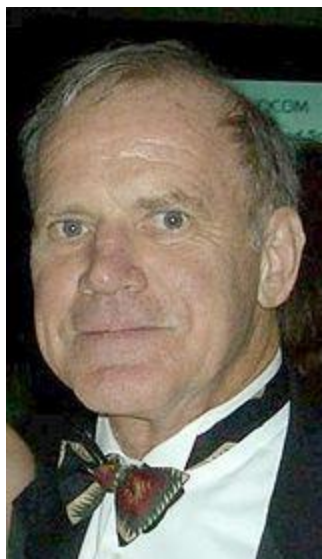


Fig. 8. Kary Banks Mullis

Inovația sa constă în folosirea unei perechi de primeri pentru a scinda molecula de ADN iar apoi, cu ajutorul ADN polimerazei, copierea ei. Această tehnică permite amplificarea unei catene mici de ADN, a unei gene specifice; practic, se obțin catene noi de ADN complementar pornind de la o moleculă inițial care funcționează ca model. Recunoașterea eficienței și aplicarea metodei PCR în laboratoarele din întreaga lume a reprezentat un pas important pentru genetica umană.

Procesul, pe cât de eficient, pe atât de clar:

- Etapa de inițiere - obținerea temperaturii optime de lucru, 94–96 °C, variabilă în funcție de tipul polimerazei;
- Denaturarea - presupune desfacerea ADN-ului studiat, pe matrița specifică, la temperaturi de 94-98 °C în ADN monocatenar, prin ruperea legăturilor de hidrogen la nivelul bazelor complementare;
- Atașarea primerilor la temperaturi de aproximativ 50–65 °C. Aceasta temperatură trebuie să fie ideală; dacă este prea scăzută, legăturile de hidrogen se realizează defectuos, dacă este prea crescută, nu se refăc;
- Extensia sau elongația - temperatura la care se desfășoară această etapă variază în funcție de tipul de ADN polimerază folosit. Se obține ADN complementar pornindu-se de la modelul inițial;
- Numărul de cicluri - într-o reacție normală, mai puțin de 10 molecule de ADN pot fi amplificate în maximum 40 de cicluri; creșterea exagerată a numărului de cicluri poate duce la apariția și stocarea produșilor nespecifici de reacție;
- Elongația finală - se realizează la temperaturi de 70-74 ° C și presupune verificarea fiecărei catene de ADN, confirmarea că a fost polimerizată iar moleculele monocatenare au fost renaturate.

Polymerase chain reaction - PCR

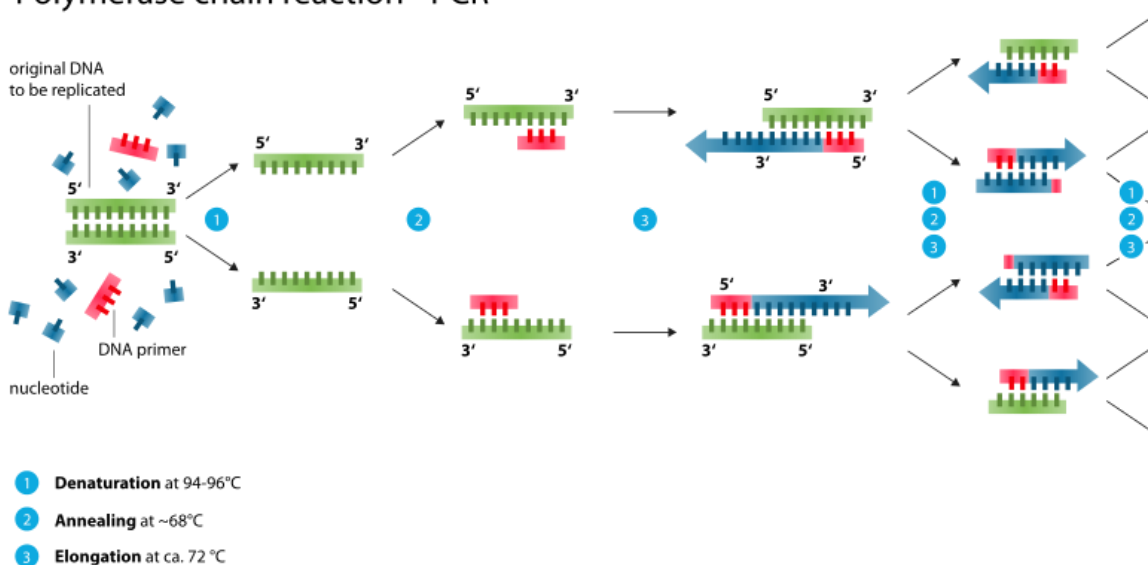


Fig. 9. Etapele PCR

Metoda PCR a devenit larg răspândită în medicină deoarece permite obținerea unei cantități mari de ADN dintr-o anumită secvență; ea nu necesită clonarea prealabilă a acestei secvențe.

Aplicabilitatea metodei se regăsește în majoritatea domeniilor, atât ca metodă de cercetare cât și ca metodă diagnostică:

- Diagnosticul unor boli monogenice cunoscute sau detectarea unor mutații noi pe gene specifice;
- Boli infecțioase, manifeste sau latente;
- Boli neoplazice;
- Studii de taxonomie și filogenie moleculară;
- Biologia populațiilor, incluzând atât populația umană, cât și organisme mici;
- Studii antropologice, prin izolarea și analiza probelor de ADN obținute de la fosile;
- Medicina legală;
- Diagnosticul prenatal al unor anomalii cromozomiale, infecții (citomegalovirus, virusul ruzeolei, virusul varicelozosterian) sau orice patologie fetală de cauză genetică (hemofiliile).

Introducerea metodei PCR ca tehnică în diagnosticul prenatal s-a produs în 1991 pentru mutații la nivelul cromozomului X. Folosind lichid amniotic, vilozități corionice sau sânge fetal, PCR permite diagnosticarea trisomiilor 21 (sindromul Down), 18 (sindromul Edwards), trisomia X sau Y. Avantajele oferite de această metodă constă în timpul scurt de procesare a probelor (24-48 de ore), automatizare, obiectivitate în interpretarea rezultatelor. Costurile relativ mari reprezintă principalul dezavantaj.

PCR a suferit numeroase modificări de-a lungul timpului, ajustări, îmbunătățiri, cu rolul de a adapta metoda la necesitățile domeniului în care se aplică.

Sunt descrise mai multe tipuri de PCR:

- **RT- PCR** (revers transcriere PCR)- utilizat pentru amplificarea unei molecule de ARN. Inițial molecula de ARN este convertită sub acțiunea revers transcriptazei în ADN complementar (ADNc) iar apoi în ADN dublu catenar.

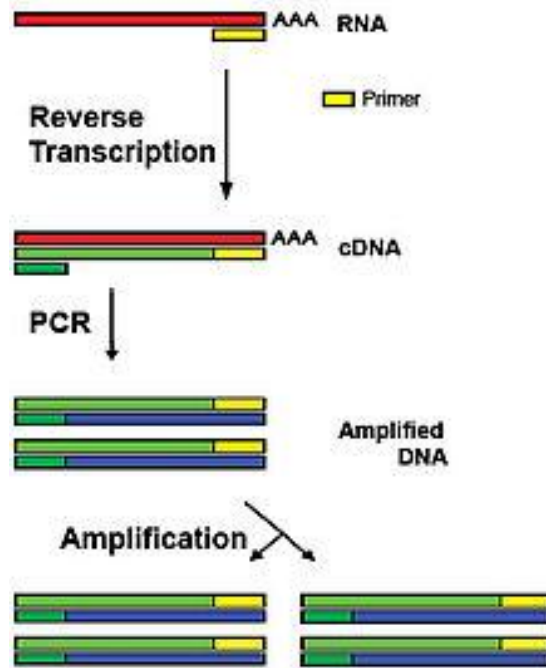


Fig. 10. Principiul metodei RT-PCR

Procesul poate fi efectuat în unul sau două etape. Gândită pentru a reduce pe cât posibil eventualele erori, metoda constând într-o singură etapă este considerată a fi mai puțin precisă decât cea în două etape însă cu un risc mai mic de contaminare datorită manipulării reduse a probelor (Fig. 10).

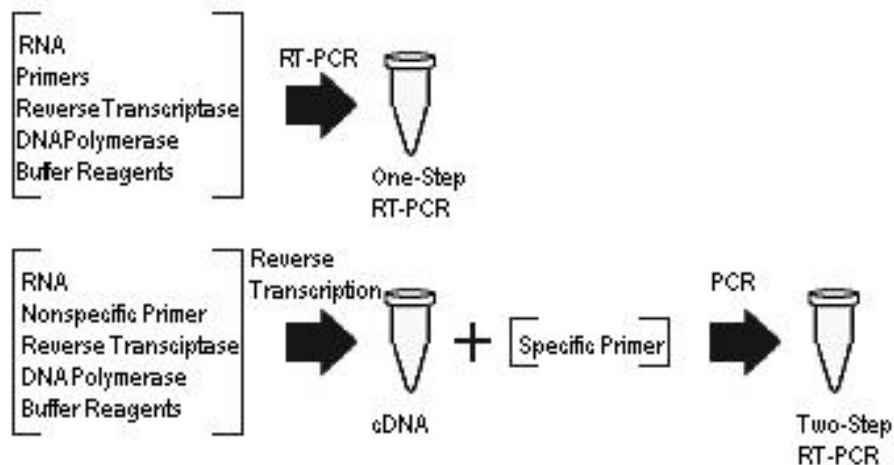


Fig. 11. RT-PCR - comparație între cele două tipuri

- **QRT-PCR** (real time PCR)- reprezintă o tehnică bazată pe principiul PRC care constă în amplificarea moleculelor de ADN și cuantificarea acestora după fiecare ciclu de amplificare. Cuantificarea este posibilă cu ajutorul unor substanțe fluorescente (coloranți sau nucleotide ADN modificate). Se poate aplica și pentru ARN. În funcție de proba de ADN utilizată, metoda se poate împărți în două categorii:

- a) QRT-PCR cu coloranți de legare a ADN-ului dublu catenar - colorantul leagă toate moleculele de ADN dublu catenar devenind fluorescent. Cuantificarea concentrației de ADN se face după fiecare ciclu. Are avantajul unor costuri scăzute.
- b) Folosirea unei sonde fluorescente specifice - detectează doar moleculele de ADN conținând o anumită informație (corespunzătoare sondei folosite). Metoda are specificitate mare.
- **Multiplex-PCR** - realizează amplificarea simultană a mai multor probe de ADN diferite sub acțiunea mai multor primeri precum și a ADN polimerazei mediată de temperatură (Fig. 11). Se folosește cu succes în infecții pentru identificarea agentului patogen, în genotiparea SNP-urilor, analiza mutațiilor și în special a delețiilor, detecția ARN, medicina legală precum și în nutritive.

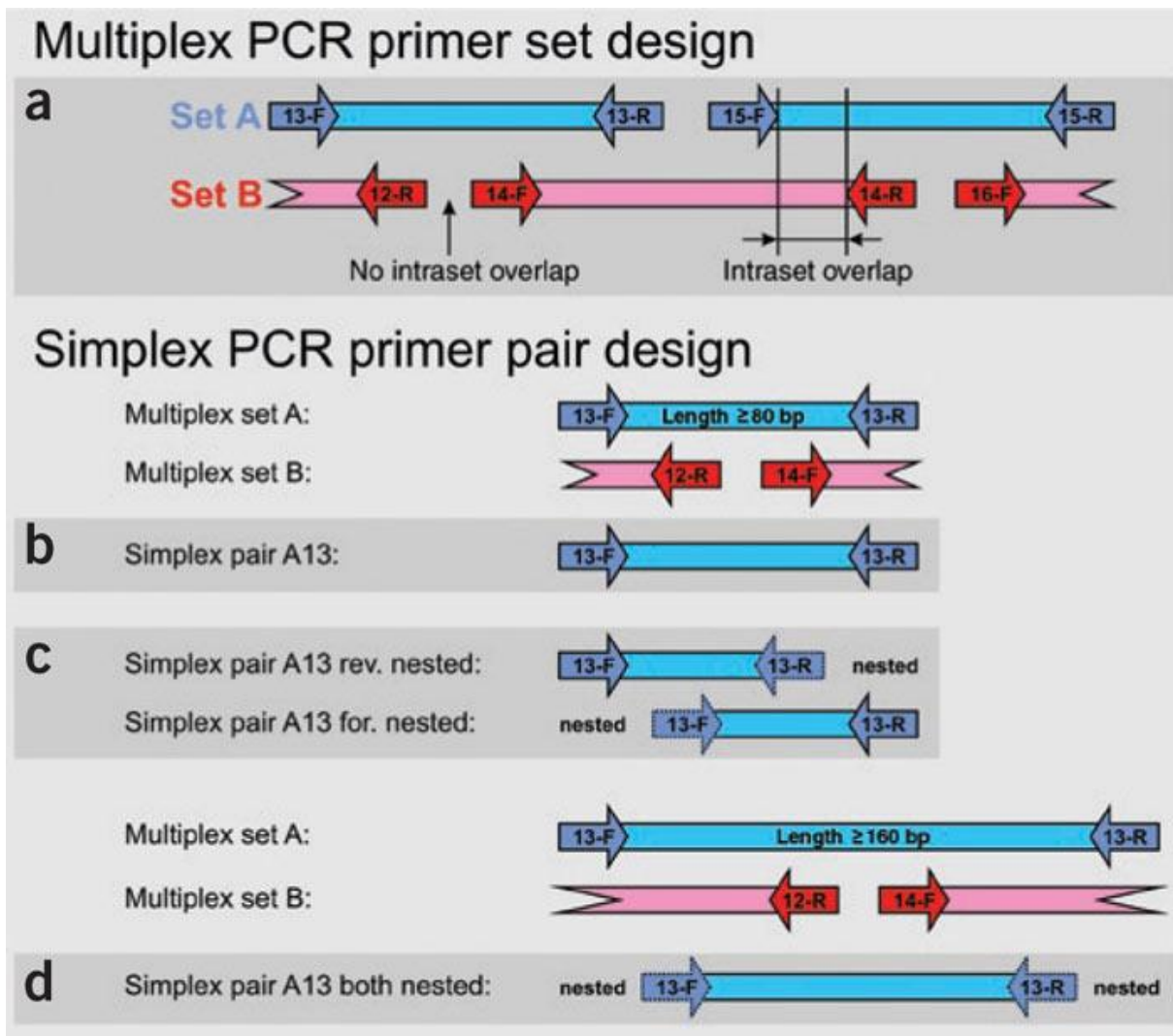


Fig. 12. În prima etapă, este nevoie de doi primeri diferiți A și B, folosiți în două

PCR-uri independente. Seturile de primeri acoperă secvența vizată în întregime. În interiorul seturilor, fragmentele PCR nu se suprapun, însă, între seturi, da. Etapa a doua constă în reamplificarea fiecărui fragment de AND. Strategiile b, c și d folosesc diferite perechi de primeri pentru a obține amplificarea moleculelor de ADN, cu mărimi variabile.

- **Amnio PCR**- o metodă de diagnostic prenatal, bazată pe tehnica PCR, care folosește lichid amniotic pentru identificarea anomaliilor cromozomiale. Prezintă avantajul obținerii rezultatelor în 24, maxim 48 de ore. Prezintă acuratețe foarte mare (100% conform testelor efectuate de producător) în identificarea sindromului Down, Edwards și Patau.

Apariția și dezvoltarea tehnicilor de diagnostic și cercetare au contribuit la aprofundarea termenilor genetici, cauzelor genetice ale unor afecțiuni necunoscute din punct de vedere etiologic. Mutații deja cunoscute sau noi s-a reușit a fi încadrate ca fiind cauza apariției unor boli. Noi maladii, sindroame, asociind un spectru larg de simptome, cu afectare multisistemică, au fost asociate cu tehnicile avansate de evaluare a genelor.

Anul 1983 a adus de asemenea și maparea primei boli genetice.

Coreea Huntington reprezintă o boală genetică rară care determină distrugerea unor anumiți neuroni, cu afectarea ireversibilă a unei părți din creier. Din punct de vedere clinic, boala se caracterizează prin mișcări coreice, bruște, necontrolate, rigiditate, tulburări de memorie și de comportament, demență. Boala este progresivă și incurabilă. Mutația responsabilă pentru apariția coreei Huntington a fost identificată pe cromozomul 4 și constă în repetarea secvenței “CAG” în proteina Huntington.

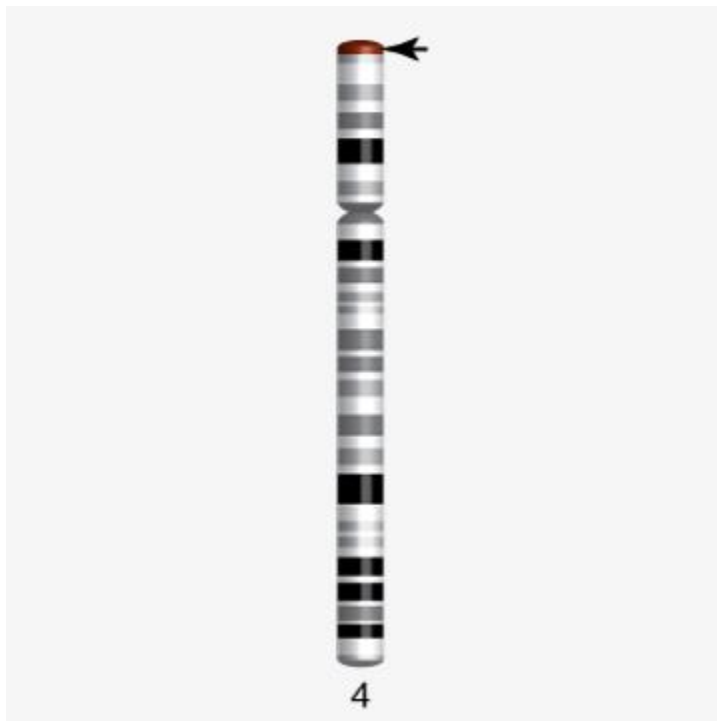


Fig. 13. Localizarea mutației pentru coreea Huntington pe cromozomul 4

Anul 1990 a fost extrem de important din punct de vedere al istoriei geneticii.

Una dintre cele mai importante descoperiri a fost reprezentată de identificarea genei BRCA1, genă de supresie tumorală. În mod normal, aceasta sintetizează proteine care împiedică creșterea și diferențierea aberantă a celulelor însă, mutații la nivelul BRCA1 modifică funcția normală a acesteia și cresc riscul de apariție a cancerului, cu predilecție cancer mamar sau ovarian. Gena este localizată pe brațul lung al cromozomului 17 și a fost de asemenea identificată și la alte mamifere. În prezent, au fost identificate peste 1000 posibile mutații ale acestei gene.

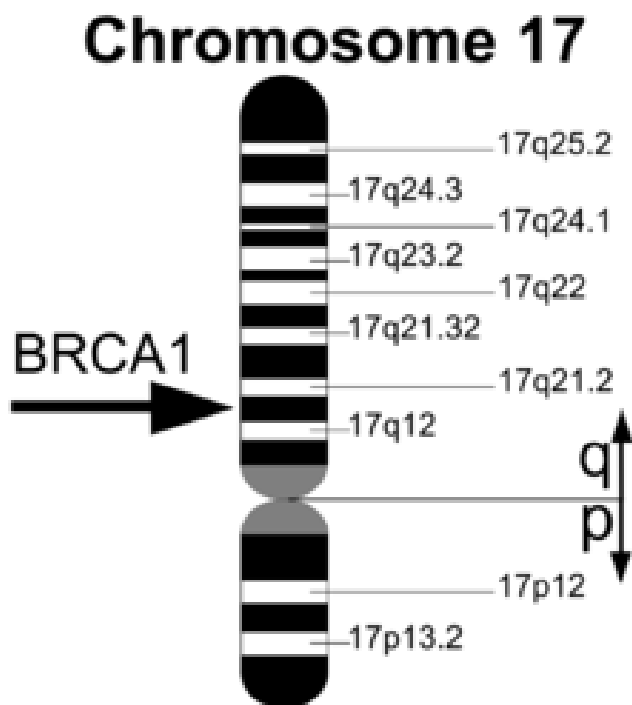


Fig. 14. Localizarea genei BRCA1 pe cromozomul 17

Început în 1990, Proiectul Genomul Uman a reprezentat unul dintre cele mai curajoase și inovative proiecte de cercetare, o colaborare reușită între Institutul Național de Sănătate al Statelor Unite ale Americii și Departamentul de Energie. Pricipalele obiective prevăzute au fost:

- Identificarea tuturor genelor incluse în genomul uman, estimate la aproximativ 80000-100000 de gene;
- secvențierea perechilor de baze din structura moleculei de ADN, aproximativ trei miliarde;
- crearea unei baze de date cu toate informațiile obținute precum și elaborarea unor metode (tool-uri) pentru manipularea acestora;
- respectarea criteriilor etice, sociale și culturale apărute pe parcursul derulării proiectului.

Probele prelucrate în cadrul acestui amplu proiect au fost reprezentate de spermă (în cazul persoanelor de sex masculin) și sânge (de la femei). Donatorii au fost anonimi; nu toate persoanele care au donat au fost incluse iar pentru probele utilizate nu a fost cunoscut donatorul.

Cercetătorii din întreaga lume au încercat să contribuie la elaborarea proiectului prin secvențierea genomului altor specii precum *Haemophilus influenzae* (HI), șoarece, *Saccharomyces cerevisiae* și *Drosophila*. De asemenea, progresul continuu al medicine și implicit al geneticii a contribuit la finalizarea acestui proiect.

Tehnica folosită presupune:

- izolarea moleculelor de ADN și “tăierea” lor în anumite puncte specifice la nivelul catenelor;
- separarea fragmentelor rezultate cu ajutorul electroforezei în gel;
- amplificarea ADN cu ajutorul PCR sau folosind vectori de clonare cu scopul de a realiza o bază de date;
- secvențierea folosind metoda Sanger.

Metoda Sanger constă în obținerea de fragmente de dimensiuni variabile, fiecare fragment terminându-se cu o nucleotide diferită. Fragmentele sunt replicate prin folosirea agenților de replicare, obținându-se loturi specifice- un lot care conține numai fragmente încheiate cu adenină, un lot doar cu citozină, unul doar cu guanină și unul doar cu timină.

- Electroforeza cu gel pentru identificarea secvenței ADN.

Proiectul a fost intens mediatizat și controversat din punct de vedere etic și social.

În luna februarie 2001, a fost publicată o lucrare care prezenta secvențierea a 90% din genomul uman. Comparativ cu numărul mare de gene estimate inițial, de ordinal miliardelor, lucrarea a prezentat aproximativ 30000 de gene identificate până în acel moment ca alcătuind genomul uman, cu structura și funcții complexe, superioare genelor similare identificate la alte specii secvențiate.

În anul 2002, genomul șoarecelui a fost secvențiat în totalitate, permițând compararea rezultatelor obținute în cadrul Proiectului Genomului Uman cu alte mamifere pentru stabilirea diferențelor și asemănarilor în ceea ce privește structura și funcția anumitor gene.

Proiectul s-a încheiat în aprilie 2003 când instituțiile implicate au anunțat finalizarea secvențierii întregului genom uman.

Anul 1995 a adus prima secvențiere completă a genomului unui organism viu.

Haemophilus influenza (HI) reprezintă principalul agent etiologic al infecțiilor de tract respirator. Genomul acestei bacterii este tipic pentru tulpinile bacteriene dar de aproximativ 10 ori mai mare decât cel al virusurilor .

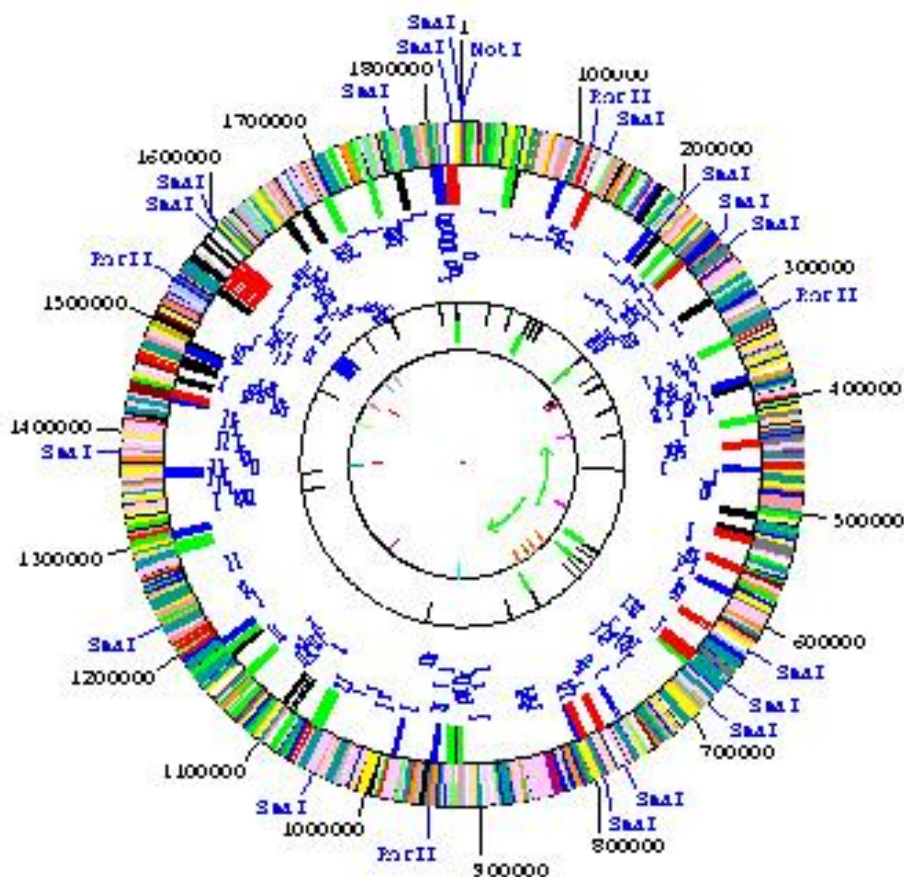


Fig. 15. Genomul HI

Primul cromozom uman decodat a fost cromozomul 22. Dimensiunii sale relativ mici și asocierea cu numeroase patologii (sindromul DiGeorge, anumite tipuri de leucemii, Sindromul Ochi de Pisică) au reprezentat motivele pentru care acesta a fost ales din totalul de 46 de cromozomi. Rezultat ca urmare a unei munci colective, organizată la nivel internațional, decodarea acestuia a fost posibilă în 1999, proces extrem de folositor pentru proiectul genomului uman aflat deja în desfășurare la acea perioadă. Cromozomul 22 este un autozom, apreciat a avea 49.5 milioane de perechi de nucleotide, reprezentând aproximativ 1.5-2% din totalul materialului genetic. Este al doilea cel mai mic cromozom uman, după cromozomul 21.

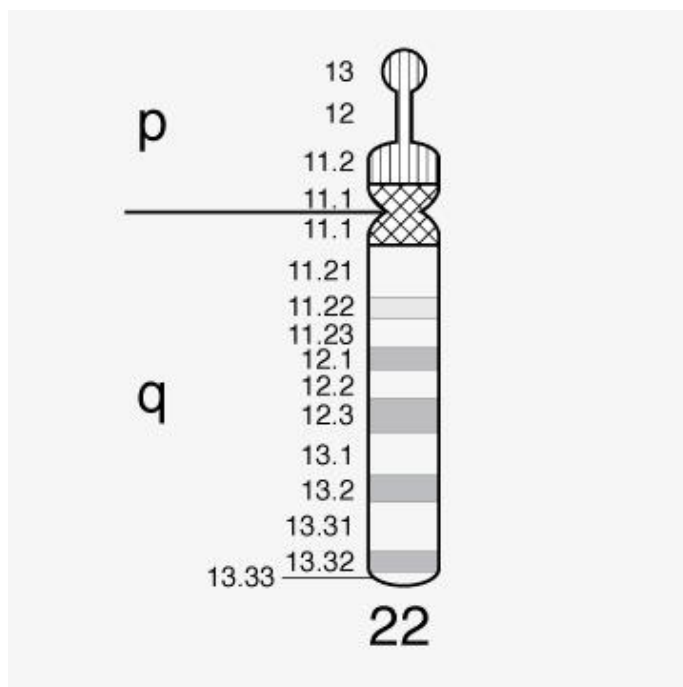


Fig. 16. Cromozomul 22

Evoluția geneticii ca știință a contribuit semnificativ la elucidarea cauzelor etiologice a multor boli și sindroame.

Deși majoritatea patologiilor pot fi considerate a avea într-o oarecare măsură legătură cu materialul genetic al fiecărei persoane, există o serie de boli de natură genetică, cromozomială sau genică, incluse în grupul de boli rare (BR). Aproape toate bolile genetice sunt rare în vreme ce nu toate bolile rare sunt genetice, ele putând avea etiologie infecțioasă, autoimună, neoplazică.

BR sunt boli care afectează un număr redus de pacienți. De exemplu, în Europa, o boală este considerată rară dacă afectează 1 din 2000 de indivizi. Există aproximativ 6000-7000 de BR descrise până în prezent iar numărul lor este în creștere.

BR sunt afecțiuni grave, cronice, uneori invalidante, cu evoluție progresivă și prognostic rezervat. Unele dintre ele pot fi diagnosticate de la naștere sau în perioada miciei copilării datorită debutului timpuriu (de exemplu osteogeneza imperfectă, sindromul Prader Willi, sindromul Rett, atrofii musculare spinale). Mai mult de jumătate însă rămân fără răsunet clinic până în viața adultă (Coreea Huntington, cancerul tiroidian).

Mutația poate fi moștenită de la părinți sau poate apărea de novo.

Pot include atât sindroame, boli complexe cu afectare multisistemică, dar și malformații izolate, fără alte modificări fenotipice.

Natura BR de cauză genetică poate fi împărțită în două categorii:

- Cromozomiale - afectează cromozomii (trisomii, monosomii, deleții, duplicații, translocații);
- Genice - afectează una sau mai multe gene (o parte din cromozom).

Bolile cromozomiale sunt boli grave deoarece volumul de material genetic afectat este mare. Ele pot fi congenitale, moștenite de la părinți, sau dobândite pe parcursul vieții.

Ele sunt denumite boli orfane, pe de o parte datorită lipsei de cunoaștere și informare a personalului medical și a populației generale cu privire la aceste afecțiuni, pe de altă parte datorită lipsei de tratament. Pacienții suferă cel mai mult de pe urma acestei lipse de cunoștințe.

Din punct de vedere al calității vieții, pacienții sunt discriminați pe plan social. Este extrem de greu să găsească un loc de muncă iar societatea nu îi acceptă, ba chiar îi marginalizează.

Inițierea întârziată a tratamentului sau chiar absența lui din diverse motive (costuri extrem de mari, absența unui tratament specific) contribuie la progresia bolii și agravarea simptomatologiei clinice, înrăutățește prognosticul bolii și scade calitatea vieții.

Înființarea asociațiilor de pacienți a ajutat foarte mult domeniul BR. Acestea au rolul de a contribui la informarea populației despre existența BR, despre drepturile și nevoile pacienților, despre necesitatea introducerii tratamentelor etiopatogenice. Ele facilitează integrarea socială a pacienților și ajută familiile acestora să conștientizeze și să învețe nevoile speciale pe care le are un pacient cu BR; de asemenea, urmăresc includerea BR în cercetările medicale precum și în alocarea bugetelor de sănătate.

Diagnosticul BR, de regula, este întârziat, uneori ani sau chiar zeci de ani de la debutul bolii, este extrem de costisitor și foarte greu de acceptat de familiile afectate.

Deși tehnicile noi de diagnostic au făcut posibilă identificarea acestor boli, simptomatologia variată, multisistemică și de cele mai multe ori nespecifică îngreunează diagnosticul clinic, întârzie confirmarea genetică și tratamentul. Datorită numărului redus de pacienți cu BR, studii clinice relevante sunt extrem de reduse, neexistând date semnificative cu privire la aceste boli.

Tratamentele specifice BR sunt de asemenea tratamente orfane. Interesul companiilor farmaceutice pentru BR este extrem de scăzut datorită numărului mic de cazuri la nivel internațional. Cu toate acestea, cu sprijinul autorităților în țări precum Germania, cercetări extinse au dus la producerea terapiilor etiopatologice pentru unele BR. Acestea contribuie la oprirea progresiei simptomelor clinice, controlul bolii, creșterea calității vieții pacienților și îmbunătățirea prognosticului atât pe termen lung cât și pe termen scurt. Există o serie de BR care beneficiază de tratamente asigurate prin programe naționale.

Fibroza chistică reprezintă o BR genetică, monogenică, afectează 1 din 2.500 de nou-născuți vii, cu transmitere recesivă, determinată de mutații ale genei CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator); aceste mutații determină creșterea vâscozității secrețiilor și apariția simptomelor digestive, bronhopulmonare, genitale. Diagnosticul poate fi stabilit prin secvențiere ADN. Tratamentul este asigurat pacienților, adulți sau copii prin intermediul "programului național de mucoviscidoză".

Sindromul Hunter, denumit și mucopolizaharidoză tip II, reprezintă o BR monogenică, determinată de deficitul de iduronidat-2-sulfatază, cu acumularea dermatan-sulfatului și heparan-sulfatului la nivelul țesuturilor și organelor. Este o afecțiune X-linkată, manifestându-se numai la pacienții de sex masculin.

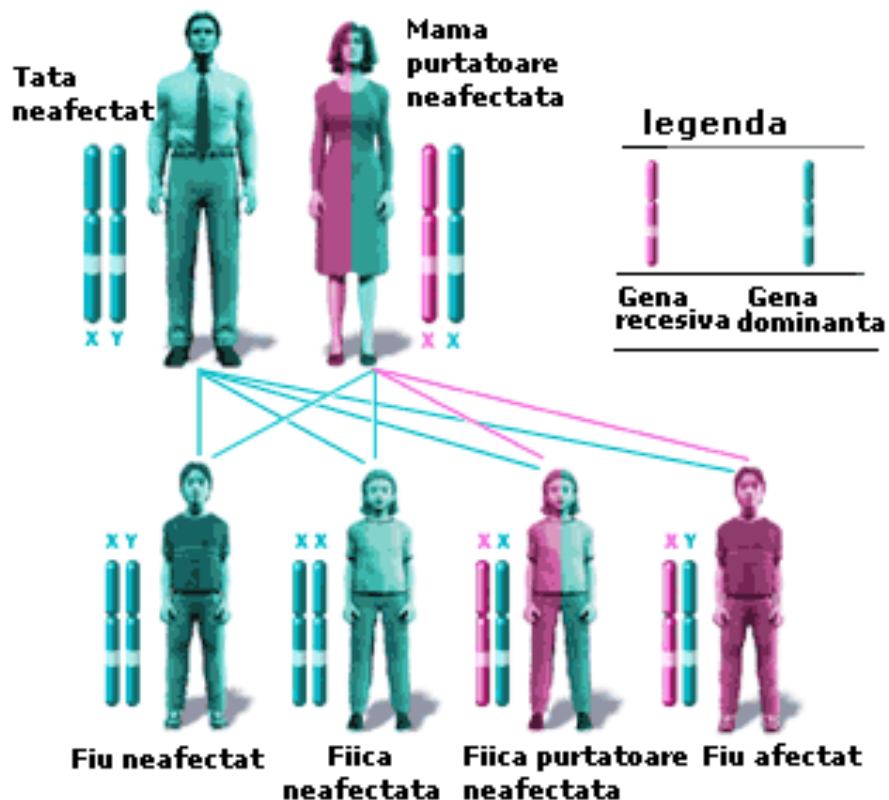


Fig. 17. Transmiterea bolilor X-linkate

Tratamentul pentru sindromul Hunter constă în substituție enzimatică, administrarea enzimei Iduronat-2-sulfatază saptamanal.

În categoria BR lizozomale sunt incluse și alte afecțiuni ce beneficiază de tratamente orfane:

- Boala Gaucher - caracterizată prin deficitul enzimei β -glucocerebrozidază. Din punct de vedere genetic, gena mutantă este situată pe brațul lung al cromozomului 1 și conține 11 exoni; până în prezent au fost descrise aproximativ 200 de mutații posibile la nivelul acestei gene. Tratamentul specific a fost obținut prin tehnica ADN recombinant.
- Boala Fabry - deficitul congenital de alfa-galactozidază A, este o BR monogenică; afectează 1 din 40000 de indivizi de sex masculin. Prezintă transmitere recesivă X-linkată, mutația fiind localizată pe cromozomul X, Xq22. Terapia de substituție hormonală este disponibilă prin program național.
- Boala Pompe - afecțiune musculară rară, monogenică, determinată de mutații la nivelul genei ce codifică sinteza enzimei alfa-glucozidază acidă.
- Boala Niemann Pick - BR caracterizată printr-un deficit genetic al enzimei sfigomielinază acidă cu acumularea consecutivă a lipidelor la nivelul organismului, în special la nivelul plămânilor, ficatului, splinei, creierului, măduvei osoase. Este o afecțiune cu transmitere autosomal recesivă, ambii părinți fiind purtători ai mutației.

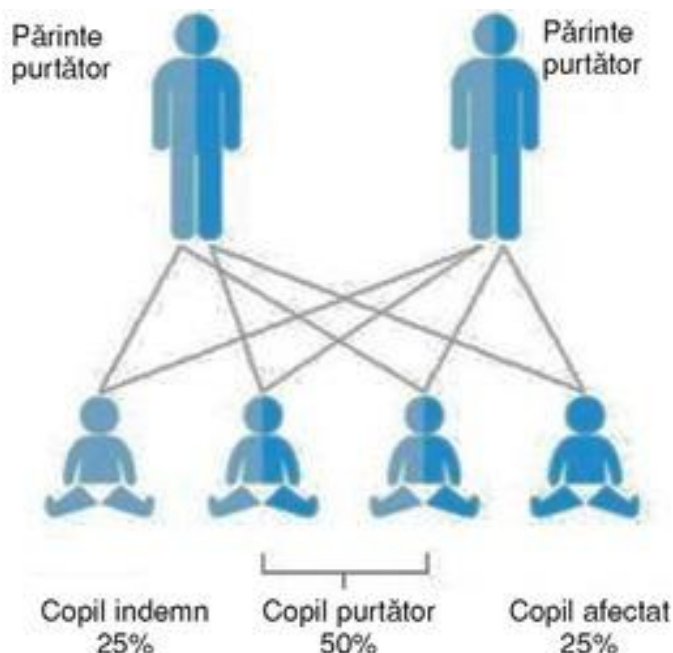


Fig. 18. Transmitere autosomal recesivă

- Boala Wilson - BR genetică, autosomal recesivă, determinată de mutații ale genei ATP7b de pe brațul lung al cromozomului 13. Mutația determină acumularea cuprului în țesuturi și afectare multisistemică.

Terapia genică reprezintă o speranță pentru pacienții ale căror boli nu au tratament curabil. Ea constă în introducerea polimerilor de acizi nucleici în celule, somatice sau germinale. În prezent, cea mai utilizată este molecula de ADN pentru înlocuirea unei gene mutante. Încă la stadiu de experiment, până în 2014, terapia genică a fost utilizată cu succes în trialuri clinice implicând pacienți cu boala Parkinson, amauroza congenitală, adrenoleucodistrofie, mielom multiplu și hemofilie.

Referințe:

1. Gregor Mendel, Alain F. Corcos, Floyd V. Monaghan, Maria C. Weber "Gregor Mendel's Experiments on Plant Hybrids: A Guided Study", Rutgers University Press, 1993.
2. [Carlson, Elof Axel](#) (2004). "Doubts about Mendel's integrity are exaggerated". Mendel's Legacy. Cold Spring Harbor, NY: [Cold Spring Harbor Laboratory Press](#). pp. 48–49. [ISBN 978-0-87969-675-7](#).
3. Randy Moore (May 2001). "The "Rediscovery" of Mendel's Work" (PDF). Bioscene 27.
4. Health Science Academy. Chapter 16: Simple Patterns of Inheritance. <http://academygenbioii.pbworks.com/w/page/36449809/Chapter%2016%3A%20Simple%20Patterns%20of%20Inheritance%20%28Erica%29>
5. Wikipedia, the free encyclopedia. Panette square. https://en.wikipedia.org/wiki/Punnett_square
6. Dahm, R (Jan 2008). "Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research". Human Genetics 122 (6): 565–81. doi:10.1007/s00439-007-0433-0.
7. Bill Bryson, A Short History of Nearly Everything, Broadway Books, 2005, p. 500.
8. Hall, A. D. (1935). "Hugo de Vries. 1848-1935". Obituary Notices of Fellows of the Royal Society 1 (4): 371. doi:10.1098/rsbm.1935.0002

9. Nanne van der Zijpp, "De Vries." Mennonite Encyclopedia, Scottdale, PA: Herald Press, 1955-59: vol. IV, p. 862-863.
10. de Vries, Hugo. Die mutationstheorie. Versuche und beobachtungen über die entstehung von arten im pflanzenreich, Leipzig, Veit & comp., 1901-03.
11. SUTTON, W. S., 1903 The chromosomes in heredity. Biol. Bull 4:231-251
12. Ernest W. Crow and James F. Crow (1 January 2002). "[100 Years Ago: Walter Sutton and the Chromosome Theory of Heredity](#)". Genetics 160 (1): 1–4.
13. Chadwell, Faye A. (1996). Benjamin F. and Barbara Shearer, eds. E. (Estella) Eleanor Carothers. Notable Women in the Life Sciences: A Biographical Dictionary (Greenwood Press). pp. 56–57 ISBN 0-313-29302-3
14. Morgan, T. H. (1940). "[Edmund Beecher Wilson. 1856-1939](#)". [Obituary Notices of Fellows of the Royal Society](#) 3 (8): 123–126. doi:[10.1098/rsbm.1940.0012](#)
15. Biblioteca universală Wikipedia. Thomas Hunt Morgan. https://en.wikipedia.org/wiki/Thomas_Hunt_Morgan
16. Kenney, D. E.; Borisy, G. G. (2009). "Thomas Hunt Morgan at the Marine Biological Laboratory: Naturalist and Experimentalist". [Genetics](#) 181 (3): 841–846. doi:[10.1534/genetics.109.101659](#)
17. A Critique of the Theory of Evolution, Princeton University Press, 1916,
18. Dorak MD, PhD, M. Tefvik. Landmarks in the History of Genetics
19. Edelman, Isidore S. and Gerald D. Fischbach. Genes and Genomes: Impact on Medicine and Society. Genes, Genomes, and Evolution Symposium. Columbia University, 16 October 2003
20. A. H. Sturtevant. Genetic studies on drosophila simulans. Columbia University, New York City. July 6, 1920
21. Oswald Theodore Avery, 1877–1955". Journal of general microbiology 17 (3): 539–549. 1957. doi:10.1099/00221287-17-3-539.
22. Jump up ^ Dochez, A. R. (1955). "Oswald Theodore Avery, 1877–1955". Transactions of the Association of American Physicians 68: 7–8.
23. McClintock, B. (1950). "The origin and behavior of mutable loci in maize". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 36 (6): 344–355. doi:10.1073/pnas.36.6.344
24. McClintock, B. (1945). "Neurospora. I. Preliminary Observations of the Chromosomes of Neurospora crassa". American Journal of Botany 32 (10): 671–678. doi:10.2307/2437624.
25. Cochran, W.; Crick, F. H. C. (1952). "Evidence for the Pauling–Corey α -Helix in Synthetic Polypeptides". Nature 169 (4293): 234.
26. Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M et al. (Feb 1977). "Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA". Nature 265 (5596): 687–95.
27. Sanger F, Coulson AR (May 1975). "A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase". J. Mol. Biol. 94 (3): 441–8. doi:10.1016/0022-2836(75)90213-2
28. Maxam AM, Gilbert W (February 1977). "A new method for sequencing DNA". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74 (2): 560–4. Bibcode:1977PNAS...74..560M. doi:10.1073/pnas.74.2.560.
29. Wade, Nicholas (September 15, 1998), "Scientist at Work/Kary Mullis; After the 'Eureka', a Nobelist Drops Out", The New York Times
30. Shmaefsky, Brian Robert (October 30, 2006). Biotechnology 101. Google. ISBN 978-0-313-33528-0.

31. Kleppe, K.; Ohtsuka, E.; Kleppe, R.; Molineux, I.; Khorana, H. G. (1971). "Studies on polynucleotides *1, *2XCVI. Repair replication of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases". *Journal of Molecular Biology* 56 (2): 341–361. doi:10.1016/0022-2836(71)90469-4.
32. Saiki, R.; Gelfand, D.; Stoffel, S.; Scharf, S.; Higuchi, R.; Horn, G.; Mullis, K.; Erlich, H. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase". *Science* 239 (4839): 487–491. doi:10.1126/science.2448875.
33. Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE (1990). "Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro". *Nucl Acids Res* 18 (21): 6409–6412. doi:10.1093/nar/18.21.6409. PMC 332522. PMID 2243783.
34. Jump up to: a b Sharkey, D. J.; Scalice, E. R.; Christy, K. G.; Atwood, S. M.; Daiss, J. L. (1994). "Antibodies as Thermolabile Switches: High Temperature Triggering for the Polymerase Chain Reaction". *Bio/Technology* 12 (5): 506–509. doi:10.1038/nbt0594-506
35. Wikipedia, enciclopedia gratuita, Polymerase chain reaction, https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction
36. T Vassu, I Stoica, O Csutak, F Muşat. *Genetica microorganismelor și inginerie genetică microbiană. Note de curs și Tehnici de laborator.* Editura Petron, București, 2001
37. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE (January 1999). "Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential". *BioTechniques* 26 (1): 112–22, 124–5. PMID 9894600.
38. Mackay, Ian (2007). *Real-time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterization.* Norfolk, England: Caister Academic Press. p. 440. ISBN 1-904455-18-2.
39. Wikipedia, enciclopedia gratuita, Reverse transcription polymerase chain reaction, https://en.wikipedia.org/wiki/Reverse_transcription_polymerase_chain_reaction
40. Wong ML, Medrano JF (July 2005). "Real-time PCR for mRNA quantitation". *BioTechniques* 39 (1): 75–85. doi:10.2144/05391rv01
41. Pfaffl, MW; Horgan, GW; Dempfle, L (2002). "Relative Expression Software Tool (REST©) for group wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR". *Nucl. Acids Res.* 30: e36.
42. Zipper et al. (2004). "Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications". *Nucleic Acids Res* 32 (12): e103. doi:10.1093/nar/gnh101.
43. Hayden MJ, Nguyen TM, Waterman A, Chalmers KJ (2008). "Multiplex-ready PCR: a new method for multiplexed SSR and SNP genotyping". *BMC Genomics* 9: 80. doi:10.1186/1471-2164-9-80.
44. Holger Römpler, Paul H Dear, Johannes Krause, Matthias Meyer, Nadin Rohland, Torsten Schöneberg, Helen Spriggs, Mathias Stiller & Michael Hofreiter. Multiplex amplification of ancient DNA. *Nature Protocols* 1, 720 - 728 (2006) Published online: 13 July 2006 doi:10.1038/nprot.2006.84
45. Li, S. H. et al. Huntington's disease gene (IT15) is widely expressed in human and rat tissues. *Neuron* 11, 985–993 (1993).
46. Andrew, S. E. et al. The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nature Genet.* 4, 398–403 (1993).
47. Duncan JA, Reeves JR, Cooke TG (October 1998). "BRCA1 and BRCA2 proteins: roles in health and disease". *Molecular pathology : MP* 51 (5): 237–47. doi:10.1136/mp.51.5.237
48. National Human Genome Institute. Advancing human health through genomics research. An Overview of the Human Genome Project. <http://www.genome.gov/12011239>

49. World Health Organisation. The Human Genetics Programme: a brief history.
<http://www.who.int/genomics/history/en/>
50. Genome unlocking life's code. TIMELINE OF THE HUMAN GENOME.
<https://unlockinglifescode.org/timeline>
51. Fleishmann, R.D. et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269, 496-512 (July 28, 1995).
52. Mayor, Susan (1999). "First human chromosome is sequenced". *BMJ* (BMJ Group) 319 (7223): 1453. doi:10.1136/bmj.319.7223.1453a. PMC 1117192. PMID 10582915. Retrieved 18 May 2013.
53. Website national Orphanet - punct de intrare. Despre boli rare.
<http://www.orpha.net/national/RO-RO/index/despre-boli-rare/>
54. Fanen P, Hasnain A (2001), [Cystic Fibrosis and CFTR Gene](#), Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.
55. Wraith JE, Scarpa M, Beck M et al. (March 2008). "Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy". *Eur. J. Pediatr.* 167 (3): 267–77. doi:10.1007/s00431-007-0635-4
56. Grabowski GA. Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease. *Lancet*. 2008 Oct 4. 372(9645):1263-71.
57. Mehta, A.; Ricci, R.; Widmer, U.; Dehout, F.; Garcia de Lorenzo, A.; Kampmann, C.; Linhart, A.; Sunder-Plassmann, G.; Ries, M.; Beck, M. (March 2004). "Fabry disease defined: baseline clinical manifestations of 366 patients in the Fabry Outcome Survey". *European Journal of Clinical Investigation* 34 (3): 236–42. doi:10.1111/j.1365-2362.2004.01309.x
58. "Type II Glycogen Storage Disease". The Association for Glycogen Storage Disease. Retrieved 22 May 2012.
59. Krasnewich DM, Sidransky E. The lysosomal storage diseases. In: Goldman L, Schafer AI, eds. *Goldman's Cecil Medicine*
60. Ala A, Walker AP, Ashkan K, Dooley JS, Schilsky ML (2007). "Wilson's disease". *Lancet* 369 (9559): 397–408. doi:10.1016/S0140-6736(07)60196-2.
61. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide Database. *The Journal of Gene Medicine*. Wiley (January 2014).
62. Simonelli, F.; Maguire, A. M.; Testa, F.; Pierce, E. A.; Mingozzi, F.; Benniselli, J. L.; Rossi, S.; Marshall, K.; Banfi, S.; Surace, E. M.; Sun, J.; Redmond, T. M.; Zhu, X.; Shindler, K. S.; Ying, G. S.; Ziviello, C.; Acerra, C.; Wright, J. F.; McDonnell, J. W.; High, K. A.; Bennett, J.; Auricchio, A. (2009). "Gene Therapy for Leber's Congenital Amaurosis is Safe and Effective Through 1.5 Years After Vector Administration". *Molecular Therapy* 18 (3): 643–650. doi:10.1038/mt.2009.277
63. Coghlan, Andy (26 March 2013) Gene therapy cures leukaemia in eight days. *The New Scientist*. Retrieved 15 April 2013
64. Lewitt, P. A.; Rezaei, A. R.; Leehey, M. A.; Ojemann, S. G.; Flaherty, A. W.; Eskandar, E. N.; Kostyk, S. K.; Thomas, K.; Sarkar, A.; Siddiqui, M. S.; Tatter, S. B.; Schwalb, J. M.; Poston, K. L.; Henderson, J. M.; Kurlan, R. M.; Richard, I. H.; Van Meter, L.; Sapan, C. V.; Doring, M. J.; Kaplitt, M. G.; Feigin, A. (2011). "AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: A double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial". *The Lancet Neurology* 10 (4): 309–319. doi:10.1016/S1474-4422(11)70039-4

9. CONSIDERAȚII ASUPRA HETEROGENITĂȚII CLINICO-MORFOLOGICE, IMUNOHISTOCHIMICE ȘI GENETICE A LEZIUNILOR MAMARE MALIGNE

✍ Adrian Dumitru, Mircea Tampa, Clara Matei, Simona-Roxana Georgescu, Anca Lăzăroiu, Mariana Costache, Maria Sajin

Cancerul mamar este o cauză principală de mortalitate la sexul feminin, fiind raportate, anual, peste 521000 de decese în întreaga lume. De asemenea cancerul mamar este de departe cea mai frecventă tumoră malignă diagnosticată la femeile din România, reprezentând peste 7000 cazuri noi diagnosticate și aproximativ 4000 de decese în anul 2014. Incidența cancerului mamar este de 58/100000 locuitori iar mortalitatea de 26/100000 în populația de sex feminin. Incidența cancerului mamar continuă să crească ușor în fiecare an, mortalitatea nu s-a modificat însă foarte mult în ultimii 20 de ani, menținându-se extrem de ridicată (60- 70 %).

Deși se consideră că neoplasmelor mamare maligne sunt vindecabile în proporții importante în stadiile inițiale, teama de diagnostic, ignoranța, lipsa unei educații sanitare continue și temeinice, numărul mic de laboratoare de anatomie patologică, lipsa unor programe de screening la nivel național fac ca în România diagnosticarea tumorilor mamare să se facă în stadii avansate (III – IV), când beneficiile tratamentului sunt reduse iar costurile foarte mari. În multe cazuri tratamentul este doar paliativ, în aceste condiții suferința fiind imensă atât pentru pacientă cât și pentru aparținători.

La diagnosticul întârziat participă și lipsa studiilor epidemiologice la nivel național precum și datele insuficiente privind factorii de risc, în special cei genetici cu rol în fiziopatogenia cancerului mamar. S-a constatat la nivel mondial că genetica cancerului mamar este extrem de polimorfă în ceea ce privește pattern-ul mutațional al genelor implicate în apariția, progresia și expansiunea neoplasmelor mamare maligne.

În ultimul timp, abordarea diagnostică și terapeutică a neoplasmelor mamare maligne s-a schimbat foarte mult, ca urmare apariției unor studii științifice ce oferă rezultate valide care fac lumina, cel puțin în parte, asupra mecanismelor patogene la nivel genic responsabile de apariția cancerului mamar. În acest sens, cancerul mamar este considerat ca fiind un ansamblu de alterări heterogene, individualizate prin diferențe la nivel molecular, histopatologic, imunohistochimic și nu în ultimul rând, clinic. Factorii prognostici larg acceptați ca având valoare predictive sunt: vârsta, istoricul familial, gradul de diferențiere tumorală, tipul histologic, dimensiunea tumorii, statusul limfoganglionilor, prezența sau absența metastazelor, expresia receptorilor hormonală (receptorul estrogenic și receptorul progesteronic), rata sau indexul mitotic obiectivat imunohistochimic prin Ki67(Mib1), expresia receptorului 2 al factorului de creștere epidermic (EGFR/HER2/neu), invazia vasculară, limfatică și perineurală precum și focalitatea sau multicentricitatea tumorii.

Clasificarea tumorilor mamare maligne ține seama și de statusul receptorilor hormonală. Acesta are rol extrem de important în managementul terapeutic, pacientele cu tumori hormone-sensibile putând beneficia de terapia hormonală care s-a dovedit a prelungi semnificativ supraviețuirea. Din păcate există un procent important de paciente care au tumori cu receptori

hormonali pozitivi nu răspund la hormonoterapie per primam chiar din momentul inițierii acestuia, acest fenomen purtând denumirea de rezistență intrinsecă. O altă categorie de paciente dezvoltă în timp rezistență la tratamentul hormonal, astfel încât abordarea terapeutică devine problematică. Aceste cazuri, care nu răspund la terapeutic convențional au condus, inevitabil, la necesitatea identificării unor noi markeri prognostici valizi și predictivi, care să faciliteze un management personalizat al tratamentului curativ sau paliativ.

O altă problemă stringentă este diagnosticul și conduita terapeutică a cazurilor de cancer mamar ereditar. Chiar dacă acest tip particular de cancer mamar este relativ rar întâlnit în România (probabil și din cauza subdiagnosticării) există pe piață teste diagnostice ce implică tehnici complexe de genetică moleculară precum secvențierea genică, care însă au adresabilitate scăzută în rândul populației generale în principal datorită costurilor ridicate.

În prezent, majoritatea direcțiilor de cercetare se axează pe studierea expresiei genice a tumorilor mamare, a celulelor stem tumorale precum și a micromediului tumoral. Profilul genetic a stat la baza propunerii unei noi clasificări ce ține seama de aspectele moleculare, cu impact direct pentru stabilirea prognosticului și alegerea unui tratament individualizat.

Este esențial să menționăm că stabilirea clasificării moleculare a tumorilor mamare maligne se face în raport de diferențierea liniilor celulare component aflate în structurile histologice ale glandei mamare; fenotipul unui subtip molecular reflectând fenotipul celulei de origine din unitatea ducto-lobulară terminală (TDLU – terminal ducto-lobular unit). Aceasta din urmă este structura morfo-funcțională principală a glandei mamare.

Din punct de vedere histologic glanda mamară este considerată o glandă sudoripară modificată având o structură de tip tubulo-alveolar compus, fiind formată din lobi separați de țesut conjunctivo-adipos. În fiecare lob, există o componentă secretorie alveolară ce se continuă cu un sistem complex de ducte intralobulare care, anastomozându-se, formează ductele interlobulare și în final canalele galactofore. Acestea din urmă au o deschidere proprie ce se realizează printr-un sinus lactifer, la nivelul mamelonului. Elementele celulare secretorii și ductele sunt structuri tubulare formate dintr-un epiteliu bistratificat compus la rândul său dintr-un strat intern, continuu, format din celule epiteliale care delimitează lumenul (celule luminales) și un strat extern, deseori discontinuu, format din celule mioepiteliale în contact cu membrana bazală (frecvent denumite celule bazale). De asemenea celule luminales au polaritate prezentând joncțiuni intercelulare la nivel apical și latero-bazal precum și cu membrana bazală subiacentă.

Din punct de vedere al biomarkerilor moleculari, celulele epiteliale luminales exprimă imunohistochimic citokeratinele de tip 8, 18 și 19, iar celule mioepiteliale se pozitivează la citokeratinele de tip 5/6, 14 și 17. Diferența de expresie a citokeratinelor nu este absolută, existând posibilitatea ca celulele luminales să exprime imunohistochimic citokeratine considerate ca fiind caracteristice celulelor mioepiteliale, alături de alți markeri specifici precum TP63, actina mușchiului neted, vimentina, CD10 și proteina S-100.

Unitatea ducto-lobulară terminală (TDLU) este hormone-sensibilă, iar elementele ei histo-architecturale suferă modificări odată cu fluctuațiile hormonale ale ciclului ovarian sau în mod iatrogen, după administrarea unei terapii hormonale substitutive sau în scop terapeutic. Sub influența progesteronului, în două jumătăți a ciclului ovarian, celulele epiteliale ale TDLU proliferază, determinând astfel apariția unei activități secretorii care va duce la telescoparea și lărgirea lumenelor structurilor tubulare glandulare. Țesutul conjunctiv interlobular devine mai lax și își mărește volumul datorită acumulării de fluid și glicozaminoglicani. În sarcină și în timpul lactației, glanda mamară își modifică semnificativ dimensiunile datorită proliferării structurilor alveolare printr-un proces de înmugurire în zonele distale ale ductelor terminale.

Prezența celulelor stem și a telocitelor de la nivelul glandei mamare a fost documentată prin numeroase studii experimentale umane și murine. Capacitatea celulelor stem de a iniția noi linii celulare explică, cel puțin în parte, variațiile histologice, arhitecturale și fiziologice ale glandei mamare odată cu înaintarea în vârstă. Deși incomplet definit, profilul imunohistochimic pentru celulele stem mamare include citokeratine 19/14, CD 44, CD 24, EpCAM, CD49f și SSSEA-4, CD133, Sox2, CK5, beta-1 integrin/CD29. Cu toate că există ipoteze conform cărora ar exista o subpopulație de celule tumorale cu caracteristici de celule stem cu rol semnificativ în inițierea și promovarea carcinogenezei, datele existente la ora actuală sunt contradictorii. În literatura de specialitate clasificarea moleculară a cancerului mamar cuprinde următoarele 3 subtipuri moleculare principale: luminal A, luminal B, bazal-like/triplu negative. Unii autori acceptă și tipurile cu supraexpresia HER2 și normal-like ca fiind subtipuri moleculare, particulare, de sine stătătoare. Aceasta paletă largă a expresiei biomarkerilor se pare că rezidă în celule stem diferite de la nivelul glandei mamare explicând astfel, cel puțin parțial, heterogenitatea morfologică, histologică, imunohistochimică și moleculară a tumorilor mamare maligne.

Un rol crucial în cercetarea expresiei genetice a tumorilor mamare maligne l-a avut grupul condus de Prof. C. Perou, care alături de colaboratorii săi publică în anul 2000 un studiu privind semnătura genetică a cancerului mamar. Publicarea acestui studiu reprezintă momentul de referință pentru clasificarea ulterioară a cancerului mamar din punct de vedere molecular. Folosind teste genetice aplicate asupra a 65 de fragmente tisulare provenind de la 42 de paciente diagnosticate cu cancer mamar, autorii au reușit să „scaneze” peste 8000 gene, demonstrând că heterogenitatea fenotipică a tumorilor mamare maligne este asociată direct cu o diversitate a expresiei genice. Din toate genele evaluate a fost selectat un subset de 456 gene care reflectă proprietățile tumorale intrinseci. Una din contribuțiile majore ale studiului de la Stanford este definirea a două subgrupe principale care țin seama de expresia receptorului estrogenic, acesta având un rol discriminant esențial. În acest mod s-a postulat ideea, conform căreia cancerul mamar RE+ și respectiv RE- sunt două entități patologice diferite, chiar dacă, de cele mai multe ori trăsăturile histopatologice sunt similare. Autorii au propus introducerea a 4 subtipuri moleculare diferite: RE+ subtip luminal, RE- subtip Erb-B2 pozitiv, RE- subtip bazal-like, RE- subtip neclasificabil (normal-like). Ulterior, autorii au revenit la clasificarea inițială și au modificat denumirile primelor două subtipuri în subtipurile luminal A și respectiv luminal B, denumiri vehiculate și în clasificările actuale. Un lucru demn de menționat este că expresia subtipurilor genice este concordantă între tumorile primare și leziunile ulterioare metastatice apărute ani mai târziu. Acest lucru se întâmplă în majoritatea cazurilor, deși există studii recente care aduc argumente solide privind heterogenitatea expresiei receptorilor de ER, PR concretizate printr-un fenomen de mismatch între tumora primară și focarele tumorale adiacente sau metastazele secundare. Acest mismatch a fost observat cu precădere la carcinoamele mamare multifocale și multicentrice.

Cele 5 subtipuri moleculare postulate de Perou, Botstein și colaboratorii au fost confirmate în seturi de date independente, care au demonstrat că profilul molecular poate fi corelat cu mecanismele carcinogenezei, și anume: ținând cont de gradul histologic și potențialul metastatic, se pot identifica expresiile favorabile sau nefavorabile asociate prognosticului și răspunsului terapeutic. Așadar subtipul luminal A are perioada cea mai mare de supraviețuire, subtipurile basal-like și cu supraexpresia HER2+ au perioada cea mai scurtă, iar subtipul luminal B are o perioadă intermediară de supraviețuire.

Teste genetice utile pentru evaluarea heterogenității moleculare a tumorilor mamare maligne sporadice. „Semnătura genică” a cancerului mamar sporadic

În ceea ce privește testele genetice specifice care stabilesc profilul genetic al tumorilor mamare maligne, sunt disponibile pe piață o serie de teste ce evaluează un număr variabil de gene oferind un tablou complex al mutațiilor responsabile de apariția și perpetuarea procesului canceros. Printre cele mai des utilizate teste în SUA și Europa se numără: MammaPrint (70-gene assay) și Oncotype DX (21-gene RS assay), disponibile și în România.

MammaPrint - The 70-Gene Assay a fost primul test diagnostic aprobat Food și Drug Administration (FDA) din SUA încă din anul 2007. Testul este folosit în principal ca test diagnostic și prognostic ce se adresează femeilor sub 60 de ani cu istoric de cancer mamar sporadic (non-ereditar) RE+ sau RE-, fără afectare limfoganglionară. MammaPrint a fost conceput în cadrul Netherlands Cancer Institute și include 70 de gene cu valoare prognostică în cancerul mamar, având o valoare predictivă mai puternică comparativ cu criteriile clinice și histologice curente. Testul nu a fost conceput însă ca o metodă singulară de predicție a evoluției bolii, ci ca o anexă ce lărgeste imaginea de ansamblu asupra prognosticului bolii canceroase. Profilul genic identificat, numit colocvial și „*the Amsterdam signature*” are valoare de excelent predictor independent pentru supraviețuirea liberă de boală la distanță (recurențe) și supraviețuirea generală. Testul este extrem de practic și pentru aprecierea beneficiului chimioterapiei în asociere cu terapia hormonală. Materialul biologic utilizat în cadrul testării MammaPrint este ARNm izolat din eșantioane de țesut tumoral proaspăt, necesitând mostre congelate sau țesuturi păstrate în soluții tampon care asigură conservarea ARN-ului. De aici rezultă o serie de probleme tehnice care pot conduce la erori de interpretare ulterioare, cauza principală fiind degradarea ARN-ului în urma conservării sau manipulării probelor biologice. Aceste inconveniente au fost înlăturate parțial prin introducerea unor teste ce pot folosi material genetic extras din probe fixate în formaldehidă și incluse în parafină. Costul testului rămâne ridicat ceea ce-i limitează utilizarea pe scară largă în practica generală.

The 76-Gene Assay este un alt test genetic ce include un număr de 76 de gene (60 de gene pentru pacienții cu tumori mamare RE+ și 16 gene pentru pacienții cu tumori RE-), colocvial denumite drept „*semnătura genică*” sau „*the Rotterdam signature*”.

Testul are o sensibilitate de 93% și o specificitate de 48% în predicția apariției metastazelor pe parcursul unui interval de referință de 5 ani. Testul oferă indici prognostici puternici pentru pacientele cu carcinoame mamare ce apar atât în premenopauză, cât și în postmenopauză, cât și pentru tumorile de dimensiuni mici (T1 conform stadializării TNM). Tehnica de lucru, dezvoltată comercial de Veridex Corporation, se bazează pe evaluarea expresiei a 76 de gene și a fost validată în două trialuri multicentrice pe 400 paciente cu ganglioni axilari negativi care nu au beneficii de tratament sistemic adjuvant. Testul necesită de asemenea extracte purificate de ARNm proaspete sau congelate.

Testul HOXB13:IL17BR evaluează expresia raportului H:I dintre gena homeobox (HOXB13) și gena receptoare a interleukinei-17B (IL-17BR). Grupul de gene HOX sunt un grup complex de gene tip homeobox ce codifică factori de transcripție cu rol definitoriu în morfogeneza și în menținerea specificității țesutului. Se consideră că gena HOXB13 interacționează cu gena receptorului de estrogen, contribuind la, superexpresia sa, eveniment care se pare a fi trigger pentru rezistența dobândită la tamoxifen sau alte terapii hormonale echivalente. Rolul IL17BR în carcinogeneză nu este încă cunoscut, dar gena IL17BR este frecvent defectivă în cazul cancerului mamar. Valoarea prognostică a raportului HOXB13:IL17BR a fost validată

în mai multe trialuri clinice ca au arătat ca acest test este foarte util la predicția riscului de reapariție a cancerului de sân. Testul HOXB13:IL17BR (H/I) utilizează fragmente tisulare fixate în formol și incluse la parafină din care se extrag și purifică acizi nucleici supuși apoi unei analize RT-PCR cantitative.

Un alt test genetic este Oncotype DX - The 21-Gene RT-PCR bazat pe o metodă RT-PCR care permite cuantificarea expresiei genice în secțiuni de țesut tumoral fixat, inclus în parafină, așadar mult mai accesibil pentru practica curentă. Utilizarea acestei metode a condus la selectarea unui panel format din 5 gene de referință (ACTB – beta-actina, GAPDH, RPLPO, GUS, TFRC) și 16 gene incriminate de transformarea malignă (Ki-67/Mib1, STK15, survivină, CCNB1 - ciclină B1, MYBL2; MMP11 – stromolisină 3, CTSL2 – catepsină L2; gene HER2: GRB7, HER2; RE, RP, BCL2, SCUBE2; alte gene: GSTM1, CD68, BAG1). Aceste gene, introduse într-un algoritm, au permis calcularea unui scor de recurență aplicabil pentru fiecare caz în parte. Testul Oncotype DX este inclus în 4 ghiduri clinice majore: National Comprehensive Cancer Network (NCCN), European Society of Medical Oncology (ESMO), American Society of Clinical Oncology (ASCO) și ghidurile clinice de la St. Gallen Consensus 11. Trei dintre ele au inclus testul Oncotype DX pentru cancerul de sân în ghidurile lor clinice, ca o opțiune pentru a prezice dacă o pacientă beneficiază sau nu de pe urma chimioterapiei. ESMO recunoaște Scorul de Recurență al Oncotype DX ca pe un instrument de diagnostic folositor în obținerea de informații adiționale prognostice și/sau predictive în completarea analizei histopatologice și pentru a prezice răspunsul la chimioterapia adjuvantă, în special pentru pacienții cu cancer mamar ER +, în fază incipientă, fara afectare limfoganglionară. O analiză despre raportul cost-eficiența al testului Oncotype DX pentru cancerul mamar a arătat că terapia ghidată de Oncotype DX pentru cancerul de sân a fost asociată cu un câștig de 2,2 ani în speranța de viață a pacientei, în comparație cu terapia cu tamoxifen sau cu terapia cu tamoxifen combinat cu chimioterapie. Totuși, un impediment major în aprecierea calității acestui test este datorat faptului că nu a fost realizată încă o comparație între prognosticul de recurență apreciat prin profilul genetic și prognosticul de recurență apreciat prin metode convenționale, în cadrul aceleiași populații. Utilizarea lui extrem de largă Oncotype DX, mai ales în SUA, este explicată în principal prin faptul că poate fi practicat pe material biologic prelevat, fixat în formol și inclus în parafină. Testul a fost inclus în 2007 în ghidul de markeri tumorali al American Society of Clinical Oncology (ASCO), ca element de referință pentru predicția riscului de recurență și indicator pentru chimioterapie la pacientele cu CM RE+, fără afectare limfoganglionară, tratate anterior cu terapie adjuvantă.

Un alt test care evaluează semnătura genetica a 97 de gene este Testul MapQuant Dx™ Genomic Grade ce oferă posibilitatea stratificării pacientelor în 2 categorii: cu tumori low-grade și cu tumori high-grade. Acest test ar putea rezolva problema gradului intermediar (grad 2), putând orienta cazurile din aceasta categorie către cele două categorii principale high-grade sau low-grade într-un procent de 80% din cazurile evaluate.

Cancerul mamar ereditar. Genele BRCA1 și BRCA2 și rolul lor în oncogeneză

În ceea ce privește cancerul mamar ereditar, sunt disponibile pe piața mondială numeroase teste care evaluează riscul apariției carcinoamelor mamare ereditare, la pacientele cu istoric familial de cancer mamar sau ovarian și care prezintă mutații sau polimorfisme genetice considerate la risc la nivelul genelor BRCA1 și BRCA2. Primele teste apărute evaluau un număr restrâns de mutații și nu și-au dovedit eficiența, ulterior acestea au fost îmbunătățite astfel încât

genele respective sunt „scanate” exon cu exon ceea ce facilitează identificarea inclusiv a mutațiilor punctiforme sau a polimorfismelor de mici dimensiuni. În prezent testele pot identifica 90-95% dintre mutațiile cunoscute la nivelul BRCA1 și 2 și se pot depista altele noi. Testele necesită secvențiere pentru confirmare, ceea ce crește costul și scade adresabilitatea. În România astfel de teste nu sunt răspândite, datorită incidenței scăzute a carcinoamelor mamare ereditare. Unele studii sugerează o utilitate relativă și în evaluarea carcinoamelor mamare sporadice. O variantă mai puțin costisitoare este analiza homocatenelor și heteroduplex ADN prin SSCP (single strand conformation polymorphism), intens folosită mai degrabă în scop științific și mai puțin în scop diagnostic. Și această metodă necesită metode de validare.

Tehnicile SSCP și AH (analiza heteroduplexurilor) sunt utile pentru detectarea unor diferențe minime ale secvențelor ampliconilor (polimorfisme determinat de substituția sau deleția/insertia unei nucleotide). Aceste metode se bazează pe diferențele de conformație pe care le adoptă catenele mutante și cele normale în anumite condiții particulare. Structurile secundare formate depind de dimensiunea ampliconilor, de compoziția în baze azotate și de natura polimorfismului. Conformerii au o mobilitate electroforetică diferită în condițiile unui gel nedendurat. Analiza combinată SSCP și HA are o eficiență crescută de detecție a polimorfismelor și dezavantajele ambelor tehnici sunt mult mai reduse.

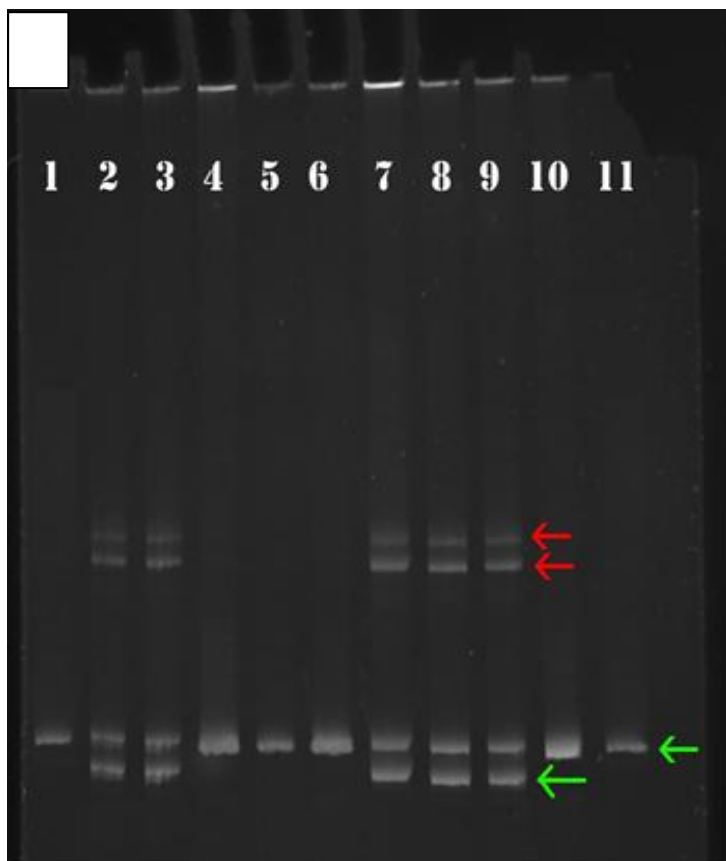


Fig. 1. Exemplu de analiză prin metoda combinată SSCP-AH a exonului 11 al genei BRCA1. Gel de poliacrilamidă 8% în care au fost încărcăți ampliconii denaturați ai exonului 11 (gelul a fost colorat cu EtBr). Probele 2,3,7,8,9 prezintă un pattern de migrare care diferă de patternul celorlalte probe (la nivelul monocatenelor indicate prin săgeți roșii și homoduplexurile indicate prin săgeți verzi). La retestarea probelor s-a obținut un pattern similar de benzi. Prezența acestor benzi suplimentare și poziția lor sugerează existența unei mutații de tip deleție la nivelul exonului 11 al genei BRCA1. Validarea prin secvențiere a confirmat existența unei deleții de 52 perechi de baze azotate.

Sindromul cancerului ereditar de sân și de ovar (HBOC = hereditary breast-ovarian cancer syndrome) are la bază o predispoziție genetică de a dezvolta cancer și se caracterizează prin:

- existența într-o familie a mai multor cazuri de cancer mamar, ovarian sau a ambelor forme;

- asocierea la aceeași persoană a ambelor forme de cancer;
- cancer mamar cu debut precoce.

Deși cele mai multe cazuri de cancer mamar și ovarian nu sunt moștenite, aproximativ 3-5% dintre cancerele de sân și 10% dintre cancerele de ovar sunt încadrate în HBOC. Numeroasele studii efectuate au arătat că mutațiile genelor BRCA1 și BRCA2 care afectează linia germinală sunt responsabile de marea majoritate a cancerelor ereditare de sân și ovar. BRCA1 (Breast Cancer 1 Gene) și BRCA2 (Breast Cancer 2 Gene) sunt gene supresoare ale tumorilor care codifică proteine cu rol în procesele de reparare a ADN-ului. Au fost comunicate peste 1200 mutații ale genei BRCA1 și peste 1300 mutații ale genei BRCA2. Deși persoanele cu HBOC moștenesc o alela BRCA1 sau BRCA2 defectuoasă de la unul dintre părinți, aceștia prezintă o a doua alelă funcțională; în cazul în care și cea de-a doua alelă devine nefuncțională se dezvoltă procesul neoplazic, prin acumularea de mutații adiționale. Se estimează că prevalența mutațiilor BRCA în populația generală este de 1/300 – 1/800. În populațiile întemeiate de un grup ancestral mic, anumite mutații BRCA1 sau BRCA2 se pot întâlni mai frecvent și sunt denumite „mutații fondatoare”. Aceste tipuri de mutații au fost identificate predominant la evreii Ashkenazi (din Europa de Est), canadienii de origine franceză și la islandezi.

Gena BRCA1 localizată la nivelul brațului lung al cromozomului 17 (mai exact 17q21) este formată din 24 de exoni și codifică o proteina formată din 1863 de aminoacizi. Intronii acestei gene au dimensiuni cuprinse între 403 și 9.2 kilobaze și conțin 3 markeri intragenici microsateliți localizați la nivelul intronilor 12, 19 și 20. Proteina BRCA1 este o fosfoproteină nucleară cu rol foarte important în menținerea stabilității genomice și în supresia tumorală. Împreună cu alte proteine supresoare ale tumorilor sau cu rol în transmiterea semnalului celular, formează un complex cu subunități multiple denumit BASC (BRCA1-associated genome surveillance complex). De asemenea se asociază cu ARN polimeraza II intervenind astfel în transcripție, dar și în recombinare și repararea ADN-lui dublu catenar.

Acronimul BRCA1 a avut inițial semnificația de Berkeley-California, după universitatea în ale cărei laboratoare a fost inițial izolată și studiată la începutul anilor '90. Ulterior după clarificarea funcțiilor sale s-a decis oficial ca BRCA1 să fie prescurtarea de la breast cancer type 1 susceptibility protein (proteina 1 de susceptibilitatea a cancerului mamar). Gena a fost pentru prima dată clonată în anul 1994 de cercetătorii de la Myriad Genetics. Mutațiile genei BRCA1, ce conduc la erori în replicarea ADN-ului și proliferarea necontrolată a celulelor epiteliale, sunt răspunzătoare de aproximativ 40% din cazurile de cancer mamar ereditar și mai mult de 80% din cazurile de cancer mamar și ovarian ereditare.

Splicing-ul alternativ deține rol important în modularea localizării moleculare și funcționarea normală a genei BRCA1. Au fost descrise mai multe variante de produși de transcripție unele fiind asociate cu mutații cauzatoare de boală. A fost identificată și o pseudogenă, localizată tot pe cromozomul 17. În literatura de specialitate este specificat ca această regiune de pe cromozomul 17 conține o duplicație în tandem (YBRCA1), de aproximativ 30kb, care duce la apariția a două copii a exonilor 1 și 2 ai BRCA1 și ale exonilor 1 și 3 ai genei adiacente denumita 1A1-3B, precum și a unei regiuni intergenice de 295 perechi de baze. Prin secvențiere s-a demonstrat că acești exoni duplicați constituie pseudogene neprocesate. Aceste constatări pot nu numai să îngreuneze analiza mutațiilor BRCA1, ci par să aibă și implicații asupra reglării normale sau anormale a transcripției, translației și funcției BRCA1.

Mutațiile genei BRCA1 se caracterizează prin apariția prematură a codonilor STOP la nivelul cadrului de citire (open reading frame, ORF), produsul rezultat fiind o proteină trunchiată, incompletă, nefuncțională sau cu funcții aberante. Cele mai frecvente mutații sunt 185delAG și 5385insC prezente în procent de 1%, respectiv, 0.15% la evreii Ashkenazi. Au fost identificați mii de purtători ai deleției 185delAG, care determină apariția codonului STOP după inserarea aminoacidului 39 din secvența proteică, rezultând astfel o structură proteică incompletă. O mutație asemănătoare este 188del11 care schimbă cadrul de citire în exonul 3 (la nivelul codonilor 39 și 36), rezultând de asemenea o proteină trunchiată. Un alt element caracteristic al genei BRCA1 îl constituie secvențele Alu repetitive. Au fost identificate 45 de rearanjări genetice, care includ deleții și duplicații într-unul sau mai mulți exoni. Genomul uman conține peste 1 milion de copii de elemente Alu (un element la fiecare 5kb), care aparent mediază rearanjările cromozomiale și recombinarea omoloagă, rezultând duplicații, inversii sau deleții. Aproximativ 41.5% din secvențele intronice ale genei BRCA1 sunt constituite din elemente Alu, privite de multe ori ca factori genetici de instabilitate.

Deși sunt prezente numeroase elemente repetitive, rearanjările sunt mai puțin frecvente la nivelul genei BRCA2. Situată pe cromozomul 13 (13q12-q13) gena codifică o proteină de 390 kDa. Gena are 27 exoni, cel mai mare exon fiind, ca și în cazul genei BRCA1, exonul 11. Inițierea transcripției are loc la nivelul exonului 2, gena fiind foarte bogată în nucleotide AT. BRCA2 funcționează tot ca o proteină de reparare a ADN-ului prin interacțiunea cu RAD 51 (proteină supresoare tumorală, codificată de gena cu același nume). Prin examinarea modificărilor posttranslaționale ale BRCA2, s-a stabilit că proteina este hiperfosforilată de Polo-like kinaza 1 (PLK1) în metafază și defosforilată când celula iese din metafază și intra în interfază. RAD 51 interacționează cu domeniul carboxi terminal al BRCA2 și cu o secvență unică de aminoacizi care se repetă de 8 ori în regiunea centrală a BRCA2. Îndepărtarea acestei regiuni duce la inhibarea apoptozei (BRCT fiind implicată în apoptoza pe calea caspazei). Majoritatea mutațiilor sunt alterări ale cadrului de citire și mutații non-sens localizate în exonul 11, cea mai frecventă fiind mutația 6174delT întâlnită cu o frecvență de aproximativ 1% în populația evreilor Ashkenazi.

Funcțiile genei BRCA1

Produsul proteic al genei BRCA1 are principala funcție de a repara breșele care apar în structura dublu catenară a ADN. Catenele din structura dublului helix de ADN sunt supuse permanent factorilor deterioranți, care rup fie o catenă, fie ambele catene creând o breșă în structura primară a ADN-ului. Când ambele catene sunt rupte, pentru multiplele mecanisme de reparație a ADN-ului este dificil să „știe” unde să intervină astfel încât să înlocuiască sau să repare secvența ADN deteriorată. Proteina BRCA1 recunoaște aceste secvențe deteriorate și le repară folosindu-se de mecanismul recombinării omoloage. Practic proteina BRCA1 utilizează secvența intactă de pe cromatida sora sau de pe cromozomul omolog (în funcție de faza ciclului celular în care se afla celula) drept matriță pentru sintetizarea sau înlocuirea secvenței lipsă. Multiple proteine BRCA1 participă la acest proces, interacționând în același timp și cu alte proteine cu funcții asemănătoare, toate adunate la nivelul sitului de reparație.

În nucleul multor tipuri de celule, proteina BRCA1 interacționează cu RAD51 în timpul reparării ADN. Tot cu RAD51 interacționează și proteina BRCA2, cu funcții asemănătoare genei BRCA1. Prin influențarea proceselor de reparație a materialului genetic, aceste trei gene și produșii lor de sinteză au un rol esențial în menținerea stabilității genomului uman.

Proteina BRCA1 se leagă direct la structura primară a ADN, cu mare afinitate pentru situsurile în care catenele prezintă rupturi. Abilitatea proteinei BRCA1 de a se lega direct de ADN explică funcția acesteia de a inhiba activitatea nucleazică atât a proteinei Mre11 cât și a întregului complex MRN (complex proteic heterotrimeric format din Mre11, Rad50 și Nbs1) De asemenea tot astfel poate fi explicată și fidelitatea cu care BRCA1 repară breșele apărute în structura acizilor nucleici. Tot un rol important al BRCA1 este și capacitatea acestei proteine de a interacționa cu γ -H2AX (histona H2AX fosforilată la nivelul serinei din poziția 139) la nivelul situsurilor de reparație a ADN, indicând astfel că proteina BRCA1 are și un rol important în recrutarea altor factori care contribuie la repararea catenelor ADN distruse.

Semnificația clinică a mutațiilor genelor BRCA1 și 2

Celulele care nu au proteinele normale BRCA1 și BRCA2 acumulează anomalii cromozomiale: rupturi, aneuploidii severe etc. Instabilitatea cromozomială generată poate constitui baza patogenică a dezvoltării tumorilor mamare.

La femeile care moștenesc o mutație inactivatoare, deficitul unei proteine BRCA este critic pentru apariția bolii, fiind generat atât de alela inactivată moștenită, cât și de pierderea somatică a alelei sălbatice în celulele epiteliale mamare sau ovariene. În plus s-a constatat că expresia genelor este suprareglată în timpul pubertății și sarcinii, fiind asociată cu creșterea secreției de estrogeni; această observație sugerează că estrogenii ar putea stimula expresia BRCA1 și/sau BRCA2. A fost propus și un model de tumorigeneza la femeile purtătoare de mutații BRCA ale liniei germinale: la pubertate, ca urmare a nivelului crescut de estrogeni, celulele epiteliale ale glandei mamare proliferază rapid.

Prezența unei mutații BRCA inactivatoare în contextul unei replicări crescute reduce mult capacitatea de reparație a ADN-ului și crește frecvența alterărilor genomice. Majoritatea celulelor care prezintă ambele tipuri de mutații nu supraviețuiesc în ciclul celular următor datorită incapacității de reparație a ADN-ului, însă în cazul în care se produc mutații adiționale la nivelul unor gene care controlează ciclul celular („checkpoint genes”), unele celule „BRCA-nule” se immortalizează și pot constitui punctul de plecare în dezvoltarea tumorilor maligne mamare și ovariene.

Penetranța mutațiilor BRCA1 și BRCA2, definită ca probabilitatea de a dezvolta cancer atunci când este prezentă o mutație, este variabilă, fiind influențată probabil de etnicitate, vârstă, tipul de cancer.

În tabelul de mai jos este prezentat riscul cumulat de cancer de sân, în funcție de decada de viață, la femeile purtătoare de mutații BRCA1 sau BRCA2, provenite din familiile cu risc crescut (Tabelul 1).

Tabel 1. Riscul cumulat de cancer mamar, în funcție de vârstă

Riscul cumulat de cancer mamar, în funcție de vârstă		
Vârsta	Risc cumulat	
	BRCA1	BRCA2
30 ani	3.2%	4.6%
40 ani	19.1%	12%
50 ani	50.8%	46%
60 ani	54.2%	61%
70 ani	85%	86%

Cancerul mamar la bărbați a fost observat în familiile cu mutații BRCA2, unele dintre acestea prezentând în exclusivitate afectarea persoanelor de sex masculin. Într-un studiu efectuat pe 26 familii care au prezentat cel puțin un caz de cancer de sân la bărbați, 77% din subiecți au avut o asociere cu mutații BRCA2. Dacă însă nu s-a luat în considerare istoricul familial, prevalența mutațiilor BRCA2 la nivelul celulelor liniei germinale la pacienții cu cancer mamar a fost de numai 4-14% . Pentru bărbații cu mutații BRCA2 riscul cumulat de cancer mamar până la vârsta de 80 ani a fost estimat la 6.9%.

La femeile cu mutații BRCA1 sau BRCA2 riscul de cancer ovarian este de 39-46% și, respectiv, de 12-20%. Cancerul ovarian prezintă un fenotip histologic distinct la această categorie de pacienți, înregistrându-se în principal tumori seroase sau endometrioid de grad înalt.

În afara cancerului ereditar de sân și ovar mutațiile BRCA1 și BRCA2 pot fi asociate și cu alte forme de cancer. Astfel, s-a estimat ca riscul de cancer de prostata este de 3 ori mai mare la bărbații purtători de mutații BRCA1 în comparație cu populația generală. Mai mult, cazuri de cancer de pancreas, prostată, esofag, laringe, stomac, colon, vezica biliară, duct biliar, melanom au fost raportate în familiile cu mutații BRCA2 ce predispun la cancer. De asemenea în anemia Fanconi s-a constatat inactivarea bialelică a BRCA2.

Testarea genetică este importantă în practica clinică pentru identificarea persoanelor care prezintă un risc semnificativ de cancer de sân sau de ovar și aplicarea strategiilor adecvate de screening și prevenție.

În cazul unui rezultat pozitiv pentru mutațiile BRCA1 și BRCA2 ale liniei germinale la o persoană cu risc crescut, este necesar ca medicul/geneticianul să furnizeze toate informațiile cu privire la opțiunile de monitorizare, screening, chimioprofilaxie sau chirurgie profilactică disponibile; trebuie să se ia obligatoriu în considerare implicațiile psihologice și familiale.

Asociația Medicilor Ginecologici-Ostetricieni din SUA recomandă ca în cazul purtătoarelor de mutații BRCA1 sau BRCA2 să se efectueze un examen clinic bianual al sânilor împreună cu o mamografie și un RMN al glandei mamare anual, începând cu vârstă de 25 ani. Rezonanța magnetică este o metodă mai sensibilă decât mamografia pentru detecția cancerului mamar.

Studii preliminare au arătat ca chimioprofilaxia cu Tamoxifen poate reduce cu 62% riscul de cancer mamar la femeile purtătoare de mutații BRCA2 ,dar nu și la cele de mutații BRCA1 (deoarece incidența tumorilor mamare estrogen- pozitive este redusă în cazul asocierii mutației BRCA1.

Chirurgia profilactică cu mastectomie bilaterală reduce riscul cancerului mamar cu peste 90-95% în funcție de procedura aplicată.

Salpingo-ovarectomia profilactică reduce riscul de cancer mamar cu 40-70% dacă se aplică femeilor aflate la premenopauza. Protecția față de cancerul mamar este mai mare în cazul femeilor purtătoare de mutații BRCA2.

Screening-ul și prevenția cancerului ovarian: deși are o valoare limitată în depistarea precoce a tumorilor ovariene, se recomandă dozarea periodică (la 6 luni) a marker-ului CEA125 în asociere cu ecografia transvaginală la persoanele cu mutații BRCA1 sau BRCA2, începând cu vârsta de 30-35 ani.

Efectul de fondator al mutațiilor genei BRCA1 și spectrul mutațional în diferite grupuri populaționale

Toate mutațiile genei BRCA1 de la nivelul celulelor liniei germinale identificate până în prezent sunt moștenite sugerând posibilitatea unui efect de fondator prin care o anumită mutație este caracteristică unui grup populațional bine definit. Din punct de vedere teoretic acea mutație

poate fi urmărită retrospectiv, existând posibilitatea identificării ancestorului comun. Dată fiind complexitatea și enorma tipologie a mutațiilor care afectează gena BRCA1, consecințele efectului de fondator pot fi folosite pentru screening-ul țintit al celor mai frecvente mutații identificate într-o anumită populație. Analiza celor mai frecvente mutații dintr-un grup populațional permite și studierea expresiei lor clinice.

Mutațiile caracteristice genei BRCA1 care afectează diferite populații ale globului sunt prezentate în tabelul următor (Tabelul 2):

Tabel 2. Mutațiile caracteristice genei BRCA1 pentru diferite populații ale globului

Mutațiile caracteristice genei BRCA1 pentru diferite populații ale globului	
Populație sau subgrup populațional	Mutații BRCA1 caracteristice
Afro-americani	943ins10, M1775R
Evrei Ashkenazi	185delAG, 188del11, 5382insC
Austrieci	2795delA, C61G, 5382insC, Q1806stop
Belgieni	2804delAA, IVS5+3A>G
Olandezi	deleție Exon 2, deleție exon 13, 2804delAA
Finlandezi	3745delT, IVS11-2A>G
Francezi	3600del11, G1710X
Canadieni	C4446T
Germani	5382insC
Greci	5382insC
Unguri	300T>G, 5382insC, 185delAG
Italieni	5083del19
Japonezi	L63X, Q934X
Nativi nord-americani	1510insG, 1506A>G
Irlandezi	2800delAA
Norvegieni	816delGT, 1135insA, 1675delA, 3347delAG
Pakistanezi	2080insA, 3889delAG, 4184del14, 4284delAG
Polonezi	300T>G, 5382insC, C61G, 4153delA
Ruși	5382insC, 4153delA
Scoțieni	2800delAA
Sud -africani	E881X
Spanioli	R71G
Suedezi	Q563X, 317ins5, 1201del11, 2594delC

Pentru populația din Europa Centrală, Nordică și de Est cele mai multe mutații ale genei BRCA1 se găsesc la nivelul exonilor 11 (55%), 2 (10%) și 20. (Figura 2)

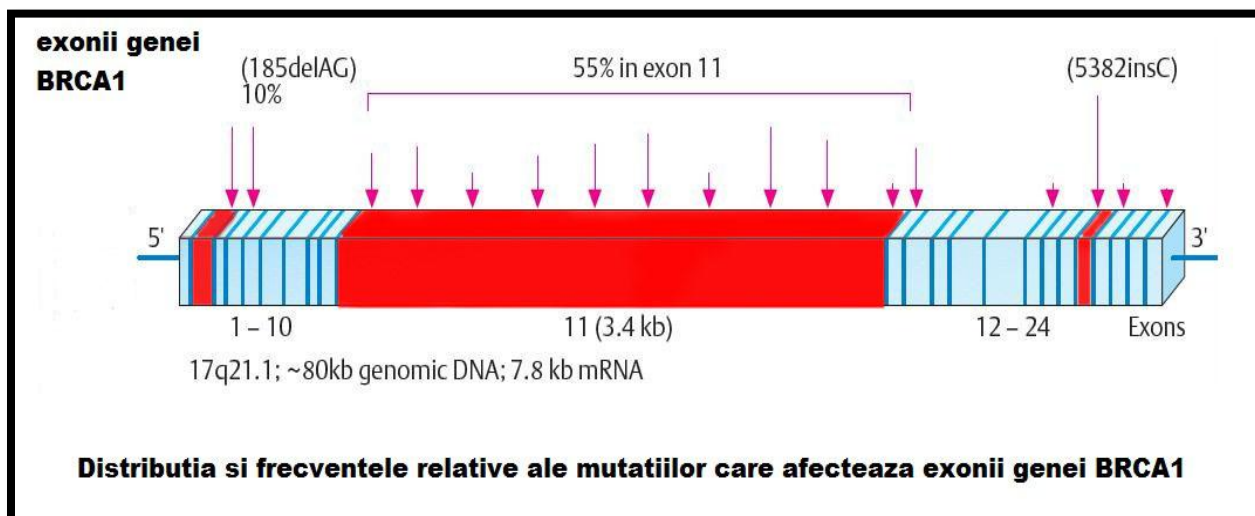


Fig. 2. Secvența exonilor în gena BRCA1 [sursa: www.research.nhgri.nih.gov, modificată]

Pentru populația din România nu s-au făcut studii epidemiologice extinse în acest sens, ci doar la nivel local pe un număr limitat de pacienți, așadar rezultatele obținute nu pot fi extrapolate pentru întreaga populație a României.

Testele genetice, fie ele aplicate asupra pacienților cu cancer mamar sporadic sau ereditar au confirmat conceptul de heterogenicitate moleculară a tumorilor mamare maligne. Dat fiind faptul ca numărul de studii dedicate cercetării aprofundate a profilului molecular al cancerului mamar este în creștere, ne putem aștepta în viitorul apropiat la schimbări majore referitoare la subtipurile moleculare sau chiar schimbarea unor paradigme în ceea ce privește patogeniza bolii canceroase.

Heterogenitatea imunohistochimică a tumorilor mamare maligne

În practica medicală curentă evaluarea semnăturii genetice a pacienților cu cancer mamar nu se face în mod curent, în principal datorită costurilor ridicate. Din acest motiv exista nevoia imperioasă a unor metode complementare mai simple și mai puțin costisitoare care să reproducă cel puțin parțial rezultatele excelente pe care le ofera testele genetice precum MammaPrint, Oncotype DX etc.

Imunohistochimia a oferit oportunitatea identificării unor caracteristici moleculare tumorale care au valoarea de biomarkeri „surogat”, în corespondență sau completând profilul molecular. Astăzi, tehnica imunohistochimică a markerilor surogat permite încadrarea în cele 5 subtipuri majore definite conform clasificării moleculare, deși există unele neconcordanțe în raport taxonomia clasificării (de exemplu tumorile HER2+ care sunt și RE+).

Markerii imunohistochimici „surogat” nu permit încă o clasificare întru totul suprapusă peste clasificarea semnăturii genetice. Cu toate acestea, definirea subtipurilor moleculare în concordanță cu markerii imunohistochimici ajută la determinarea tratamentului optim și a unui prognostic valid.

Subtipurile de cancer mamar, corespunzătoare clasificării moleculare țin seama de expresia imunohistochimică a 3 markeri: receptorul pentru estrogen (RE), receptorul pentru progesteron (RP) și Her2neu. Desigur, diagnosticul final necesită prelucrarea prin tehnica colorației clasice cu hematoxilină-eozină precum și folosirea altor colorații speciale sau imunohistochimice care să traseze diagnosticul final în conformitate cu criteriile OMS actuale pentru diferitele tipuri histologice de tumori mamare maligne. Există 5 subtipuri moleculare de carcinoame mamare: subtipul luminal A, luminal B și un al treilea subtip – luminal C, identificat mai recent sunt pozitive la RE. Celelalte 2 subtipuri sunt: Her2+ și basal-like sau triplu negative, ambele nefiind pozitive la ER.

Subtipul luminal A

Carcinoamele mamare subtip luminal A (profilul imunohistochimic este RE+/RP+/Her2) are un nivel foarte înalt de expresie a genelor RE și a genelor asociate estrogenului (NAT1, ESR1, GATA3, FOXA1), genele care coordonează proliferarea fiind mai puțin active astfel încât se corelează cu o instabilitate genomică relativ scăzută. Imunohistochimic nu exprimă HER2/neu, ceea ce-l deosebește de subtipul luminal B. De asemenea este caracterizat prin grad histologic scăzut, celulele fiind bine diferențiate, indexul mitotic obiectivat imunohistochimic prin Ki67 este redus iar scorul Nottingham este mai mic (modificarea Elston-Ellis a scorului pentru gradarea carcinoamelor mamare Scarff-Bloom-Richardson). În concluzie acest subtip molecular este mai puțin agresiv, are un prognostic mai bun. Prevalența aproximativă a acestui subtip de cancer mamar este de 40%.

Subtipul Luminal B

Carcinoamele mamare cu subtipul luminal B (profilul imunohistochimic RE+/RP+/Her2+) au o prevalență de aproximativ 20% și exprimă în plus suplimentar o serie de gene ce codifică factori de transcripție responsabili de proliferare și de ciclul celular. De asemenea acest subtip molecular prezintă mutații genetice suplimentare, ceea ce-l face mai puțin stabil genetic, lucru care se traduce printr-un fenotip mai agresiv. Carcinoamele mamare de acest subtip prezintă de obicei grad histologic înalt, fiind mai slab diferențiate, au rată de proliferare înaltă și un prognostic semnificativ mai rezervat decât tumorile mamare maligne luminale tip A. Acest subtip molecular se aseamănă cu tumorile care sunt ER negative, identificându-se o creștere a frecvenței mutațiilor TP53 precum și pierderea heterozigoției genei RB1.

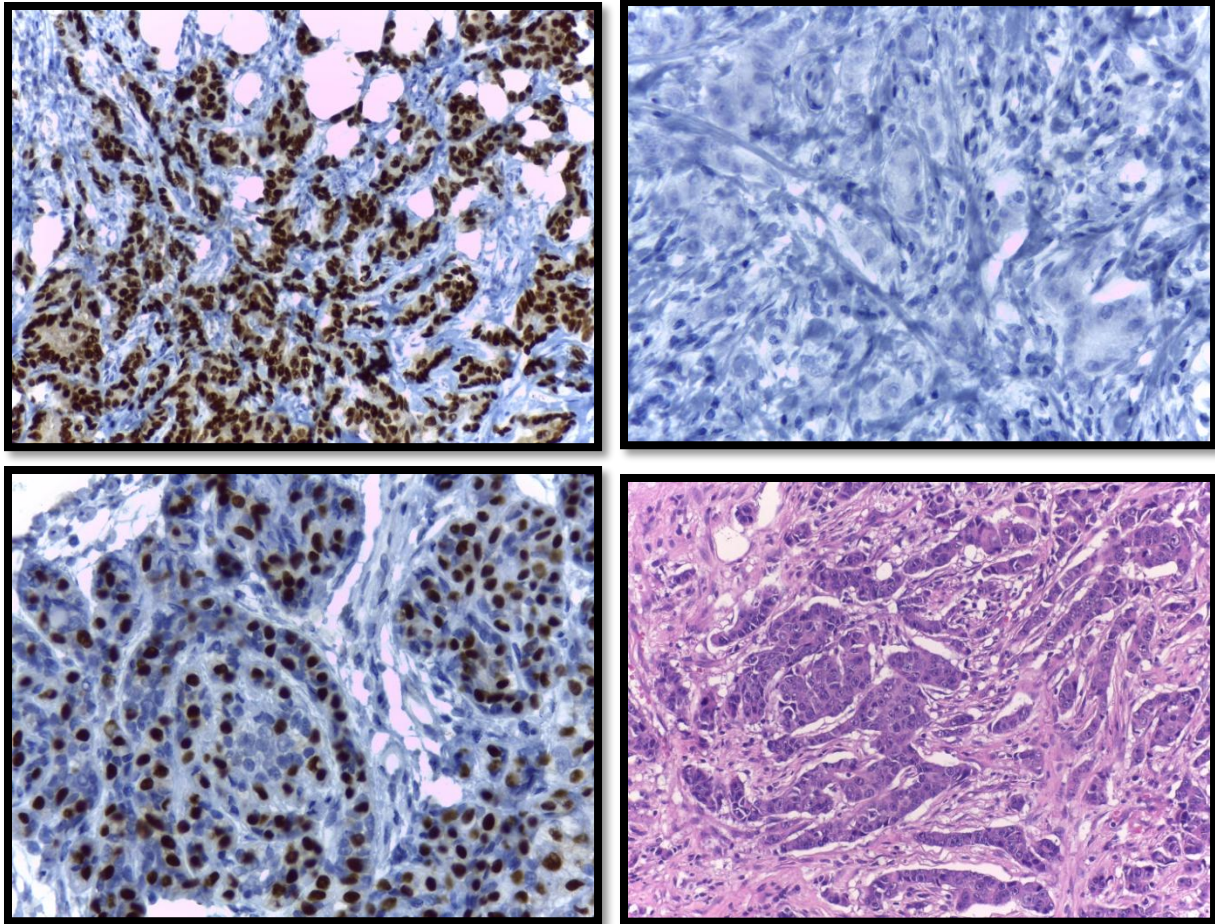


Fig. 3-6. Carcinom mamar ductal invaziv (NSP- no special type), subtipul molecular Luminal A. Proliferare celulara malignă în care celulele se dispun sub formă de insule, cordoane sau celule individuale, într-o stroma desmoplazică bogată, fără formare de structuri tubulo-glandular, grad histologic G3 (figura 3- colorație H.E. Ob x10), imunomarcaj ER+, Ob x20 (figura 4), imunomarcaj PR+, Ob x10 (figura 5) și imunomarcaj Her2/neu negativ scor 0, Ob x20 (figura 6)

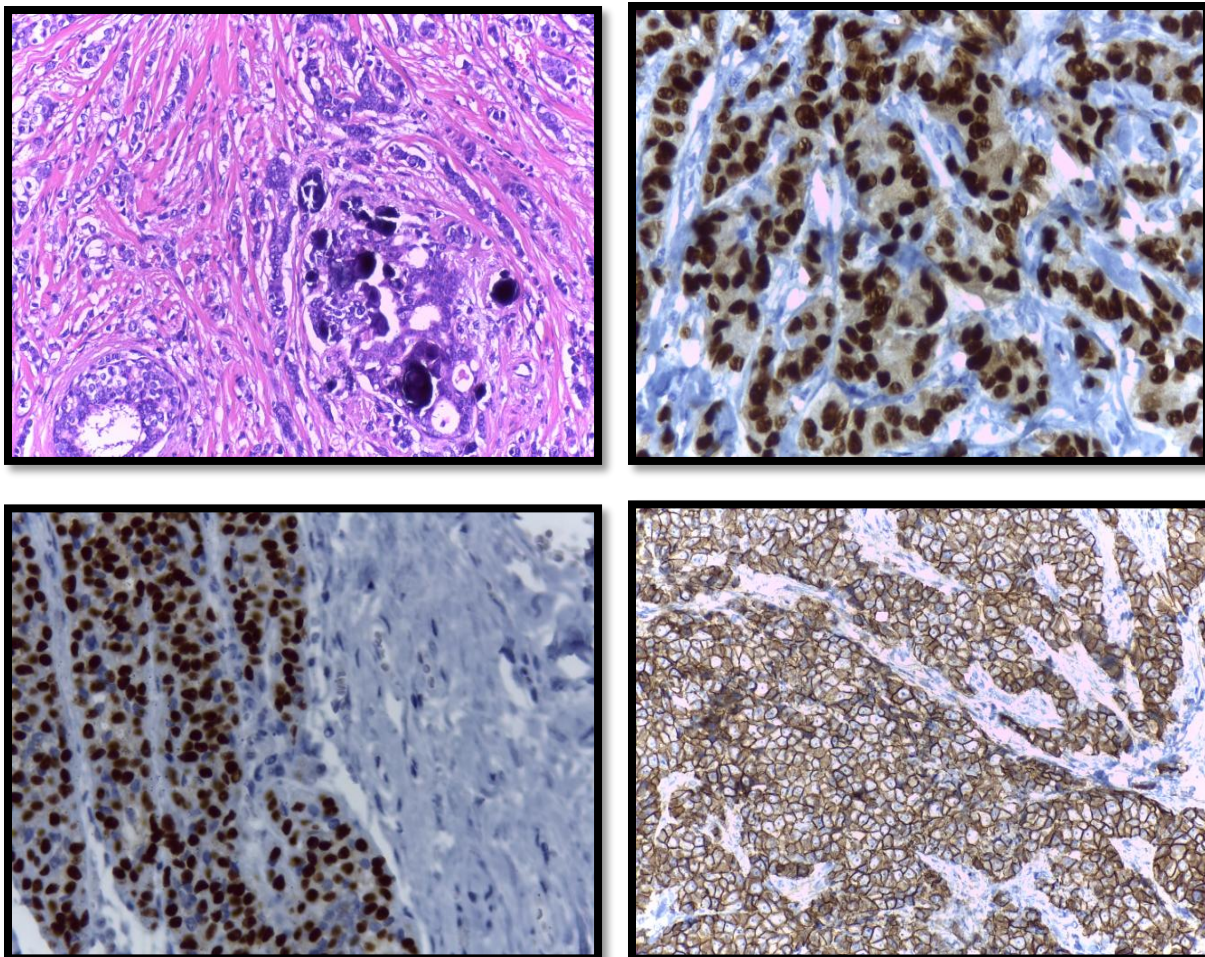


Fig. 7-10. Carcinom mamar ductal invaziv subtipul molecular Luminal B. Proliferare celulara malignă în care celulele se dispun sub formă de insule, cordoane sau celule individuale, separate de o stroma desmoplazică bogată, cu formare de structuri tubulo-glandular ce prezintă în lumen calcificări distrofice, grad histologic grad histologic G2 (figura 7 - colorație H.E. Ob x10), imunomarcaj ER+, Ob x20 (figura 8), imunomarcaj PR+, Ob x20 (figura 9) și imunomarcaj Her2/neu+ scor 3, Ob x10 (figura 10)

Subtipul Luminal C

Acest subtip de cancer mamar este a fost identificat mai recent, extrem de heterogen, are o evoluție mai agresivă decât subtipurile luminal A sau B. Se aseamănă cu subtipurile luminal A și B datorită expresiei genelor pentru receptorul estrogenic. Cu toate acestea această expresie este slabă și pe în plus tumorile încadrate aici exprimă o serie complex de gene care al căror rol carcinogenic este puțin înțeles (de ex proteina receptorului pentru transferină, v-myb, factorul 4 asociat TNF, proteina nucleolară p40 ș.a.). Datorită instabilității genomice marcate și a heterogenității imunohistochimice, acest subtip molecular este mai degrabă asemănător carcinoamelor mamare bazaloide în ciuda imunoreactivității slabe la ER. În acest sens unii autori nu recunosc carcinoamele mamare subtip luminal C ca fiind entități de sine stătătoare, asimilându-le fie celor bazaloide, fie sugerând o suclasificare a carcinoamelor luminal B care să includă și subtipul C.

Subtipul HER2 pozitiv

Tumorile HER2 pozitive (profilul imunohistochimic este RE-/RP-/Her2+) au o prevalență de 10-15% și sunt caracterizate printr-o serie de modificări genetice complexe, care implică supraexpresiei genelor localizate la nivelul cromozomului 17q, (ERBB2 și GRB7). Au fost identificate, suplimentar, mutații ale genei tumorale supresor TP53. Tumorile acestui subtip molecular au grad histologic înalt, expresie scăzută a receptorilor pentru estrogen și progesteron și uneori expresie crescută a receptorului androgenic. Tumorile de acest tip metastazează precoce, sunt rezistente la tratamentul hormonal și au prognostic mai rezervat. Tratamentul cu anticorp monoclonal recombinat, Trastuzumab (Herceptin) și cu antracicline crește semnificativ supraviețuirea. Din punct de vedere al clasificării histologice, carcinoamele mamare Her2+ înglobează: carcinomului ductal invaziv (NST grad 2 și 3), dar și carcinoamelor mamare apocrine.

Cu privire la carcinoamele mamare apocrine sau cu diferențiere apocrine, unii autori sugerează individualizarea subtipului molecular apocrin ca entitate distinctă în cadrul clasificării moleculare, datorită prezenței genelor pentru RA, a secvenței patogenice în care intervine în activarea semnalizării RA și a caracteristicilor histologice de tip apocrine și nu în ultimul rând a supraexpresiei Her2. Profilul imunohistochimic al acestui posibil subtip este RE-/RA+/Her2+.

Subtipul bazal-like/triplu negativ

Grupul carcinoamelor bazaloide cuprinde tumori RE-, RP- și HER2- (triplu negative). Prezintă expresie redusă a RE și HER2, dar expresie înaltă a genelor epiteliale bazale și a citokeratinelor bazale/mioepiteliale normale ale sânului (KRT5, KRT6, KRT14, KRT17, calponina 1/CNN1), caveolina 1/CAV1, laminină/LAMB1, Pcadherine, nestina, vimentină, CD44, EGFR. Tumorile pot exprima la un nivel redus citokeratinele 8/18, caracteristice celulelor luminales. Heterogenitatea genomică este marcată (duplicații 12p13 și 10p, deleții la nivelul 4p și 5q), pierderea heterozigotității genei RB1 și foarte frecvent mutații la nivelul genei și BRCA1. Mutațiile genei BRCA1 sunt dovezi clare în favoarea unor caracteristici comune CM ereditare și CM sporadic bazal-like. Subtipul molecular triplu negativ are o prevalență de 15-20%. Această categorie de tumori nu răspund la terapia endocrină cu Tamoxifen și nici la Trastuzumab (Herceptin), dar sunt sensibile la terapia de bază cu platina și inhibitori de poli-ADP-riboz-polimerază.

În general, carcinoamele mamare triplu negative au un prognostic nefavorabil, dar nu uniform nefavorabil, esențială fiind clasificarea histologică. Astăzi, următoarele histotipuri ale carcinomului mamar sunt clasificate în categoria "triplu negativ": unele carcinoame ductale slab diferențiate, carcinomul medular, carcinomul adenoid chistic, carcinomul scuamos, carcinomul cu diferențiere condroidă, carcinom mioepitelial, carcinom secretor, carcinom dezvoltat pe leziuni de adenoza microglandulară, carcinomul metaplastic/carcinosarcomul.

Contrar evoluției agresive prezise pentru carcinoamele bazaloide prin profilul expresiei genice, unele dintre tumorile citate mai sus sunt printre cele mai puțin agresive sau au o evoluție variabilă, dependentă de gradul celular și nuclear și de stadializarea TNM.

Alte subtipuri moleculare

Subtipul normal-like, cuprinde un grup de carcinoame mamare neclasificabile din punct de vedere genetic datorită expresiei asemănătoare cu țesutului mamar normal și cu alte tumorilor mamare benigne. Unii autori contestă existența sa iar alții susțin posibilitatea ca acest subtip să fie, în realitate, datorat unui artefact prin contaminarea eşantioanelor prelevate cu o cantitate importantă de țesut mamar normal.

În ultima perioadă, aprofundarea cercetărilor genice și imunohistochimice a carcinoamelor mamare, în special a celor bazal-like a condus la identificarea unor noi posibile profile moleculare, diferite de cele existente, sugerându-se o revizuire sau completare a clasificării moleculare curente. Astfel au fost propuse: subtipul „apocrin”, subtipul „interferon/STAT1” și subtipul „claudin-low”, desprins din grupul carcinoamelor bazal-like.

Concluzii

În prezent, caracterizarea cancerelor mamare invazive se realizează în funcție de tipul histologic, gradul histoprognoctic și statusul biomarkerilor surogat RE, RP și HER2. Markerii adiționali precum CK5/6, EGFR și ki67, E-Cadherina, P63 sunt utilizați pentru determinarea cât mai exactă a histotipului în conformitate cu ghidurile internaționale actuale OMS pentru diagnosticul și managementul tumorilor mamare maligne. Un profil de șase markeri imunohistochimici (RE, RP, HER2, CK5/6, EGFR, ki67) se pare că este cel mai folositor pentru aprecierea subtipului molecular al cancerului de sân folosind metoda biomarkerilor „surogat”.

Semnificația clinică a expresiei genetice sau a heterogenității profilului imunohistochimic în subtipurile cancerului de sân altele decât carcinomul ductal invaziv, nu este încă complet elucidată. Tumori cu imunofenotip similar continuă să varieze în ceea ce privește răspunsul la tratament și prognosticul. De asemenea o aprofundare mai bună a cercetărilor asupra semnalelor moleculare reciproce ce apar între celulele epiteliale mamare neoplazice și constituenții celulari ai micromediului tumoral extracelular ar putea duce la identificarea unor noi mecanisme patogenice și consecutiv ar putea dezvolta linii de cercetare care să implementeze metode noi, inovative de tratament și prevenție pentru cancerul de sân.

Înțelegerea mecanismelor progresiei tumorale precum și continuarea studiilor de genetică moleculară poate duce la definirea unui set mai important de gene predictive, deschizând drumul spre o abordare terapeutică personalizată.

Bibliografie selectivă

1. WHO. WHO fact sheet no 297. Geneva: World Health Organization; update February 2015
2. McCafferty PJ, Healy NA, Kerin MJ. Breast cancer subtypes and molecular biomarkers. *Diag Histopathol* 2009; 15(10): 485-489.
3. Moinfar F. Is 'basal-like' carcinoma of the breast a distinct clinicopathological entity? A critical review with cautionary notes. *Pathobiology* 2008; 75(2): 119–131.
4. Gusterson B. Do 'basal-like' breast cancers really exist? *Nat Rev Cancer* 2009; 9(2): 128-134.
5. Hergueta-Redondo M, Palacios J, Cano A, Moreno-Bueno G. „New” molecular taxonomy in breast cancer. *Clin Trans Oncol* 2008; 10(2): 777-785

6. Gusterson BA, Ross DT, Heath VJ, Stein T. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2005; 7(4): 143-148
7. Liu S, Dontu G, Wicha MS. Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis. *Breast Cancer Res* 2005; 7(3): 86–95.
8. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke M.F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100(7): 3983-3988.
9. Stingl J. Detection and analysis of mammary gland stem cells. *J Pathol* 2009; 217(2): 229-241
10. Stingl J, Caldas C. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(10): 791-799.
11. C. M. Perou, T Sørli, M B. Eisen, M van de Rijn, S S. Jeffrey, C A. Rees, J R. Pollack, D T. Ross, H Johnsen, L A. Akslen, Ø. Fluge, A Pergamenschikov, C Williams, S X. Zhu, P E. Lønning, A. Børresen-Dale, P O. Brown, & D Botstein. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* August 2000, 406, 747-752 17
12. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Monville F et al. Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers. *Oncogene* 2006; 25(15): 2273–2284.
13. Weigelt B, Hu Z, He X. Molecular portraits and 70-gene prognosis signature are preserved throughout the metastatic process of breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65(20): 9155–9158
14. Sotiriou C, Wirapati P, Loi S et al. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98(4): 262-272
15. Potti A, Dressman HK, Bild A et al. Genomic signatures to guide the use of chemotherapeutics. *Nat Med* 2006; 12(11): 1294-1300
16. Straver ME, Glas AM, Hannemann J et al. The 70-gene signature as a response predictor for neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 119(3): 551–558.
17. Knauer M, Mook S, Rutgers EJT et al. The predictive value of the 70-gene signature for adjuvant chemotherapy in early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 120(3): 655–661.
18. Cardoso F, Van't Veer L, Rutgers E, Loi S, Mook S, Piccart-Gebhart MJ (February 2008). "Clinical application of the 70-gene profile: the MINDACT trial". *J. Clin. Oncol.* 26 (5): 729–35
19. Ionescu C, Amălinei C, Balan R, Grigoraş A, Căruntu I-D. Profilul molecular al cancerului mamar: de la gene la trasaturi morfologice. *Jurnalul de Chirurgie, Iași*, 2011, Vol. 7, Nr. 2: 142-155.
20. Wang Y, Klijn JGM, Sieuwerts AM et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph node-negative primary breast cancer. *Lancet* 2005; 365(9460): 671–679.
21. Foekens JA, Atkins D, Zhang Y et al. Multicenter validation of a gene expression based prognostic signature in lymph node negative primary breast cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24(11): 1665–1671
22. Jerevall PL, Brommesson S, Strand C et al. Exploring the two-gene ratio in breast cancer independent roles for HOXB13 and IL 17BR in prediction of clinical outcome. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 107(2): 225–234

23. Jansen MP, Siewerts AM, Look MP et al. HOXB13-to-IL17BR expression ratio is related to tumor aggressiveness and response to tamoxifen of recurrent breast cancer: a retrospective study. *J Clin Oncol* 2007; 25(6): 662–668
24. Cronin M, Pho M, Dutta D et al. Measurement of gene expression in archival paraffin embedded tissues: development and performance of a 92-gene reverse transcriptase polymerase chain reaction assay. *Am J Pathol* 2004; 164(1): 35–42.
25. Habel LA, Shak S, Jacobs MK et al. A population-based study of tumor gene expression and risk of breast cancer death among lymph node-negative patients. *Breast Cancer Res* 2006; 8(3): 1–15.
26. Lyman GH, Cosler LE, Kuderer NM, Hornberger J. Impact of a 21-gene RT-PCR assay on treatment decisions in early-stage breast cancer: an economic analysis based on prognostic and predictive validation studies. *Cancer*. 2007 Mar 15;109(6):1011-8
27. Arpino G, Generali D, Sapino A et al. Gene expression profiling in breast cancer: A clinical perspective. *The Breast*, 2013, 22: 109-120.
28. Sambrook, J, Russell, D.W, *Molecular cloning – A laboratory manual*, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor ,2001, New York
29. Welsh, P.L, King, M.C. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Human Molecular genetics*, 2001, 10 (7): 705-713
30. Kadouri, L, Hubert, A, Rotenberg, Y. si colab. Cancer risks in carriers of the BRCA1/2 Ashkenazi founder mutations. *Journal of Medical Genetics*, 2007; 44(7):467–471
31. Miki, Y, Swensen, J, Shattuck-Eidens, D. et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, octombrie 1994, 266 (5182): 66–71
32. Wang, T.L. et al. Prevalence of somatic alterations in the colorectal cancer cell genome. *PNAS*, 2002, 99:3076-3080
33. Hall, J.M, Lee. M.K., Newman, B et al.. "Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21". *Science* decembrie 1990, 250 (4988): 1684–9
34. Dumitrescu, R.G, Cotarla, I. Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med*, 2005.,9(1):208-21
35. Buisson M, Anczukow O, Zetoune, A. et al. The 185delAG Mutation (c.68_69del AG) in the BRCA1 gene triggers translation reinitiation at a downstream AUG codon. *Human Mutation*, 2006, 27(10):1024-1029
36. Ewald I.P, Ribeiro I, Plamero E.I et al. Genomic rearrangements in BRCA1 and BRCA 2: a literature review. *Genetics and Molecular Biology*, 2009., 32(3): 437-446
37. Lin H.R, Ting N.S.Y, Qin J, Lee W.H. M-Phase- specific phosphorylation of BRCA2 by Polo-like kinase 1 correlates with the dissociation of the BRCA2-P/CAF complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(13): 35979- 35978
38. Boulton S.J.. Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins". *Biochemical Society Transactions* 2006, 34 (5): 633–645
39. Durant S.T, Nickoloff J.A. Good timing in the cell cycle for precise DNA repair by BRCA1. *Cell Cycle* 2005, 4 (9): 1216–22
40. Mazoyer S. Genomic rearrangements in the BRCA1 and BRCA2 genes. *Hum Mutat*, 2005. 25 (5): 415–22
41. Lacroix, M. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocrine-related Cancer*, decembrie 2006,13 (4): 1033–67
42. Thompson D, Easton, D.F. the Breast Cancer Linkage Consortium. Cancer incidence in BRCA1 mutation carriers. *Journal of the National Cancer Institute*, 2002, 94(18):1358–1365

43. Antoniou, A. Average Risks of Breast and Ovarian Cancer Associated with BRCA1 or BRCA2 Mutations Detected in Case Series Unselected for Family History: A Combined Analysis of 22 Studies. *The American Journal of Human Genetics*, 2003, 72: 1117–1130
- K.H., si colab., 2006. "Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer". *Journal of the American Medical Association*; 295(12):1379–1388
44. Casadei S, Walsh T, Coata K.H. et al. Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer. *Journal of the American Medical Association*, 2006; 295(12):1379–1388
45. Campeau, P.M, Foulkes W.D, Tischkowitz. M. Hereditary breast cancer: New genetic developments, new therapeutic avenues. *Human Genetics* , 2008, 124(1):31–42
46. Kauff, N.D, Domchek S.M, Friebel T.M et al. Risk-reducing salpingo-oophorectomy for the prevention of BRCA1- and BRCA2-associated breast and gynecologic cancer: A multicenter, prospective study. *Journal of Clinical Oncology*, 2008, 26(8):1331–1337
47. Neuhausen, S.L. Founder populations and their uses for breast cancer genetics. *Cancer Research* ,2000, 2 (2): 77–81
48. Tonin P.N, Mes-Masson A.M, Narod S.A, Ghadirian P, Provencher D. Founder BRCA1 and BRCA2 mutations in French Canadian ovarian cancer cases unselected for family history. *Clinical Genetics* 1999,55 (5): 318–324
49. Wagner T., Moslinger R.A, Muhr D et al. BRCA1-related breast cancer in Austrian breast and ovarian cancer families: specific BRCA1 mutations and pathological characteristics. *International Journal of Cancer*, 1998,77 (3): 354–36
50. Claes K et al. Mutation analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in the Belgian patient population and identification of a Belgian founder mutation BRCA1 IVS5 + 3A > G. *Disease Markers*, 1999, 15 (1-3): 69–73
51. Verhoog L.C, van den Ouweland A.M, Berns E et al. Large regional differences in the frequency of distinct BRCA1/BRCA2 mutations in 517 Dutch breast and/or ovarian cancer families. *European Journal of Cancer*, 2001, 37 (16): 2082–2090
52. Pääkkönen K., Sauramo , Sarantaus L, et al. Involvement of BRCA1 and BRCA2 in breast cancer in a western Finnish sub-population. *Genetic Epidemiology*, 2001, 20 (2): 239–246
53. Muller P, Heimdal K., Apold J, et al. Genetic epidemiology of BRCA1 mutations. *European Journal of Cancer*, 2001, 37 (18), 2428-2434
54. Backe J, Hofferbert S, Skawran B, Dork T, et al. Frequency of BRCA1 mutation 5382insC in German breast cancer patients". *Gynecologic Oncology*, 1999,72 (3): 402–406
55. Ladopoulou A, Kroupis C, Konstantopoulou I, et al. Germ line BRCA1 and BRCA2 mutations in Greek breast/ovarian cancer families: 5382insC is the most frequent mutation observed. *Cancer Letters*, 2002,185 (1): 61–70
56. Van Der Looij et al. Prevalence of founder BRCA1 and BRCA2 mutations among breast and ovarian cancer patients in Hungary". *International Journal of Cancer* ,2000,86 (5): 737–740
57. Baudi F, Quaresima B, Grandinetti C Cuda et al. Evidence of a founder mutation of BRCA1 in a highly homogeneous population from southern Italy with breast/ovarian cancer. *Human Mutation*, 2001,18 (2): 163–164
58. Sekine M, Nagata H, Tsuji S et al. Japanese Familial Ovarian Cancer Study Group. Mutational analysis of BRCA1 and BRCA2 and clinicopathologic analysis of ovarian cancer

- in 82 ovarian cancer families: two common founder mutations of BRCA1 in Japanese population. *Clinical Cancer Research*, 2001, 7 (10): 3144–3150
59. Liede, A, Jack, E, Hegele, R.A.; Narod, S.A., 2002. A BRCA1 mutation in Native North American families". *Human Mutation* 19 (4): 460
 60. The Scottish/Northern Irish BRCA1/BRCA2 Consortium . "BRCA1 and BRCA2 mutations in Scotland and Northern Ireland". *British Journal of Cancer* ,2003,88 (8): 1256–1262
 61. Borg A, Dørum A, Heimdal K. et al. BRCA1 1675delA and 1135insA account for one third of Norwegian familial breast-ovarian cancer and are associated with later disease onset than less frequent mutations. 1999, *Disease Markers* 15 (1-3): 79–84
 62. Aziz Z, Liede A, Malik I.A et al. Contribution of BRCA1 and BRCA2 mutations to breast and ovarian cancer in Pakistan. *American Journal of Human Genetics* ,2002, 71 (3): 595–606
 63. Górski B, Byrski T, Huzarski T et al. Founder mutations in the BRCA1 gene in Polish families with breast-ovarian cancer. *American Journal of Human Genetics* , 2000,66 (6): 1963–1968
 64. Cohen B, Liede A, Black D.M et al. Evidence of a founder BRCA1 mutation in Scotlan. *British Journal of Cancer*, 2000, 82 (3): 705–711
 65. Reeves M.D, Yawitch T.M, van der Merwe N.C. et al. BRCA1 mutations in South African breast and/or ovarian cancer families: evidence of a novel founder mutation in Afrikaner families". *International Journal of Cancer* 2004,110 (5): 677–682
 66. Vega A, Campos B, Bressac-De-Paillerets B et al. The R71G BRCA1 is a founder Spanish mutation and leads to aberrant splicing of the transcript. *Human Mutation*, 2001,17 (6): 520–521
 67. Bergman A, Einbeigi Z, Olofsson U et al. The western Swedish BRCA1 founder mutation 3171ins5; a 3.7 cM conserved haplotype of today is a reminiscence of a 1500-year-old mutation. *European Journal of Human Genetics*, 20019 (10): 787–793
 68. Melchor L, Benítez J. An integrative hypothesis about the origin and development of sporadic and familial breast cancer subtypes. *Carcinogenesis* 2008; 29(8): 1475–1482
 69. Adem C, Soderberg CL, Hafner K et al. ERBB2, TBX2, RPS6KB1, and MYC alterations in breast tissues of BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 41(1): 1–11
 70. Correa Geyer F, Reis-Filho JS. Microarray-based gene expression profiling as a clinical tool for breast cancer management: are we there yet? *Int J Surg Pathol* 2009; 17(4): 285–302
 71. Herschkowitz JI, He X, Fan C, Perou CM. The functional loss of the retinoblastoma tumour suppressor is a common event in basal-like and luminal B breast carcinomas. *Breast Cancer Res* 2008; 10(5): R75
 72. Lal P, Tan LK, Chen B. Correlation of HER-2 status with estrogen and progesterone receptors and histologic features in 3,655 invasive breast carcinomas. *Am J Clin Pathol* 2005; 123(4): 541–546.
 73. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353(16): 1659–1672
 74. Vanden Bempt I, Drijkoningen M, De Wolf-Peeters C. The complexity of genotypic alterations underlying HER2-positive breast cancer: an explanation for its clinical heterogeneity. *Curr Opin Oncol* 2007; 19(6): 552–557.
 75. Farmer P, Bonnefoi H, Becette V et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene* 2005; 24(29): 4660–4671

76. Doane AS, Danso M, Lal P et al. An estrogen receptor-negative breast cancer subset characterized by a hormonally regulated transcriptional program and response to androgen. *Oncogene* 2006; 25(28): 3994-4008.
77. van de Rijn M, Perou CM, Tibshirani R. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am J Pathol* 2002; 161(6): 1991-1996.
78. Klingbeil P, Natrajan R, Everitt G et al. CD44 is overexpressed in basal-like breast cancers but is not a driver of 11p13 amplification. *Breast Cancer Res* 2010; 120(1): 95-10
79. Westbury CB, Reis-Filho JS, Dexter T, Mahler-Araujo B. Genome-wide transcriptomic profiling of microdissected human breast tissue reveals differential expression of KIT (c-Kit, CD117) and oestrogen receptor-alpha (ER alpha) in response to therapeutic radiation. *J Pathol* 2009; 219(1):131-140
80. Pusztai L, Mazouni C, Anderson K et al. Molecular classification of breast cancer: limitations and potential. *Oncologist* 2006; 11(8):868–877.
81. Turner NC, Reis-Filho JS, Russell AM et al. BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene* 2007; 26(14): 2126-2132.
82. Lakhani SR, Reis-Filho JS, Fulford L, Penault-Llorca F. Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. *Clin Cancer Res* 2005; 11(14): 5175-5180
83. Gruvberger S, Ringner M, Chen Y et al. Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns. *Cancer Res* 2001; 61(16): 5979-5984
84. Peppercorn J, Perou CM, Carey LA. Molecular subtypes in breast cancer evaluation and management: divide and conquer. *Cancer Invest* 2008; 26(1): 1-10
85. Hu Z, Fan C, Oh DS et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics* 2006; 7: 96.
86. Prat A, Perou CM. Mammary development meets cancer genomics. *Nat Med* 2009; 15(8): 842-844

10. INSTRUMENTE CLINICE DE CERCETARE ÎN PSORIAZIS

✍ Mircea Tampa, Madalina Irina Mitran, Cristina Iulia Mitran, Adrian Dumitru, Clara Matei, Isabela Sarbu, Simona-Roxana Georgescu

Psoriazisul este o afecțiune dermatologică inflamatorie, mediată imun, cu evoluție cronică, care afectează 1-3% din populație. Poate debuta la orice vârstă, dar majoritatea pacienților sunt diagnosticați în decada a treia de viață. Patogeneza are la bază proliferarea anormală a keratinocitelor ceea ce conduce la îngroșarea epidermului. În etiologia sa un rol important îl au factorii genetici. Astfel aproape o treime dintre subiecții cu psoriazis au o rudă de gradul I cu aceeași afecțiune. S-a observat că dacă ambii părinți suferă de psoriazis, copilul are un risc de 41% de a dezvolta psoriazis. Dacă este afectat un singur părinte riscul scade la 14%, iar dacă nu există istoric familial riscul este de doar 2%. Prezența HLACw6 crește riscul de 13 ori de a dezvolta psoriazis în populația caucaziană.

În patogeneza bolii un rol important îl joacă limfocitele T și citokinele pe care le eliberează, care stimulează macrofagele și celulele dendritice, având ca rezultat apariția inflamației și stimularea proliferării keratinocitelor. Acest proces stă la baza formării plăcii de psoriazis (Figura 1).

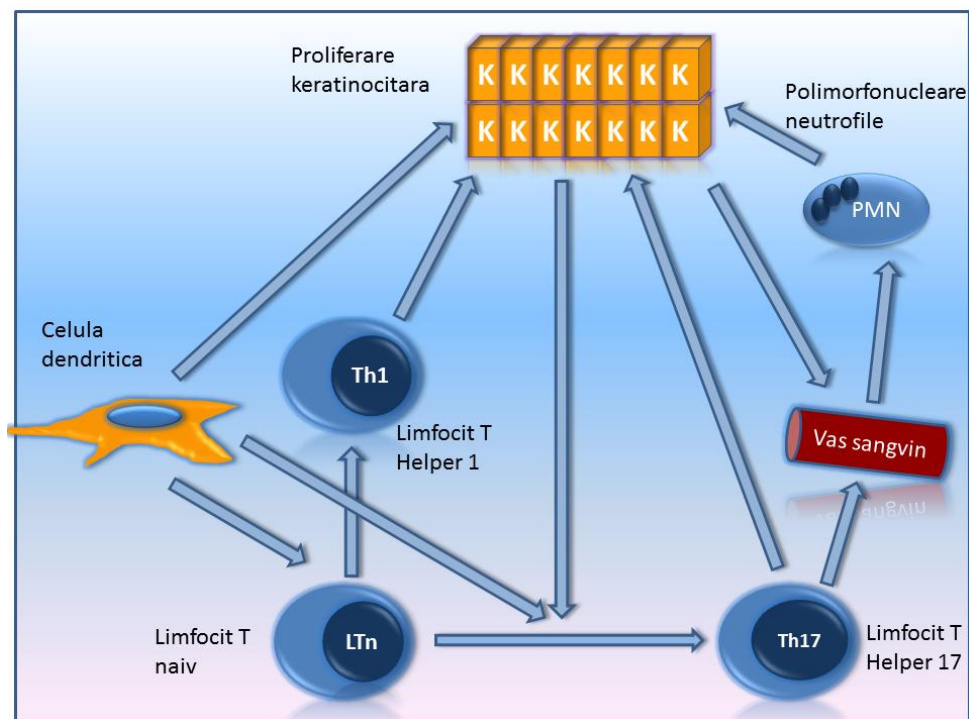


Fig. 1. Mecanismele celulare implicate în proliferarea keratinocitara ce stă la baza formării plăcii de psoriazis. Interacțiunile încrucisate dintre keratinocite, limfocite T (naive, helper 1 și/sau 17), neutrofile, celule dendritice și celulele endoteliale reprezintă fundamentul patogenic al formării leziunilor cutanate caracteristice în psoriazis.

Majoritatea pacienților (80-90%) prezintă psoriazis în plăci. Plăcile de psoriazis sunt eritematoase, rotund ovalare, bine delimitate, de diferite dimensiuni, izolate sau confluate acoperite de scuame alb-argintii (*Figura 2*). Scuamele sunt lamelare, pot fi îndepărtate cu ușurință, devin aderente de plăcile indurate în formele cronice. Leziunile pot fi localizate oriunde, dar cel mai frecvent sunt dispuse la nivelul zonelor de extensie (genunchi, coate). Diferite instrumente clinice utilizează caracteristicile fizice ale leziunilor (eritem, indurație, descuamare) pentru evaluarea severității psoriazisului.



Fig. 2. Aspect clinic în psoriazis: plăci eritematoase bine delimitate, elevate, acoperite de scuame alb-sidefii, pluristratificate, dispuse predominant pe zonele de extensie și lombar

Deși psoriazisul nu prezintă risc vital are un important impact psihologic. Studiile arată că stresul provocat de această afecțiune este asemănător cu cel întâlnit la pacienții cu diabet sau boală cardiacă ischemică. Un procent de aproximativ 5% dintre pacienții cu psoriazis suferă de depresie și experimentează idei de suicid iar o treime stări anxioase, acestea în mare parte fiind rezultatul stigmatizării resimțite prin prezența leziunilor de psoriazis în special pe zonele vizibile (mâini, antebrate, scalp, față).

Într-un studiu ce a vizat pacienți din mai multe țări europene cărora li s-a aplicat un chestionar 28% considerau că au psoriazis sever, iar 45% aproape sever. Cu privire la impactul social se pare că 29% dintre pacienții cu psoriazis întâmpină dificultăți în relațiile interpersonale. Psoriazisul are efecte asupra activităților zilnice, asupra activității profesionale și funcției sexuale cu reducerea semnificativă a calității vieții. Pacienții cu psoriazis experimentează sentimente de inferioritate socială, au o stimă scăzută față de sine și consideră că cei din jur îi evaluează în funcție de aspectul fizic. Pentru acești pacienți este important ca cei cu care vin în contact să înțeleagă că boala lor nu este una contagioasă. Uneori aceștia simt că nici măcar dermatologul nu este conștient de dimensiunea impactului psoriazisului asupra calității vieții lor.

Au fost dezvoltate diferite instrumente pentru evaluarea severității psoriazisului din punct de vedere fizic și psihologic. Aceste instrumente sunt mai frecvent utilizate în cercetare și mai puțin în practica clinică.

I. Instrumente de evaluare a severității psoriazisului

În dermatologie spre deosebire de alte specialități severitatea bolii este mult mai greu de evaluat. Nu sunt disponibile metode de laborator prin care să fie cuantificată. Astfel instrumentele clinice rămân singurele prin care se poate realiza o evaluare. În ceea ce privește

extinderea bolii nu întotdeauna pacientul cu un număr de leziuni mai mare va avea o calitate a vieții mai scăzută. De aceea pentru evaluare trebuie ținut seama atât de extinderea bolii cât și de impactul asupra calității vieții. Puzenat et al. a realizat o analiză a literaturii medicale între anii 1980-2009 pe tema evaluării severității psoriazisului, selectând articole în limba engleză și franceză. Au fost identificate 7898 de articole. Au fost raportate 44 de instrumente, pentru evaluare clinică, 6 dintre acestea fiind standardizate. În plus, până în anul 2010 au fost identificate 21 de chestionare care evaluează calitatea vieții.

Actual sunt disponibile numeroase instrumente clinice pentru a evalua severitatea leziunilor și impactul acestora asupra calității vieții. Pentru ca un astfel de instrument să permită obținerea unor rezultate bune trebuie să întrunească anumite caracteristici. Trebuie să fie unidimensional, să fie reproductibil și exact, să fie ușor de înțeles și aplicat. În plus trebuie să poată detecta modificările, inclusiv modificările mici, de exemplu obținute în urma tratamentului (responsiveness).

Testele care evaluează calitatea vieții în legătură cu starea de sănătate (health-related quality of life – HRQoL) au fost introduse încă din anii 1990, dar totuși astăzi sunt destul de puțin utilizate în practica medicală. Instrumentele care evaluează HRQoL vizează estimarea impactului stării de sănătate asupra a trei componente, fizică, psihologică și socială. Un studiu a evidențiat că aproximativ 75% dintre pacienții cu psoriazis consideră că afecțiunea are un impact de la moderat la sever asupra calității vieții.

Metodele de evaluare a impactului bolii asupra calității vieții pot fi clasificate în două categorii, nespecifice și specifice. Indicatorii nespecfici estimează afectarea calității vieții în general și includ chestionare precum *Medical Outcome Survey Short Form 36*, *Euro QoL*. În schimb cele specifice de tipul *Dermatology Life Quality Index* și *Skindex* se raportează la deteriorarea calității vieții produsă de afecțiunile dermatologice. În plus au fost dezvoltate instrumente clinice specifice psoriazisului precum *Psoriasis Disability Index*, *Impact of Psoriasis Questionnaire*, etc. Unele studiile au arătat că nu există o corelație semnificativă între scorurile care evaluează severitatea clinică a bolii, bazându-se pe elemente obiective și scorurile cu privire la impactul bolii asupra calității vieții, având un caracter subiectiv.

Psoriasis Area and Severity Index

Psoriasis Area and Severity Index (PASI) a fost descris în urmă cu aproximativ 40 de ani (1978) de Fredricksson și Pettersson pentru evaluarea eficacității tratamentului cu retinoizi. Ulterior a devenit una dintre cele mai folosite metode de evaluare clinică a severității psoriazisului. Astăzi, PASI este utilizat pentru evaluarea severității bolii dar și pentru a stabili eficacitatea tratamentului în studiile clinice. Totuși rareori este utilizat în practica medicală. Se urmărește reducerea valorii scorului în comparație cu valoarea inițială. Scorul PASI presupune evaluarea leziunilor de pe întreaga suprafață corporală care este divizată în patru segmente, cap, trunchi, membre superioare și membre inferioare.

Leziunile se analizează urmărind intensitatea eritemului, gradul de indurație și nivelul de descumare. Eritemul, indurația și gradul de descumare pot varia în intensitate de la absent la sever, astfel:

- 0 - absent,
- 1 - ușor,
- 2 - moderat,
- 3 - intens,
- 4 - sever

Pentru a cuantifica suprafața corporală afectată se utilizează următoarea schemă:

- 0 - fără leziuni
- 1 - sub 10%
- 2 - 10-29%
- 3 - 30-49%
- 4 - 50-69%
- 5 - 70-89%
- 6 - peste 90%

Scorul fiecărui segment topografic este înmulțit cu un factor ponderal, care corespunde proporției segmentului respectiv din suprafața corporală totală astfel cap - 0,1, membre superioare - 0,2, trunchi - 0,3, membre inferioare - 0,4. Se aplică următoarea formulă:

$$\text{PASI} = 0,1 (E_c + I_c + D_c) A_c + 0,3 (E_t + I_t + D_t) A_t + 0,2 (E_{ms} + I_{ms} + D_{ms}) A_{ms} + 0,4 (E_{mi} + I_{mi} + D_{mi}) A_{mi}$$

E=eritem, I=indurație, D=descuamare, A=aria corporală
c=cap, t=trunchi, ms=membre superioare, mi=membre inferioare

Interpretarea scorului:

- <7 - psoriazis ușor,
- 7 – 12 - psoriazis moderat,
- >12 - psoriazis sever

Valorile scorului PASI pot fi între 0 și 72. Valoarea 72 nu poate fi atinsă fiind doar teoretică. În funcție de scorul PASI, psoriazisul poate fi considerat ușor, moderat sau sever, dar nu există valori standard pentru definirea intervalelor. Astfel după unii autori psoriazisul sever corespunde unei valori peste 18). În practică valorile din jumătatea superioară a scorului PASI sunt rar întâlnite. Pacienții cu psoriazis foarte sever au de obicei un scor de 40-50.

PASI este un indicator sensibil în ceea ce privește modificările bolii, astfel este util în evaluarea evoluției bolii și evaluarea eficacității anumitor terapii, în special terapiile biologice. PASI 75 (procentul de pacienți la care s-a înregistrat reducerea cu 75% a scorului PASI), este cel mai frecvent utilizat în studiile clinice pentru evaluarea răspunsului la agenții biologici. În același sens poate fi calculat și PASI 50 (procentul de pacienți la care s-a înregistrat reducerea cu 50% a scorului PASI), unii autori considerând că PASI 50 este un indicator mai util în studiile clinice.

Dezavantajele scorului PASI includ necesitatea unui timp relativ crescut pentru calcularea scorului, dificultatea calculului și faptul că nu este liniar. În acest sens introducerea calculatoarelor pentru obținerea scorului PASI a facilitat calculul. În plus, caracteristicile clinice evaluate nu au fost clar definite și pot fi interpretate diferit în funcție de evaluator. Trebuie ținut cont că eritemul și prezența scuamelor sunt influențate de umiditate, de temperatură și de aplicarea recentă a emolientelor. Unele preparate precum cignolinul cresc gradul de eritem.

Calcularea scorului PASI este dependentă de observator, depinzând în principal de experiența acestuia. Totuși studiile arată că în cazul evaluatorilor experimentați variația intra și inter-observator este relativ mică. Dar în cazul pacienților cu un număr redus de leziuni variațiile sunt mai mari. În plus, scorul PASI prezintă o sensibilitate scăzută în ceea ce privește evaluarea răspunsului la tratament în cazul acestor pacienți. Nu se recomandă aplicarea scorului PASI la pacienți cu leziuni care însumează sub 3% din suprafața corporală.

Unele studii arată o corelație slabă între PASI și testele de evaluare a impactului asupra calității vieții. Astfel trebuie ținut cont de faptul că unii pacienți deși prezintă un număr redus de leziuni, calitatea vieții lor poate fi scăzută. Trebuie avut în vedere impactul procentului ariei corporale afectate asupra scorului. Astfel un pacient ce prezintă 2 plăci la nivelul coatelor va avea scorul *body surface area* (BSA) sub 10% ca și un pacient care prezintă leziuni de psoriazis gutat diseminate pe ambele membre superioare, având un impact psihologic mai mare. Totuși de cele mai multe ori reducerea semnificativă a scorului PASI se asociază și cu ameliorarea calității vieții (28,29). Mattei et al. analizând pacienții cu psoriazis moderat-sever care sunt sub tratament cu agenți biologici a observat o corelație bună între PASI și DLQI. Reducerea PASI cu 75% atrage implicit și îmbunătățirea semnificativă a scorului DLQI.

Scorul PASI joacă un rol important în selecția pacienților pentru administrarea tratamentelor pe bază de agenți biologici. Astfel pentru ca un pacient să fie eligibil scorul PASI trebuie să fie peste 10, DLQI trebuie să aibă o valoare peste 15. Deocamdată scorul PASI rămâne “standardul de aur” în studiile clinice.

Simplified PASI

Simplified PASI (SPASI) a fost dezvoltat din necesitatea de a avea un instrument mai ușor de utilizat în clinică. Astfel a fost creată o variantă simplificată a scorului PASI. Acest scor presupune notarea mediei cu privire la eritem, indurație și descuamare a leziunilor, evaluate pe o scală de la 0 la 4 și suprafața corporală afectată, utilizând o scală de la 0 la 6. SPASI prezintă o sensibilitate scăzută atunci când leziunile ocupă mai puțin de 10% din suprafața corporală sau când doar o regiune a corpului este afectată.

Self-Administered PASI

Self-Administered PASI (SAPASI) reprezintă corespondentul scorului PASI, evaluarea fiind efectuată de către pacient. Presupune hașurarea de către pacient a zonelor de tegument afectate pe o planșă unde este ilustrat corpul uman. Ulterior, având la dispoziție o scală vizuală, acesta evaluează leziunile în funcție de cele trei caracteristici clinice (eritem, indurație și descuamare). Apoi, pe baza acestor date medicul calculează scorul SAPASI, utilizând același algoritm folosit pentru scorul PASI.

Deși scorul SAPASI este realizat de pacient, iar PASI de medic s-a observat o corelație semnificativă a rezultatelor. Corelația a fost mai puternică la pacienții cu o evoluție a psoriazisului de mai lungă durată. Există o bună corelare între PASI și SAPASI, dar tendința pacienților este de a supraestima severitatea leziunilor. Acest fapt este evident mai ales în cazul pacienților cu psoriazis gutat, care consideră că întreaga suprafață corporală la nivelul căreia sunt diseminate leziunile este afectată de psoriazis și nu iau în calcul doar leziunile. De aceea nu se recomandă la acești pacienți utilizarea acestui scor.

Psoriasis Log-Based Area and Severity Index (PLASI) și Psoriasis Exact Area and Severity Index (PEASI) sunt două scoruri care au la bază scorul PASI. Pentru ca sensibilitatea scorului PASI să crească în cazul pacienților cu psoriazis ușor-moderat au fost propuse aceste două scoruri. Acestea se bazează pe un calcul mai precis a suprafeței corporale afectate. Scorul PLASI include 6 scale cu privire la suprafața corporală afectată după cum urmează 100–46, 46–21, 21–10, 10–5, 5–2, 2–0%. În acest fel discriminarea în cazul pacienților cu un număr redus de leziuni este mai bună. Scorul PEASI ia în calcul procentele de suprafață corporală afectată și nu valori corespunzătoare acestora.

Body Surface Area

Scorul **Body Surface Area (BSA)** ține seama de procentul de suprafață corporală afectată. Se consideră că palma pacientului reprezintă 1%. Astfel 9% reprezintă cap și gât, 18% membrele superioare (9% un membru superior), 36% membrele inferioare (18% un membru inferior) și 1% zona genitală. Totuși se pare că de fapt, la majoritatea indivizilor o palmă reprezintă în jur de 0,70-0,76%.

Scorul prezintă și anumite dezavantaje. BSA nu este un indicator bun al evoluției bolii, modificându-se puțin după 2 săptămâni de tratament. În plus rezultatele acestui scor implică un grad crescut de subiectivism, valorile pot varia semnificativ inter-observator. Totuși se pare că BSA are o variabilitate mare inter-observator, dar nu și intra-observator. În cazul pacienților cu un număr redus de leziuni de multe ori BSA este supraestimat de către evaluator. Nu este un indicator eficient al severității bolii, astfel există pacienți cu psoriazis sever dar un scor BSA scăzut și invers.

Interpretarea scorului:

BSA<5% - psoriazis ușor,

BSA 5% - 10% psoriazis mediu,

BSA>10% psoriazis sever

Physician's Global Assessment

Physician's Global Assessment (PGA) este un indicator simplu de utilizat incluzând evaluarea celor trei caracteristici fizice a leziunilor de psoriazis (eritem, indurație și scuame), dar fără a fi subîmpărțite pe segmente topografice. Se evaluează realizându-se o medie a caracteristicilor tuturor leziunilor. PGA nu ia în calcul procentul de suprafață corporală afectată. Scala de evaluare variază între 0 și 5, sau după unii autori 6 sau 7, ceea ce conduce la imposibilitatea comparării unor rezultate obținute în studii clinice care folosesc versiuni diferite ale scorului. Scorul are o sensibilitate scăzută în cazul leziunilor puține.

PGA poate fi calculat prin raportare la severitatea bolii la un moment bazal pentru a evalua evoluția, ceea ce definește PGA dinamic (dPGA) sau doar în funcție de caracteristicile afecțiunii în momentul examinării, PGA static (sPGA). PGA și PASI sunt cele mai utilizate instrumente în studiile clinice. Spre deosebire de PASI, PGA nu este standardizat, numărul de scale variind în funcție de numărul de simptome evaluate și numărul de categorii variază în cadrul fiecărei scale. În încercarea de a implementa metode mai puțin complexe și ușor de utilizat în practică pentru evaluarea psoriazisului unii cercetători au evidențiat faptul că produsul dintre PGA și BSA ar avea o bună sensibilitate, obținând o bună corelație cu scorul PASI.

Tabel 1. Severitatea psoriazisului în funcție de PGA

Gradul de severitate al psoriazisului	Caracteristicile clinice ale leziunilor
Sever	indurație, descuamare și/sau eritem foarte accentuate
Moderat spre sever	indurație, descuamare și/sau eritem accentuate
Moderat	indurație, descuamare și/sau eritem moderate
Ușor spre moderat	intermediar între moderat și ușor
Ușor	indurație, descuamare și/sau eritem ușoare
Aproape fără leziuni	intermediar între ușor și fără leziuni
Fără leziuni	fără leziuni de psoriazis (posibil hipo sau hiperpigmentare postinflamatorie)

Lattice System Physician's Global Assessment

Lattice System Physician's Global Assessment (LS-PGA) este un instrument clinic introdus recent în practică, în ultimii 10 ani. Se calculează într-un mod asemănător scorului PASI, raportându-se la procentul de suprafață corporală afectată și evaluarea caracteristicilor leziunilor, folosindu-se o scală de la 0 la 4. Intervalele folosite pentru evaluarea suprafeței corporale afectate diferă de cele utilizate la calculul scorului PASI - 0%, 1-3%, 4-9%, 10-20%, 21-29%, 30-50% și 51-100%. Prin aplicarea unor sub-intervale între 0-10% rezultatele sunt mai bune în cazurile cu un număr redus de leziuni. În plus, în calcularea scorului în ceea ce privește caracteristicile plăcii rolul cel mai important este atribuit indurației, iar cel mai scăzut descuării. S-a pus în evidență că efectul terapiei asupra indurației a determinat cea mai mare creștere a calității vieții. Scorurile PASI și PGA alocă aceeași importanță celor trei trăsături morfologice ale plăcii de psoriazis.

S-a observat că o reducere cu 2 sau 3 clase a LS-PGA se corelează cu PASI 75 sau PASI 50, ceea ce indică faptul că ar putea fi utilizat în studiile clinice pentru evaluarea eficacității tratamentelor. S-a pus în evidență o corelație bună între PASI, sPGA și LS-PGA, cel mai bine corelându-se rezultatele obținute utilizând scorurile PASI și LS-PGA. Corelația mai scăzută cu PGA poate fi explicată prin faptul că cel din urmă nu ia în calcul suprafața corporală afectată.

Prin utilizarea scorului LS-PGA s-a identificat o variație mică inter-observator. Se pare că variația inter-observator utilizând scorul LS-PGA este mai mică în comparație cu scorul PASI.

National Psoriasis Foundation- Psoriasis Score

National Psoriasis Foundation- Psoriasis Score (NPF-PS) evaluează indurația a două leziuni reprezentative de psoriazis, suprafața corporală afectată în momentul examinării în comparație cu o valoare de bază, pruritul resimțit de pacient, evaluarea globală a bolii atât de medic cât și de pacient. Pentru fiecare se atribuie valori între 0-5. Este un indicator util pentru evaluarea eficacității tratamentului. Principalul component evaluat este indurația astfel scala de măsurare a indurației crește cu doar 0,25 mm de la un nivel la altul. Spre deosebire de scorul PASI rezultatele nu sunt alterate atunci când leziunile ocupă o suprafață corporală mică.

Un avantaj al acestui scor este evaluarea pruritului, a cărui intensitate nu este evaluată de ceilalți indicatori. Pruritul este un simptom frecvent întâlnit la pacienții cu psoriazis, fiind prezent la 60-92% dintre aceștia. Studiile au arătat că prezența pruritului la pacienții cu psoriazis are un important impact asupra calității vieții. NPF-PS se corelează cu PASI și PGA. În plus se corelează cu indicatorii de evaluare a calității vieții. Studiile arată că NPF-PS exprimă percepția pacientului asupra bolii.

Simplified Psoriasis Index

Simplified Psoriasis Index (SPI) cuprinde trei părți, incluzând date referitoare la severitatea bolii (SPI-s), impactul psihologic (SPI-p) și istoricul bolii (SPI-i). SPI-i include 4 întrebări despre evoluția bolii (ex. episoade de eritrodermie) și 6 întrebări despre diferitele terapii urmate (cu metotrexat, acitretin). Punctajul maxim care poate fi obținut fiind 10. SPI-p presupune evaluarea psihologică pe baza unei scale analoge.

SPI-s poate fi efectuat atât de medic cât și de pacient, astfel sunt disponibile două variante proSPI-s, pentru medic și saSPI-s pentru pacient. Diferența între cele două constă în adaptarea

limbajului folosit. Scorul SPI presupune acordarea unei importanțe crescute zonelor în care prezența leziunilor implică un impact social și psihologic semnificativ. Astfel în prima parte este utilizată o planșă unde suprafața corporală este împărțită în 10 zone inegale. Extinderea leziunilor este cuantificată pentru fiecare zonă astfel:

0 - leziuni absente sau minime

0,5 - leziuni prezente, dar un procent crescut de piele sănătoasă

1 - leziuni extinse

Ulterior, acestea se însumează (valoare maximă 10). Apoi se evaluează eritemul, indurația și descuamarea, realizându-se o medie a tuturor leziunilor, după cum urmează :

0 - fără leziuni, ușor eritem sau pigmentare reziduală

1 - ușor eritem și/sau scuame, cu indurație focală ușoară

2 - ușor spre moderat eritem și/sau scuame majoritatea leziunilor prezintă indurație

3 - moderat eritem și/ sau scuame și/sau indurație

4 - marcat eritem și/ sau scuame și/sau indurație

5 - piele intens inflamată cu/fără pustule

Ulterior scorul extinderii leziunilor se înmulțește cu scorul caracteristicilor leziunilor, valorile pot varia între 0-50.

S-a evidențiat o corelație bună între PASI și proSPI-s și saSPI-s. Variabilitatea inter-observator este moderată.

Copenhagen Psoriasis Severity Index

Pentru evaluarea severității psoriazisului sunt descrise alte numeroase teste printre care ***Copenhagen Psoriasis Severity Index (CoPSI)*** care pare să realizeze discriminarea mai bine între cazurile ușoare de psoriazis, prezintă o liniaritate mai bună și este mai ușor de calculat în comparație cu scorul PASI.

Scorul CoPSI nu include procentul de tegument afectat, parametru care de cele mai multe ori conduce la scăderea reproductibilității. Variabilitatea intra și inter-observator este mai bună în comparație cu scorul PGA.

Dermatology Life Quality Index

Dermatology Life Quality Index (DLQI) a fost introdus de Finlay și Khan, în 1994. DLQI este un chestionar alcătuit din 10 întrebări ușor de aplicat care evaluează gradul de alterare a calității vieții pacientului cu o afecțiune dermatologică fiind primul indicator specific al calității vieții adresat acestor pacienți. DLQI este considerat “standardul de aur” pentru măsurarea HRQoL. Valorile scorului variază de la 0 la 30, un scor crescut fiind asociat cu afectarea semnificativă a calității vieții. Pacientul va răspunde la întrebări raportându-se la ultimele 7 zile. Scorul fiecărei întrebări variază între 0 și 3:

0 - deloc

1 - puțin

2 - mult

3 - foarte mult

Chestionarul trebuie aplicat la o anumită perioadă de timp, fără a deveni foarte frecvent pentru a evita riscul ca pacientul să devină familiar cu întrebările și răspunsurile să nu mai fie corespunzătoare. Se adresează persoanelor cu vârste de peste 18 ani. A fost alcătuită și o variantă

pentru copii - *Children's Dermatology Life Quality Index* (CDLQI). Există și o versiune cu benzi desenate, fiind foarte ușor de completat pentru copii.

Interpretarea scorului:

0-1 = fără efect asupra calității vieții pacientului

2-5 = efect scăzut asupra calității vieții pacientului

6-10 = efect moderat asupra calității vieții pacientului

11-20 = efect important asupra calității vieții pacientului

21- 30 = efect foarte important asupra calității vieții pacientului

Pentru evaluarea severității psoriazisului unii clinicieni au propus aplicarea regulii lui 10. Astfel psoriazisul sever se definește prin DLQI peste 10, scorul BSA peste 10 sau scorul PASI peste 10.

Întrebările chestionarului vizează simptomele și trăirile emoționale, activitățile zilnice, activitatea profesională, școlară, relațiile interpersonale și tratamentul. Totuși prezența simptomelor joacă un rol important în alterarea calității vieții. Testul DLQI se axează pe simptomatologie doar la prima întrebare. De remarcat că scorul PASI nu cuantifică simptomele pacienților cu psoriazis (ex prurit).

DLQI poate fi utilizat pentru evaluarea capacității unui tratament de a îmbunătăți calitatea vieții (16). Astfel a devenit un instrument foarte folosit în studiile clinice pentru terapia biologică (etanercept, efalizumab, etc).

DLQI este folosit în foarte multe boli dermatologice, cel mai frecvent fiind folosit în psoriazis, dermatită atopică și acnee. A fost introdus în foarte multe țări fiind tradus în peste 20 de limbi, inclusiv limba română. Aplicarea chestionarelor ce evaluează calitatea vieții trebuie să țină cont și de aspectele culturale. Astfel în urma unui studiu care a presupus aplicarea chestionarelor DLQI și Skindex unor pacienți de diferite naționalități au reieșit diferențe cu privire la nivelul afectării calității vieții deși de fapt exista același grad de impact asupra acesteia. De aceea se recomandă ca studiile clinice care folosesc aceste teste să includă pacienți cu aceleași obiceiuri culturale. În plus prin traducerea dintr-o limbă în alta sensul unor cuvinte se poate modifica.

Skindex 29

Utilizarea *Skindex 29* presupune aplicarea unui chestionar alcătuit din 29 de întrebări cu referire la simptome, integrarea socială și statusul emoțional. Spre deosebire de DLQI, răspunsul la întrebări vizează ultimele 4 săptămâni. Timpul de completare variază între 10-15 minute. În unele studii *Skindex 29* pare să aibă o sensibilitate superioară DLQI și PDI. S-a observat o corelație puternică cu DLQI.

S-a observat o corelație slabă între *Skindex 29*, prin raportare la scala simptomelor și PASI și SAPASI. Acest rezultat se poate datora faptului că *Skindex* evaluează prezența unor simptome precum pruritul sau senzația de arsură, care nu sunt evaluate de PASI și SAPASI.

Skindex 17 provine din scorul *Skindex 29*, prezentând doar două scale, cea a simptomelor și a statusului emoțional. În ceea ce privește adaptabilitatea din punct de vedere lingvistic și cultural, cele mai bune rezultate au fost obținute în cazul chestionarelor SF 36 și *Skindex 17*.

Short Form 36

Short Form 36 (SF36) este un chestionar bazat pe 36 de întrebări care ținesc următoarele componente, funcția fizică (limitarea unor activități zilnice precum îmbrăcat, spălat), limitarea activității fizice (afectarea activității de muncă), percepții generale ale stării de sănătate, durere, funcția socială, impact emoțional, sănătate mintală, vitalitate. Astfel utilizând SF 36 este evaluat impactul bolii asupra componentei fizice dar și asupra componentei psihice. Valorile pentru fiecare secțiune variază între 0 și 100. Cu cât scorul este mai mare cu atât starea de sănătate a celui evaluat este mai bună. Scorul evaluează de asemenea evoluția stării de sănătate în ultimul an.

SF 36 este un bun instrument utilizat în studiile clinice. SF 36 este un indicator folosit pentru aprecierea calității vieții în special la pacienții cu multiple afecțiuni, nefiind un instrument specific bolilor dermatologice. Secțiunea referitoare la durerea corporală și cea referitoare la împiedicarea activităților zilnice se corelează cel mai bine cu DLQI.

Psoriasis Disability Index

Psoriasis Disability Index (PDI) a fost primul instrument specific introdus pentru a determina calitatea vieții pacienților cu psoriazis. PDI exprimă măsura în care tratamentul modifică efectele psoriazisului asupra pacientului cu psoriazis. PDI presupune aplicarea unui chestionar cu 15 întrebări cu privire la activitățile zilnice, activitate profesională sau școlară, timp liber și tratament, desfășurate în ultimele 4 săptămâni. În practică este ușor de utilizat, timpul necesar completării nedepășind 5 minute. Valoarea maximă a scorului este 45, corespunzând unui efect marcat asupra calității vieții, iar cea minimă 0. Este destinat persoanelor cu vârste de peste 16 ani.

Studiile au arătat o corelație foarte bună între PASI și PDI, dar și între DLQI și PDI (26,52). Prezintă o sensibilitate scăzută în cazul pacienților cu un număr redus de leziuni și în cazul populațiilor diferite din punct de vedere cultural.

The Impact of Psoriasis Questionnaire

The Impact of Psoriasis Questionnaire (IPSO) este un chestionar alcătuit din 16 întrebări, scorul pentru fiecare întrebare variind între 0-4. Scorul final reflectă afectarea din punct de vedere fizic, psihologic și social a pacienților cu psoriazis. Studii recente au arătat că eficacitatea sa în aprecierea impactului pe care îl are psoriazisul asupra calității vieții este asemănătoare cu cea obținută în urma aplicării chestionarelor DLQI sau Skindex.

Cele 16 întrebări sunt împărțite în trei categorii, în funcție de domeniul evaluat, fizic, psihologic și social. Conform unui studiu, IPSO este cel mai rar folosit în studiile clinice, alături de **Psoriasis index of quality of life (PSORI-QOL)**, în schimb DLQI este cel mai utilizat. PSORI-QoL este un chestionar care pune accentul mai mult pe impactul psihologic decât pe componenta fizică a bolii. Realizarea sa a inclus pacienți din trei țări europene cu scopul de a se reduce riscul de apariție a diferențelor atunci când va fi tradus. Este un instrument promițător ce ar putea fi aplicat în clinică și studii clinice.

Psoriasis Life Stress Inventory

Psoriasis Life Stress Inventory (PLSI) este un indicator ce presupune 15 întrebări cu 4 posibilități de răspuns variind de la „deloc” la „foarte mult”. Prin aplicarea acestui chestionar este evaluat stresul pacientului datorat psoriazisului raportându-se la ultimele 4 luni.

Astfel scorul poate lua valori între 0 și 45. Pacienții cu un scor peste 10 prezintă un grad crescut de stres din cauza diagnosticului de psoriazis. Completarea chestionarului durează 10-15 minute. Spre deosebire de alte scoruri care pun accentul pe impactul psoriazisului asupra activităților zilnice, acest scor pune accentul în mod direct pe evenimentele stresante din cauza leziunilor de psoriazis cum ar fi purtarea de haine care să acopere leziunile, evitarea de către cei din jur, etc.

S-a observat o corelație bună cu DLQI și PDI, dar nu se corelează cu testele de evaluare a severității precum PASI și SAPASI.

II. Instrumente de evaluare a severității afectării unghiale din psoriazis

De multe ori, leziunile cutanate sunt trecute pe primul loc iar modificările unghiale sunt trecute cu vederea de către clinicieni. Dar trebuie avut în vedere că afectarea unghială are un impact psihologic semnificativ, cu deteriorarea calității vieții. Niciunul dintre instrumentele actuale de evaluare a severității nu includ și aprecierea la acest nivel.

Aproximativ 50% dintre pacienții cu psoriazis prezintă modificări unghiale. Afectarea izolată doar a unghiei, fără leziuni cutanate a fost observată la 5-10% dintre subiecți. Studiile au arătat că 70-80% dintre pacienții cu artrită psoriazică prezintă afectare unghială. Sunt mai frecvent afectate unghiile de la mâini față de cele de la picioare. În cele mai multe cazuri leziunile apar după debutul leziunilor cutanate.

Leziunile observate în psoriazisul unghial sunt diverse. La nivelul matricei unghiale apar depresiuni cupuliforme (pitting), leuconichie, pete roșii la nivelul lunulei și se observă aspectul sfărâncios al unghiei. Mai rar pot să apară liniile Beau. La nivelul patului unghial efectele bolii se traduc prin hiperkeratoză, onicoliză, decolorare în pată de ulei și hemoragii în așchie. Țesuturile periunghiale pot fi afectate cu dezvoltarea paronichiei subacute sau cronice.

Afectarea unghială la un pacient cu psoriazis poate fi considerată un semn al activității bolii dar și un precursor pentru apariția artritei psoriazice. Aproximativ 90% dintre pacienți resimt un disconfort cosmetic, iar jumătate afirmă afectarea activităților zilnice și profesionale. Prezența leziunilor unghiale este asociată cu un grad moderat spre sever al psoriazisului, leziunile unghiale pot fi considerate un indicator al severității bolii. Durerea apare la aproximativ 50% dintre pacienți.

În ceea ce privește afectarea unghială în psoriazis există un deficit a măsurării gravității și în special a impactului asupra calității vieții. De-a lungul timpului au fost propuse mai multe metode pentru evaluarea severității afectării unghiale la pacienții cu psoriazis, printre acestea se numără *Baran's nail psoriasis severity index*, *Cannavò's scoring system*, *Nail Psoriasis Severity Index*, cea din urmă fiind singura validată, fiind o metodă reproductibilă și facilă.

Nail Psoriasis Severity Index

Nail Psoriasis Severity Index (NAPSI) este cel mai utilizat scor pentru evaluarea severității psoriazisului unghial. Este un scor introdus recent, în anul 2003 de Riche și Scher. Metoda presupune divizarea unghiei în patru cadrane prin trasarea unor linii imaginare (una verticală și una orizontală) și evaluarea leziunilor matricei și patului unghial, în fiecare cadran. La nivelul matricei unghiale se va urmări prezența depresiunilor cupuliforme (pitting), leuconichiei, a petelor roșii de la nivelul lunulei și aspectul sfărâmicios al unghiei. La nivelul patului unghial trebuie evaluate prezența onicolizei, hiperkeratozei, hemoragiilor în așchie, decolorării în pată de ulei.

Inițial se calculează scorul fiecărui cadran. În lipsa acestor leziuni scorul este 0, iar în prezența tuturor este 4, această regulă aplicându-se atât pentru matricea unghială, cât și pentru patul unghial (se obțin două scoruri per cadran). Astfel scorul fiecărei unghii variază între 0 și 8, fiind obținut din suma scorului matricei unghiale și a patului unghial. Scorul final se obține adunând scorurile tuturor unghiilor, variind între 0 și 80 sau poate lua valori până la 160 dacă se evaluează și unghiile picioarelor. Pentru evaluarea celor 10 unghii de la mână metoda necesită între 10 și 15 minute. NAPSI nu este util în detectarea modificărilor minore.

Variația inter-observator pare a fi mai mare în ceea ce privește evaluarea leziunilor de la nivelul patului unghial față de evaluarea celor de la nivelul matricei. Dezavantajul NAPSI este că nu măsoară numărul petelor roșii, dimensiunea zonelor de decolorare în pată de ulei, sau nivelul hiperkeratozei subunghiale. Astfel este dificil de observat dacă apar modificări în urma tratamentului. De aceea unii autori au sugerat introducerea unei scale de la 0-ușor la 3-sever pentru o mai bună evaluare.

S-a observat o corelație bună între scorurile NAPSI și Cannavo. Spre deosebire de NAPSI, scorul Cannavo necesită un timp mai scurt pentru a fi calculat.

Van der Verden a analizat pacienții cu psoriazis unghial și a observat că leuconichia a fost foarte frecventă în lotul martor. Astfel a apărut ipoteza dacă leuconichia ar trebui eliminată din scorul NAPSI. O altă observație a fost frecvența crescută a liniilor Beau la pacienții cu psoriazis, liniile Beau nefiind incluse în scorul NAPSI. În urma acestor observații van der Verden et al. aduc în atenție posibilitatea modificării scorului NAPSI.

Target NAPSI presupune de asemenea divizarea unghiei în patru cadrane, scala de evaluare a fiecărei leziuni variază între 0 și 8, în fiecare cadran. Este evaluată unghia cea mai afectată. Pe perioada studiului se urmărește aceeași unghie evaluată inițial chiar dacă nu mai este cel mai sever deteriorată. Pentru evaluarea tratamentului se recomandă utilizarea scorului în combinație cu alte instrumente clinice.

Modified nail psoriasis severity index

Modified nail psoriasis severity index (MNAPSI) urmărește prezența aceluiași leziuni ca și în cazul scorului NAPSI, cu excepția faptului că onicoliza și decolorarea în pată de ulei sunt evaluate împreună. Unghia nu mai este divizată în patru cadrane. Scorul se obține prin adunarea valorilor corespunzătoare celor 7 leziuni, obținute conform metodei prezentate în tabelul de mai jos. Realizarea acestui scor a avut ca scop obținerea unui scor mai simplu și mai ușor de utilizat în practică decât scorul NAPSI.

Tabel 2. Scorul MNAPSI

Oniciliză și decolorare în pată de ulei	0 - 0% 1 - ≤10% 2 - 11-30% 3 - >30%
Pitting	0 - 0 1 - 1-10 2 - 11-49 3 - ≥50
Aspect sfărâmicios al unghiei	0 - 0% 1 - 1-25% 2 - 26-50% 3 - >50%
Leuconichie Pete roșii Hemoragii în așchie Hiperkeratoză	0 - prezent 1 - absent

Nail psoriasis quality of life scale

Nail psoriasis quality of life scale (NPQ 10) este un instrument care apreciază impactul psoriazisului unghial asupra calității vieții. Are la bază un chestionar cu 10 întrebări. Prima întrebare evaluează gradul de durere de la nivel unghial, iar restul estimează gradul de împiedicare a efectuării activităților zilnice. Întrebărilor li se atribuie scoruri de la 0 la 2, iar ulterior se adună toate scorurile pentru obținerea scorului final. Scorurile sunt transformate în procente. Jong et al. în 1996 au atras atenția pentru prima dată asupra afectării calității vieții la pacienții cu psoriazis unghial. S-a identificat o bună corelație cu DLQI și valori mai crescute la persoanele de sex feminin.

Nail Assessment in Psoriasis and Psoriatic Arthritis

Nail Assessment in Psoriasis and Psoriatic Arthritis (NAPPA) este un chestionar alcătuit din 3 părți. Prima parte apreciază gradul de alterare a calității vieții (NAPPA-QoL), ținând seama de simptomatologia din ultima săptămână. A doua parte (NAPPA-PBI), care evaluează eficacitatea tratamentelor administrate este subîmpărțită în două chestionare, primul fiind completat înainte de inițierea terapiei iar cel de-al doilea în timpul sau după încheierea tratamentului. Ultima parte (NAPPA-CLIN) presupune aprecierea severității clinice a unghiilor prin evaluarea celei mai puțin afectate și celei mai grav afectate unghii de la mâini și picioare. Scorurile celor 4 unghii se adună și se obține scorul final.

S-a observat o corelare bună a chestionarelor NAPPA-QoL și NAPPA-PBI cu chestionarele care apreciază calitatea vieții, în schimb corelația cu scorul NAPSI a fost moderată. NAPPA-CLIN s-a corelat foarte bine cu scorul NAPSI.

III. Instrumente de evaluare a severității artritei psoriazice

Prevalența artritei psoriazice în Europa variază între 0.02%-0.42%. Artrita psoriazică este inclusă în categoria spondiloartritelor seronegative având un efect eroziv asupra articulațiilor, ceea ce conduce la dizabilitate ce uneori poate deveni importantă. Astfel artrita psoriazică poate avea un marcat impact fizic și psihologic asupra pacientului. Totuși studiile arată că într-un procent semnificativ aceasta nu este diagnosticată, fiind necesare metode pentru screening.

Majoritatea cazurilor se asociază cu psoriazis vulgar, într-un procent redus (5%) observându-se asocierea cu psoriazis gutat sau pustulos. În patogeneza bolii sunt implicați numeroși factori. Se pare că un rol important îl dețin limfocitele T. Citokinele proinflamatorii TNF alfa și IL 1 induc eliberarea factorilor de creștere de la nivel articular cu creșterea infiltratului inflamator și îngroșare capilară. Efectul benefic al inhibitorilor de TNF alfa reprezintă o dovadă a rolului acestuia în patogeneza bolii. Terapia biologică a îmbunătățit cu mult evoluția bolii și calitatea vieții pacienților. Între 6-39% dintre pacienții cu psoriazis vor dezvolta artrită psoriazică. Afectarea articulară apare de obicei după debutul psoriazisului.

Sunt disponibile mai multe instrumente pentru a măsura efectele afecțiunii asupra statusului fizic și psihologic.

Psoriatic Arthritis Response Criteria

Psoriatic Arthritis Response Criteria (PsARC) este un scor care inițial a fost introdus pentru evaluarea eficacității sulfasalizinei. Cuprinde evaluarea globală realizată de medic, de pacient, numărul de articulații dureroase și numărul de articulații mărite în volum. Pentru a se considera eficient tratamentul, este necesar să se fi remediat 2 itemi, dar unul să se refere la articulații. Referitor la itemii ce evaluează articulațiile trebuie să se observe o ameliorare cu cel puțin 30%. În primul studiu realizat cu un agent biologic pentru evaluarea rezultatelor s-a folosit PsARC. Actual scorul este folosit pentru evaluarea diferitelor terapii biologice (etanercept, infliximab) pentru tratamentul artritei psoriazice.

Psoriatic Arthritis Impact Profile

Psoriatic Arthritis Impact Profile (PAIP) are la bază 5 părți, o parte generală și 4 părți speciale. Partea generală aduce informații despre durata psoriazisului și a artritei psoriazice, spitalizări rezultate din cauza acestor afecțiuni, tratamentele urmate, suprafața corporală afectată și durerea resimțită de pacient, evaluată prin scala VAS. Părțile speciale se focusează pe evaluarea psihologică, socială, reumatologică și socioeconomică. Scorul final presupune adunarea scorurilor corespunzătoare celor 4 părți speciale și variază între 0-82 pentru pacienții cu artrită psoriazică și 0-54 pentru cei cu psoriazis.

Psoriatic Arthritis Screening and Evaluation

Psoriatic Arthritis Screening and Evaluation (PASE) reprezintă un instrument pentru identificarea pacienților cu psoriazis care necesită un consult reumatologic. Cuprinde un chestionar ce include 15 întrebări care evaluează simptomatologia (7 întrebări) și funcția fizică (8 întrebări) ale pacientului. Cu cât scorul este mai mare cu atât riscul co-existenței artritei psoriazice este mai mare.

PASE ar putea fi folosit nu numai pentru screening ci și pentru monitorizare. PASE detectează modificările apărute în urma tratamentului, astfel poate fi utilizat pentru monitorizarea eficacității acestuia. PASE are avantajul că diferențiază simptomele de artrită psoriazică față de cele de osteoartrită.

Psoriatic Arthritis Quality of Life

Recent a fost introdus chestionarul *Psoriatic Arthritis Quality of Life* (PsAQoL) ce poate fi utilizat în studiile clinice și presupune evaluarea calității vieții celor cu artrită psoriazică, celelalte chestionare vizând mai mult consecințele fizice ale bolii, legate de gradul de dizabilitate.

PsAQoL este un instrument ușor de folosit, necesită un timp scurt și oferă informații fidele cu privire la calitatea vieții la pacienții cu artrită psoriazică. Este alcătuit din 20 de întrebări cu variante de răspuns “da” sau “nu”, scorul maxim care poate fi obținut fiind 20, corelându-se cu un grad scăzut al calității vieții. Scorul PsAQoL nu este influențat de durata evoluției bolii și identifică pacienții care prezintă o exacerbare a artritei.

Un alt chestionar care evaluează impactul pe care îl are artrita psoriazică asupra calității vieții pacienților este Psoriatic Arthritis Impact of Disease (PsAID), disponibil în două variante, pentru practica medicală și pentru studiile clinice.

Concluzii

Psoriazisul este o afecțiune ce afectează un segment semnificativ din populație, cu implicații atât la nivel fizic cât și psihologic. Monitorizarea evoluției leziunilor și a eficacității tratamentului reprezintă elemente cheie în managementul psoriazisului. De aceea utilizarea instrumentelor clinice pentru evaluarea severității bolii, în practica medicală contribuie la o mai bună abordare a pacientului cu psoriazis. Sunt disponibile numeroase instrumente care se concentrează atât pe evaluarea componentei fizice cât și psihice. Totuși, indicatorii de evaluare a severității psoriazisului existenți prezintă dezavantaje din cauza complexității, uneori a sensibilității scăzute sau a lipsei standardizării. De aceea din ce în ce mai multe studii se focusează pe realizarea unui instrument care să se apropie cât mai mult de ideal.

Aceste instrumente clinice sunt mult mai mult utilizate în studiile clinice, jucând un rol important în special în studiile referitoare la terapia biologică.

Bibliografie

1. Weigle N, McBan S. Psoriasis. Am Fam Physician. 2013;87(9):626-633.
2. Ayala F. Clinical presentation of psoriasis. Reumatismo. 2007;59 Suppl 1:40-5.
3. Ruiz DG, Azevedo MN, Santos OL. Psoriatic arthritis: a clinical entity distinct from psoriasis? Rev Bras Reumatol. 2012 Aug;52(4):630-8.
4. Colimbra S, Oliveira H, Figueiredo A, et al. Psoriasis: Epidemiology, Clinical and Histological Features, Triggering Factors, Assessment of Severity and Psychosocial Aspects. Psoriasis - A Systemic Disease, Dr. Jose O' Daly (Ed.), ISBN: 978-953-51-0281-6.
5. Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, et al. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. Mc. Graw-Hill Professional; Seventh edition. 2007. ISBN-10: 0071466908.

6. Langley RG, Krueger GG, Griffiths CE. Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life. *Ann Rheum Dis.* 2005;64 Suppl 2:ii18-23.
7. Fouéré S, Adjadj L, Pawin H. How patients experience psoriasis: results from a European survey. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2005;19 Suppl 3:2-6.
8. McKenna SP, Cook SA, Whalley D, et al. Development of the PSORIQoL, a psoriasis-specific measure of quality of life designed for use in clinical practice and trials. *Br J Dermatol.* 2003;149(2):323-31.
9. Bhosle MJ, Kulkarni A, Feldman SR et al. Quality of life in patients with psoriasis. *Health Qual Life Outcomes.* 2006;4:35.
10. Prins M, Krabbe PF, Swinkels QO, et al. The effect of treatment on quality of life in psoriasis patients. *Acta Derm Venereol.* 2005;85(4):304-10.
11. Puzenat E, Bronsard V, Prey S, et al. What are the best outcome measures for assessing plaque psoriasis severity? A systematic review of the literature. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2010;24 Suppl 2:10-6.
12. Silva MF, Fortes MR, Miot LD, Marques SA. Psoriasis: correlation between severity index (PASI) and quality of life index (DLQI) in patients assessed before and after systemic treatment. *An Bras Dermatol.* 2013;88(5):760-3.
13. Doward LC, Meads DM, Thorsen H. Requirements for quality of life instruments in clinical research. *Value Health.* 2004;7 Suppl 1:S13-6.
14. Mazzotti E, Barbaranelli C, Picardi A, et al. Psychometric properties of the Dermatology Life Quality Index (DLQI) in 900 Italian patients with psoriasis. *Acta Derm Venereol.* 2005;85(5):409-13.
15. Lewis V, Finlay AY. 10 years experience of the Dermatology Life Quality Index (DLQI). *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2004;9(2):169-80.
16. Mease PJ, Antoni CE, Gladman DD, Taylor WJ. Psoriatic arthritis assessment tools in clinical trials. *Ann Rheum Dis.* 2005;64 Suppl 2:ii49-54
17. Sampogna F, Sera F, Abeni D. Measures of clinical severity, quality of life, and psychological distress in patients with psoriasis: a cluster analysis. *J Invest Dermatol.* 2004;122(3):602-7.
18. Faria JR, Araújo AR, Jimenez LM, et al. Inter-rater concordance study of the PASI (Psoriasis Area and Severity Index). *An Bras Dermatol.* 2010;85(5):625-9.
19. Gourraud PA, Le Gall C, Puzenat E, et al. Why statistics matter: limited inter-rater agreement prevents using the psoriasis area and severity index as a unique determinant of therapeutic decision in psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2012;132(9):2171-5.
20. Cappelleri JC, Bushmakina AG, Harness J, Mamolo C. Psychometric validation of the physician global assessment scale for assessing severity of psoriasis disease activity. *Qual Life Res.* 2013;22(9):2489-99
21. Chularojanamontri L, Griffiths CE, Chalmers RJ. Responsiveness to change and interpretability of the simplified psoriasis index. *J Invest Dermatol.* 2014;134(2):351-8.
22. Bonifati C, Berardesca E. Clinical outcome measures of psoriasis. *Reumatismo.* 2007;59 Suppl 1:64-7.
23. Carlin CS, Feldman SR, Krueger JG, et al. A 50% reduction in the Psoriasis Area and Severity Index (PASI 50) is a clinically significant endpoint in the assessment of psoriasis. *J Am Acad Dermatol.* 2004;50(6):859-66.
24. Chow C, Simpson MJ, Luger TA, et al. Comparison of three methods for measuring psoriasis severity in clinical studies (Part 1 of 2): change during therapy in Psoriasis Area and Severity

- Index, Static Physician's Global Assessment and Lattice System Physician's Global Assessment. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015;29(7):1406-14
25. Chularojanamontri L, Griffiths CE, Chalmers RJ. The Simplified Psoriasis Index (SPI): a practical tool for assessing psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2013;133(8):1956-62.
 26. Menter A, Tying SK, Gordon K, et al. Adalimumab therapy for moderate to severe psoriasis: A randomized, controlled phase III trial. *J Am Acad Dermatol*. 2008;58(1):106-15
 27. Mease PJ. Assessment tools in psoriatic arthritis. *J Rheumatol*. 2008;35(7):1426-30.
 28. Reich K, Griffiths CE. The relationship between quality of life and skin clearance in moderate-to-severe psoriasis: lessons learnt from clinical trials with infliximab. *Arch Dermatol Res*. 2008;300(10):537-44
 29. Darjani A, Heidarzadeh A, Golchai J, et al. Quality of life in psoriatic patients: a study using the short form-36. *Int J Prev Med*. 2014;5(9):1146-52.
 30. Mattei PL, Corey KC, Kimball AB. Psoriasis Area Severity Index (PASI) and the Dermatology Life Quality Index (DLQI): the correlation between disease severity and psychological burden in patients treated with biological therapies. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014;28(3):333-7.
 31. Loudon BA, Pearce DJ, Lang W, Feldman SR. A Simplified Psoriasis Area Severity Index (SPASI) for rating psoriasis severity in clinic patients. *Dermatol Online J*. 2004;10(2):7.
 32. Szepietowski JC, Sikota M, Pacholek T, et al. Clinical evaluation of the self administered Psoriasis Area and Severity Index (SAPASI). *Acta Dermatoven*. 2001;10(3):79-83
 33. Sampogna F, Sera F, Mazzotti E, et al. Performance of the self-administered psoriasis area and severity index in evaluating clinical and sociodemographic subgroups of patients with psoriasis. *Arch Dermatol*. 2003;139(3):353-8.
 34. Jacobson CC, Kimball AB. Rethinking the Psoriasis Area and Severity Index: the impact of area should be increased. *Br J Dermatol*. 2004;151(2):381-7.
 35. Spuls PI, Lecluse LL, Poulsen ML, et al. How good are clinical severity and outcome measures for psoriasis?: quantitative evaluation in a systematic review. *J Invest Dermatol*. 2010;130(4):933-43.
 36. Mikhail M, Scheinfeld N. Psoriasis severity, scoring, and treatment with phototherapy and systemic medications . *Systemic treatment of psoriasis*. 2005;5(1):38-45
 37. Jensen JD, Fujita M, Dellavalle RP. Validation of psoriasis clinical severity and outcome measures: searching for a gold standard. *Arch Dermatol*. 2011;147(1):95-8
 38. Mustafa AA, Al-Hoqail IA. Biologic systemic therapy for moderate-to-severe psoriasis: A review, *Journal of Taibah University Medical Sciences*. 2013;8(3):142–150.
 39. Walsh JA, McFadden M, Woodcock J, et al. Product of the Physician Global Assessment and body surface area: a simple static measure of psoriasis severity in a longitudinal cohort. *J Am Acad Dermatol*. 2013;69(6):931-7.
 40. Shikar R, Willian MK, Okun MM, et al. The validity and responsiveness of three quality of life measures in the assessment of psoriasis patients: results of a phase II study. *Health Qual Life Outcomes*. 2006;4:71.
 41. Simpson MJ, Chow C, Morgenstern H, et al. Comparison of three methods for measuring psoriasis severity in clinical studies (Part 2 of 2): use of quality of life to assess construct validity of the Lattice System Physician's Global Assessment, Psoriasis Area and Severity Index and Static Physician's Global Assessment. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015;29(7):1415-20
 42. Finlay AY. Current severe psoriasis and the rule of tens. *Br J Dermatol*. 2005;152(5):861-7.

43. Ograczyk A, Miniszewska J, Kępska A, Zalewska-Janowska A. Itch, disease coping strategies and quality of life in psoriasis patients. *Postepy Dermatol Alergol.* 2014;31(5):299-304.
44. Berth-Jones J, Thompson J, Papp K, et al. A study examining inter-rater and intrarater reliability of a novel instrument for assessment of psoriasis: the Copenhagen Psoriasis Severity Index. *Br J Dermatol.* 2008;159(2):407-12.
45. Dilnawaz M, Sadiq S, Shaikh ZI, et al. Clinical audit: baseline Psoriasis Area and Severity Index (PASI) and Dermatology Life Quality Index (DLQI) assessment of psoriasis patients. *J Pakistan Assoc Dermatol.* 2013;23(4):407-411
46. Lin TY, See LC, Shen YM, et al. Quality of life in patients with psoriasis in northern Taiwan. *Chang Gung Med J.* 2011;34(2):186-96.
47. Nijsten T, Meads DM, de Korte J, et al. Cross-cultural inequivalence of dermatology-specific health-related quality of life instruments in psoriasis patients. *J Invest Dermatol.* 2007;127(10):2315-22.
48. Fernandez-Peñas P, Jones-Caballero M, Espallardo O, García-Díez A. Comparison of Skindex-29, Dermatology Life Quality Index, Psoriasis Disability Index and Medical Outcome Study Short Form 36 in patients with mild to severe psoriasis. *Br J Dermatol.* 2012;166(4):884-7.
49. Nijsten TE, Sampogna F, Chren MM, Abeni DD. Testing and reducing skindex-29 using Rasch analysis: Skindex-17. *J Invest Dermatol.* 2006;126(6):1244-50.
50. Bronsard V, Paul C, Prey S, et al. What are the best outcome measures for assessing quality of life in plaque type psoriasis? A systematic review of the literature. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2010;24 Suppl 2:17-22.
51. Aghaei S, Moradi A, Ardekani GS. Impact of psoriasis on quality of life in Iran. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2009;75(2):220.
52. Pakran J, Riyaz N, Nandakumar G. Determinants of quality of life in psoriasis patients: a cluster analysis of 50 patients. *Indian J Dermatol.* 2011;56(6):689-93.
53. Nijsten T, Whalley D, Gelfand J, et al. The psychometric properties of the psoriasis disability index in United States patients. *J Invest Dermatol.* 2005;125(4):665-72.
54. Nijsten T, Unaeze J, Stern RS. Refinement and reduction of the Impact of Psoriasis Questionnaire: classical test theory vs. Rasch analysis. *Br J Dermatol.* 2006;154(4):692-700.
55. Gupta MA, Gupta AK. The Psoriasis Life Stress Inventory: a preliminary index of psoriasis-related stress. *Acta Derm Venereol.* 1995;75(3):240-3.
56. Reich K. Approach to managing patients with nail psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2009;23 Suppl 1:15-21
57. Augustin M, Ogilvie A. Methods of outcomes measurement in nail psoriasis. *Dermatology.* 2010;221 Suppl 1:23-8.
58. Dogra A, Arora AK. Nail psoriasis: the journey so far. *Indian J Dermatol.* 2014;59(4):319-33.
59. Schons KR, Knob CF, Murussi N, et al. Nail psoriasis: a review of the literature. *An Bras Dermatol.* 2014;89(2):312-7.
60. Radtke MA, Langenbruch AK, Schäfer I, et al. Nail psoriasis as a severity indicator: results from the PsoReal study. *Patient Relat Outcome Meas.* 2011;2:1-6.
61. Mukai MM, Poffo IF, Werner B. NAPSUI utilization as an evaluation method of nail psoriasis in patients using acitretin. *An Bras Dermatol.* 2012;87(2):256-62.

62. Aktan S, Ilknur T, Akin C, Ozkan S. Interobserver reliability of the Nail Psoriasis Severity Index. *Clin Exp Dermatol.* 2007;32(2):141-4.
63. Haneke E. Nail Psoriasis, Psoriasis, Dr. Jennifer Soung (Ed.), 2012. ISBN: 978-953-307-878-6,
64. Kaçar N, Ergin S, Erdoğan BS. The comparison of Nail Psoriasis Severity Index with a less time-consuming qualitative system. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2008;22(2):219-22.
65. van der Velden HM, Klaassen KM, van de Kerkhof PC, Pasch MC. Fingernail psoriasis reconsidered: a case-control study. *J Am Acad Dermatol.* 2013;69(2):245-52.
66. Rigopoulos D, Tosti A. Nail Psoriasis: From A to Z. Springer. 2014. 73-77.
67. Mease PJ. Measures of psoriatic arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2011;63 Suppl 11:S64-85.
68. Ortonne JP, Baran R, Corvest M, et al. Development and validation of nail psoriasis quality of life scale (NPQ10). *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2010;24(1):22-7.
69. Augustin M, Blome C, Costanzo A, et al. Nail Assessment in Psoriasis and Psoriatic Arthritis (NAPPA): development and validation of a tool for assessment of nail psoriasis outcomes. *Br J Dermatol.* 2014;170(3):591-8
70. Liu JT, Yeh HM, Liu SY, Chen K. Psoriatic arthritis: Epidemiology, diagnosis, and treatment. *World J Orthop.* 2014;5(4):537-43.
71. Mease PJ. Psoriatic arthritis - update on pathophysiology, assessment, and management. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2010;68(3):191-8.
72. Salvarani C, Pipitone N, Catanoso MG. Clinical assessment in psoriatic arthritis. *Reumatismo.* 2007;59 Suppl 1:68-72.
73. Mease PJ, Antoni CE, Gladman DD, Taylor WJ. Psoriatic arthritis assessment tools in clinical trials. *Ann Rheum Dis.* 2005;64 Suppl 2:ii49-54
74. Coaccioli S, Bruno AA, Celi G, et al. Validation of an original questionnaire for patients with psoriatic arthritis: the Psoriatic Arthritis Impact Profile (PAIP). *Clin Ter.* 2014;165(2):e100-8.
75. Qureshi AA, Dominguez P, Duffin KC, et al. Psoriatic arthritis screening tools. *J Rheumatol.* 2008;35(7):1423-5.
76. Dominguez PL, Husni ME, Holt EW, et al. Validity, reliability, and sensitivity-to-change properties of the psoriatic arthritis screening and evaluation questionnaire. *Arch Dermatol Res.* 2009;301(8):573-9.
77. Husni ME, Meyer KH, Cohen DS, et al. The PASE questionnaire: pilot-testing a psoriatic arthritis screening and evaluation tool. *J Am Acad Dermatol.* 2007;57(4):581-7.
78. Wink F, Arends S, McKenna SP, et al. Validity and reliability of the Dutch adaptation of the Psoriatic Arthritis Quality of Life (PsAQoL) Questionnaire. *PLoS One.* 2013;8(2):e55912.
79. McKenna SP, Doward LC, Whalley D, et al. Development of the PsAQoL: a quality of life instrument specific to psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2004;63(2):162-9.
80. Gossec L, de Wit M, Kiltz U, Braun J, et al. A patient-derived and patient-reported outcome measure for assessing psoriatic arthritis: elaboration and preliminary validation of the Psoriatic Arthritis Impact of Disease (PsAID) questionnaire, a 13-country EULAR initiative. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(6):1012-9.

11. DEZVOLTAREA DE TERAPII CELULARE ÎN BOLILE OSTEOARTICULARE: CELULELE STEM

*✍ Laura-Cristina Rusu, Simona Sanda Anghel, Florina Maria Bojin,
Gabriela Tănăsie*

Studiul celulelor stem face parte dintre cele mai moderne abordări ale medicinei actuale. Descoperiri importante apărute în studiile de laborator și în cele clinice au crescut foarte mult utilizarea acestora.

Pentru a putea exploata potențialul celulelor stem, e nevoie să se găsească un mod sigur și eficient de a înmulți celule stem umane in vivo sau in vitro. E de asemenea important să se înțeleagă felul în care funcționează sistemul imun – mai ales în ceea ce privește combaterea infecțiilor, rejețul grefelor și boala „greafă contra gazdă” – precum și diferențierea celulelor stem.

Progresul în terapia genică și studiile în domeniul plasticității celulelor stem ar putea transforma aceste celule într-un instrument terapeutic foarte important.

Studiul celulelor stem a început încă din 1960, când Ernest A. McCulloch și James E. Till au evidențiat natura clonală a celulelor medulare. În 1970 Fridenstein și colaboratorii săi au izolat aceste celule pe baza capacității lor de a adera la suprafețele de cultură. Ei le-au numit datorită formei celulare specifice, unități formatoare de colonii fibroblastice. În 1998 James Thomson de la Universitatea din Wisconsin-Madison a izolat celule din masa celulară internă a unui blastocist și a obținut prima linie de celule stem embrionare umane. În același timp John Gearhart la Universitatea Johns Hopkins a raportat prima izolare de celule embrionare germinale din creasta genitală. În 1999, echipa condusă de Mark Pittenger și în 2000 echipa condusă de Coelho, au demonstrat capacitatea celulei mezenchimale umane de a se diferenția sub acțiunea unor factori de mediu în osteoblaste, condroblaste și adipocite.

Majoritatea studiilor cu privire la plasticitatea celulelor stem adulte folosesc celule provenite din măduva osoasă hematogenă. În măduvă există mai multe populații de celule stem, celulele stem mezenchimale, cu potențial multiplu: osteogenic, condrogenic, adipogenic, miogenic, neuronal, dar și celulele stem hematopoietice care sunt în prezent cel mai bine caracterizate, fiind progenitori ai tuturor celulelor sanguine. Terapiile cu celule stem au fost utilizate prima dată în leucemii, unde au fost folosite cu succes celule stem hematopoietice medulare pentru transplant.

Potențialul plastic al celulelor stem este folosit ca bază de plecare în terapiile cu celule stem nediferențiate sau diferențiate in vitro într-o serie de maladii, precum bolile osteo-articulare, cardio-vasculare, metabolice și neuro-degenerative.

A fost investigat recent potențialul celulelor stem mezenchimale de a fi o sursă celulară pentru ingineria tisulară vasculară, demonstrându-se că suporturile însăși înțate cu aceste celule dezvoltă o matrice cu o compoziție asemănătoare cu cea a suporturilor însăși înțate cu celule vasculare, ceea ce a reprezentat un rezultat promițător.

În ultimul timp s-a încercat fundamentarea unor terapii inovative cu aplicare în tratarea unor boli cronice osteo-articulare. Afecțiunile degenerative corelate cu vârsta, fac parte din categoria afecțiunilor cu mare impact socio-economic, necesitând spitalizare, proceduri de reabilitare, îngrijiri la domiciliu. La nivel european prevalența osteoartritei este de aproximativ

12% între 25 - 50 de ani, iar peste 60 de ani atinge chiar 95%. Tratatamentul prin proceduri de transplant celular combinate cu tehnici de bioinginerie tisulară, vor duce la accelerarea recuperării funcționale, scurtarea perioadei de spitalizare și reducerea ratei complicațiilor.

Aplicabilitatea terapiei cu celule stem s-a extins și în domeniul medicinei dentare. Aceasta vizează celulele stem adulte, situate în interiorul pulpei dentare care au potențialul de a se transforma în celule odontoblastice sub acțiunea anumitor stimuli. Un grup de cercetători a anunțat că a reușit să parcurgă un pas important în procesul de inducere a celulelor pulpare de a se diferenția în celule producătoare de dentină, numite odontoblaști. Utilizând șoareci de experiență, oamenii de știință au implantat fragmente de colagen prelevate din matricea proteică aparținând pulpei dentare a molarilor și au urmărit efectele. Fiecare fragment de colagen a fost saturat cu forma recombinată a unei gene, numită matrice dentinară-1 (DMP 1), care codifică de fapt o proteină a dentinei, care în studiile precedente s-a dovedit a induce transformarea celulelor mezenchimale nediferențiate în celule odontoblastice. După o perioadă de două săptămâni cercetătorii au observat că DMP 1 a avut efect similar și în cazul molarilor la șoarecii de laborator, nu doar în condițiile in vitro, pe culturile celulare. Astfel, s-a constatat că această proteină are calitatea de a iniția diferențierea celulelor pulpare tinere în forme celulare care sintetizează țesut dentar dur. Acesta din urmă se aseamănă foarte mult cu dentina, având în vedere proprietățile sale: prezența depozitelor calcificate, markerii proteici ai celulelor nou formate sunt specifice și odontoblaștilor și prezența matricei de colagen.

Un indiciu deosebit de important în perspectiva unei terapii cu celule stem aduc recentele studii care demonstrează capacitatea celulelor stem de a induce toleranța la nivel de țesut, sistemul imun al gazdei recunoscând drept propriu, țesutul derivat din celulele stem, iar grefa nu este respinsă. Această inducere a toleranței în caz de aloigenie sau xenogenie, fără utilizarea unor procedee de imunosupresie indusă, a fost demonstrată la rozătoare în care transplantul de măduvă a dus la obținerea unor animale mozaic și în modele de șoareci sau șobolan transplantați cu celule stem. Astfel, pare posibil ca transplantul de celule stem să depășească problema autoimunității.

Capacitatea celulelor stem de a reconstitui unele țesuturi prin migrare, proliferare și diferențiere spre oricare din cele trei foițe embrionare, precum și posibilitatea de a reproduce acest proces în culturi in vitro, a generat în ultimii ani o multitudine de experimente, protocoale și rezultate.

De asemenea, celulele stem adulte reprezintă o alternativă mult mai puțin controversată, etic și terapeutic, decât celulele stem embrionare.

CARACTERISTICILE CELULELOR STEM

Celula stem are proprietatea de a se divide (autoreplica) pe perioade nedefinite de timp - adeseori pe toată durata vieții organismului. Pe lângă capacitatea de autoreînnoire, în condiții adecvate sau primind semnale corespunzătoare, celulele stem pot să se diferențieze în toate tipurile diferite de celule care formează organismul. Adică, celulele stem au potențialul de a se dezvolta în celule diferențiate care au forme caracteristice și funcții specializate, precum celulele cardiace, celulele epiteliale, celulele nervoase, etc.

Diviziunea celulelor stem poate fi: simetrică și asimetrică. Prin diviziune simetrică rezultă fie două noi celule stem (păstrând astfel caracterul nediferențiat), fie două celule diferențiate (specializate). Prin diviziune asimetrică rezultă o celulă stem și o celulă diferențiată.

Clasificarea celulelor stem

În funcție de originea lor, celulele stem se clasifică în:

- celule stem embrionare, ce pot proveni de la embrioni, fetoși sau de la embrioni clonați în laborator;
- celule stem adulte, au originea în organismul matur și ajută la menținerea și repararea țesuturilor, dând naștere în special tipului celular caracteristic țesutul din care provin.

În funcție de potențialul lor de diferențiere, celulele stem au fost clasificate astfel:

- totipotente, capabile de a da naștere tuturor tipurilor celulare embrionare și extraembrionare. “Toti”- derivat din latinescul *totus* - înseamnă tot, în întregime. Din celulele stem totipotente se formează embrionul și trofoblastul placentar, deci, pot genera întregul organism. Exemple de celule stem totipotente sunt celulele-ou și celulele morulei;
- pluripotente, pot da naștere la aproape toate tipurile celulare ce derivă din cele trei foițe embrionare. De exemplu, celulele stem embrionare sunt considerate pluripotente deoarece acestea nu se pot diferenția și în celulele stratului extern al blastocistului care va forma placenta și nu pot dezvolta un întreg organism;
- multipotente, capabile să producă o categorie limitată de linii celulare diferențiate. De exemplu, celulele stem hematopoietice, celulele stem mezenchimale;
- unipotente, au abilitatea de a genera un singur tip de celule, dar spre deosebire de celulele non-stem prezintă capacitatea de a se autoreînnoi.

Termenul “pluripotent” este utilizat de majoritatea oamenilor de știință pentru a descrie celulele stem care se pot diferenția în celule derivate din toate cele trei straturi (foițe) germinative embrionare - mezoderm, endoderm, și ectoderm. Aceste trei straturi germinative sunt sursa embrionară pentru toate celulele organismului. Toate tipurile diferite de celule specializate care compun organismul provin din unul din aceste straturi germinative. “Pluri”-derivat din latinescul *plures* - înseamnă mai multe. Deci, celulele pluripotente au potențialul de a se dezvolta spre orice tip de celulă, o proprietate constatată în cursul natural al dezvoltării embrionare și în anumite condiții de laborator.

Tabel 1. Straturile germinative embrionare din care se dezvoltă țesuturile diferențiate

STRAT GERMINATIV EMBRIONAR	ȚESUT DIFERENȚIAT
Endoderm	Timus
	Glande tiroide și paratiroide
	Laringe, trahee, plămân
	Vezica urinară, vagin, uretră
	Organe digestive (ficat, pancreas)
	Mucoasa tractului digestiv
	Mucoasa tractului respirator
Mezoderm	Măduva osoasă (sânge)
	Corticosuprarenala
	Țesut limfatic
	Fibre musculare striate, netede și miocardice
	Țesut conjunctiv (inclusiv cel osos și cartilagos)

	Sistemul urogenital
	Inima și vasele sanguine (sistemul vascular)
Ectoderm	Piele
	Țesut nervos
	Medulosuprarenala
	Hipofiza
	Țesutul conjunctiv al capului și al feței
	Ochi, urechi

Celula stem embrionară este definită prin originea sa, adică provine din unul din stadiile timpurii ale dezvoltării embrionare, numit blastocist. După primele 2-3 zile de la fertilizare, embrionul se prezintă sub forma unei aglomerări de celule, morula. Următorul stadiu embrionar este blastocistul, alcătuit din celule dispuse în două straturi, unul exterior din care se va forma placenta și unul interior, o masă de celule internă, din care sunt recoltate celulele stem embrionare în faza anterioară implantării acestuia în peretele uterin. Celulele stem de după a 5-a zi sunt pluripotente și nu totipotente, pentru că ele nu se pot diferenția și în celulele stratului extern al blastocistului care va forma placenta.

Celula stem embrionară se poate autoreplica și este pluripotentă - adică poate să genereze celule derivate din toate cele trei straturi germinative embrionare. Utilizarea lor este însă limitată din considerente etice. Expresia unor markeri de pluripotență (transcription factors) ca Oct-4, Nanog și Sox-2 este caracteristică acestor celule.

Celula stem unipotentă, un termen care este utilizat de obicei pentru o celulă într-un organism adult, înseamnă că celulele în discuție sunt capabile să se diferențieze de-a lungul unei singure linii de descendență. "Uni" derivă din cuvântul latin unus, care înseamnă unu. Este posibil ca unele celule stem adulte aflate în multe țesuturi diferențiate și intacte (nelezate), să fie unipotente și să se dezvolte în condiții normale spre un singur tip de celule. Acest proces ar permite o stare permanentă de autoreînnoire a acestui țesut. Totuși, dacă țesutul este lezat și este necesară înlocuirea mai multor tipuri de celule, celulele stem multipotente pot fi activate pentru a repara leziunea.

Celula stem adultă este o celulă nediferențiată (nespecializată) care se găsește într-un țesut diferențiat (specializat); ea poate să se autoreînnoiască și poate să devină specializată pentru a produce toate tipurile de celule specializate ale țesutului din care a provenit. Celule stem adulte sunt capabile de regenerare (autoreînnoire) pe durata vieții organismului.

Lista țesuturilor adulte care conțin celule stem, crește continuu și include măduva osoasă, periostul, țesutul adipos, sângele periferic, creierul, vasele sanguine, musculatura scheletică, pielea și mucoasa digestivă, ficatul și pancreasul, pulpa dentară.

În concluzie, celulele stem embrionare umane prezintă o capacitate replicativă virtual nelimitată, cu potențial de a da naștere majorității, dacă nu tuturor tipurilor celulare diferențiate (25,26). Această caracteristică este desemnată de termenul științific de "pluripotență." Celulele stem adulte sunt nespecializate, se pot regenera, dar nu prezintă fenomenul de pluripotențialitate în cultură.

Totuși, din celulele stem mezenchimale s-a izolat o subpopulație denumită celule progenitoare adulte multipotente (MAPC), ce demonstrează o plasticitate remarcabilă, cu posibilitatea de a se diferenția in vitro spre celule de origine mezodermică, neuroectodermică sau endodermică. Aceste MAPC exprimă factorii de transcripție OCT4 și REX1, doi markeri specifici celulelor stem embrionare nediferențiate.

Cercetătorii au căutat să înțeleagă capacitatea organismului de a repara și/sau înlocui celulele și țesuturile anumitor organe. De mult timp era cunoscut faptul că celulele stem sunt capabile să se autoreînnoiască și că pot genera multe tipuri de celule. Astăzi există dovezi noi care indică faptul că celulele stem sunt prezente în mult mai multe țesuturi și organe decât s-a crezut inițial, și că aceste celule sunt capabile să se dezvolte în mai multe tipuri de celule decât s-a presupus anterior. În prezent, se fac eforturi pentru a folosi celulele stem cu scopul de a elabora tratamente noi, din ce în ce mai eficiente, pentru o mulțime de boli și dizabilități.

Celulele stem adulte, la fel ca toate celulele stem, au cel puțin două caracteristici. În primul rând, ele pot să producă copii identice cu ele însele pentru o perioadă lungă de timp; această capacitate de a prolifera se numește autoreînnoire de lungă durată. În al doilea rând, ele pot să genereze tipuri de celule mature care au morfologie caracteristică și funcții specializate. Celulele stem produc unul sau mai multe tipuri intermediare de celule înainte de a ajunge în stadiul de celulă complet diferențiată. Celula intermediară se numește celulă precursoră sau progenitoare. Celulele precursore sau progenitoare din țesuturile fetale sau adulte sunt celule parțial diferențiate care se divid și generează celule diferențiate.

Celulele stem adulte au rolul de a menține funcționarea continuă a celulelor (numită homeostazie) și, în anumite limite, să înlocuiască celulele care mor datorită unor leziuni sau boli.

Se estimează că doar 1/10.000 sau 1/15.000 de celule din măduva osoasă hematogenă este o celulă stem hematopoietică. În plus, celulele stem adulte se găsesc în diferite țesuturi ale organismului matur și se comportă foarte diferit în funcție de localizarea lor. De exemplu, celulele stem hematopoietice sunt generate continuu în măduva osoasă hematogenă, unde se diferențiază în tipuri mature de celule sanguine. De fapt, cel mai important rol al celulelor stem hematopoietice este de a reînnoi celulele sanguine. În schimb, celulele stem din intestinul subțire sunt staționare și sunt localizate separat de celulele mature pe care le generează. Celulele stem din mucoasa intestinală se află la baza criptelor – invaginații adânci între celulele epiteliale mature, diferențiate, care mărginesc lumenul intestinal.

Spre deosebire de celulele stem embrionare, care sunt definite prin originea lor (masa celulară internă a blastocistului), celulele stem adulte nu sunt definite în acest fel. De fapt, nimeni nu cunoaște cu exactitate originea celulelor stem adulte în nici un țesut matur. Unii au sugerat că celulele stem sunt într-un fel sau altul depozitate izolat în timpul dezvoltării fetale și împiedicate să se diferențieze. Definițiile celulelor stem adulte variază în literatura de specialitate de la o simplă descriere a celulelor până la un set riguros de criterii experimentale care trebuie îndeplinite înainte de a putea considera o anumită celulă ca fiind o celulă stem adultă. Aceste celule sunt fie prelevate din organisme adulte, fie din cordonul ombilical și prezintă dezavantajul că numărul de celule fiice obținute este limitat și nu sunt la fel de longevive ca celulele stem embrionare care pot rezista perioade îndelungate fără să-și piardă caracteristicile.

Majoritatea informațiilor asupra celulelor stem adulte, provin din studii efectuate pe șoareci. Lista țesuturilor adulte care conțin celule stem, crește continuu și include măduva osoasă, periostul, țesutul adipos, sângele periferic, creierul, vasele sanguine, musculatura scheletică, pielea și mucoasa digestivă, ficatul și pancreasul, pulpa dentară.

Pentru a putea fi considerată o celulă stem adultă, celula trebuie să fie capabilă de autoreînnoire pe toată durata vieții organismului. Acest criteriu, deși e fundamental pentru natura unei celule stem, e greu de dovedit in vivo. Într-un organism atât de complex ca și cel uman este aproape imposibil să se facă un experiment care să permită studierea evoluției in vivo a unor celule stem adulte candidate și să fie urmărite pe întreaga durată a vieții individului.

În cazul ideal, celulele stem adulte ar trebui să fie clonogenice. Cu alte cuvinte, o singură celulă stem adultă, ar trebui să fie capabilă să genereze o serie de celule genetic identice care apoi să producă toate tipurile de celule diferențiate ale țesutului în care acea celulă stem adultă se află. Din nou, această proprietate este greu de demonstrat in vivo. În practică, cercetătorii, sau dovedesc că o celulă stem este clonogenică in vitro, sau că o populație purificată de celule stem candidate poate repopula țesutul respectiv.

O celulă stem adultă, ar trebui să fie capabilă să genereze celule complet diferențiate, cu fenotipuri mature, și care sunt perfect integrate în țesutul respectiv, și sunt capabile să îndeplinească funcții specializate adecvate pentru țesutul respectiv.

Majoritatea cercetătorilor care susțin că au identificat celula stem adultă, se bazează pe 2 caracteristici celulare: morfologia celulară și faptul că tipurile de celule diferențiate care rezultă, prezintă markeri de suprafață specifici țesutului respectiv. Unele studii demonstrează și că celulele diferențiate care provin din celule stem adulte sunt funcționale, precum și că celulele care sunt introduse în țesutul diferențiat in vivo interacționează corespunzător cu celulele învecinate.

Tabel 2. SURSE DE CELULE STEM

TIP DE CELULĂ STEM	LOCAȚIE	TIP CELULAR (TISULAR) GENERAT	REFERINȚE BIBLIOGRAFICE
Mezenchimală	Măduva osoasă hematogenă, periost, țesut adipos, membrana sinovială, cordon ombilical	Os, cartilaj, tendon, țesut adipos, mușchi, celule neuronale	3,5,6,7,8,9
Hematopoietică	Măduva osoasă hematogenă, sângele periferic, sângele din cordonul ombilical	Celule sanguine, hepatice (ovale), musculare	30,31
Epitelială	Intestin, epidermă	Toate celulele din criptele epiteliale, din straturile epiteliale	30, 31
Neurală	Creier	Neuroni, astrocite	32
Embrionară	Masa internă a blastocistului	Toate celulele	33

Se presupune că celulele stem mezenchimale sunt similare indiferent de sursa tisulară din care provin, atâta timp cât prezintă potențial de autoreînnoire și multidiferențiere, precum și markeri celulari comuni. Cu toate acestea, proprietățile celulelor stem mezenchimale pot fi afectate în cursul diverselor proceduri aplicate în prelucrare.

Măduva osoasă hematogenă este sursa clasică de celule stem. Este considerată ca fiind locul în care rezidă celulele stem mezenchimale neangajate, care prin potențialul lor de autoreînnoire și de diferențiere furnizează organismului celule mezenchimale nediferențiate și diferențiate, pe durata întregii existențe a acestuia. Procentul de celule stem hematopoietice în măduva osoasă hematogenă este de 0,5-3% , iar procentul de celule stem mezenchimale este de 0,01%.

Celulele stem provenite din măduva osoasă hematogenă, pot fi sortate cu ajutorul markerilor de suprafață în populații de celule stem hematopoietice și de celule stem mezenchimale (celule stromale medulare). O altă modalitate de a separa populațiile de celule stem ale măduvei osoase hematogene este de a folosi proprietatea celulelor stem mezenchimale de a adera la substratul de creștere, pe când celulele stem hematopoietice nu aderă.

Recoltarea măduvei osoase se realizează de regulă din creasta iliacă sau din stern. Izolarea celulelor stem mezenchimale din măduva osoasă se poate realiza prin 2 metode: aderarea directă la suprafețe de plastic și izolarea celulelor mononucleare în gradient de densitate, urmată ulterior de selecția celulelor ce aderă la suprafețele de cultură din plastic (pasaj 0). Ambele metode conduc la obținerea de populații similare de celule stem mezenchimale.

Periostul este o membrană vasculo-conjunctivă care învelește la periferie întregul os, cu excepția capetelor articulare, care sunt acoperite de cartilaje. Examenul microscopic al periostului arată că această membrană este formată la adult din două straturi, unul extern sau superficial, numit periostul fibros și altul intern sau profund, care vine în raport cu masa osoasă, numit periostul osteogen, cambiu. Fiind o membrană vasculo-conjunctivă, conține multiple tipuri celulare: celule aparținând stratului periostal intern, celule aparținând stratului extern-fibros, pericite vasculare și poate fi astfel o potențială sursă de celule osteo- și condroprogenitoare. Celulele derivate din periost pot forma țesut osos și cartilagos in vitro și in vivo (38), precum și țesut adipos in vitro (metoda digestiei enzimaticе). Acest aspect are implicații importante în practica ingineriei tisulare și în realizarea produselor destinate culturilor celulare ce vizează aplicațiile clinice.

Țesutul adipos, la fel ca și măduva osoasă, derivă din stratul germinativ embrionar mezodermic și poate fi izolat ușor în cantități mult mai mari decât măduva osoasă, sub forma lipoaspiratului. Țesutul adipos reprezintă o sursă de celule stem mezenchimale, care conform unor studii se diferențiază la fel ca și celulele măduvei osoase spre lineajele: osteogenic, condrogenic, adipogenic, mioogenic și neurogenic sub influența unor factori inductivi specifici.

Membrana sinovială este membrana care tapetează interiorul capsulei articulațiilor mobile. Această sursă a fost descrisă în unele studii ca fiind superioară din punct de vedere al capacității celulelor derivate de a se diferenția în variate tipuri celulare, în special spre lineajul condrogenic.

Izolarea celulelor stem mezenchimale din periost, țesut adipos și membrana sinovială se poate realiza prin metoda digestiei enzimaticе sau uneori prin metoda explantelor aderate la suprafețele de cultură.

Numeroase studii au raportat faptul că celulele stem din măduva osoasă hematogenă au capacitatea de a repopula majoritatea tesuturilor nonhematopoietice, celulele stem fiind identificate într-o serie de țesuturi conjunctive, musculatura scheletică (20), țesut adipos (40), ficat.

Ipoteza existenței unor celule stem mezenchimale neangajate în măduva osoasă care dau naștere tuturor liniilor celulare de origine mezenchimală din țesuturi aflate la distanță, este susținută de experimente realizate in vivo cât și in vitro. Date științifice susțin existența unor precursori mezenchimali angajați, cu o capacitate stemică variabilă și chiar celule stem mezenchimale neangajate în țesuturi mezenchimale aflate la distanță de măduva osoasă, așa cum este cazul în țesutul muscular sau osos. Opinia actuală este că acești progenitori ajung în țesuturile respective în perioada de creștere a organismului sau în cursul vieții adulte, în cazul unor procese de reparare a țesuturilor în urma unor leziuni.

Măduva osoasă, sediul celulelor stem mezenchimale neangajate, alimentează cu acești progenitori țesuturile mezenchimale de la distanță. De aceea, pentru a ajunge în țesuturile țintă, celulele stem mezenchimale trebuie să părăsească stroma medulară fie ca atare, fie după angajarea pe o cale de diferențiere specifică. Această diferențiere ar putea avea loc și în cursul deplasării celulei (în cadrul migrării) prin diverse micromedii întâlnite în cale. La modul general (prin interacțiuni celulă-celulă și celulă-matrice extracelulară), aceste celule stem se eliberează din conexiunile cu matricea extracelulară și își crează drum spre vasele de sânge. Așadar, vasele sanguine periferice reprezintă un compartiment de tranzit pentru celulele stem, pe care acestea îl folosesc pentru a ajunge la destinația finală: un micromediu tisular propice, la distanță de măduva osoasă în care se pot stabili, pot prolifera și ulterior se pot diferenția. Faptul că progenitorii mezenchimali trec prin sânge spre destinația finală este o chestiune neacceptată în totalitate. Unele studii nu au reușit să detecteze acești progenitori mezenchimali în sângele periferic. Alte studii au reușit să izoleze din sânge, prin selecție pozitivă, o populație de celule aderente care produc colonii de progenitori mezenchimali, iar un alt studiu a izolat progenitori mezenchimali din sângele periferic al bolnavilor cu cancer de sân după mobilizarea cu factori de creștere. Este important să se știe dacă acești progenitori mezenchimali sunt prezenți în mod normal în sângele periferic al indivizilor sănătoși sau bolnavi sau după stimularea măduvei osoase. În cazul celulelor stem hematopoietice, stimularea cu factori de creștere sau cu anumite medicamente duce la eliberarea lor în sânge.

S-a dovedit și faptul că pe lângă măduva osoasă, sângele din cordonul ombilical este o sursă de celule stem mezenchimale. Aceste celule au multe caracteristici comune cu cele medulare, ca de exemplu adeziunea de suprafețe din plastic, aspect morfologic asemănător, expresia unor antigene membranare și citoplasmice, precum și potențialul de diferențiere în fenotipuri osteo-condrogenice și adipocitare. În plus, în culturile de celule mezenchimale din cordonul ombilical, s-a identificat un procent de 5-10% de celule latente, sugerând faptul că în cursul gestației, celulele stem mezenchimale neangajate circulă în torrentul sanguin al fătului. Corelația inversă dintre conținutul de celule stem mezenchimale din sângele de cordon ombilical și vârsta sarcinii sugerează că aceste celule mezenchimale călătoresc prin diverse țesuturi fetale în cursul etapei timpurii a sarcinii.

Aceste dovezi științifice sugerează existența unei migrații pe distanță mare a celulelor stem mezenchimale prin curentul sanguin. Pe distanță scurtă însă se pare că migrează în mod frecvent, cum este situația în cazul reparării leziunilor de cartilaj, regenerarea mușchiului, precum și diferențierea celulelor gingivale și periodontale în osteoblaști.

Diferențele dintre celulele stem provenite din diverse surse

S-a stabilit că celulele stem hematopoietice provenite din țesuturi aflate într-un stadiu de dezvoltare mai timpuriu, au o capacitate mai mare de autoreînnoire, au caractere diferite în ceea ce privește homing-ul și markerii celulari și există o probabilitate mai mică ca ele să fie respinse de sistemul imun. Aceste caracteristici le fac mai utile pentru transplantul terapeutic.

În măduva osoasă hematogenă, cam una din 10.000-15.000 de celule este o celulă stem. În sânge proporția este de 1 la 100.000 de celule sanguine. Din cordonul ombilical și placentă se pot extrage cel mult câteva milioane de celule stem hematopoietice, suficient pentru un transplant la copil, dar prea puțin în cazul unui transplant la adult. Există mai puține șanse ca celulele stem hematopoietice din cordonul ombilical să producă o complicație a transplantului numită boala „greșă contra gazdă”, în care leucocitele donatorului atacă țesuturile primitorului.

Comparând celulele stem din cordonul ombilical cu cele provenite din măduva osoasă hematogenă adultă, s-a stabilit că celulele stem din cordonul ombilical au o mai mare capacitate de proliferare. De asemenea, celulele stem din cordonul ombilical se grează mai bine în măduva osoasă a primitorului, decât cele provenite din măduva osoasă hematogenă a unui donator adult. Co-transplantul celulelor stem mezenchimale cu celulele stem hematopoietice, prin acțiunea lor imunomodulatoare și imunosupresoare, reduce probabilitatea de respingere datorită compatibilității imperfecte a celulelor stem hematopoietice în transplantul alogenic. Potențialul imunomodulator al celulelor stem mezenchimale le evidențiază ca fiind extrem de interesante în tratamentul bolilor autoimune și inflamatorii.

Celulele stem mezenchimale din măduva osoasă, contribuie la formarea și funcționarea micromediului stromal care produce semnale inductive/reglatoare nu doar pentru celulele mezenchimale progenitoare, dar și pentru dezvoltarea celulelor progenitoare hematopoietice și alte celule nemezenchimale stromale prezente în măduva osoasă.

Într-un studiu comparativ privind celulele derivate din măduva osoasă, membrana sinovială, periost, țesut muscular și adipos, a fost descrisă capacitatea de proliferare extensivă, până la pasajul 10, a celulelor derivate din membrana sinovială, măduva osoasă și periost. Se precizează faptul că numărul de colonii/ 10^3 celule nucleate a fost mai mic, iar numărul de celule/colonie a fost mai mare în culturile provenite din celule derivate din măduva osoasă decât în culturile celulelor derivate din alte țesuturi mezenchimale.

Același studiu precizează faptul că cele mai multe celule diferențiate spre lineajul osteogenic au fost celulele derivate din măduva osoasă, membrana sinovială și periost. În diferențierea spre lineajul condrogenic s-au remarcat în special celulele derivate din membrana sinovială, precum și celulele derivate din măduva osoasă și periost. În adipogeneză, cele mai multe colonii puse în evidență cu Oil Red O au fost cele rezultate din celulele derivate din membrana sinovială și din țesutul adipos.

În concluzie, se poate afirma că există diferențe funcționale între celulele stem mezenchimale provenite din variate surse.

Caracteristicile celulelor stem mezenchimale

În microscopia cu contrast de fază, culturile de celule stem mezenchimale sunt evidențiate ca fiind o populație omogenă de celule asemănătoare fibroblaștilor. Morfologic, celulele sunt alungite, fusiforme și dezvoltă după pasaje repetate, colonii celulare cu aspect de „vârtej” (fig. 1,2).



**Fig. 1. Aspect morfologic caracteristic celulelor stem mezenchimale.
Imagine de microscopie indirectă (x40)**

În aspiratele medulare s-a constatat frecvența scăzută a celulelor stem mezenchimale (2-5 celule mezenchimale progenitoare / 1×10^6 celule mono-nucleare / cm^2).

Studiile asupra ciclului celular au arătat că doar o fracțiune din celulele stem mezenchimale proliferază activ (aproximativ 10%), restul sunt blocate la stadiul G0/G1 al ciclului celular. Acest procent mare de celule aflate în stadiul G0/G1 sugerează disponibilitatea lor spre diferențiere.

Celulele stem mezenchimale au multe caracteristici prin care se pot deosebi de celulele stem hematopoietice:

- prin însămânțare, celulele stem mezenchimale aderă la placa de cultură, pe când celulele stem hematopoietice nu aderă, ci se cultivă în supernatant;

- spre deosebire de celulele stem hematopoietice care nu se divid *in vitro* (sau au o proliferare limitată), celulele stem mezenchimale pot prolifera *in vitro*, producându-se până la 35 de diviziuni;

- forma alungită, fibroblast-like, este de asemenea un criteriu prin care celulele stem mezenchimale se deosebesc de celulele stem hematopoietice care arată și se comportă în culturi celulare similar leucocitelor .



**Fig. 2. Celule fibroblast-like cu dispoziție tipică “în vârtej”.
Imagine de microscopie indirectă (x40)**

Markerii celulelor stem

Pe suprafața tuturor celulelor organismului se află receptori, care au capacitatea de a lega selectiv sau de a adera de molecule semnal. Există multe tipuri de receptori, care diferă atât din punct de vedere structural, cât și al afinității pentru moleculele semnal. În mod normal, celulele folosesc acești receptori, precum și moleculele care se fixează de aceștia, ca o modalitate de comunicare intercelulară, în scopul de a-și îndeplini funcțiile specifice în cadrul organismului. Receptorii de pe suprafața celulară sunt de fapt markerii celulelor stem. Fiecare tip de celulă prezintă pe suprafață, o anumită combinație de receptori, care îl face să se distingă de alte tipuri de celule. Cercetătorii s-au folosit de singularitatea biologică a receptorilor celulelor stem pentru a „marca” celulele. Folosirea markerilor celulari a făcut posibilă descoperirea și studierea celulelor stem.

Markerii celulelor stem au primit nume în funcție de moleculele care se fixează pe receptorii de pe suprafața celulelor stem.

Obținerea unor serii de anticorpi monoclonali împotriva antigenelor de suprafață ale celulelor stem mezenchimale, alături de alți anticorpi obținuți pentru a caracteriza celulele stromale ale măduvei osoase, a fost crucială pentru imunofenotiparea acestor celule.

Pentru caracterizarea tipului celular, markerii de suprafață se evidențiază folosind tehnici de flowcitometrie.

Primele 2 pasaje ale culturii de celule stromale medulare determină purificarea celulelor stem mezenchimale, care se evidențiază prin prezența markerilor caracteristici CD105, CD73, CD90 și absența markerilor tipic hematopoietici, CD45, CD34.

Alți markeri folosiți pentru identificarea celulelor stem mezenchimale sunt receptorii pentru interleukina 1, 3, 4, 6 și 7, pentru ICAM 1 și 2, VCAM 1, integrinele alfa 1, 2, 3, 4 și 5 precum și integrinele beta 1, 3 și 4.

Tabel 3. Markerii celulelor stem și ai celulelor diferențiate

DENUMIREA MARKERULUI	TIPUL CELULAR	SEMNIFICAȚIA
<i>Măduva osoasă hematogenă și sânge</i>		
CD29,CD73,CD90,CD105 SH2,SH3, SH4	Celule stem mezenchimale	Markeri caracteristici celulelor stem mezenchimale
Stro-1 antigen	Celule precursorare stromale (mezenchimale)	Glicoproteină de suprafață celulară situată pe unele subseturi de celule stromale (mezenchimale) ale măduvei osoase hematogene; selectarea celulelor Stro-1 ⁺ contribuie la izolarea celulelor recursorare mezenchimale (sunt celule multipotente care se diferențiază în adipocite, osteocite, fibre musculare netede, fibroblaste, condrocite și celule sanguine)
CD44	Celule mezenchimale	O moleculă de adeziune celulară folosită pentru identificarea anumitor tipuri de celule mezenchimale
Bone morphogenetic protein receptor (BMPR)	Celule stem mezenchimale și celule progenitoare mezenchimale	Important pentru deosebirea celulelor mezenchimale diferențiate de celule stem mezenchimale și celulele progenitoare mezenchimale
c-Kit	Celule stem hematopoietice, celule stem mezenchimale	Receptor de suprafață al celulelor măduvei osoase hematogene care identifică celule stem hematopoietice și celule stem mezenchimale
Colony-forming unit (CFU)	Celule stem hematopoietice, celule stem mezenchimale	Colony-forming unit detectează capacitatea unei celule stem sau a unei celule progenitoare să producă una sau mai multe linii celulare, de ex. eritrocite și/sau leucocite
Fibroblast colony-forming unit (CFU-F)	Fibroblaste ale măduvei osoase hematogene	O singură celulă a măduvei osoase hematogene produce o colonie de celule fibroblastice multipotente; aceste celule sunt precursorii unor celule mezenchimale diferențiate
Antigenul de suprafață al liniilor celulare diferențiate (Lin)	Celule stem hematopoietice, celule stem mezenchimale, leucocite și eritrocite diferențiate	Există 13-14 proteine de suprafață diferite care sunt markeri pentru liniile de celule sanguine mature; detectarea celulelor Lin-negative contribuie la purificarea populațiilor de celule stem hematopoietice și de celule progenitoare hematopoietice
Muc-18 (CD146)	Fibroblaști în măduva osoasă hematogenă și celule endoteliale	Proteină de suprafață (superfamilia imunoglobulinelor) caracteristică pentru fibroblaștii măduvei osoase hematogene; o subpopulație de celule Muc-18+ sunt precursori mezenchimali

DENUMIREA MARKERULUI	TIPUL CELULAR	SEMNIIFICAȚIA
Stem cell antigen (Sca-1)	Celule stem hematopoietice, celule stem mezenchimale	Proteină de suprafață a celulelor măduvei osoase hematogene, care identifică celule stem hemato-poietice și celule stem mezenchimale
CD34	Celule stem hematopoietice, celule progenitoare endoteliale, celule musculare satelite	Proteină de suprafață a celulelor măduvei osoase hematogene, care identifică celule stem hemato-poietice și progenitorii endoteliali; CD34 identifică și celulele musculare satelite (un tip de celule stem ale țesutului muscular)
Thy-1	Celule stem mezenchimale	Proteină de suprafață care e absentă pe celulele stem hematopoietice
<i>Celule stem pluripotente</i>		
Fosfataza alcalină	Celule stem embrionare, carcinom embrionar	Nivele crescute ale acestei enzime se asociază cu prezența celulelor stem pluripotente nediferențiate
Stem cell factor (SCF sau ligandul c-Kit)	Celule stem embrionare, carcinom embrionar, celule stem hematopoietice, celule stem mezenchimale	Proteină de suprafață care stimulează proliferarea celulelor stem embrionare și a carcinomului embrionar, precum și a celulelor stem hematopoietice și a celulelor stem mezenchimale; se fixează pe receptorul c-Kit
<i>Țesut osos</i>		
Bone-specific alkaline phosphatase (BAP)	Osteoblaste	Enzimă exprimată în osteoblast; Activitatea ei indică formarea țesutului osos
Hidroxiapatita	Osteoblaste	Matricea osoasă mineralizată care asigură integritatea structurală a țesutului osos; marker al formării osoase
Osteocalcina	Osteoblaste	Proteină care fixează mineralele și care este sintetizată doar de către osteoblast; marker al formării osoase

PROPRIETĂȚILE FUNCȚIONALE ALE CELULELOR STEM MEZENCHIMALE

Autoreplicarea

Studiile ciclului celular au evidențiat că în timp ce o mică fracțiune de celule stem mezenchimale sunt activ angajate în proliferare (aproximativ 10% în faza S, G2, M), marea majoritate a celulelor sunt în faza G₀/G1 a ciclului celular. Deși punctele de control și lungimea fiecărei faze a ciclului celular nu au fost determinate, procentul mare de celule G₀/G1 sugerează o competență ridicată a celulelor de a se diferenția. Mai mult decât atât, populația G₀/G1 a celulelor progenitoare mezenchimale include un subset minor și variabil de celule în stare de latență, evidențiate prin conținutul de ADN și ARN sau analize FACS de mărime și granularitate.

După subcultivare, celulele stem mezenchimale evidențiază un potențial expansiv larg, dar variabil. În timp ce unele culturi de celule pot fi expandate până peste 15 dublări celulare (pasaje), altele își încetează replicarea după a patra dublare celulară. Natura acestui conflict se poate datora câtorva factori, printre care procedura de recoltare a măduvei folosită, frecvența scăzută a celulelor stem mezenchimale în aspiratele medulare (2-5 celule mezenchimale progenitoare/1x10⁶ celule mononucleare) și vârsta sau starea donorului de la care au fost prelevate celulele stem mezenchimale. În ciuda înaltului potențial expansiv ex vivo, celulele stem mezenchimale nu își pierd cariotipul lor normal și activitatea telomerazei. Totuși cultivarea extensivă duce la alterarea funcțională a celulelor, evidențiată la început prin semne evidente de senescență și/sau apoptoză.

Influența asupra micromediului stromal medular

Profilul expresiei citokinelor a fost descris pentru celulele stem mezenchimale. Celulele mezenchimale progenitoare produc o serie de factori de creștere, interleukine și chemokine. În timp ce multe din aceste citokine sunt produse, altele sunt exprimate doar după stimulare. În plus, celulele stem mezenchimale exprimă o serie de receptori pentru citokine și factori de creștere (tabel IV).

Tabel 4. Principalele caracteristici ale celulelor mezenchimale progenitoare derivate din măduva osoasă. Expresia antigenelor specifice, receptorilor de citokine și moleculelor de adeziune și producția de citokine și molecule ale matricei extracelulare

TIPUL MARKERULUI	DENUMIRE	REFERINTE BIBLIOGRAFICE
Antigene specifice	SH2, SH3, SH4 STRO-1 α -actina muschilor netezi MAB1740	56, 57, 59, 66
Citokine și factori de creștere	Interleukine: 1 α , 6, 7, 8, 11, 12, 14 și 15 LIF, SCF, ligandul Flt-3 GM-CSF, G-CSF, M-CSF	50, 67
Receptori de citokine și factori de creștere	IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R, LIFR, SCFR, G-CSFR, IFN γ R, TNF IR, TGF β IR, TGF β IIR, bFGFR, PDGFR, EGFR	56, 3, 60, 69
Molecule de adeziune	ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, ALCAM-1, LFA-3, L-selectin, CD44, integrine α 1,2,3,4,5, β 1,3,4	56, 3, 68
Matrice extracelulară	colagen tip I, III, IV, V, VI, fibronectină, laminină, proteoglicani, hialuronan	18, 56, 70

Aceste date pun în evidență faptul că celulele stem mezenchimale din măduva osoasă contribuie la formarea și funcționarea micromediului stromal care produce semnale inductive/reglatoare nu doar pentru celulele mezenchimale progenitoare, dar și pentru dezvoltarea celulelor progenitoare hematopoietice și alte celule nemezenchimale stromale prezente în măduva osoasă.

Această participare dinamică a celulelor stem mezenchimale din micromediul stromal medular este întărită de date care arată că ele produc un sortiment larg de molecule ale matricei, incluzând fibronectina, laminina, colagenul și proteoglicanii. De asemenea, exprimă o serie de receptori corespondenți asociați cu matricea și interacțiunile de adeziune celula - celula (Tabel IV). De o relevanță particulară este expresia puternică a CD44 (56,3), un receptor pentru diverși liganzi, cum ar fi hialuronan și osteopontina, implicați în organizarea matricei extracelulare osoase.

Plasticitatea

Abia de curând s-a luat în considerare posibilitatea ca celulele stem aflate în țesuturile adulte să poată genera celule specializate ale altui tip de țesut față de cel în care se află în mod normal, un țesut care provine din același strat germinativ embrionar, sau un țesut care provine dintr-un strat germinativ diferit. De exemplu, studiile au dovedit că celulele stem sanguine (ce provin din mezoderm) pot fi capabile să genereze și mușchi striat (care de asemenea provine din mezoderm) și neuroni (care provin din ectoderm). Celulele stem care provin dintr-un țesut adult își pot schimba morfologia și să dobândească caracteristici care seamănă cu cele ale celulelor diferențiate din alte țesuturi. Celulele nespecializate devin specializate printr-un proces numit diferențiere. În timpul diferențierii celulele trec prin diferite stadii, devenind și mai specializate cu fiecare etapă de dezvoltare.

Plasticitatea reprezintă capacitatea unei celule stem dintr-un țesut adult de a genera celule diferențiate aparținând altui țesut.

Majoritatea studiilor cu privire la plasticitatea celulelor stem adulte, folosesc celule provenite din măduva osoasă hematogenă.

Măduva osoasă hematogenă pare să conțină 3 populații de celule stem: celule stem mezenchimale, celule stem hematopoietice și (posibil) celule progenitoare endoteliale.

Celulele stem mezenchimale (celulele stromale ale măduvei osoase hematogene) pot fi expandate și induse să se diferențieze spre linia osteoblastică, condrogenică, adipocitară, musculară, neuronală, epitelială și stroma de suport hematopoietică - rețeaua de reticulină care susține precursorii elementelor figurate.

Prin creșterea in vitro a celulelor măduvei osoase (BMCs), în mediu de creștere conținând factori de creștere specifici (de exemplu factorul de creștere epidermal și factorul de creștere derivat din plachete) pentru câteva luni menținând o densitate celulară relativ scăzută de $0.5-1.5 \times 10^3$ celule/cm² a fost obținută o subpopulație denumită celule progenitoare adulte multipotente (MAPC), care exprimă factorii de transcripție OCT4 și REX1, doi markeri specifici celulelor stem embrionare nediferențiate. Celulele progenitoare adulte multipotente nediferențiate nu exprimă CD45, c-Kit sau Sca-1 spre deosebire de celulele hematopoietice, considerându-se că aceste celule pot reprezenta o subpopulație de celule stem mezenchimale.

MAPC demonstrează o plasticitate semnificativă, cu posibilitatea de a se diferenția in vitro spre celule ca hepatocite, celule endoteliale și neuroni de origine endodermică, mezodermică, neuroectodermică.

Pluripotentialul MAPC a fost confirmat in vivo; celulele progenitoare adulte multipotente pot contribui la formarea multor țesuturi (inclusiv creier, retina, plămâni, miocard, schelet, mușchi, intestin, rinichi, splina, măduva osoasă, sânge și piele) la șoarecii himere, ce sunt derivați din injectarea celulelor progenitoare adulte multipotente în blastocistul timpuriu.

În ceea ce privește diferențierea in vivo a celulelor stem mezenchimale în țesut adipos și osos, se cunoaște faptul că adipocitele se dezvoltă postnatal datorită creșterii oaselor și a măririi canalului medular. Când creșterea încetează, iar numărul celulelor stem hematopoietice scade în mod normal odată cu înaintarea în vârstă, celulele stem mezenchimale se diferențiază în adipocite care ocupă spațiul restant. Osteogeneza este mai intensă în timpul perioadei de creștere, deși există un turn-over al țesutului osos pe tot parcursul vieții.

Marea majoritate a celulelor dintr-o cultură de celule stem mezenchimale sunt celule proliferative, care în funcție de condițiile de mediu, manifestă potențial de diferențiere spre anumite lineaje celulare. Circa 30 % din aceste celule au un triplu potențial de diferențiere: spre linia osteogenă, condrogenă și adipogenă, restul celulelor prezentând un potențial de diferențiere spre linia osteogenă și condrogenă sau doar osteogenă. S-au identificat și clone celulare cu potențial cvadruplu de diferențiere: osteogenic, condrogenic, adipogenic și spre stroma hematopoietică.

În concluzie, culturile de celule stem mezenchimale obținute din măduva osoasă nu sunt omogene ci sunt formate din celule latente și celule angajate în proliferare, cu diferite potențiale de diferențiere. Pe măsură ce aceste celule proliferază și se diferențiază își pierd capacitatea de autoreînnoire.

RECONSTRUCȚIA OSTEOARTICULARĂ PRIN INGINERIE TISULARĂ

De-a lungul vieții, procesele de regenerare au loc în organism permanent. Cu toate acestea, structuri de tipul oaselor, tendoanelor, cartilajelor, au o capacitate limitată de autoreparare și după un proces lezional, puterea regenerativă a țesuturilor adulte este adesea insuficientă pentru a induce o recuperare funcțională completă. Când organele sau țesuturile sunt ireparabil alterate, acestea ar putea fi înlocuite cu sisteme artificiale sau cu organ similar de la un alt donor. Numărul potențialilor donori de organe este însă limitat.

Crearea unor metode de inginerie tisulară care să permită înlocuirea organelor prin intermediul cultivării ex vivo a celulelor autologe, poate reprezenta un înlocuitor valid pentru transplantul de organ, fiind prevenite astfel și riscurile de transmitere a unor afecțiuni de la donori, o problemă comună a transplantului de organ. Ingineria tisulară, cu ajutorul celulelor, mai ales al celulelor stem, permite exploatarea a două calități importante ale acestor celule: înalta capacitate de proliferare și pluripotentialitatea acestor celule imature. Utilizarea celulelor stem embrionare este limitată atât din considerente etice, cât și datorită răspunsului imun alogen, ce poate induce rejecția transplantului. O alternativă pare a fi utilizarea celulelor stem adulte.

Ingineria tisulară apare ca o opțiune viabilă, ea tinzând să regenereze structurile, nu doar să le înlocuiască, recuperând funcția. Există preocupări intense pentru a produce materiale osteoconductive pentru repararea defectelor osoase.

Strategii recente utilizează nanobiomaterialele, respectiv materiale nanostructurate și nano-compozitele, mai ales că osul în sine este un exemplu de material nanocompozit. Spumele metalice se dezvoltă într-o arhitectură tridimensională similară osului spongios. Ele sunt biocompatibile și osteoconductive, dar nu sunt biodegradabile.

Materialele polimerice inerte chimic și biologic nu induc adeziunea celulară și formarea de țesut, astfel că se încearcă folosirea polimerilor naturali cum ar fi colagenul, pentru a modifica materialul sintetic și a îmbunătăți proprietățile de adeziune celulară. Polimerii naturali biodegradabili utilizați sunt: colagenul, acid hialuronic, chitosanul, iar polimerii sintetici biodegradabili folosiți pentru realizarea de matrici poroase sunt: poliacidul lactic, poliacidul glicolic sau poliacidul lactic-co-glicolic. Totuși, folosirea polimerilor naturali ca și biomateriale pentru cultivarea de celule este deseori limitată de performanța mecanică limitată a acestora și de pierderea proprietăților biologice pe parcursul dezvoltării țesutului nou. Cu toate aceste preocupări pentru obținerea unor produse aplicabile în practica terapeutică, riscul folosirii diverselor dispozitive și suporturi în tratamentul bolilor osteo-articulare trebuie să rămână în limite acceptabile privind nivelul de siguranță și de protecție al sănătății.

În domeniul ortopedic s-a demonstrat posibilitatea de transplantare a condrocitelor umane autologe sau a celulelor stem mezenchimale pentru reconstrucția cartilagiului deteriorat ca urmare a traumatismelor sau a unor entități patologice și pentru a favoriza formarea de țesut osos nou în tratamentul anomaliilor scheletului, al traumelor sau al tumorilor osoase. Cartilagiul hialin reprezintă un candidat ideal pentru a fi substituit cu un țesut structural complex, deoarece troficitatea sa nu este dependentă de fluxul sanguin, fiind asigurată direct de lichidul sinovial, inervația nu apare ca necesară, iar capacitatea de reparare intrinsecă devine mult limitată. Folosirea unor biocomponente celulare ar putea conduce la rezultate pozitive în repararea țesutului articular, conducând la o ameliorare a tehnicii chirurgicale. Astfel de suporturi tridimensionale trebuie să aibă caracteristicile de a fi biocompatibile. Astfel, acestea nu trebuie să genereze un răspuns inflamator, să nu fie imunogene, să nu declanșeze reacții citotoxice. De asemenea trebuie să fie biodegradabile, sterilizabile, trebuie să permită multiplicarea celulară și producția matricei, asigurând nutriția.

Transplantul de celule diferențiate spre lineajul osteogenic și condrogenic sau implantul de celule stem colonizate pe o biomatrice structurală, reprezintă o metodă de viitor pentru tratamentul afecțiunilor osteoarticulare.

STUDIUL EXPERIMENTAL IN VITRO – IDENTIFICAREA SURSELOR DE CELULE OSTEO- ȘI CONDROPROGENITOARE LA DIFERITE SPECII. IZOLAREA ȘI EXPANDAREA IN VITRO A ACESTORA

Celulele stem mezenchimale “convenționale” sunt cele obținute din măduva osoasă hematogenă. Cu toate acestea, tot mai numeroase studii din literatură raportează obținerea de celule stem mezenchimale din alte variate surse: periost, țesut adipos, membrana sinovială, musculatura scheletică, pulpa dentară. Lim și colaboratorii au izolat și caracterizat celulele progenitoare din periost pe baza diferiților markeri de suprafață caracteristici celulelor stem mezenchimale.

Pentru evidențierea surselor de celule osteo/condroprogenitoare din periost, măduva osoasă hematogenă și țesut adipos, s-au izolat celule stem mezenchimale și s-a comparat morfologia, capacitatea de expansiune și potențialul de diferențiere al unor specii spre lineajele osteogenic, condrogenic și adipogenic.

În acest sens, s-au studiat celule umane, canine, ovine, cabaline și de șobolan, urmărindu-se evidențierea asemănărilor cât și a deosebirilor dintre celulele derivate din periost, măduva osoasă și țesutul adipos, pentru identificarea surselor optime de celule osteo- și condroprogenitoare. Caracterizarea în paralel a celulelor stem mezenchimale provenite de la cinci specii diferite, conferă caracter de originalitate acestui studiu.

Material și metodă

Izolarea celulelor derivate din periost

Lambourile periostale au fost prelevate de la câini de rasă comună. S-au recoltat segmente de periost și s-au izolat celulele periostale prin două metode: metoda explantului și metoda digestiei enzimatiche.

Materialul biologic recoltat a fost fragmentat și repartizat în:

- plăci cu godeuri (fiecare godeu a conținut aproximativ 1 ml de soluție sterilă cloruro-sodică izotonă (Sigma), cu adaos 1% penicilină/streptomicină (Sigma); segmentele periostale au fost dispuse în așa fel încât fața osteogenică a rămas la suprafață, pentru cultivarea explantelor (fig. 17);
- eprubete sterile cu același conținut – pentru obținerea celulelor periostale după prelucrare prin digestie enzimatică.



Fig. 3. Segmente periostale repartizate în godeuri

Metoda explantului

1. Lambourile periostale au fost spălate cu tampon fosfat salin (Sigma), au fost așezate cu zona osteogenă superficială și s-au îndepărtat pe cât posibil porțiunile de țesut adipos și muscular;
2. Segmentele rezultate, de aproximativ 1 cm², au fost așezate în plăci Petri cu zona osteogenă în contact cu placa și au fost menținute timp de 10 minute în incubator la 37°C pentru a asigura aderența inițială;
3. Lambourile aderente au fost acoperite cu o cantitate suficientă de mediu nutritiv compus din: mediu de cultură HAM/F 12: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (1:1) cu L-glutamine (ATCC) + 10% ser fetal bovin (ATCC) + 1% Penicilină/Streptomicină (Sigma) + 3ng/ml bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) (R&D), astfel încât să nu fie posibilă flotarea lor (fig. 26);

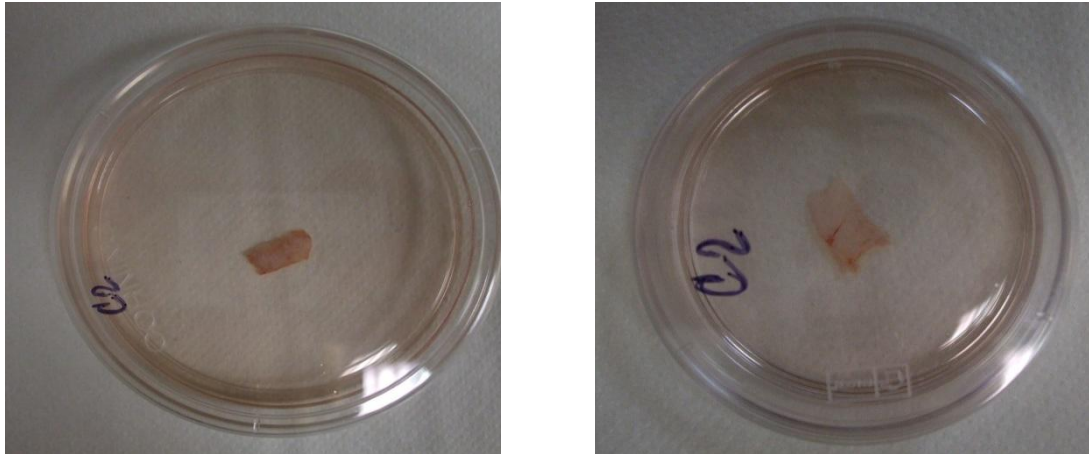


Fig. 4. Lambouri periostale aderente la placa Petri, acoperite cu mediu nutritiv

Metoda digestiei enzimatic

1. Lambourile de periost au fost spălate cu tampon fosfat salin (Sigma) și curățate (s-au îndepărtat pe cât posibil zonele cu țesut muscular și adipos);
2. Segmentele rezultate au fost trecute în eprubete sterile și acoperite cu aproximativ 1 ml de collagenază de tip I a, 2000 U/ml (Sigma) de origine bacteriană (*Clostridium histolyticum*);
3. Eprubetele cu probele de țesut au fost incubate la 37°C timp de aproximativ 30-45 min. pentru desăvârșirea procesului de digestie. Intervalul de timp necesar digestiei a fost determinat de mărimea probei și de cantitatea de țesut fibros (fig. 23);

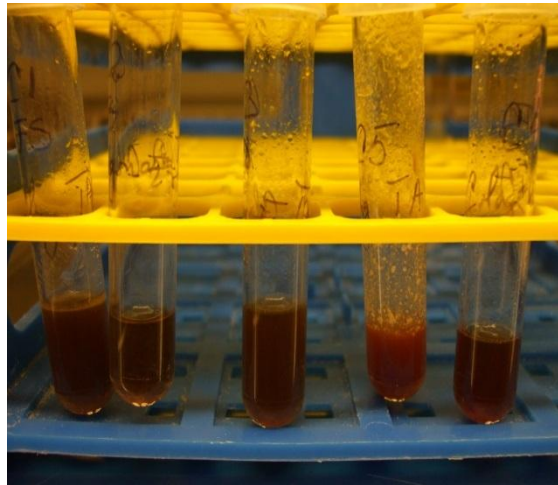


Fig. 5. Probe pentru care procesul de digestie s-a finalizat

4. După finalizarea digestiei, suspensiile celulare rezultate au fost filtrate (filtru de 70 μm, Falcon, Becton Dickinson), trecute în tuburi Falcon (Becton Dickinson) de 50 ml și suplimentate până la 20 ml cu tampon fosfat salin (prima spălare) (fig. 24);



Fig. 6. Filtrarea suspensiilor celulare

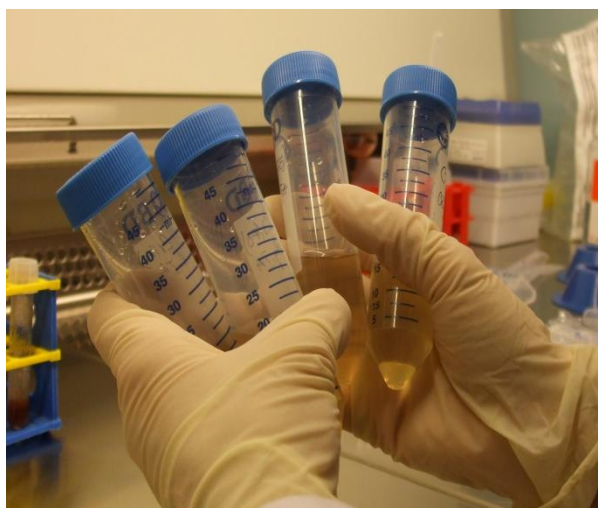


Fig. 7. Aspect după prima centrifugare

5. Suspensiile celulare diluate au fost supuse unei centrifugări la 400g timp de 10 minute, la temperatura camerei, cu frână la decelerare (Fig.25);
6. După centrifugare s-a înlăturat majoritatea supernatantului (aproximativ 19 ml). Butonul rezultat prin sedimentarea celulelor a fost omogenizat mecanic cu supernatantul reținut, peste aceasta suspensie celulară fiind adăugat tampon fosfat salin până la 20 ml (a doua spălare);
7. Suspensiile celulare au fost supuse unei noi centrifugări la 400g timp de 10 minute, la temperatura camerei, cu frână la decelerare;
8. După centrifugare s-a înlăturat cea mai mare parte din supernatant. Butonul rezultat prin sedimentarea celulelor a fost omogenizat mecanic cu o cantitate redusă, 1 ml de mediu de cultură, compus din: mediu nutritiv HAM/F 12: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (1:1) cu L-glutamine (ATCC) + 10% ser fetal bovin (ATCC) + 1% Penicilină/Streptomicină (Sigma) + 3ng/ml bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) (R&D);

9. Din aceste suspensii s-au prelevat probe care au fost colorate cu Tripan Blue (Sigma) și transferate în hemocitometru pentru numărarea celulelor și determinarea viabilității lor. Viabilitatea celulară a depășit proporția de 95%. Numărul de celule viabile a determinat tipul de recipiente alese pentru cultivare;
10. Suspensiile celulare au fost trecute în recipiente de cultură care conțineau mediu de cultură în volum variabil, în funcție de capacitatea acestora. Însămânțarea s-a făcut la o concentrație de 5×10^4 celule/cm²;
11. Probele au fost incubate la o temperatură de 37°C, în atmosferă de 5% CO₂.

Izolarea celulelor derivate din măduva osoasă

Au fost izolate celule derivate din măduva osoasă de șobolan, canină, ovină și umană, prin 2 metode: metoda izolării în gradient de densitate și metoda aderării directe la suprafețe de cultură din plastic.

Metoda izolării în gradient de densitate

Diferențele de densitate celulară (greutatea specifică a celulei în câmp gravitațional) sunt frecvent utilizate pentru separarea celulelor. În câmp gravitațional celulele cu densitate crescută (eritrocitele, polimorfonuclearele, celulele moarte) se deplasează mai anevoios decât celulele cu densitate scăzută (limfocite, monocite). Gradientul de densitate este un mediu cu masa moleculară mare care funcționează ca un separator. În câmp gravitațional el permite trecerea particulelor mici și grele, în timp ce particulele mai mari și mai ușoare sunt incapabile să-l străbată. Cele mai utilizate preparate sunt: Ficoll-Paque și Lymphoprep. Centrifugarea în gradient de densitate determină separarea probelor în mai multe straturi: stratul superior (plasma, trombocite), urmat de inelul de mononucleare, apoi stratul intermediar (gradientul de densitate) și stratul inferior sau sedimentul (eritrocite, polimorfonucleare, celule moarte) (fig. 33).

1. Probele de măduvă osoasă recoltate pe heparină au fost transferate în tuburi sterile Falcon (Becton Dickinson) de 16 ml și diluate în proporție de 1:1 cu tampon fosfat salin (Sigma).
2. Pentru fiecare probă s-au pregătit tuburi Falcon de 50 ml, sterile, cu Ficoll – Paque (GE Healthcare), la temperatura camerei, astfel încât proporția față de măduva diluată să fie 1:1.
3. Materialul biologic diluat a fost scurs ușor pe pereții tubului ținut la început ușor înclinat, pentru a nu amesteca cele două componente care trebuiau să formeze în final două straturi separate (fig. 32).



Fig. 8. Pregătirea probelor pentru izolare în gradient de densitate (măduva osoasă-stratul superior, Ficoll-Paque-stratul inferior)

În același scop, se pot plasa probele de măduvă diluată în eprubete și ulterior se introduce Ficoll cu pipeta de transfer Pasteur sau stripeta (Corning), la baza tubului. Manipularea trebuie să fie riguroasă pentru a se evita amestecul celor două componente.

4. Probele s-au centrifugat la 1160 g (se poate opta și pentru 1800 g, conform altor protocoale de lucru), timp de 30 minute, la temperatura camerei. Decelerația trebuie să se realizeze fără frână.
5. După centrifugare, s-a recoltat „inelul” de celule mononucleare de la interfața componentelor și s-a transferat în tuburi sterile Falcon, de 50 ml.



Fig.9. Aspectul probei prelucrate în gradient de densitate

6. S-a diluat fiecare probă cu tampon fosfat salin până la un volum total de 25 ml, urmând o ușoară omogenizare.
7. Probele s-au centrifugat la 400 g, timp de 10 minute, la temperatura camerei, cu frână la decelerare (prima spălare).
8. După omogenizarea mecanică a butonului rezultat după îndepărtarea supernatantului, s-a adăugat din nou tampon fosfat salin, pentru a doua spălare.

9. Suspensiile celulare s-au centrifugat la 400 g timp de 10 minute, la temperatura camerei, cu frână la decelerare.
10. După a doua centrifugare s-a îndepărtat supernatantul, iar butonul rezultat prin sedimentarea celulelor a fost omogenizat cu 1 ml de mediu de cultură, compus din: mediu nutritiv MEM Alpha Medium (1000 mg/l glucoza) (Gibco) + 10% ser fetal bovin (Sigma) + 1% Penicilină/Streptomicină (Sigma) + 3ng/ml bFGF-basic Fibroblast Growth Factor (Factor bazal de creștere al fibroblastelor) (R&D).
11. S-au prelevat probe care au fost colorate cu Tripan Blue (Sigma). Se pot folosi diluții variabile de colorant. În prezentul studiu am utilizat 50 μl Tripan Blue și 10 μl suspensie celulară (factor de diluție = 6). După omogenizarea componentelor și atașarea lamei la hemocitometru, se transferă 10 μl amestec în hemocitometru, pentru numărarea celulelor și stabilirea viabilității celulare (fig. 34).

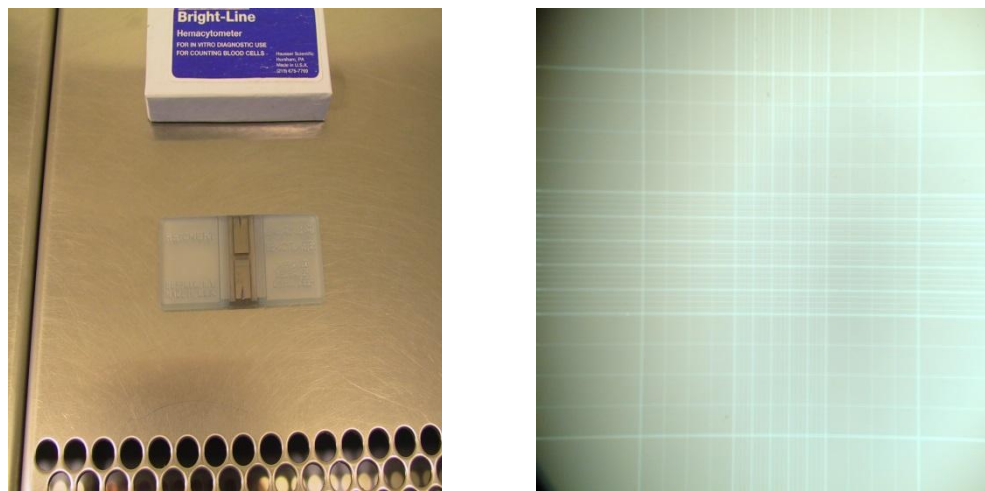


Fig. 10. Hemacitometru (camera Neubauer)

Celulele nonviabile, cu membrana celulară lizată, se colorează în albastru, iar celulele vii cu membrana intactă rămân necolorate.

Media aritmetică a celulelor vii din cele 4 pătrate externe mari x factorul de diluție x 10^4 (coeficient de conversie) = număr celule vii /ml.

Formula aplicată pentru determinarea viabilității este :

$$\frac{\text{Celule viabile}}{\text{Nr. total de celule (colorate și necolorate)}} \times 100$$

12. Însămânțarea s-a făcut la o concentrație de 5×10^4 celule/cm² în recipiente Falcon (Becton Dickinson), cu filtru.
13. Probele au fost incubate la o temperatură de 37°C, în atmosferă de 5% CO₂, pentru 18-24 ore, în vederea atașării celulelor aderente.

Metoda aderării directe la suprafețe de cultură din plastic

1. Materialul biologic s-a transferat în tuburi Falcon (Becton Dickinson) de 50 ml, sterile, unde s-a diluat în proporție de 1:1 cu tampon fosfat salin.
2. S-a centrifugat la 400g, timp de 10 minute, la temperatura camerei, cu frână la decelerare (prima spălare);
3. După centrifugare s-a înlăturat majoritatea supernatantului, s-a omogenizat mecanic și s-a adăugat din nou tampon fosfat salin pentru a doua spălare;
4. Materialul biologic a fost supus unei noi centrifugări la 400g timp de 10 minute, la temperatura camerei, cu frână la decelerare;
5. După a doua centrifugare s-a îndepărtat supernatantul până aproape de depozit. Butonul rezultat prin sedimentarea celulelor a fost omogenizat mecanic cu 1 ml de mediu de cultură, compus din: mediu nutritiv MEM Alpha Medium (1000 mg/l glucoza)(Gibco) + 10% ser fetal bovin (Sigma) + 1% Penicilină/Streptomicină (Sigma) + 3ng/ml bFGF-basic Fibroblast Growth Factor (Factor bazal de creștere al fibroblastelor) (R&D), prelevându-se probe (10 μ l) care au fost tratate cu o soluție de liză a hematiilor (Becton Dickinson) în proporție de 1:9, din care s-au transferat în hemacitometru câte 10 μ l de amestec pentru numărarea celulelor după metoda standard de numărare a celulelor în camera Neubauer;
6. Însămânțarea s-a făcut la o concentrație de 5×10^4 celule / cm^2 în recipiente Falcon (Becton Dickinson), cu filtru (fig. 22);
7. Probele au fost incubate la o temperatura de 37°C, în atmosferă de 5% CO₂, în vederea separării selective prin aderare la suprafețe din plastic.

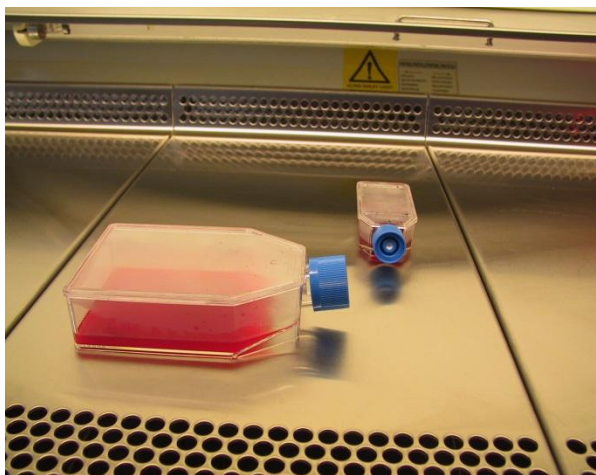


Fig. 11. Măduvă osoasă însămânțată în recipiente Falcon de 75 cm^2 și 25 cm^2 , cu filtru

Izolarea celulelor derivate din țesut adipos cabalin

Materialul biologic a fost recoltat de la un cal diagnosticat cu osteocondroză, care a fost supus ulterior terapiei cu celule stem mezenchimale autologe, izolate din țesut adipos (capitolul „Studiu terapeutic pe animal pentru investigarea eficienței terapiei cu celule stem mezenchimale în bolile osteoarticulare” din prezenta lucrare).

Țesutul adipos a fost prelucrat în vederea obținerii de celule stem mezenchimale prin metoda digestiei enzimaticе, urmată de aderarea directă la suprafețele de cultură din plastic, prin următorul protocol de lucru:

1. Materialul biologic a fost disociat mecanic în fragmente cât mai mici, repartizat în tuburi Falcon și tratat cu aproximativ 1 ml colagenază de tip I a (Sigma) 2000 U/ml, de origine bacteriană (*Clostridium histolyticum*) + 4,5 ml mediu (MEM Alpha Medium (1000 mg/l glucoza) + 10% ser fetal bovin + 2% Penicilină / Streptomicină) (fig. 28);
2. Probele de țesut adipos au fost incubate la 37°C, cu agitare intermitentă, pentru circa 2 ore, dar digestia se poate prelungi până la 24 de ore în aceleași condiții în cazul în care se observă că digestia nu este finalizată;

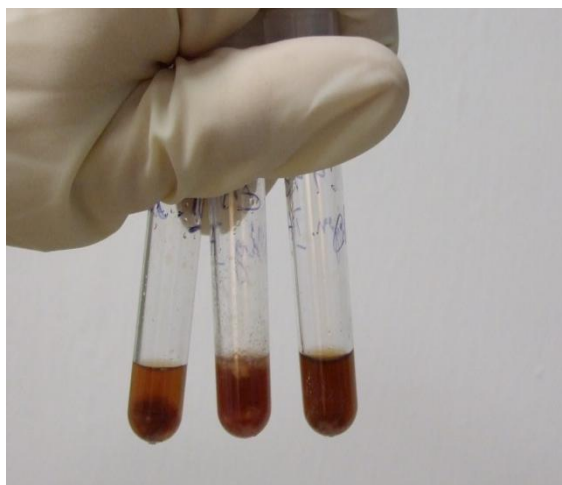


Fig. 12. Probe de țesut adipos supus digestiei enzimaticе

4. După finalizarea digestiei, suspensiile celulare rezultate au fost filtrate (filtru de 70 μm, Falcon, Becton Dickinson), trecute în tuburi Falcon de 50 ml și suplimentate până la 20 ml cu tampon fosfat salin (prima spălare);
5. Suspensiile celulare diluate au fost supuse unei centrifugări la 300 g timp de 5 minute, la temperatura camerei, cu frână la decelerare;
6. Butonul rezultat prin sedimentarea celulelor a fost omogenizat mecanic și s-a adăugat tampon fosfat salin până la 20 ml (a doua spălare);
7. Suspensiile celulare au fost supuse unei noi centrifugări la 300 g timp de 5 minute, la temperatura camerei, cu frână la decelerare;
8. Sedimentul celular a fost omogenizat mecanic, s-a făcut numărarea celulelor în hemacitometru, iar apoi suspensiile celulare au fost însămânțate în recipiente de cultură Falcon (T25) care conțineau mediu de cultură compus din: mediu nutritiv MEM Alpha Medium (1000 mg/l glucoza) + 10% ser fetal bovin + 2% Penicilină/Streptomicină + 3ng/ml bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) la o concentrație de 5×10^4 celule/cm²;
9. Probele au fost incubate la o temperatură de 37°C, în atmosferă de 5% CO₂, cu schimbarea mediului la fiecare 3 zile.

Expandarea celulelor derivate din măduva osoasă (câine, șobolan, oaie, om) și a celulelor derivate din țesutul adipos cabalin

Pentru cultivarea celulelor derivate din măduva osoasă de șobolan, canină, ovină și umană, precum și a celulelor derivate din țesutul adipos cabalin, s-a folosit un mediu de proliferare compus din: MEM Alpha Medium (1000 mg/l glucoza) (Gibco) + 10% ser fetal bovin (Sigma) +1% Penicilină/Streptomicină (Sigma) + 3 ng/ml bFGF-basic Fibroblast Growth Factor (Factor bazal de creștere al fibroblastelor) (R&D).

După 3 zile de la însămânțare, fracția celulară care nu a aderat s-a îndepărtat și s-a schimbat mediul de cultură. Ulterior, mediul se schimbă la fiecare 3-4 zile până în momentul obținerii confluentei dorite, care în mod normal se realizează după 7-12 zile. În tot acest timp s-au urmărit microscopic modificările morfologice celulare apărute (fig. 35).



Fig. 13. Analiza microscopică a culturilor celulare la microscopul inversat Olympus IX70

La fiecare atingere a confluentei dorite s-a efectuat pasajul celular (tripsinizarea).

1. Recipientele de cultură au fost tratate cu tampon fosfat salin cald (37°C), pentru îndepărtarea urmelor de mediu care ar putea influența activitatea enzimatică a tripsinei (2 clătiri ușoare).
2. Pentru detașarea enzimatică a celulelor aderente s-a folosit tripsină/EDTA 0,25 % (Sigma), caldă (37°C), în cantitate suficientă încât să acopere placa de cultură.
3. După câteva minute (3-7 min.) de menținere a recipientelor în incubator, se vizualizează microscopic detașarea celulelor.
4. Suspensiile celulare detașate de pe plăci s-au transferat în tuburi Falcon de 50 ml conținând circa 25 ml soluție rece (4 °C) de ser fetal bovin 20%, care realizează neutralizarea enzimei.
5. Probele au fost centrifugate 10 minute la 400 g, la rece.

6. Butonul celular rezultat în urma îndepărtării supernatantului a fost desprins mecanic, prin mișcări ușoare de omogenizare și adăugare treptată de mediu, pentru a se evita formarea de agregate celulare care împiedică buna desfășurare a etapelor următoare.
7. După adăugarea a circa 20 ml tampon fosfat salin, probele au fost centrifugate din nou 10 minute la 400 g.
8. După îndepărtarea supernatantului s-au numărat celulele obținute și s-a făcut reînsămânțarea la diverse concentrații celulare, între 500 celule/cm² și 5000 celule/cm².
9. O parte din celulele obținute la fiecare pasaj au fost congelate în vederea prezervării. S-a folosit un mediu de congelare conținând 10% dimetil- sulfoxid (DMSO, Sigma) pentru a preveni formarea cristalelor de gheață.

Expandarea celulelor derivate din periostul canin

Pentru cultivarea celulelor derivate din periostul canin s-a folosit un mediu de proliferare compus din: HAM/F 12: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (1:1) cu L-glutamine (ATCC) + 10% ser fetal bovin (ATCC) + 1% Penicilină/Streptomicină (Sigma) + 3ng/ml bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) (R&D).

Expandarea celulelor izolate din periost prin metoda digestiei enzimaticice s-a realizat în condiții similare expandării celulelor derivate din măduva osoasă, respectiv după un interval de 2-3 zile de la prima însămânțare s-a îndepărtat fracția celulară care nu a aderat și s-a continuat cultivarea până la atingerea confluenței dorite, cu schimbarea mediului de cultură la interval de 3-4 zile.

În cazul celulelor izolate din periost prin metoda explantului, s-a respectat intervalul de hrănire al celulelor, cu specificația că în acest caz nu au existat celule neaderate în supernatatul de cultură, ci s-a urmărit migrarea celulelor din țesut pe placă, în urma atașării la suprafața de cultură din plastic. Acest lucru s-a realizat în 3-5 zile de la prima însămânțare în ambele cazuri (explant și digestie) (fig. 36, 37).

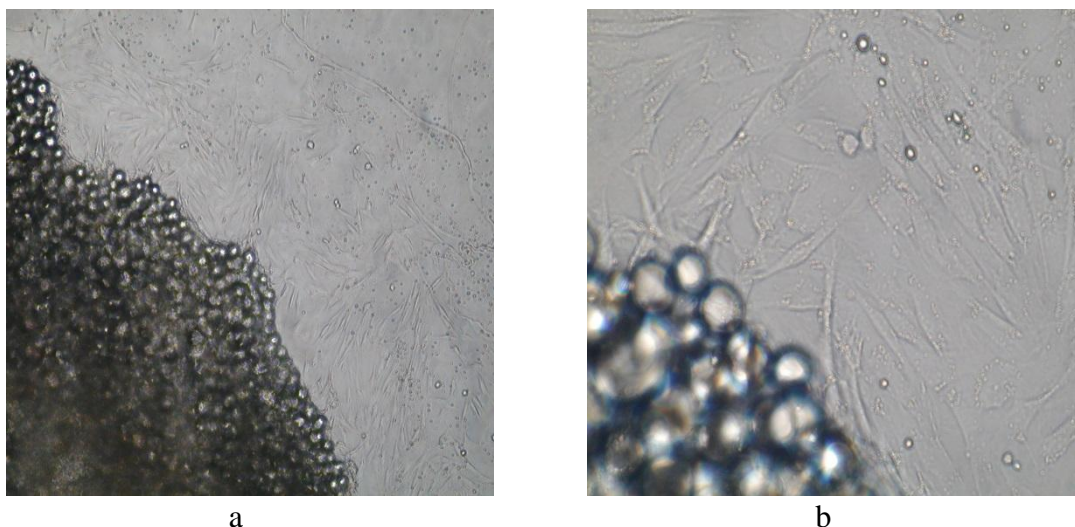


Fig. 14. Migrarea celulelor din explanturile periostale canine în ziua 4 de cultură, (a: x100), (b: x400)



Fig. 15. Cultură de celule periostale canine obținute prin metoda digestiei în ziua 6 de cultură (x100)

Expansiunea celulară, precum și modificările morfologice au fost urmărite cu ajutorul microscopului inversat Olympus IX70 (fig. 35).

La fiecare atingere a confluentei dorite (80-90%) s-au efectuat pasaje prin tripsinizare, cu specificația că în cazul celulelor izolate din periost prin metoda explantului s-au îndepărtat fragmentele tisulare folosite fie spontan (fig. 38), fie cu o zi înainte de primul pasaj.

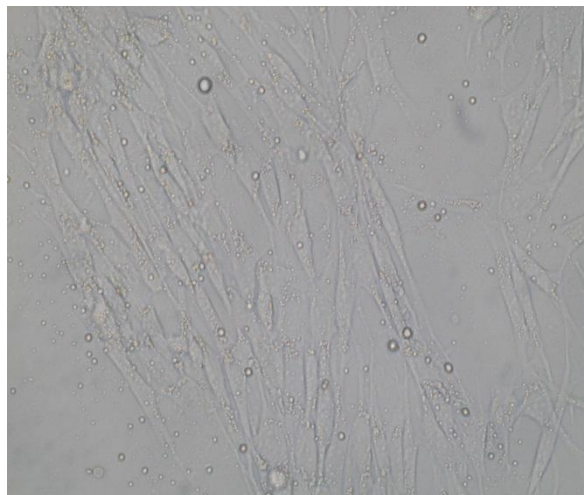


Fig. 16. Celule derivate din periostul canin după detașarea spontană a explantului în ziua 5 de cultură (x400)

Analiza expresiei markerilor de tip mezenchimal

Analiza expresiei vimentinei pentru celulele derivate din periost, măduva osoasă și țesut adipos

Pentru identificarea calitativă prin metode imunohistochimice a expresiei vimentinei, caracteristică a țesuturilor de origine mezenchimală, s-au utilizat anticorpi monoclonali anti-vimentină, clona V9 (Dako).

Celulele derivate din periost și măduva osoasă hematogenă aflate la pasajul 2, cultivate în incinte de cultură detașabile Nunc Permanox (Nalgene) au fost prelucrate în vederea analizei imunohistochimice astfel:

1. După îndepărtarea mediului, culturile au fost spălate cu tampon fosfat salin;
2. Celulele au fost fixate cu metanol 100%, timp de 10 minute, la temperatura de -20°C;
3. După îndepărtarea fixatorului s-au efectuat câteva spălări succesive cu tampon fosfat salin;
4. Culturile fixate au fost incubate timp de 30 de minute cu anticorpul primar anti-vimentină (Dako) diluat cu tampon fosfat salin, la temperatura camerei, pe agitator;
5. După spălare cu tampon fosfat salin, culturile au fost incubate timp de 30 de minute cu anticorpul secundar biotinitat (Dako) diluat cu tampon fosfat salin, la temperatura camerei, pe agitator;
6. După o nouă spălare cu tampon fosfat salin, probele au fost incubate timp de 20 de minute cu streptavidină-HRP (conjugată cu peroxidază) (sistem de detecție Dako);
7. După 2 spălări succesive cu tampon fosfat salin s-a adăugat substratul cromogenic AEC (3-amino-9-etilcarbazol) și s-a incubat timp de 10 minute, la temperatura camerei, până s-a obținut o culoare roșietică;
8. Probele s-au spălat cu apă de robinet de câteva ori și s-a făcut contramarcarea nucleilor cu hematoxilină timp de 30 de secunde, urmând o succesiune de câteva spălări pentru îndepărtarea colorantului;
9. S-au desprins lamele de incintele de cultură atașate și s-au montat folosind un mediu de montare apos, cu aplicarea lamelelor.

Analiza viabilității celulare

Microscopia de fluorescență cu acridin orange/bromură de etidiu

Tehnica de colorare cu acridin orange/bromură de etidiu este folosită pentru vizualizarea modificărilor legate de apoptoză ce apar la nivelul celulelor și a nucleilor acestora. Celulele se analizează în microscopie de fluorescență și se cuantifică pentru a stabili gradul de apoptoză și implicit viabilitatea celulară.

Se prepară o soluție stoc (100x) din: 50 mg bromura de etidiu (Becton Dickinson) + 15 mg acridin orange (Becton Dickinson) dizolvate în 1 ml etanol 95%. Se adaugă 49 ml apă distilată și se omogenizează. Soluția stoc se păstrează în alicoturi la congelator. Soluția de lucru se prepară astfel: 1 ml soluție stoc (100x) se diluează 1/100 în tampon fosfat salin, se omogenizează și se păstrează în ambalaj opac, la 4 °C, până la utilizare (maxim 1 lună).

Pentru analiza viabilității celulare a celulelor derivate din periost, măduva osoasă și țesut adipos cultivate în incintele Permax Nunc s-a procedat astfel:

1. După îndepărtarea mediului, culturile au fost spălate cu tampon fosfat salin;
2. Celulele au fost tratate cu soluția de lucru acridin orange/bromură de etidiu timp de aproximativ 3 minute, la temperatura camerei, la întuneric;
3. Opțional se adaugă tuș negru de China (Sigma) pentru contrast în probă și se omogenizează mecanic ușor;
4. Probele se analizează la microscopul de fluorescență.

Tehnica se poate aplica și pentru testarea viabilității celulelor din suspensiile celulare. În acest caz se utilizează volume egale (circa 25 μ l) din suspensia celulară (cu $1-5 \times 10^6$ celule/ml) și din soluția de lucru acridin orange/bromură de etidiu. După omogenizare, celulele se plasează în hemacitometru, se vizualizează microscopic inițial în vizibil și apoi în fluorescență, se numără și se stabilește gradul de viabilitate.

Celulele vii apar în fluorescență verde (cu acridin orange) iar celulele moarte apar în fluorescență oranj (cu bromura de etidiu).

Crioprezervarea și decongelarea celulelor izolate

Pentru **crioprezervarea** celulelor derivate din periost, măduva osoasă și țesut adipos se utilizează ca agent de crioprezervare dimetilsulfoxidul (DMSO), o substanță crioprotectoare pentru celule, dar totodată toxică pentru acestea la temperatura camerei. Din acest motiv, este necesar să fie adusă la o temperatură scăzută înainte de a veni în contact cu celulele. Se utilizează atât pentru celule umane cât și pentru celule animale.

1. În vederea prezervării celulelor pentru o perioadă de timp mai îndelungată se obține o suspensie celulară prin tripsinizarea celulelor derivate din măduva osoasă și periost aflate în cultură. Suspensia celulară trebuie să aibe o concentrație de $1 - 3 \times 10^6$ celule/ml. Mediul folosit pentru resuspendarea celulelor după centrifugare se recomandă a fi mediul nutritiv folosit pentru proliferarea celulelor stem mezenchimale, adică MEM Alpha Medium + 10% ser fetal bovin + 1% Penicilină/Streptomycină. Se recomandă ca suspensia celulară să se păstreze la 4 °C pentru 10-15 minute înainte de utilizare.
2. Se prepară mediul de congelare din DMSO și ser fetal bovin rece (4 °C) în proporție de 1:4 și se păstrează în gheață până la utilizare.
3. Peste suspensiile celulare se adaugă mediul de congelare în proporție de 1:1, picătură cu picătură și se amestecă treptat.
4. Se repartizează în criotuburi din polipropilenă.
5. Criotuburile se introduc în cutii speciale de congelare conținând izopropanol 100% și se păstrează la -80 °C până a doua zi când se transferă în azot lichid în vederea stocării pe o perioadă mai îndelungată (fig. 38).



Fig. 17. Stocatoare de azot lichid

În vederea **decongelării** celulelor umane sau animale, derivate din măduva osoasă, periost și țesut adipos, aflate în azot lichid, se parcurg următoarele etape:

1. Se repartizează câte 20 ml mediu nutritiv călduț (37°C), folosit pentru proliferarea celulelor stem mezenchimale, adică MEM Alpha Medium + 10% ser fetal bovin + 1% Penicilină/Streptomicină, în tuburi Falcon de 50 ml.
2. Probele preluate din containerul cu azot lichid se introduc într-o baie de apă încălzită în prealabil la 37°C , pentru dezghețare rapidă.
3. Înainte ca probele să fie decongelate complet se transferă conținutul criotubului în tuburile Falcon cu mediu nutritiv.
4. Se centrifughează la 400g, timp de 10 minute, la temperatura camerei. Opțional se poate repeta centrifugarea pentru îndepărtarea agentului de crioprezervare, cu o nouă cantitate de mediu.
5. După îndepărtarea supernatantului, se adaugă 1 ml mediu peste „butonul” celular din tub, se omogenizează mecanic și se repartizează în incinte de cultură în funcție de numărul de celule determinat la numărarea celulelor în hemacitometru.

Rezultate

În prezentul studiu au fost analizate exemplare din specii diferite (om, câine, oaie, cal, șobolan) urmărindu-se evidențierea asemănărilor cât și a deosebirilor dintre celulele derivate din periost, măduva osoasă și țesutul adipos, pentru identificarea surselor optime de celule osteo- și condroprogenitoare.

La câine, au fost izolate, caracterizate și expandate in vitro celule derivate din periost. Acestea au fost evaluate din punct de vedere al caracteristicilor morfologice, a viabilității și a fost urmărită capacitatea de proliferare în condiții de cultură adecvate.

La speciile studiate s-a remarcat faptul că rata de proliferare diferă în funcție de vârsta subiectului și starea sa de sănătate. Astfel, la cățelii tineri, sănătoși, s-au obținut concentrații mai mari de celule periostale/ cm^2 într-un termen mai scurt, același lucru fiind evidențiat și în cazul probelor de măduvă osoasă. Numărul total de celule obținut la primul pasaj pentru probele de explant de periost canin a variat între $1,5 \times 10^6$ - $2,7 \times 10^6$, în funcție de mărimea probelor inițiale.

Pentru probele obținute prin metoda digestiei enzimaticе numărul total de celule obținut la primul pasaj a fost mai mare, variind între $3,5 \times 10^6$ - 7×10^6 , tot în funcție de mărimea probelor inițiale, iar pentru măduva osoasă canină numărul total de celule obținut la primul pasaj a variat între 4×10^6 - $7,4 \times 10^6$. Prin expandare s-a reușit obținerea la pasajul 2, proba explant, până la 10×10^6 celule totale /subiectul cu rata de proliferare cea mai mare, la proba digestie până la 15×10^6 celule totale /subiectul cu rata de proliferare cea mai mare, iar pentru măduva osoasă s-a obținut până la 13×10^6 celule totale /subiectul cu rata de proliferare cea mai mare.

S-a constatat că rata de proliferare se reduce după pasajul 2 proporțional cu numărul pasajelor efectuate, respectiv cu durata de viață a culturii celulare, la toate speciile studiate.

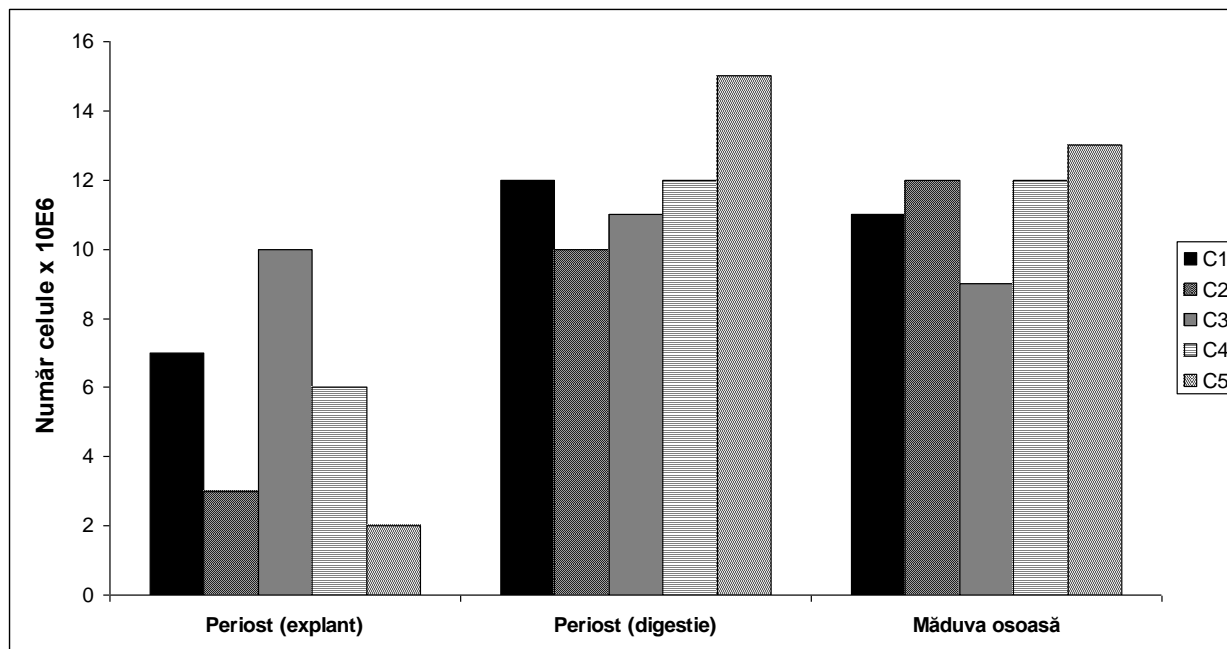
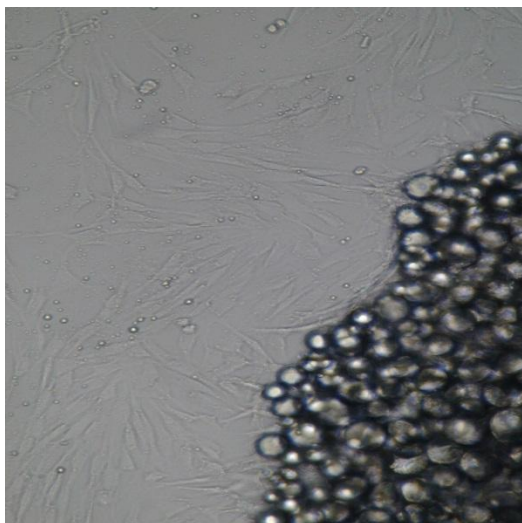


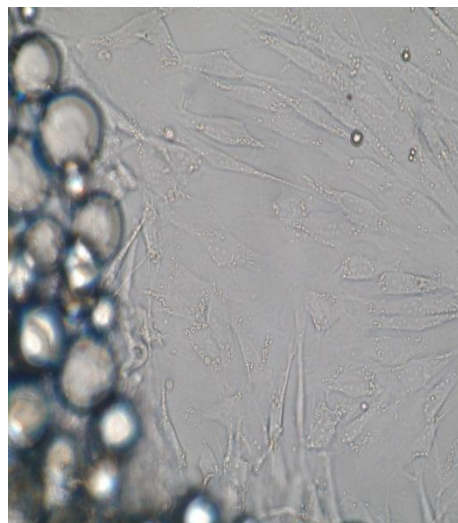
Fig. 18. Numărul total de celule derivate din periost (metode de izolare: explant și digestie enzimatică) și celulele derivate din măduva osoasă, la indivizii lotului canin de studiu (n=5), (la pasajul 2)

Potențialul de expansiune al celulelor derivate din periostul canin (metoda digestiei enzimaticе) nu s-a dovedit a fi inferior celui aparținând celulelor derivate din măduva osoasă canină în cazul cultivării în mediu de proliferare, cu precizarea că metoda explantului furnizează o cantitate ceva mai redusă de celule periostale decât metoda enzimatică (fig. 39).

Cultivarea explanturilor periostale canine prin aderență la placa de cultură a permis migrarea și atașarea de suprafața de plastic a celulelor din partea osteogenă a periostului. Celulele au migrat într-un interval de 3-5 zile de la însămânțare prezentând morfologie asemănătoare fibroblastelor, alungite, dispuse “în vârtej” (fig. 40,41).



a

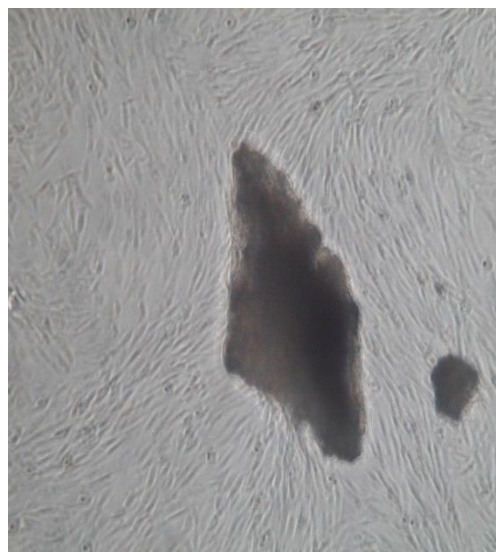


b

Fig. 19. Migrarea celulelor din explanturile periostale canine în ziua 4 de cultură, (a:x200), (b:x400)



a



b

Fig. 20. Confluență în cultura explanturilor periostale canine în ziua 13 de cultură, (a: x40), (b: x100)

În același interval de 3-5 zile s-a constatat și apariția în plăcile de cultură cu suspensii celulare periostale obținute prin digestie enzimatică a celulelor fibroblast-like, aderente, distribuite uniform pe suprafața de cultură (fig. 42, 43).



Fig. 21. Celule derivate din periostul canin (metoda digestiei enzimatic), ziua 8 de cultură, (x100)

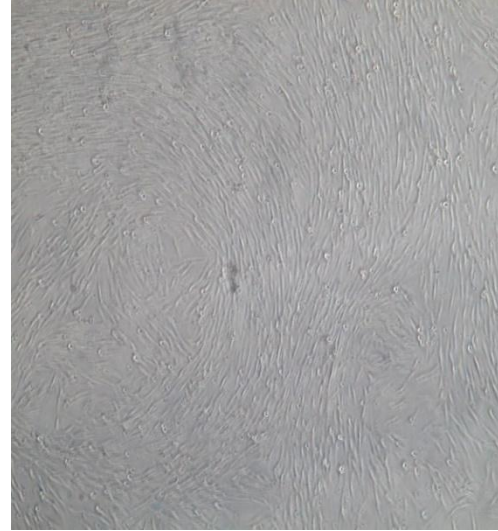


Fig. 22. Confluență în cultura celulelor periostale canine (metoda digestiei enzimatic), în ziua 13 de cultură, (x100)

În cazul probelor de măduvă osoasă, la toate speciile studiate, primele celule aderente prezentând morfologie asemănătoare fibroblastelor au apărut în 3-5 zile de la însămânțare. La unii indivizi, în cazul în care metoda aleasă pentru izolarea celulelor derivate din măduva osoasă a fost cea a aderenței directe la suprafațe din plastic, celulele nu s-au distribuit uniform pe suprafață în cultura primară, ci s-au format aglomerări celulare în special acolo unde au existat fragmente microscopice osoase antrenate în cursul recoltării măduvei. Din aceste “centre germinative” s-a observat migrarea și expansiunea celulară (fig. 44, 46). În cazul în care metoda aleasă pentru izolarea celulelor derivate din măduva osoasă a fost cea în gradient de densitate, celulele s-au distribuit uniform pe suprafață în cultura primară (fig. 45).



Fig. 23. Celule derivate din măduvă osoasă umană, ziua 13 de cultură primară, (x100)



Fig. 24. Celule derivate din măduvă osoasă canină, ziua 13 de cultură primară, (x100)

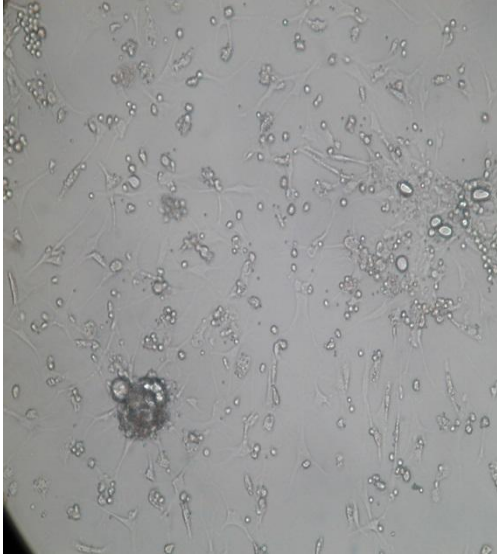


Fig. 25. Celule derivate din măduva osoasă de șobolan, ziua 4 de cultură primară, (x 200)



Fig. 26. Celule derivate din măduva osoasă de șobolan, ziua 12 de cultură primară, (x100)



Fig. 27. Celule derivate din măduva osoasă de oaie, ziua 7 de cultură primară (x60)



Fig. 28. Celule derivate din țesut adipos de cal, ziua 13 de cultură primară (x100)

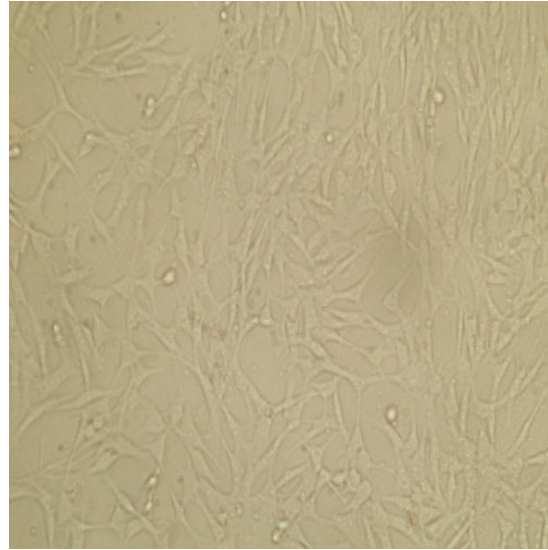
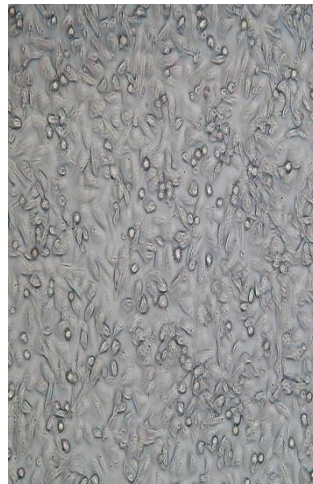


Fig.29. Celule derivate din țesut adipos de cal, pasaj 1, ziua 7 de cultură (x200)

Nu s-au remarcat diferențe majore în morfologia celulelor studiate. Totuși, s-a constatat faptul că celulele umane cu preponderență, prezentau o formă alungită încă din primele zile de cultură spre deosebire de celulele animale care la început erau mai puțin alungite, iar pe măsură ce creștea gradul de confluență celulară, tendința de alungire se accentua, fapt remarcat în special la celulele ovine (fig. 51).



a



b



c

Fig. 30. Celule derivate din măduva osoasă de oaie, cu diferite grade de confluență celulară: (a: x100), (b: x200), (c: x40)

Atât la primul cât și în următoarele pasaje s-au obținut la toate speciile studiate culturi de celule aderente, distribuite uniform pe suprafața de cultură, cu celule ce și-au menținut constant forma alungită, în morfologie asemănătoare fibroblastelor, formând colonii dispuse “în vârtej”.

Densitatea celulară la care s-a făcut reînsămânțarea a variat între 500 celule/cm² și 5000 celule/cm². În primele pasaje, la o densitate celulară scăzută (500-1000 celule/cm²), s-a evidențiat apariția unui tip celular mai mic, dispus în "vârtej", cu capacitate de autoreînnoire rapidă precum și apariția unui tip de celule mai "mature", aparent mai mari decât tipul celular descris anterior, aplatizate și cu capacitate replicativă mai scăzută. Dacă reînsămânțarea se face la o densitate mare sau se depășesc 5-6 pasaje, probabilitatea dezvoltării celulelor cu capacitate de autoreînnoire rapidă, dispuse în "vârtej" scade. Acestea pot fi înlocuite de celule mai mari, aplatizate, cu capacitate replicativă mai scăzută.

Confluența celulară de aproximativ 80-90% s-a realizat într-un interval de 8 -12 zile, la toate speciile studiate (fig. 52).

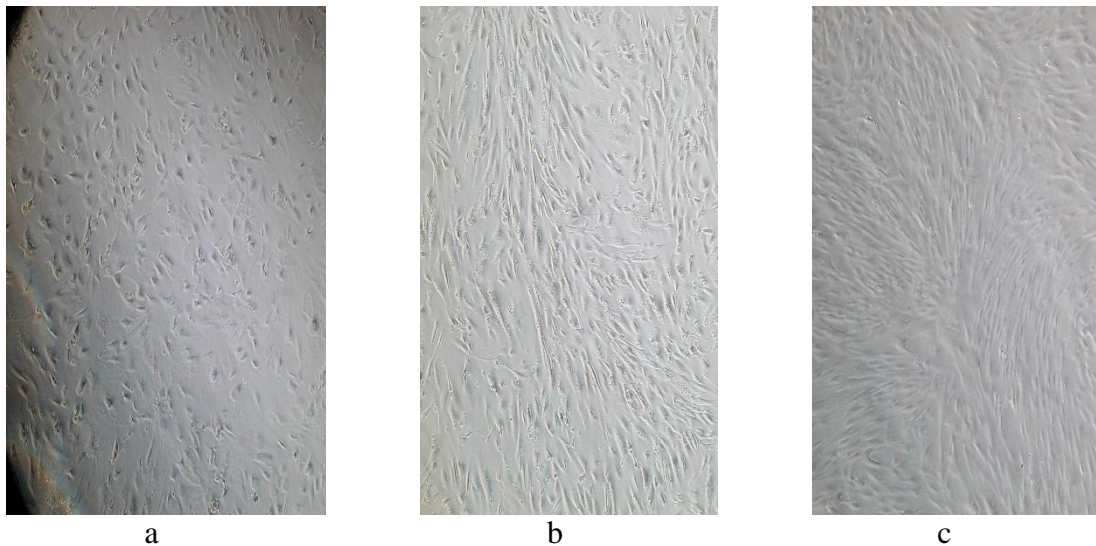


Fig. 31. Diferite grade de confluență (a: 40%), (b: 80%), (c: 95%), în cultura de celule umane derivate din măduva osoasă (x100)

Dacă tripsinizarea (pasajul) se efectuează când gradul de confluență al celulelor este de aproximativ 80% se obțin culturi bogate în celule stem mezenchimale cu capacitate de autoreînnoire rapidă, decât în cazul în care pasajul se efectuează la un grad mare de confluență (peste 95%), însă în acest caz numărul total de celule obținute este mai mare decât atunci când tripsinizarea se efectuează la un grad mai mic de confluență.

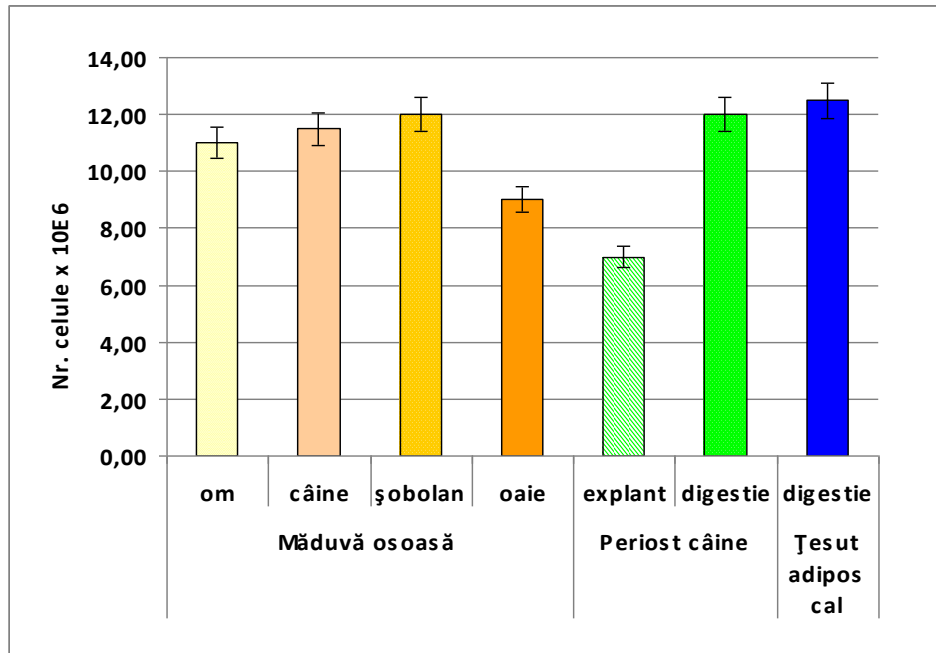


Fig. 32. Media numărului de celule obținute prin expandare, la pasajul 2, pentru fiecare specie, în funcție de materialul biologic studiat

Prin pasaje repetate, până la P5, s-a reușit menținerea viabilității în cultură până la 60 de zile de cultivare, atât pentru celulele derivate din măduva osoasă la toate speciile studiate, cât și pentru celulele derivate din periostul canin și din țesutul adipos cabalin. La acest termen, viabilitatea celulară observată în fluorescență, utilizând acridin orange/bromură de etidiu a fost de aproximativ 90-98 % (fig.54,55).

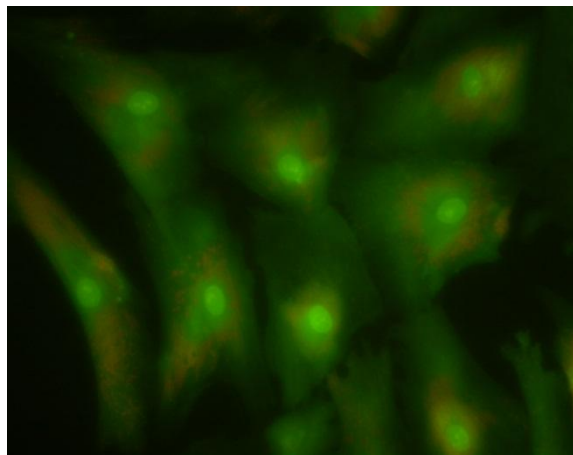


Fig. 33. Celule viabile derivate din țesut adipos de cal, în microscopie de fluorescență cu acridin orange/bromură de etidiu, la 30 de zile de cultivare (x400)

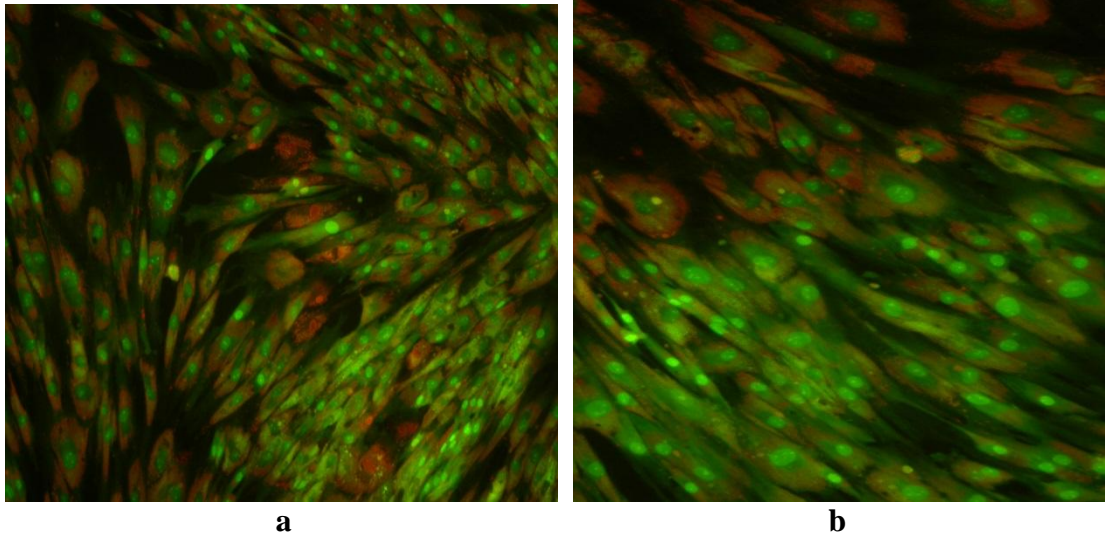


Fig. 34. Celule vii (fluorescență verde) și celule apoptotice (fluorescență oranj) în microscopie de fluorescență cu acridin orange/bromură de etidiu, la 60 de zile de cultivare: a. celule derivate din periostul canin (x100); b. celule derivate din măduva osoasă canină (x200)

Pentru caracterizarea tipurilor celulare obținute în prezentul studiu, ce au fost folosite în procesul de diferențiere spre lineajele osteogenic, condrogenic și adipogenic, din capitolul “Studiu experimental in vitro – potențialul de diferențiere a celulelor izolate din diferite surse” și în experimentele in vivo din prezenta lucrare, s-a analizat gradul de exprimare al vimentinei.

Vimentina este o proteină prezentă în celulele de origine mezenchimală, identificată calitativ prin metode imunohistochimice. Vizualizarea reacției se bazează pe conversia enzimatică a substratului cromogen AEC (3-amino-9-etilcarbazol) într-un precipitat de culoare roșie, detectabil microscopic.

Celulele derivate din periost și măduva osoasă obținute de la diversele specii studiate exprimă pozitiv vimentina (fig. 56, 57, 58).



Fig. 35. Expresia pozitivă a vimentinei la model experimental câinele (x100): a.celule derivate din periostul canin, b.celule derivate din măduva osoasă canină

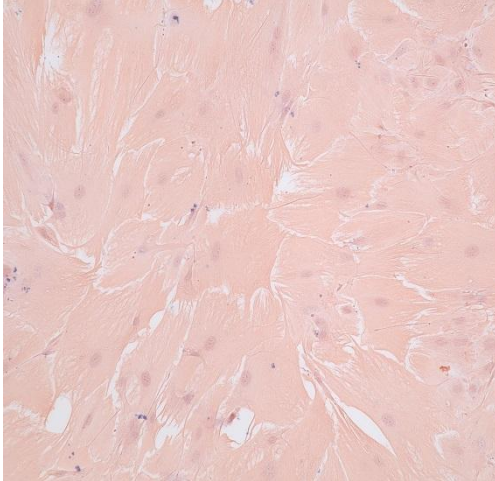


Fig. 36. Expresia pozitivă a vimentinei în celule de derivate din măduva osoasă de șobolan (x200)



Fig. 37. Expresia pozitivă a vimentinei în celule de derivate din măduva osoasă umană (x100)

Protocolul de lucru folosit pentru congelarea ulterioară a celulelor din cultură s-a dovedit a fi optim, având în vedere viabilitatea destul de ridicată a celulelor rămase după decongelare, la toate speciile studiate (60-70%).

Discuții și concluzii

În acest capitol, s-au descris detaliat cele mai uzuale metode de izolare și expandare a celulelor stem mezenchimale din periost, măduva osoasă și țesut adipos la diverse specii: om, câine, oaie, cal, șobolan, cu precizarea particularităților ce se impun a fi respectate în vederea optimizării folosirii acestor celule în practica medicală, precum și în cercetarea științifică. S-a urmărit de asemenea evidențierea asemănărilor cât și a deosebirilor dintre celulele derivate din diferite surse, pentru identificarea surselor optime de celule osteo- și condroprogenitoare.

Se presupune că celulele stem mezenchimale sunt similare indiferent de sursa tisulară din care provin, atâta timp cât prezintă potențial de autoreînnoire și multidiferențiere, precum și markeri celulari comuni (34,35,40). Cu toate acestea, proprietățile celulelor stem mezenchimale pot fi afectate în cursul diverselor proceduri aplicate în prelucrare (36,37).

În prezentul studiu, izolarea celulelor stem mezenchimale din măduva osoasă s-a făcut prin 2 metode: aderarea directă la suprafețe de plastic și izolarea celulelor mononucleare în gradient de densitate, urmată ulterior de selecția celulelor ce aderă la suprafețele de cultură din plastic (pasaj 0). Ambele metode conduc la obținerea de populații similare de celule stem mezenchimale. Pentru practicienii mai puțin experimentați în acest domeniu sugerăm alegerea metodei aderării directe la suprafețe de plastic, mai puțin laborioasă și cu costuri mai reduse decât metoda izolării celulelor în gradient de densitate.

Conform unor studii, celulele stem mezenchimale pot fi expandate până la 15 pasaje, cu toate că au fost raportate situații în care unele culturi au încetat să prolifereze după circa 4 replicări. În acest caz, se pare că intervine influența procedurii folosite la recoltarea măduvei osoase sau frecvența scăzută a celulelor stem mezenchimale în materialul recoltat (2-5 celule stem mezenchimale/ 1×10^6 celule mononucleare) și vârsta sau starea de sănătate a donorului.

În ciuda potențialului lor expansiv in vitro, celulele stem mezenchimale nu își modifică (după o moderată subcultivare) cariotipul și activitatea normală a telomerazei. Totuși, cultivarea de lungă durată influențează funcționalitatea normală a acestor celule și duce la apariția semnelor de senescență și apoptoză celulară.

Când se investighează culturile de celule stem mezenchimale din punct de vedere proliferativ, acestea par a fi neomogene. Studiile au arătat că în aceste culturi există o populație celulară "latentă", formată din celule mici și agranulare, cu o capacitate redusă de a genera colonii de celule. Aceste celule au un profil antigenic diferit de majoritatea celorlate celule proliferative. Totuși, aceste celule pot fi determinate să prolifereze în anumite condiții (stimularea cu factori secretați de progenitorii mezenchimali maturi) și se crede că reprezintă un rezervor ex-vivo de celule care se reînnoiesc, neangajate în proliferare sau diferențiere.

Confirmând rezultatele altor cercetări în domeniu, în prezentul studiu s-a constatat faptul că atât coloniile de celule stem mezenchimale, dar și fiecare celulă în parte prezintă un anumit grad de heterogenitate în morfologie și rată de proliferare, la toate speciile studiate. Astfel, se descriu 2 fenotipuri celulare distincte în primele pasaje și anume un tip celular mai mic, dispus în "vârtej", cu capacitate de autoreînnoire rapidă și un al doilea tip de celule stem mezenchimale, mai "mature", aparent mai mari decât tipul celular descris anterior, aplatizate și cu capacitate replicativă mai scăzută. Proporția de celule stem mezenchimale cu capacitate de autoreînnoire rapidă rămâne ridicată de-a lungul primelor pasaje dacă cultura este menținută la o densitate celulară redusă. Celulele stem mezenchimale considerate mai mature predomină în culturile obținute după mai multe pasaje, fapt descris și de alți autori. De asemenea, s-a constatat că acest tip celular proliferează ceva mai lent. Însămânțarea celulelor la densitate mică crește probabilitatea dezvoltării celulelor cu capacitate de autoreînnoire rapidă, dispuse în "vârtej". Acestea pot fi înlocuite parțial de celule mai mari, aplatizate, cu capacitate replicativă mai scăzută, dacă însămânțarea se face la o densitate mare sau se depășesc 5-6 pasaje. De asemenea, culturile bogate în celule stem mezenchimale cu capacitate de autoreînnoire rapidă sunt obținute dacă tripsinizarea (pasajul) se efectuează când gradul de expandare al celulelor este de aproximativ 80%. Dacă cultura atinge un grad mare de confluență (peste 95%) înainte de pasare, acest tip celular nu se regăsește în proporție satisfăcătoare, însă numărul total de celule obținute este mai mare decât în cazul în care tripsinizarea se efectuează la un grad mai mic de confluență.

S-a remarcat la speciile studiate și faptul că expansiunea celulară diferă în funcție de vârsta subiectului și starea sa de sănătate, aspect descris și în literatură. S-a constatat că rata de proliferare se reduce după pasajul 2 proporțional cu numărul pasajelor efectuate, respectiv cu durata de viață a culturii celulare, la toate speciile studiate.

Confirmând rezultatele altor studii, putem spune că celulele stem mezenchimale pot fi expandate fără modificări fenotipice semnificative până la 4-5 pasaje, cu toate că rata de proliferare a celulelor stem mezenchimale precum și alte proprietăți ale acestora se modifică gradual prin expandare. De aceea, în vederea utilizării lor recomandăm expansiunea acestora până la pasajul 4 sau 5.

Studiul a evaluat și a optimizat metodele de izolare și cultivare ale celulelor derivate din periostul canin. Prelucrarea fragmentelor de periost în vederea izolării celulelor stem mezenchimale s-a realizat prin 2 metode: metoda explantului și metoda digestiei enzimatică. Metoda digestiei sub acțiunea colagenazei a fost aleasă și în cazul prelucrării fragmentelor de țesut adipos cabalin.

În literatură a fost descrisă tendința stratului osteogenic periostal (cambiu) de a rămâne atașat osului în cursul recoltării periostului. Comparând utilizarea lambourilor periostale aderente

plăcii de cultură din metoda explantului cu folosirea suspensiei celulare rezultate din digestia fragmentelor de periost putem spune că în primul caz migrarea și expansiunea celulelor s-a făcut din partea osteogenică neprelucrată, nemodificată a periostului, situație similară cu ceea ce se întâmplă in vivo în cursul procesului de regenerare osoasă. Concluzia prezentului studiu este că folosirea metodei migrării celulelor periostale din explant oferă cu o mai mare probabilitate celule cu potențial osteogenic decât metoda digestiei. Prin tratamentul enzimatic al lambourilor periostale se obțin celule atât din stratul osteogenic cât și din stratul fibros al periostului. Sunt imposibil de separat aceste straturi înaintea prelucrării și se produce astfel contaminarea cu alte tipuri celulare asemănătoare fibroblastelor, non-progenitoare, din stratul fibros al periostului care pot inhiba diferențierea celulelor stem mezenchimale în aceste culturi celulare. Din aceste motive recomandăm alegerea metodei explantului pentru obținerea de celule derivate din periost, precursori ai lineajelor osteoblastic și condrogenic.

În practica medicală și în cercetarea științifică celulele derivate din periost își dovedesc avantajele față de celulele derivate din măduva osoasă, în ciuda dificultăților de a obține periost cu stratul osteogenic intact. În primul rând, celulele din partea osteogenică a periostului contribuie într-o fază incipientă la restaurarea integrității țesutului osos lezat. În al doilea rând, potențialul osteogenic al celulelor periostale se menține chiar și în urma cultivării îndelungate în mediu osteogenic. S-a reușit cultivarea celulelor periostale pe termen lung (3-4 luni) înainte de a se realiza diferențierea finală, dovedindu-se astfel disponibilitatea acestor celule în evaluarea in vitro, pe termen lung a interacțiunii celulare din studiul biomaterialelor. Ca o consecință a faptului că celulele periostale sunt mai puțin diferențiate și pot fi cultivate fără pierderea potențialul osteogenic s-a raportat expandarea acestor celule până la pasajul 7 înainte de finalizarea diferențierii osteoblastice.

Prezentul studiu a pus în evidență importanța utilizării celulelor derivate din periost în comparație cu celulele derivate din măduva osoasă, indiferent de specie, celulele periostale fiind surse optime de celule osteo- și condroprogenitoare, fiind recomandate în studiul capacității osteoconductive și osteoinductive a biomaterialelor, cu aplicații în medicina regenerativă.

În ceea ce privește caracterizarea celulelor derivate din periost, țesut adipos și măduva osoasă obținute de la diversele specii analizate se poate concluziona faptul că celulele izolate și expandate în prezentul studiu pot fi considerate celule stem mezenchimale pe baza faptului că aderă la plastic, au o morfologie asemănătoare fibroblastelor (formă alungită, formează colonii în "vârtej"), au capacitate de autoreînnoire și proliferază in vitro pe termen lung, exprimă pozitiv vimentina și se diferențiază spre cele trei lineaje celulare caracteristice celulelor stem mezenchimale: osteoblastic, condrogenic și adipogenic.

12. STUDIU EXPERIMENTAL IN VITRO – POTENȚIALUL DE DIFERENȚIERE AL CELULELOR IZOLATE DIN DIFERITE SURSE

✍ *Laura-Cristina Rusu, Simona Sanda Anghel,
Florina Maria Bojin, Gabriela Tănăsie*

Strategia obținerii de populații celulare cu capacitate de diferențiere spre un anumit țesut este dependentă cel puțin în parte, de prezența unor subseturi celulare distincte cu multiplă funcționalitate sau a unor populații de celule stem “primitive” capabile de diferențiere spre multiple lineaje celulare. Este importantă identificarea și separarea subseturilor celulare cu capacitate de transformare celulară dorită de celelalte subpopulații celulare cu potențial de diferențiere care nu corespund obiectivelor urmărite. Implementarea acestor strategii în ingineria tisulară permite focalizarea spre obținerea de produse și protocoale specifice tipurilor celulare studiate, incluzând tehnicile de culturi celulare, tehnologiile de obținere a factorilor de creștere sau a biomaterialelor, evitându-se astfel obținerea unor tipuri celulare nedorite și implicit abaterile de la rezultatele scontate.

Pentru dezvoltarea de terapii celulare în bolile osteoarticulare au fost izolate celule stem mezenchimale din măduva osoasă, membrana sinovială, periost, cordon ombilical. Celulele derivate din periost pot genera țesut osos sau cartilaj in vitro dar și in vivo, precum și țesut adipos in vitro (metoda digestiei enzimatic).

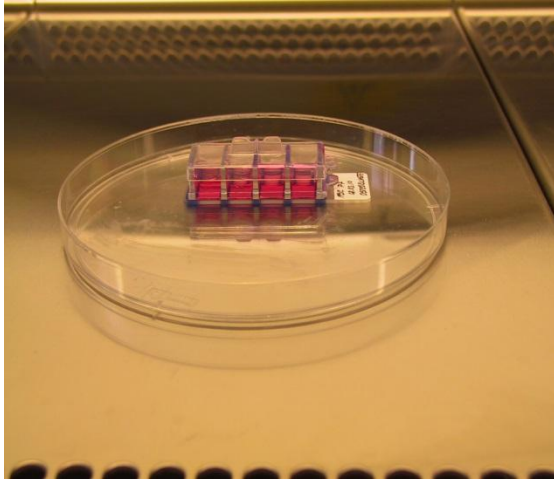
În procesul de vindecare a unei fracturi osoase, condițiile micromediului local influențează diferențierea progenitorilor celulari spre lineajul osteoblastic sau condrogenic.

Material și metodă

Condiții de cultivare a celulelor derivate din periost și măduva osoasă în vederea diferențierii osteogenice, condrogenice și adipogenice

La pasajul 2 (P2), celulele obținute din măduva osoasă de șobolan, canină și umană, precum și celulele obținute din periostul canin prin metode de izolare și expandare descrise pe larg în capitolul „Studiu experimental in vitro –identificarea surselor de celule osteo- și condroprogenitoare la diferite specii. Izolarea și expandarea in vitro a acestora” din prezenta lucrare, analizate din punct de vedere al expresiei markerilor de tip mezenchimal, au fost reînsămânțate în incinte de cultură caracteristice fiecărui tip de evaluare a diferențierii spre cele trei lineaje celulare: osteoblastic, condrogenic și adipogenic. Însămânțarea s-a făcut la o concentrație de $1,5 \times 10^4$ celule/cm² pentru diferențierea osteoblastică, 4×10^4 celule/cm² pentru diferențierea adipogenică și 3×10^4 celule/cm² pentru diferențierea condrogenică în monostrat sau 5×10^5 celule pentru diferențierea condrogenică în „buton celular”.

S-au utilizat incinte de cultură Permax Nunc (Nalge Nunc Internațional) detașabile, pentru culturile în monostrat și tuburi conice Falcon de polipropilenă pentru diferențierea condrogenică în „buton” (fig.59,60).



**Fig. 1. Incinte de cultură
Permanox Nunc**



Fig. 2. Tuburi conice Falcon de 16 ml

În vederea diferențierii condrogenice în „buton celular” s-au folosit celule în suspensie celulară rezultate în urma tripsinizării culturilor de celule stem mezenchimale, care s-au prelucrat astfel:

1. Celulele numărate în vederea asigurării concentrației dorite s-au centrifugat la 350g timp de 5 minute, în tuburi conice Falcon;
2. După îndepărtarea mediului și agitarea mecanică a probelor s-a adăugat aproximativ 1ml mediu cu factori condroinductivi;
3. Probele s-au centrifugat din nou la 350g timp de 5 minute;
4. S-a îndepărtat mediul, probele au fost agitate mecanic și din nou centrifugate cu mediu de diferențiere condrogenic, circa 1 ml pentru fiecare probă.
5. Probele au fost incubate la 37°C și 5% CO₂ fără desprinderea butonului format prin centrifugare, cu capacul tubului neînfiletat la maxim;
6. A doua zi se scutură scurt fiecare probă pentru desprinderea integrală a butonului lipit de partea conică a tubului.

Până în ziua 24 de cultură mediul se schimbă la 2-3 zile, avându-se grijă ca întotdeauna butonul celular să fie detașat de tub cu ocazia remanierii mediului (circa 1 ml în fiecare tub).

S-au folosit medii de diferențiere ready-to-use Miltenyi Biotec: NH OsteoDiff Medium, NH ChondroDiff Medium și NH AdipoDiff Medium, cu adaos de antibiotic 1%.

Analiza diferențierii spre lineajul osteogenic a celulelor derivate din periost și măduva osoasă

Potențialul de diferențiere spre lineajul osteogenic a celulelor derivate din măduva osoasă de șobolan, canină și umană și din periostul canin a fost analizat după 10 zile de menținere a culturilor în mediu cu factori osteoinductivi. Acest termen este recomandat de producătorul mediilor gata preparate utilizate în acest caz. S-au analizat prezența fosfatazei alcaline în cultură, potențialul de formare și mineralizare al matricii extracelulare osoase, imunolocalizarea colagenului de tip I și a osteocalcinei, precum și expresia genică a fosfatazei alcaline și a osteocalcinei prin metode histochimice, imunohistochimice, biochimice și moleculare.

Analiza histochimică a fosfatazei alcaline

Un sistem-substrat lichid, gata de utilizare pentru evidențierea fosfatazei alcaline este 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfat/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT) (Sigma). Acest sistem-substrat generează un produs final insolubil, nitro blue tetrazolium diformazan, de culoare variabilă între albastru și purpuriu, detectabil microscopic.

În vederea evidențierii histochimice a fosfatazei alcaline, celulele derivate din periost și măduva osoasă hematogenă cultivate în incinte de cultură detașabile Nunc Permanox (Nalge Nunc Internațional) au fost prelucrate astfel:

1. După îndepărtarea mediului, culturile au fost spălate cu tampon fosfat salin rece (4°C);
2. Celulele au fost fixate cu acetonă timp de 5 minute, la temperatura de – 20°C;
3. După îndepărtarea fixatorului, probele au fost spălate succesiv cu apă distilată rece și lăsate să se usuce timp de 30 de minute, la temperatura camerei;
4. Culturile fixate au fost incubate timp de 10 de minute cu sistemul- substrat lichid BCIP/NBT, la temperatura camerei;
5. Reacția a fost oprită prin îndepărtarea soluției substrat și spălarea cu apă distilată;
6. S-au desprins lamele de incintele de cultură atașate și s-au montat folosind un mediu de montare apos, cu aplicarea lamelor.

Analiza potențialului de formare a matricii osoase mineralizate

Mineralizarea matricii osoase extracelulare a fost analizată histochimic prin tehnica Von Kossa. Prin aceasta se pune în evidență prezența sărurilor de calciu (fosfați, carbonați, sulfăți, oxalați). Depozitele de fosfat de calciu pot fi detectate prin metoda Von Kossa datorită colorării acestora în negru.

Culturile din incintele detașabile Nunc Permanox au fost prelucrate astfel:

1. După îndepărtarea mediului, culturile au fost spălate cu tampon fosfat salin rece (4°C);
2. Celulele au fost fixate cu formaldehidă 4%, timp de 10 minute, la 4°C;
3. După îndepărtarea fixatorului s-au efectuat câteva spălări succesive cu apă distilată rece;
4. Culturile fixate au fost acoperite cu o soluție de nitrat de argint 5% (Sigma) și ținute timp de 30 de minute la întuneric;
5. Probele au fost spălate și acoperite cu apă distilată, după care au fost expuse la lumină ultravioletă timp de 1 oră;
6. După câteva spălări cu apă distilată, probele au fost tratate timp de 2 minute cu o soluție de tiosulfat de sodiu 5% (Sigma);
7. Probele s-au spălat cu apă de robinet de câteva ori și s-a făcut contramarcarea nucleilor cu hematoxilină (Sigma) timp de 30 de secunde, urmând o succesiune de câteva spălări pentru îndepărtarea colorantului;
8. S-au desprins lamele de incintele de cultură atașate și s-au montat folosind un mediu de montare apos, cu aplicarea lamelor.

Imunocalizarea colagenului de tip I

Vizualizarea reacției se bazează pe conversia enzimatică a substratului cromogen AEC (3-amino-9-etilcarbazoil) într-un precipitat de culoare roșie, detectabil microscopic.

În vederea evidențierii imunohistochimice a colagenului de tip I, celulele derivate din periostul canin și măduva osoasă hematogenă de câine și de șobolan au fost cultivate în incinte de cultură detașabile Nunc Permanox și prelucrate astfel:

1. După îndepărtarea mediului, culturile au fost spălate cu tampon fosfat salin rece (4°C);
2. Celulele au fost fixate cu formaldehidă 4%, timp de 8 minute, la 4°C;
3. După îndepărtarea fixatorului, probele au fost spălate în mod repetat cu apă distilată rece și lăsate să se usuce la temperatura camerei;
4. Culturile fixate au fost incubate timp de 30 de minute cu anticorpul primar anti-colagen I (Santa Cruz Biotechnology) diluat cu tampon fosfat salin, la temperatura camerei, pe agitator;
5. După spălare cu tampon fosfat salin, culturile au fost incubate timp de 30 de minute cu anticorpul secundar biotinitat (sistem de detecție Dako) diluat cu tampon fosfat salin, la temperatura camerei, pe agitator;
6. După o nouă spălare cu tampon fosfat salin, probele au fost incubate timp de 20 de minute cu streptavidină-HRP (conjugată cu peroxidază) (sistem de detecție Dako);
7. După 2 spălări succesive cu tampon fosfat salin s-a adăugat substratul cromogenic AEC (sistem de detecție Dako) și s-a incubat timp de 10 minute, la temperatura camerei, până s-a obținut o culoare roșietică;
8. Probele s-au spălat cu apă de robinet de câteva ori și s-a făcut contramarcarea nucleilor cu hematoxilină timp de 30 de secunde, urmând o succesiune de câteva spălări pentru îndepărtarea colorantului;
9. S-au desprins lamele de incintele de cultură atașate și s-au montat folosind un mediu de montare apos, cu aplicarea lamelelor.

Analiza imunohistochimică a osteocalcinei

În vederea evidențierii imunohistochimice a osteocalcinei, celulele derivate din măduva osoasă umană cultivate în incinte de cultură detașabile Nunc Permanox, au fost analizate pe baza protocolului de lucru descris la imunolocalizarea colagenului. S-a utilizat kitul Human Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit (R&D Systems) și sistemul de detecție HRP-AEC (R&D Systems). Reacția se bazează pe conversia enzimatică a substratului cromogen AEC (3-amino-9-etilcarbazol) într-un precipitat de culoare roșie, detectabil la microscopul optic.

Detecția biochimică a fosfatazei alcaline

O parte din celulele derivate din măduva osoasă de șobolan supuse diferențierii osteogenice au fost cultivate în plăci cu 96 de godeuri. Materialul biologic diferențiat a fost lizat chimic, centrifugat și pus în contact cu un substrat solubil pentru detecția enzimatică a activității fosfatazei alcaline, para-nitrofenilfosfatul. Activitatea enzimatică a fost cuantificată prin măsurarea absorbanței la 405 nm (Reader ELISA Biorad semiautomat) și determinată pe baza unor serii de standarde de para-nitrofenol.

În paralel a fost determinată concentrația proteinelor totale prin metoda Bradford. Această metodă se bazează pe relația de directă proporționalitate a absorbăței la 595 nm a colorantului Coomassie Blue, cu masa proteică (spectrofotometru NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies, Inc.). Activitatea fosfatazei alcaline a fost calculată pe baza unor serii de standarde de albumină bovină și exprimată în μM para-nitrofenol/mg proteine.

Determinarea biochimică a activității fosfatazei alcaline s-a realizat astfel:

1. După îndepărtarea mediului din godeuri, culturile au fost spălate cu tampon fosfat salin rece (4°C);
2. În fiecare godeu s-a adăugat câte 250 μl Ripa buffer (Thermo Scientific) cât mai rece și s-au incubat timp de 5 minute, pe gheață, în vederea lizării celulelor;
3. Materialul celular lizat a fost omogenizat mecanic și centrifugat la 14500 rpm timp de 30 de minute;
4. S-au extras eșantioane de câte 100 μl lizat celular și s-au adăugat peste 100 μl substrat (SigmaFast para-nitrofenilfosfat) pentru fiecare probă. Incubarea s-a realizat la 37°C timp de 30 minute, pe agitator (Shaker HT tip 1415);
5. Reacția enzimatică a fost stopată prin adăugarea de 3N NaOH pentru fiecare probă;
6. Măsurarea absorbanței s-a realizat la 405 nm, cu determinarea activității enzimatice pe baza unor serii de standarde de para-nitrofenol;
7. Pentru determinarea concentrației proteinelor prin metoda Bradford s-a utilizat pentru fiecare probă un amestec format din 2 μl lizat celular și 200 μl Bradford Reagent (Sigma);
8. Câte 1 μl amestec din fiecare probă a fost analizat la spectrofotometrul NanoDrop.

Caracterizarea moleculară a diferențierii osteogenice. Expresia genică a fosfatazei alcaline și a osteocalcinei

Reacția de polimerizare în lanț (Polymerase Chain Reaction-PCR) a unei molecule de ADN este o metodă de amplificare in vitro bazată pe sinteza enzimatică a secvențelor de ADN, folosind doi primeri oligonucleotidici (sens și antisens) specifici genei de interes. Tehnica PCR este o metodă mediată termic folosită pentru a amplifica molecule de ADN cu ajutorul enzimei ADN polimeraza. Amplificarea se realizează, în primul rând, cu scopul de a obține in vitro o cantitate suficient de mare dintr-o anumită porțiune de ADN, care să poată fi separată și chiar vizualizată prin tehnica de electroforeză în gel. ADN-ul obținut astfel mai poate fi secvențializat pentru a afla înșiruirea nucleotidelor din compoziția sa.

În prezentul studiu, expresia genelor studiate a fost investigată prin tehnica RT-PCR (Reverstranscripție - PCR) în celulele derivate din măduva osoasă de șobolan supuse diferențierii osteogenice.

Pentru extracția ARN-ului s-a folosit kitul de extracție GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma) astfel:

1. Suspensiile celulare obținute în urma tripsinizării culturilor celulare ($2-3 \times 10^6$ celule/probă) au fost transferate în tuburi Eppendorf de 1,5 ml și s-au centrifugat 5 minute la 1500 rpm;
2. Supernatantul s-a îndepărtat complet și probele s-au omogenizat pentru separarea celulelor;
3. S-a preparat soluția de lucru pentru liză (250 μl soluție liză + 2,5 μl 2-mercaptoetanol) și soluția de spălare 2 (soluție de spălare 2 concentrată + 300 ml etanol 70%);
4. S-au adăugat câte 250 μl soluție de liză pentru fiecare probă și s-a omogenizat bine;
5. Materialul biologic lizat s-a filtrat prin coloanele de filtrare din kit;
6. Pentru recuperarea ARN-ului filtrat la baza coloanelor de filtrare, acestea s-au centrifugat la 14500 rpm timp de 2 minute;
7. Peste lichidul filtrat al fiecărei probe s-au pipetat 250 μl etanol 70% și s-a omogenizat;

8. Probele au fost transferate în coloanele de legare din kit și s-au centrifugat la 14500 rpm timp de 15 secunde;
9. S-a îndepărtat lichidul de la baza coloanelor de legare și fiecare probă a fost spălată în 3 etape succesive prin adăugarea pe rând a fiecărei soluții de spălare din kit, câte 500 μl, urmate de centrifugări scurte (15 secunde) la turație maximă (14500 rpm). După fiecare spălare s-a aruncat lichidul acumulat la bază și s-au transferat coloanele de legare în alte tuburi Eppendorf;
10. Coloanele de legare au fost transferate în tuburi de 2 ml și s-a adăugat în fiecare probă câte 50 μl soluție de eluare, urmând o scurtă centrifugare (1 minut) la 14500 rpm;
11. Dacă cantitatea de ARN care se prefigurează a se obține depășește 50 μg, se repetă etapa anterioară cu încă 50 μl soluție de eluare;
12. Coloanele de legare s-au îndepărtat și s-a păstrat conținutul de la baza fiecărui tub. S-a cuantificat cantitatea de ARN total extrasă cu ajutorul spectrofotometrului NanoDrop (ND-1000, NanoDrop Technologies, Inc).

Pentru prepararea amestecului de reacție (master mix PCR) s-au utilizat compușii kitului Qiagen One Step RT-PCR (Qiagen):

1. Pentru fiecare probă s-a realizat un amestec de 30 μl format din soluție tampon 5x (10 μl) + soluție Q 5x (10 μl) + d NTP 10 mM (2 μl) + câte 3 μl din fiecare primer al perechii de primeri (sens și antisens) (0,6 μM) + amestecul enzimatic (Omniscript revers transcriptaza, Sensiscript revers transcriptaza, HotStar Taq ADN polimeraza) al kitului Qiagen One Step RT-PCR (2 μl);
2. Se mai adaugă celor 30 μl obținuți la punctul 1, pentru fiecare probă, încă 20 μl dintr-un amestec format din volumul de probă calculat astfel încât să conțină o cantitate de 100 ng ARN și diferența până la 20 μl constând din apă cu puritate moleculară (Sigma);
3. Probele se centrifughează scurt (câteva secunde) la 9000 rpm.

Expresia genelor studiate a fost investigată prin tehnica RT-PCR (Reverstranscripție - PCR). ADN-ul complementar s-a obținut prin reverstranscripție și a fost amplificat prin PCR cu primeri specifici secvențelor de gene investigate (Eurogentec) (tabel X).

Tabel 1. Primeri specifici genelor implicate în diferențierea osteogenică la șobolan

Fosfataza alcalină	Sens: AACGGATCTCGGGGTACACC Antisens: GGACCTGAGCGTTGGTGTG Temperatura de legare: 55°C Mărimea produsului obținut: 342bp Număr de cicluri: 35
Osteocalcin	Sens: ACCTAGCAGACACCATGAGGACC Antisens: CGAGTCCTGGAGAGTAGCCAAAG Temperatura de legare: 56°C Mărimea produsului obținut: 373bp Număr de cicluri: 35

Cu ajutorul termocycler-ului PCR (Gene Amp PCR Systems 2720 – Applied Biosystems) s-a parcurs următorul program: incubarea 30 de minute la 50°C (reverstranscripția), activarea amplificării (denaturarea inițială) la 95°C pentru 3 minute, urmată de 35 de cicluri de denaturare la 94°C pentru 40 de secunde, elongarea la 55 °C timp de 30 de secunde și extensia la 72 °C timp de 45 de secunde. Polimerizarea finală s-a realizat la 72 °C timp de 10 minute.

Câte 10 μ l amestec din fiecare probă (produs PCR amplificat + cyan orange buffer (Invitrogen) au fost introduse în godeurile din gelul de agaroză 2% cu adaos de bromură de etidiu și supuse migrării electroforetice (aparatură Biorad Sub-Cell), la 75 V timp de 15 minute. Cu ajutorul transiluminatorului (aparatură Biorad Fluor-S Multimager) s-a realizat vizualizarea în UV a prezenței sau absenței benzilor și s-a estimat dimensiunea acestora comparativ cu scara standardizată 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen).

Analiza diferențierii spre lineajul condrogenic a celulelor derivate din periost și măduva osoasă

Analiza histochimică a proteoglicanilor

Celulele derivate din măduva osoasă canină și din periostul canin cultivate în monostrat în mediu cu factori condroinductivi timp de 24 de zile au fost analizate histochimic privind potențialul de diferențiere condrogenic. Astfel, s-au efectuat tehnicile de colorare cu Safranin O și Alcian Blue pentru punerea în evidență în matricea extracelulară a proteoglicanilor, indicatori pozitivi pentru țesutul cartilajinos.

Tehnica de colorare cu Safranin O pune în evidență proteoglicani și glicozaminoglicani care se colorează în oranj spre roșu. Citoplasma se colorează în verde-gri.

1. După îndepărtarea mediului, culturile din incintele Nunc Permanox au fost spălate cu tampon fosfat salin;
2. Celulele au fost fixate cu formaldehidă și apoi cu etanol 50% timp de 10 minute.
3. După îndepărtarea fixatorului s-au efectuat câteva spălări cu apă distilată;
4. Culturile fixate au fost acoperite cu o soluție de Light Green 0,1% (Sigma) pentru de 2 minute;
5. Probele au fost spălate cu apă distilată și tratate pentru 30 de secunde cu acid acetic 1%;
6. După spălare cu apă distilată, probele au fost ținute în colorantul Safranin O de concentrație 0,1% (Sigma), diluat în etanol de concentrație 50% timp de 5 minute;
7. Probele s-au spălat cu apă distilată de câteva ori și au fost tratate cu etanol 50% pentru 10 secunde;
8. După spălarea cu apă distilată, lamele au fost desprinse de incintele de cultură atașate și s-au montat folosind un mediu de montare apos, cu aplicarea lamelor.

Pentru tratarea probelor cu Alcian Blue în vederea evidențierii proteoglicanilor ce apar colorați în albastru, au fost parcurși următorii pași:

1. După îndepărtarea mediului, culturile din incintele Nunc Permanox au fost spălate cu tampon fosfat salin;
2. Celulele au fost fixate cu formaldehidă și apoi cu etanol 50% timp de 10 minute;
3. După îndepărtarea fixatorului s-au efectuat câteva spălări cu apă distilată;
4. Culturile fixate au fost acoperite cu hematoxilina (Sigma) pentru 3 minute;
5. Probele au fost spălate cu apă de robinet și ținute într-o soluție 1% de Alcian Blue (Sigma) diluat în acid acetic de concentrație 3% (pH 2,5) timp de 20 de minute;
6. Probele s-au spălat cu apă de robinet de câteva ori și au fost tratate cu etanol 50% pentru 10 secunde;
7. După spălarea cu apă distilată, lamele au fost desprinse de incintele de cultură atașate și s-au montat folosind un mediu de montare apos, cu aplicarea lamelor.

Analiza imunofluorescentă a agrecanului

Celulele derivate din măduva osoasă de șobolan au fost cultivate în monostrat timp de 24 de zile și analizate în microscopie de fluorescență (microscop cu fluorescență Nikon Eclipse E800 dotat cu filtre de fluorescență) privind potențialul de diferențiere condrogenic.

Pentru analiza imunofluorescentă a agrecanului s-au urmărit etapele:

1. După îndepărtarea mediului, culturile au fost spălate cu tampon fosfat salin;
2. Celulele au fost fixate cu formaldehidă 4%, timp de 8 minute, la 4°C;
3. După îndepărtarea fixatorului, probele au fost spălate cu o soluție 1% de albumină bovină (Sigma) în tampon fosfat salin, timp de 5 minute;
4. Culturile fixate au fost incubate timp de 24 de ore, peste noapte, cu anticorpul primar anti-agrecan (R&D Systems) diluat cu tampon fosfat salin, la 4°C, în condiții de suficientă umiditate;
5. După spălare cu soluția 1% de albumină bovină în tampon fosfat salin, culturile au fost incubate timp de 60 de minute cu anticorpul secundar cuplat cu fluorocromul Alexa Fluor 488 (Invitrogen), diluat cu tampon fosfat salin, la întuneric, la temperatura camerei;
6. După câteva spălări cu soluția 1% de albumină bovină în tampon fosfat salin, s-a făcut contramarcarea nucleilor celulari cu DAPI (4',6-diamidină- 2-fenil indol) diluat (Invitrogen), (1 mg/ml), diluat 1:3000 în tampon fosfat salin, timp de 1 minut, urmând o succesiune de câteva spălări cu soluția 1% de albumină bovină în tampon fosfat salin;
7. Se îndepărtează mediul de spălare astfel încât probele să fie aproape uscate;
8. S-au desprins lamele de incintele de cultură atașate și s-au montat folosind un mediu de montare pentru fluorescență (ProLong Gold antifade reagent, Invitrogen), cu aplicarea lamelor.

Analiza imunohistochimică a agrecanului

În vederea evidențierii imunohistochimice a agrecanului, celulele derivate din măduva osoasă umană cultivate în "buton" celular, în mediu cu factori condroinductivi timp de 24 de zile au fost analizate pe baza protocolului de lucru descris la diferențierea osteogenică pentru imunolocalizarea colagenului, după efectuarea secțiunilor la microtom. S-a utilizat kitul Human Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit (R&D Systems) și sistemul de detecție HRP-AEC (R&D Systems). Reacția se bazează pe conversia enzimatică a substratului cromogen AEC (3-amino-9-etilcarbazol) într-un precipitat de culoare roșie, detectabil la microscopul optic.

Caracterizarea moleculară a diferențierii condrogenice. Expresia genică a colagenului II și a agrecanului

Celulele derivate din măduva osoasă de șobolan cultivate în monostrat, în mediu cu factori condroinductivi timp de 24 de zile au fost analizate din punct de vedere molecular urmând protocoalele de lucru descrise în detaliu la diferențierea osteogenică.

Pentru extracția ARN-ului s-a folosit kitul de extracție GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma). Expresia genelor studiate a fost investigată prin tehnica RT-PCR (Reverstranscripție - PCR), descrisă detaliat la caracterizarea moleculară a diferențierii osteogenice.

Tabel 2. Primeri specifici genelor implicate în diferențierea condrogenică la șobolan (Eurogentec)

Colagen tip II	Sens : ACGGTCCTACAATGTCAGGGC Antisens : AATGGGACCAGAGACACCAGG Temperatura de legare : 55°C Mărimea produsului obținut: 459bp Număr de cicluri: 35
Agrecan	S : CAAGGTCCCTCATTCTCCGC AS : GGGATGGCTGGATAGTTGGG Temperatura de legare : 55°C Mărimea produsului obținut: 667bp Număr de cicluri: 35

Analiza diferențierii spre lineajul adipogenic a celulelor derivate din periost și măduva osoasă

Potențialul de diferențiere spre lineajul adipogenic a celulelor derivate din măduva osoasă de șobolan, canină și umană și din periostul canin a fost analizat după 21 de zile de menținere a culturilor în mediu cu factori adipoinductivi, folosind colorația cu Oil Red O.

1. După îndepărtarea mediului, culturile celulare din incintele Nunc Permax au fost spălate cu tampon fosfat salin steril, cu grijă. Se impune evitarea uscării probelor. Nu se lasă culturile fără lichid mai mult de 30 de secunde pentru oricare etapă a protocolului;
2. Celulele au fost fixate cu formalină 10% timp de 30 de minute, la temperatura camerei. Manipularea se face cu grijă pentru a evita afectarea probelor, picurându-se soluțiile necesare în contact cu pereții incintelor;
3. După îndepărtarea fixatorului, probele au fost spălate cu tampon fosfat salin steril;
4. Culturile fixate au fost tratate cu izopropanol 60% pentru 2 minute;
5. După îndepărtarea izopropanolului s-a adăugat colorantul Oil Red O, soluție de lucru proaspăt preparată, pentru 5-10 minute în vederea colorării vacuolelor lipidice;
6. Colorarea a fost oprită prin spălarea cu apă de robinet de mai multe ori, până la îndepărtarea totală a colorantului. Nu se pune apa direct în godeuri ci se picură prin prelingere pe pereții incintelor;
7. Contramarcarea nucleilor cu hematoxilină s-a făcut timp de 30 de secunde pentru fiecare probă, urmând o succesiune de câteva spălări cu apă de robinet pentru îndepărtarea colorantului și montarea probelor.

Rezultate

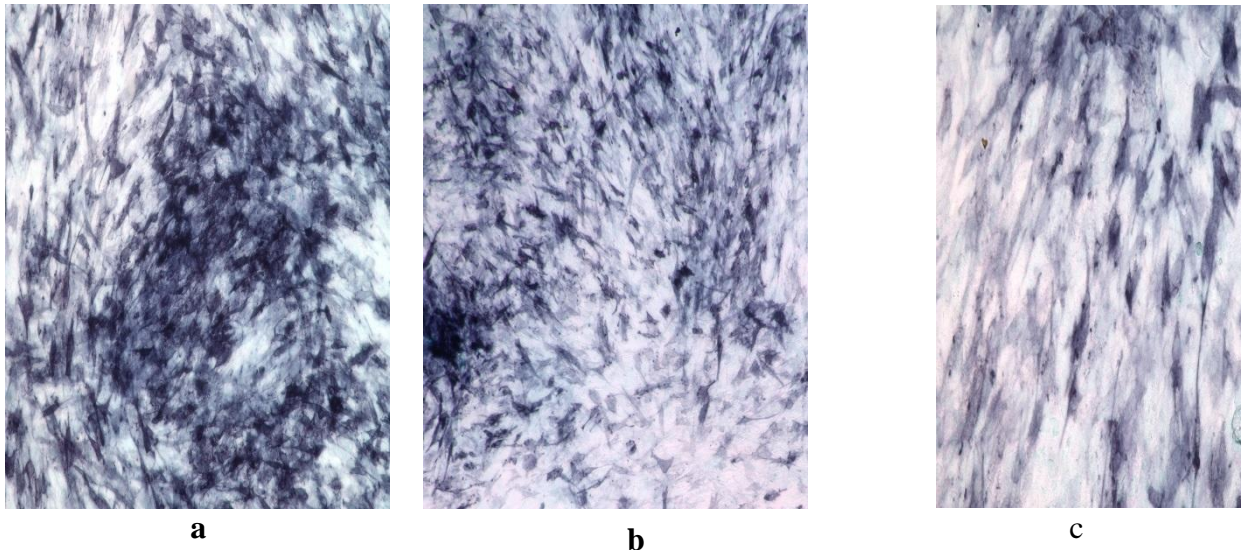
În prezentul studiu au fost analizate exemplare din specii diferite (om, câine, șobolan) urmărindu-se evidențierea asemănărilor cât și a deosebirilor dintre celulele derivate din periost și celulele derivate din măduva osoasă privind potențialul de diferențiere spre cele trei lineaje celulare: osteoblastic, condrogenic și adipogenic.

Diferențierea osteogenică

Diferențierea osteogenică a fost evaluată pe baza prezenței fosfatazei alcaline în cultură, a potențialului de formare și mineralizare al matricii extracelulare, a imuno-localizării colagenului de tip I și a osteocalcinei, precum și a expresiei genice a fosfatazei alcaline și a osteocalcinei. Osteoblastele pot fi identificate morfologic prin aspectul cuboidal și prin asocierea acestora cu matricea osoasă nou sintetizată.

Celulele angajate în diferențierea osteogenică sunt caracterizate histologic prin expresia fosfatazei alcaline, o enzimă implicată în mineralizarea matricii osoase. Sistemul-substrat lichid BCIP/NBT generează un produs final insolubil, nitro blue tetrazolium diformazan, de culoare variabilă între albastru și purpuriu, punând în evidență prezența enzimei.

În studiul efectuat asupra celulelor canine se observă faptul că în același interval de timp, procesul de osteogeneză este mai avansat în celulele derivate din periost decât în celulele derivate din măduva osoasă, la toți indivizii lotului de studiu (fig. 61).



a

b

c

Fig. 3. Diferențierea osteogenică (model experimental canin).

Evidențierea activității fosfatazei alcaline: a. celule derivate din periost diferențiate osteogenic (metoda explantului)(x100); b. celule derivate din periost (metoda digestiei) (x100); c. celule derivate din măduva osoasă diferențiate osteogenic (x200)

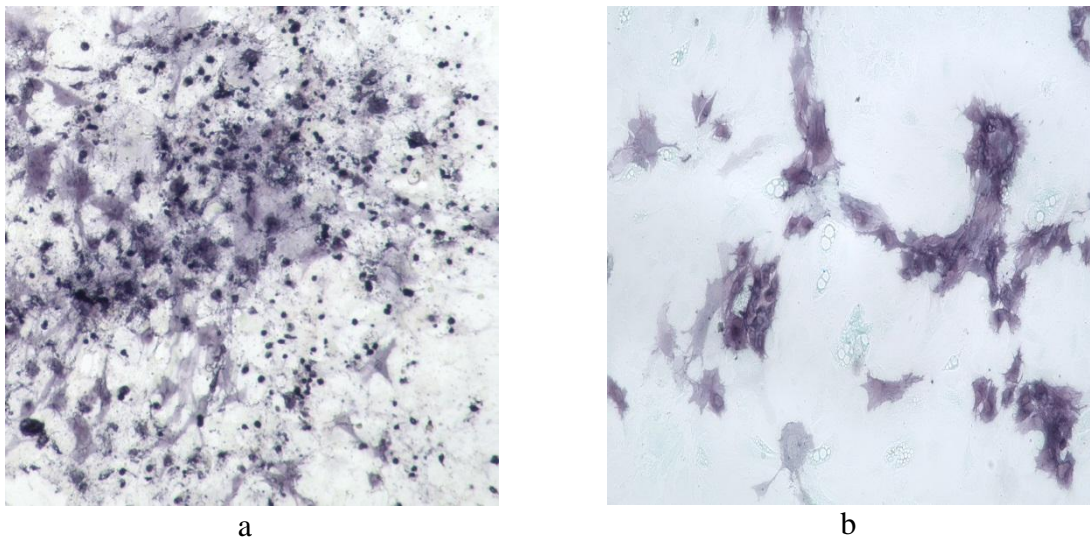


Fig. 4. Diferențierea osteogenică. Activitatea fosfatazei alcaline în: a. celule derivate din măduva osoasă umană diferențiate osteogenic (x100); b) celule derivate din măduva osoasă de șobolan diferențiate osteogenic (x200). Analiza histochimică prin sistemul BCIP/NBT evidențiază activitatea intensă a fosfatazei alcaline

Potențialul de mineralizare al matricii osoase se evidențiază prin funcția specializată a osteoblastelor de a secreta factori de mineralizare cum ar fi sărurile de calciu. Depozitele de fosfați de calciu se pot detecta prin tehnica Von Kossa, prin care depozitele de fosfați se colorează în negru datorită argintului metalic provenit din nitratul de argint (fig. 63).

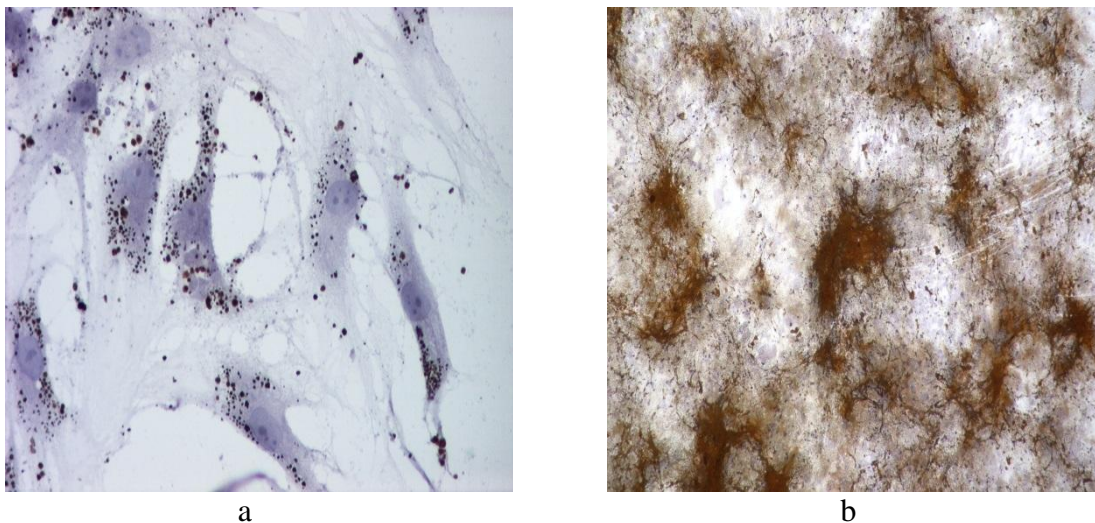


Fig. 5 . Diferențierea osteogenică. Depozite minerale evidențiate prin tehnica Von Kossa a. celule derivate din măduva osoasă umană diferențiate osteogenic (x200); b. celule derivate din măduva osoasă de șobolan diferențiate osteogenic (x60)

În culturile de celule periostale canine diferențiate osteogenic, depozitele minerale sunt mult mai evidente decât în culturile derivate din măduva osoasă canină, ceea ce sugerează faptul că în același interval de timp, procesul de mineralizare osoasă este mai rapid în primul caz, cu precizarea că la explant pare a fi cel mai intens (fig. 64).

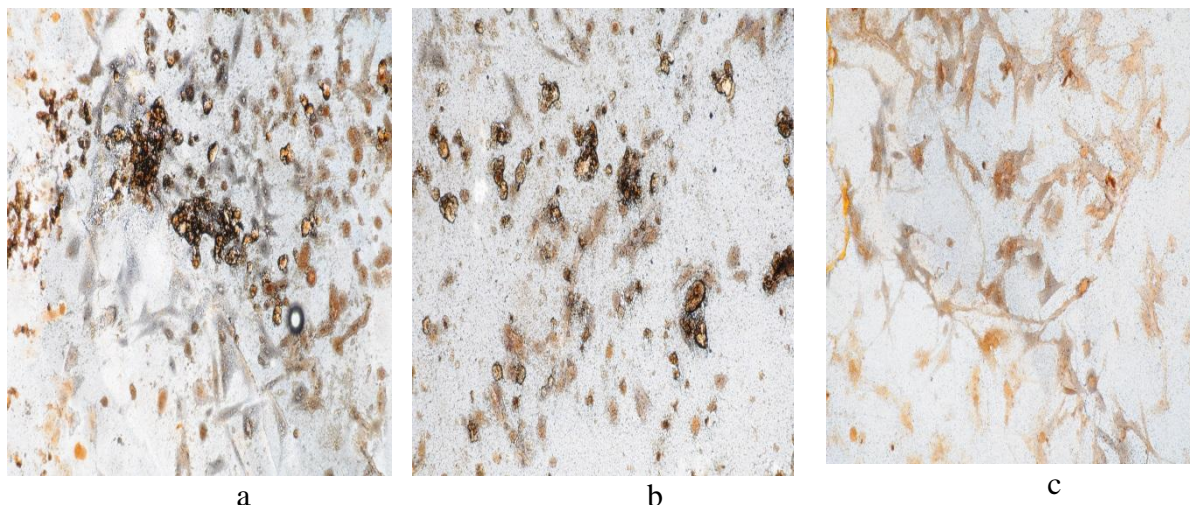


Fig. 6. Diferențierea osteogenică (model experimental canin). Depozite minerale evidențiate prin tehnica von Kossa (x100) : a. celule derivate din periost (metoda explantului); b. celule derivate din periost (metoda digestiei); c. celule derivate din măduva osoasă diferențiate osteogenic

În ziua 10 de diferențiere spre linia osteoblastică se observă sinteza de collagen I în celulele modelului experimental canin (fig.65). Collagenul de tip I este o proteină majoritară în organism și este componenta organică majoră a matricii osoase.

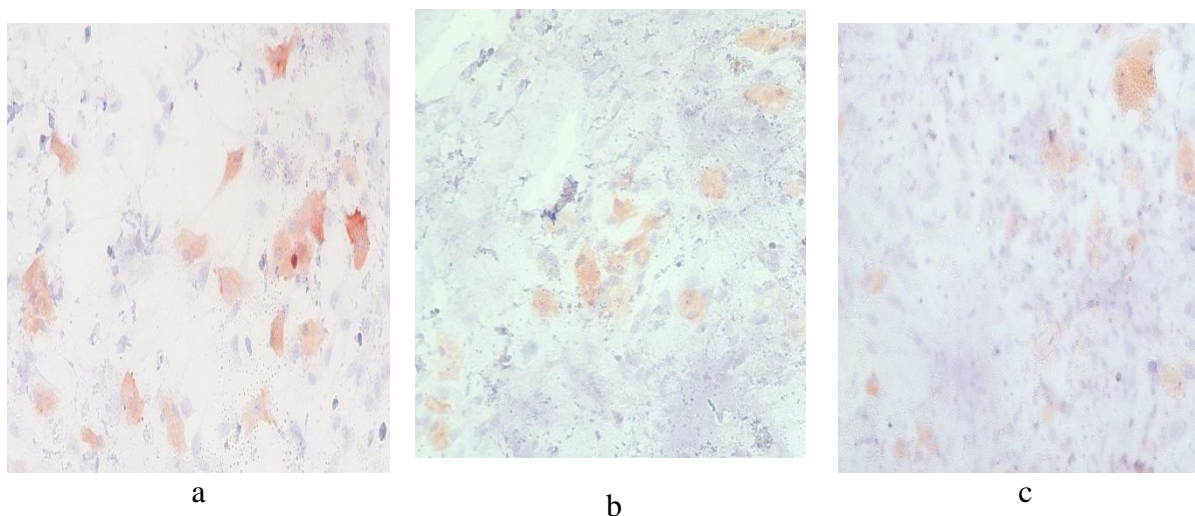


Fig. 7. Diferențierea osteogenică (model experimental canin). Imunolocalizarea collagenului de tip I (x200) în : a. celule derivate din periost (metoda explantului); b. celule derivate din periost (metoda digestiei); c. celule derivate din măduva osoasă

Pentru modelul experimental canin se remarcă o expresie mai puternică a collagenului I la toate probele cu celule derivate din periost față de probele cu celule derivate din măduva osoasă, cu preponderență în celulele periostale izolate prin metoda explantului, la circa 70-80% din indivizii studiați.

În cazul celulelor derivate din măduva osoasă de șobolan, procesul de osteogeneză este mai avansat în unele probe din lotul de studiu (aproximativ 50-60%), evidențiat prin prezența unui număr mai mare de celule în care expresia colagenului I este pozitivă (fig. 66).

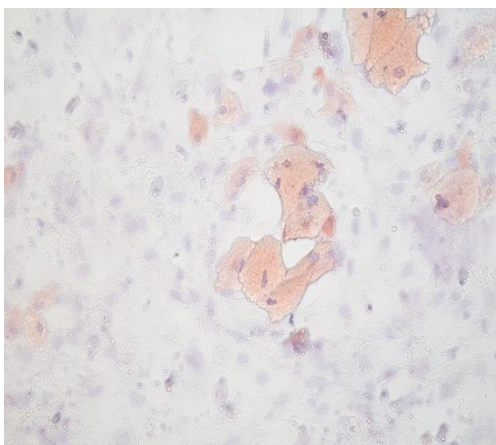


Fig. 8. Diferențierea osteogenică. Imunolocalizarea colagenului de tip I în celule derivate din măduva osoasă de șobolan diferențiate osteogenic, (x200)

În celulele derivate din măduva osoasă umană cultivate în mediu cu factori osteoinductivi, expresia osteocalcinei, pusă în evidență prin tehnica imunohistochimică ce se bazează pe reacția de conversie enzimatică a substratului cromogen AEC într-un precipitat de culoare roșie, este intens pozitivă la toți indivizii din lotul de studiu (fig. 67).

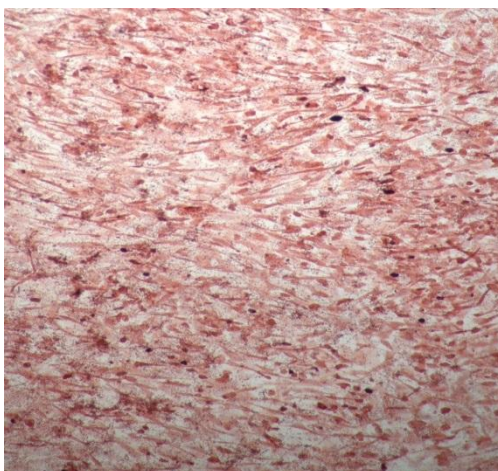


Fig. 9. Diferențierea osteogenică. Evidențierea imunohistochimică a osteocalcinei în celulele derivate din măduva osoasă umană diferențiate osteogenic (x100)

Activitatea fosfatazei alcaline în celulele derivate din măduva osoasă de șobolan supuse diferențierii osteogenice a fost analizată prin utilizarea unui substrat solubil, para-nitrofenilfosfatul. Concentrația proteinelor totale a fost determinată prin metoda Bradford, o tehnică de cuantificare a cantităților de ordinul microgramelor de proteine, folosind principiul formării complexului proteină-colorant.

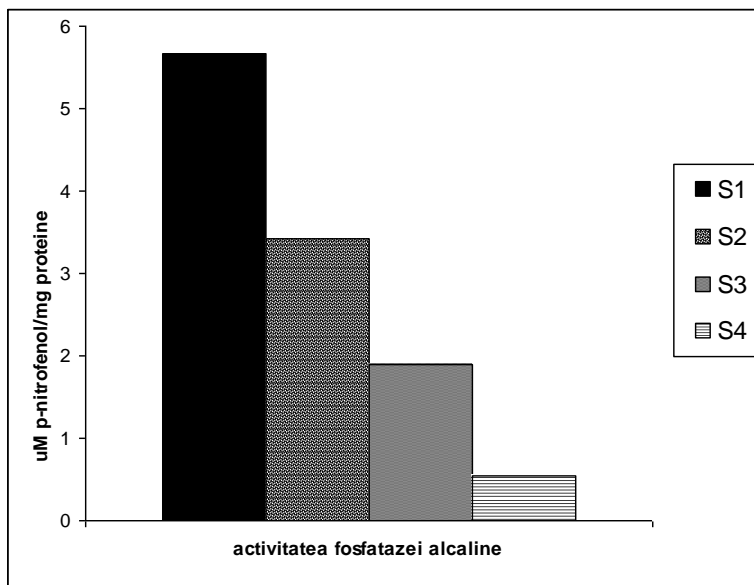


Fig. 10. Detecția biochimică a fosfatazei alcaline în celule derivate din măduva osoasă de șobolan diferențiate osteogenic (n=4)

Valorile determinate pentru activitatea fosfatazei alcaline s-au situat între 0,54-5,66 μM para-nitrofenol/mg proteine (fig.68), pentru 4 cazuri din lotul de studiu, indicând variații de la un individ la altul, fapt constatat și în cursul altor determinări, precum și cu ocazia studiului in vivo la modelul experimental pe șobolan, unde reconstrucția defectelor osoase, în același interval de timp, a prezentat diferențe în funcție de individ.

Expresia genelor studiate a fost investigată prin tehnica RT-PCR. ADN-ul complementar s-a obținut prin reverstranscripție și a fost amplificat prin PCR cu primerii specifici. Produsele PCR au fost supuse migrării electroforetice în gel de agaroză cu adaos de etidium-bromid, iar cu ajutorul transiluminatorului s-a efectuat vizualizarea prezenței sau absenței benzilor și s-a estimat dimensiunea acestora, comparativ cu scara standardizată.

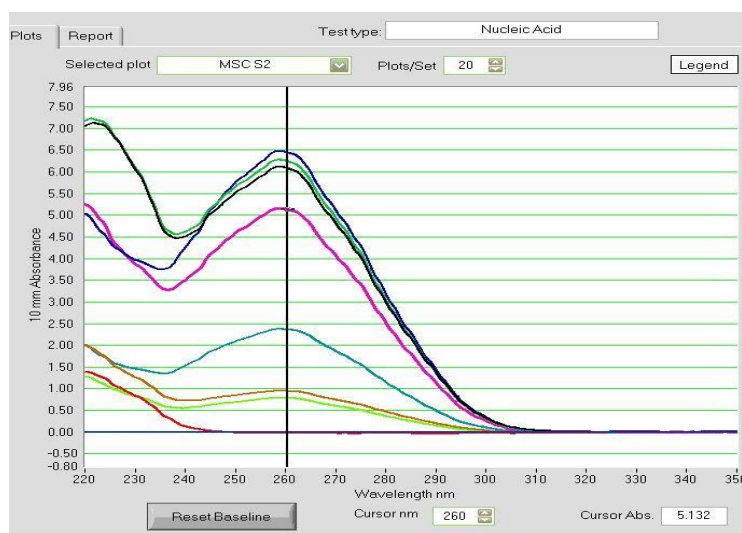


Fig. 11. Reprezentarea grafică a concentrațiilor de ARN izolat din celule stem mezenchimale de șobolan diferențiate osteogenic

Pentru celulele derivate din măduva osoasă de șobolan cultivate în mediu cu factori osteoinductivi, expresia genică a fosfatazei alcaline și a osteocalcinei diferă în cadrul lotului studiat de la un individ la altul, respectiv prezintă variații de la intens pozitiv până la slab pozitiv, conform figurii 70, fapt constatat și în urma evaluării rezultatelor studiului in vivo la modelul experimental pe șobolan.

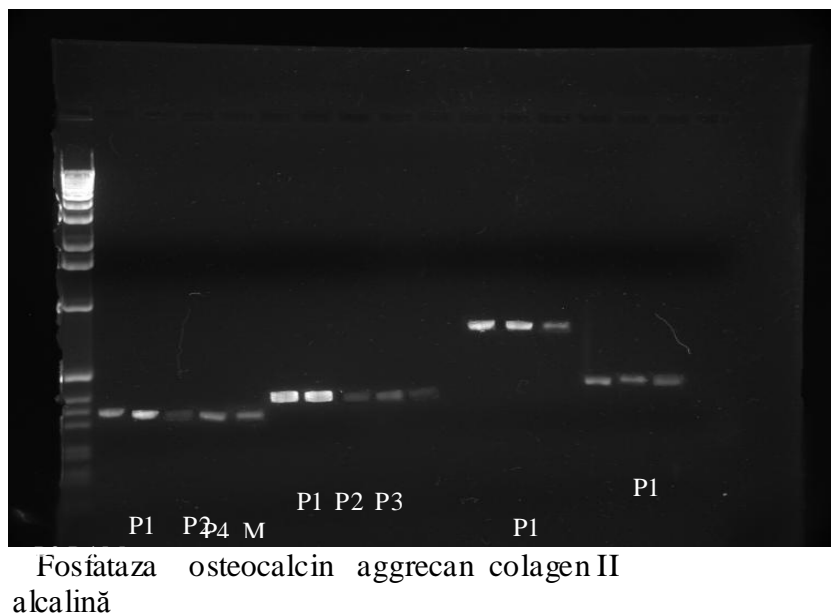


Fig. 12. Caracterizarea moleculară a diferențierii osteogenice și condrogenice la șobolan. Expresia genică a fosfatazei alcaline, osteocalcinei, agrecanului și collagenului II (P=probă, M=martor)

Diferențierea condrogenică

După 3 săptămâni (24 zile) de cultivare în mediu de diferențiere condrogenic, celulele derivate din măduva osoasă de șobolan, canină și umană și din periostul canin au fost analizate morfologic, histochimic, imunohistochimic și imuno fluorescent, precum și molecular, pentru evidențierea diferențierii spre condrocite. A fost sesizată tendința de formare a coloniilor celulare (conglomerate celulare) în cazul celulelor cultivate în monostrat, în mediu cu factori condroinductivi (fig. 71).

Analiza histochimică prin Alcian Blue și Safranin O a evidențiat faptul că celulele derivate din periostul canin și din măduva osoasă canină diferențiate condrogenic generează proteoglicani în matricea extracelulară, indicatori pozitivi pentru țesutul cartilagos, colorați în oranj spre roșu prin tehnica Safranin O sau în albastru prin tehnica Alcian Blue (fig. 71, 72).

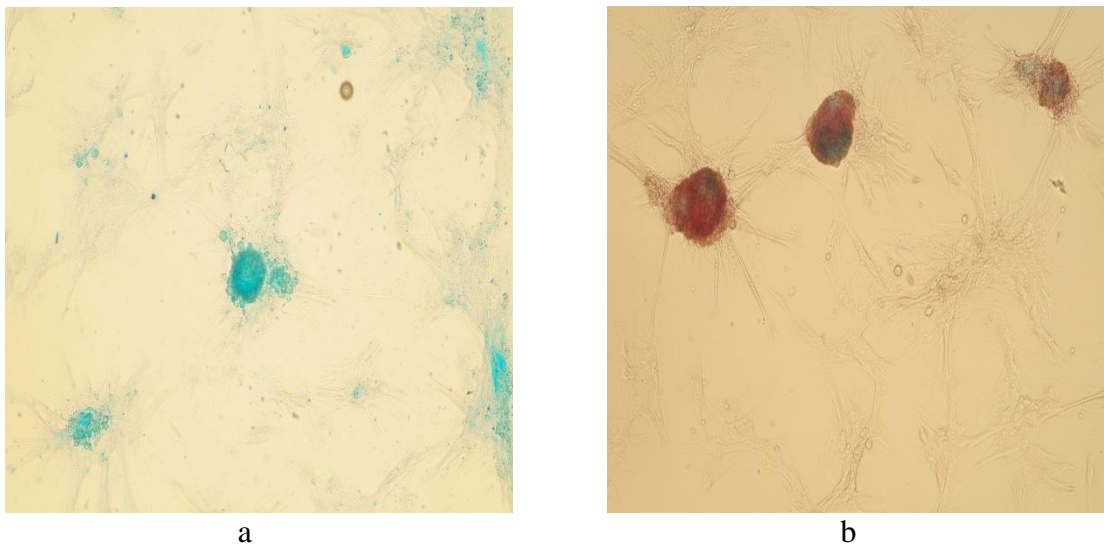


Fig. 13. Diferențierea condrogenică a celulelor periostale canine (metoda explantului). Colorarea cu Alcian Blue (a) și Safranin O (b), (x400)

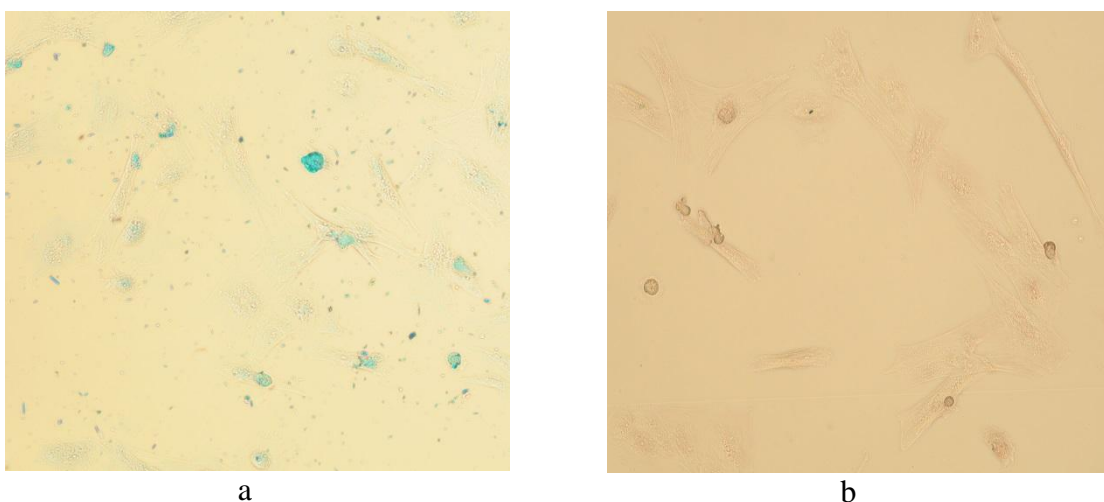


Fig. 14. Diferențierea condrogenică a celulelor derivate din măduva osoasă canină. Colorarea cu Alcian Blue (a) și Safranin O (b), (x400)

În culturile de celule periostale canine diferențiate condrogenic, tendința de formare a conglomeratelor celulare este mult mai evidentă decât în culturile derivate din măduva osoasă canină la 80% din indivizii lotului de studiu, ceea ce sugerează faptul că în același interval de timp, procesul de generare al proteoglicanilor și al glicozaminoglicanilor este mai rapid în celulele derivate din periost.

Celulele derivate din măduva osoasă de șobolan cultivate în monostrat în mediu cu factori condroinductivi au fost analizate în microscopie de fluorescență privind potențialul de diferențiere condrogenic. A fost analizat agrecanul, un proteoglican al matricii extracelulare produs de condrocite, exprimat intens pozitiv în toate probele studiate (fig. 73). Este o proteină cu rol deosebit de important în formarea și funcționarea cartilajului. S-a remarcat aceeași tendință de formare a conglomeratelor celulare, fapt pus în evidență prin localizarea nucleilor în imaginile de fluorescență albastră (fig. 73)

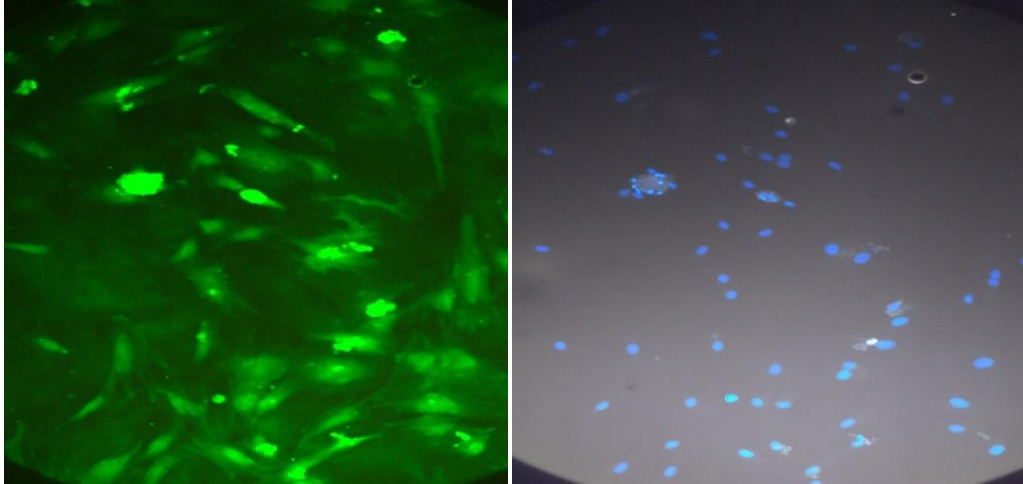


Fig. 15. Evidențierea imunofluorescentă a agrecanului în celulele derivate din măduva osoasă de șobolan diferențiate condrogenic (fluorescență verde) și nucleii acestora (fluorescență albastră), (x200)

Celulele derivate din măduva osoasă umană au fost diferențiate în mediu condrogenic în “buton” celular. Secțiunile obținute la microtom din butonul celular au fost analizate imunohistochimic pentru detectarea agrecanului, care s-a evidențiat la microscopul optic ca un precipitat de culoare roșie, exprimat pozitiv la toate probele studiate (fig. 74).

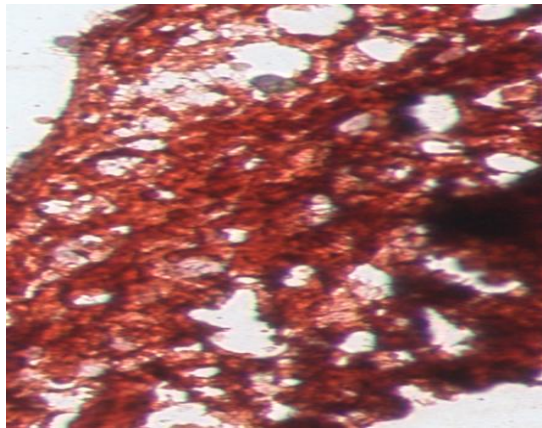


Fig. 16. Evidențierea imunohistochimică a agrecanului în celulele derivate din măduva osoasă umană diferențiate condrogenic (x200)

Caracterizarea moleculară a diferențierii condrogenice a celulelor derivate din măduva osoasă de șobolan a evidențiat expresia genică intens pozitivă pentru agrecan și mai slab pozitivă pentru collagen II (fig. 70)

Diferențierea adipogenică

Diferențierea adipogenică a fost evaluată pe baza prezenței vacuolelor lipidice în celulele diferențiate. Adipocitele sunt de formă rotundă și conțin picături lipidice care fuzionează formând vacuole, detectabile prin colorare cu Oil Red O, un colorant roșu lipofil.

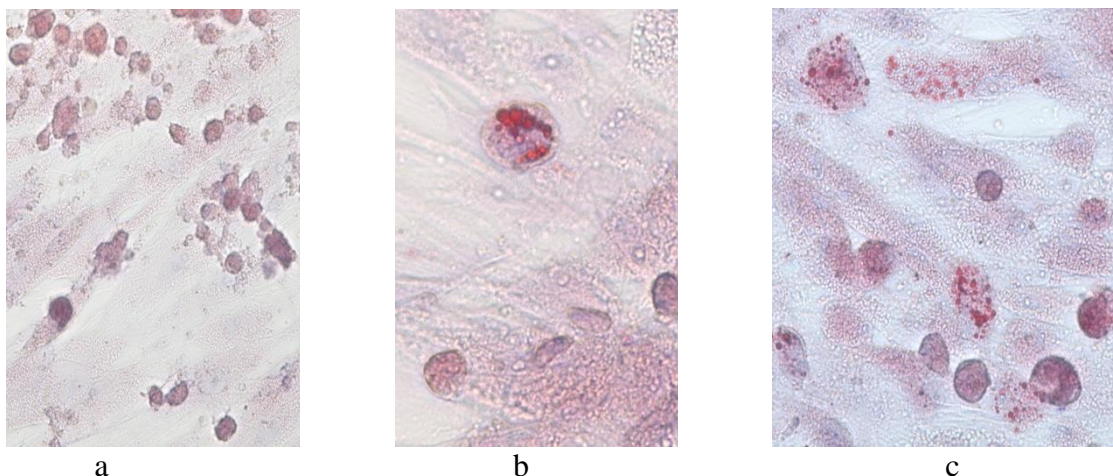


Fig. 17. Diferențierea adipogenică (model experimental canin). Metoda histochimică de evidențiere a adipocitelor prin Oil Red O: a. celule periostale diferențiate adipogenic (metoda explantului) (x200) ; b. celule periostale diferențiate adipogenic (metoda digestiei) (x400); c. celule derivate din măduva osoasă diferențiate adipogenic (x400)

Rezultatele obținute indică existența unor particularități în ceea ce privește potențialul de diferențiere spre lineajul adipogenic al celulelor periostale canine în funcție de metoda aleasă pentru izolarea celulelor din periost. Astfel, adipogeneza prezintă un potențial mult mai mare în celulele derivate din măduva osoasă de câine decât în celulele periostale și în special față de celulele izolate din periost prin metoda explantului, unde diferențierea adipogenică este cea mai scăzută (fig. 75). Într-un singur caz din studiu diferențierea adipogenică a fost relativ egală pentru celulele periostale obținute prin metoda explantului față de celulele periostale obținute prin metoda digestiei enzimaticice.

S-a remarcat de asemenea faptul că, potențialul de diferențiere adipogenică al celulelor derivate din măduva osoasă de câine este inferior celui prezent în celulele derivate din măduva osoasă umană și de șobolan (fig. 76, 77).

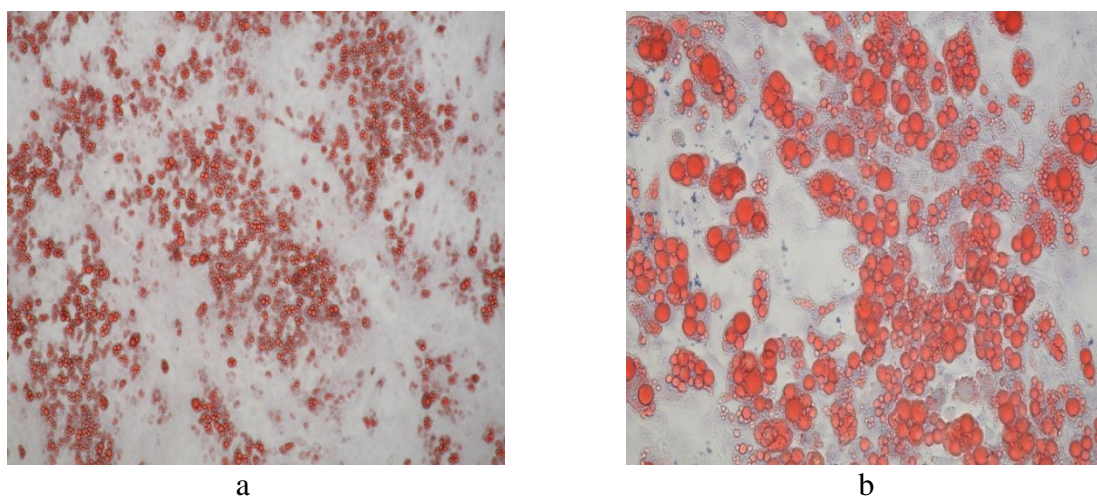


Fig. 18. Diferențierea adipogenică a celulelor derivate din măduva osoasă de șobolan. Metoda histochimică de evidențiere a adipocitelor prin Oil Red O, (a: x40), (b: x200)

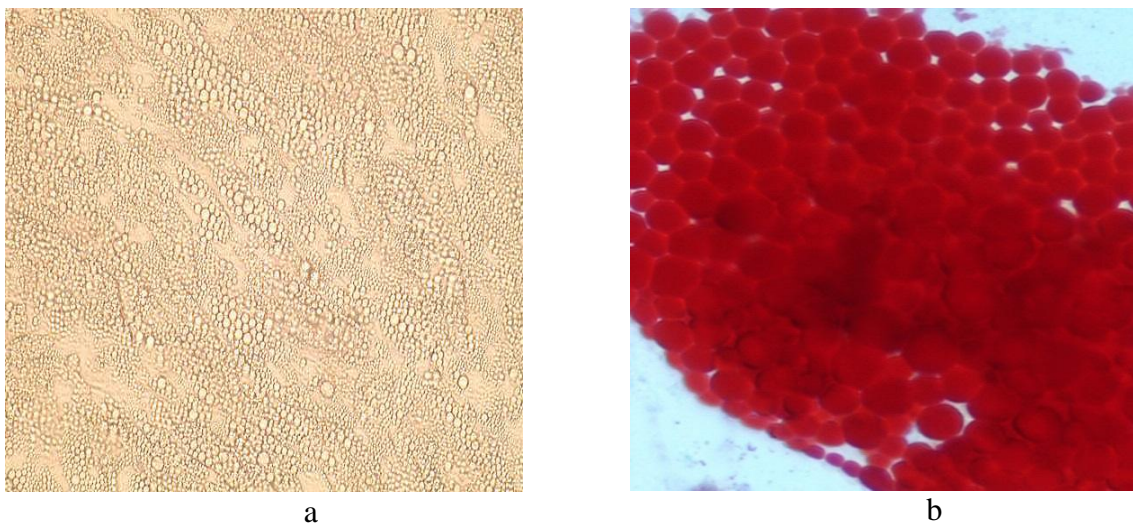


Fig. 19. Diferențierea adipogenică a celulelor derivate din măduva osoasă umană. Adipocite umane înainte și după colorare cu Oil Red O, (a: x100), (b: x400)

La două probe cu celule derivate din măduva osoasă de șobolan cultivate în mediu de proliferare pentru celule stem mezenchimale s-a remarcat diferențierea spontană spre lineajul adipocitar începând cu ziua 8 de cultivare al pasajului 2 (fig.78). De precizat faptul că această tendință s-a manifestat doar în godeurile însămânțate la o densitate celulară cuprinsă între $4 \times 10^3/\text{cm}^2$ și $8 \times 10^3/\text{cm}^2$.

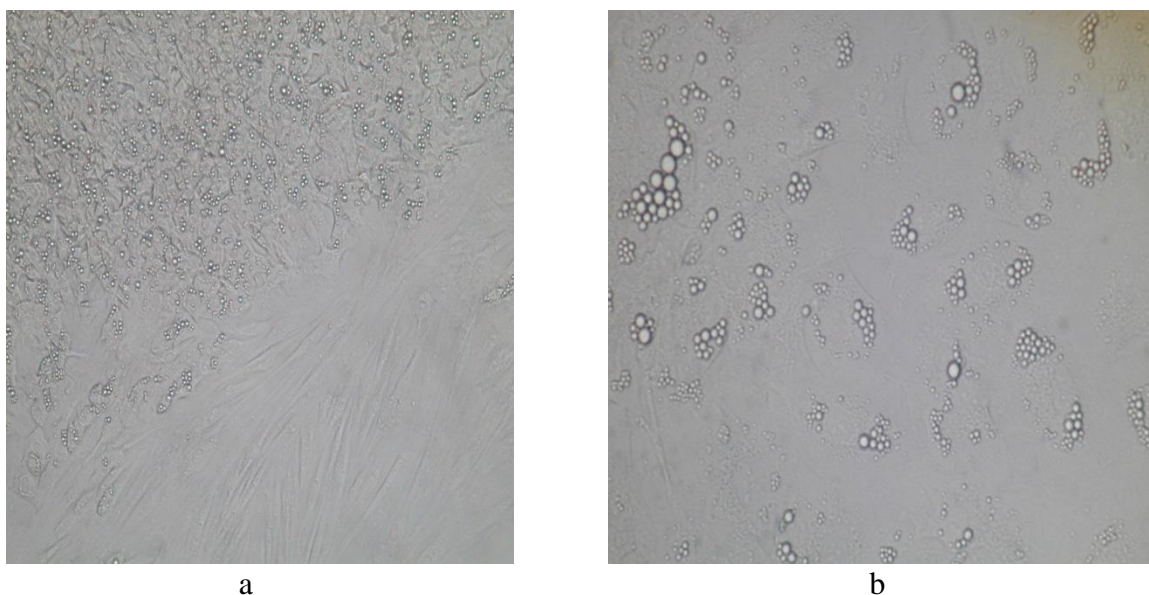


Fig. 20. Diferențierea adipogenică spontană a celulelor derivate din măduva osoasă de șobolan, pasaj 2, ziua 10 de cultură, (a: x100), (b: x200)

Discuții și concluzii

Studiul prezent dorește să evidențieze asemănările cât și deosebirile dintre celulele obținute în urma cultivării celulelor periostale izolate prin metoda explant/digestie enzimatică și celulele derivate din măduva osoasă, analizate în trei medii variate de diferențiere. La modelul experimental canin, potențialul de expansiune al celulelor derivate din periost (metoda digestiei) nu este inferior potențialului celulelor derivate din măduva osoasă cultivate în mediu de proliferare, cu precizarea că metoda explantului furnizează o cantitate ceva mai redusă de celule periostale decât metoda enzimatică așa cum am demonstrat în capitolul „Studiu experimental in vitro – identificarea surselor de celule osteo- și condroprogenitoare la diferite specii. Izolarea și expandarea in vitro a acestora” din prezenta lucrare.

Celulele studiate au prezentat o remarcabilă viabilitate și capacitate de proliferare pentru toate speciile studiate. Nu s-au observat diferențe semnificative în ceea ce privește morfologia celulelor cuprinse în studiu. În schimb, s-a constatat faptul că celulele implicate în diferențiere au un potențial proliferativ scăzut în comparație cu celulele cultivate în mediu de creștere pentru celule stem mezenchimale la toate speciile studiate, confirmând rezultatele obținute în alte studii.

Dintre celulele angajate în diferențiere, am constatat că celulele periostale obținute prin metoda explantului au avut rata de proliferare cea mai mare, cu tendința cea mai accentuată de a forma agregate celulare sau colonii. Aceasta tendință apare în diferențierea osteo- și condrogenică (fig.61,71). Aceste considerente conduc la concluzia că utilizarea celulelor periostale scurtează timpul necesar cultivării, cu reducerea implicită a costurilor și a riscului de contaminare.

Celulele derivate din periost pot forma țesut osos și cartilagos in vitro și in vivo, precum și țesut adipos in vitro (metoda digestiei enzimaticice). Pentru modelul experimental canin, prezentul studiu constată particularități în ceea ce privește potențialul de diferențiere al celulelor periostale în funcție de metoda aleasă pentru prelucrarea fragmentelor de periost recoltat. În timp ce celulele derivate din măduva osoasă se diferențiază spre cele trei lineaje celulare, confirmând rezultatele altor cercetări în domeniu cu aplicații pe alte specii, celulele periostale obținute prin cultivarea explantelor de periost se diferențiază cu precădere spre lineajul osteoblastic și condrogenic și mai slab spre lineajul adipogenic, în timp ce celulele obținute prin metoda digestiei enzimaticice a fragmentelor de periost se diferențiază pozitiv spre toate cele trei linii celulare: osteo-, condro- și adipogenică. O posibilă explicație ar fi faptul că celulele obținute prin metoda explantului din partea osteogenă a periostului (cambiu) sunt cu precădere precursori ai lineajelor osteo/condrogenic, pe când celulele periostale obținute prin metoda digestiei conțin celule din cambiu contaminate cu alte tipuri celulare din stratul superior fibros. De altfel, concluzia capitolului „Studiu experimental in vitro – identificarea surselor de celule osteo- și condroprogenitoare la diferite specii. Izolarea și expandarea in vitro a acestora” al prezentei lucrări subliniază faptul că folosirea metodei migrării celulelor periostale din explant oferă cu o mai mare probabilitate celule cu potențial osteogenic decât metoda digestiei, deoarece în primul caz migrarea și expansiunea celulelor s-a făcut din partea osteogenică neprelucrată, nemodificată a periostului, situație similară cu ceea ce se întâmplă in vivo în cursul procesului de regenerare osoasă. Deoarece periostul este o membrană vasculo-conjunctivă care învelește osul și conține multiple tipuri celulare (celule aparținând stratului periostal intern-cambiu, celule aparținând stratului extern-fibros, pericite vasculare), poate fi o potențială sursă de celule progenitoare. Acest aspect are implicații importante în practica ingineriei tisulare și în realizarea produselor destinate culturilor celulare ce vizează aplicațiile clinice.

Celulele cuboidal-rotunjite sunt considerate a fi celule osteo/condro-progenitoare. Conform lui Izumi expresia fosfatazei alcaline în periost nu se datorează fibroblastelor sau precursorilor condrogenici, ci se datorează osteoblastelor și precursorilor osteoblastici. Acest aspect conduce la concluzia că în culturile de celule periostale, prezența progenitorilor ce exprimă pozitiv fosfataza alcalină este crescută sau se poate considera că aproape toate celulele sunt capabile să se diferențieze în osteoblaste. După Hanada există 2 tipuri celulare, unul ce exprimă pozitiv fosfataza alcalină și unul ce exprimă negativ fosfataza alcalină, prezente în fazele timpurii ale culturilor de celule periostale. Celulele ce exprimă negativ fosfataza alcalină sunt nu doar fibroblastele contaminante din stratul exterior, fibros, al periostului ci și celule progenitoare mezenchimale nediferențiate, capabile să se diferențieze spre lineajul osteogenic.

În vederea stabilirii unor modalități eficiente de tratament al afecțiunilor ce vizează cartilajul, au fost izolate celule stem mezenchimale din măduva osoasă, membrana sinovială, periost și cordon ombilical. Periostul are potențialul de a se diferenția în neocartilaj deoarece conține în mare măsură celule progenitoare capabile de a se transforma direct în condrocite, cu un potențial condrogenic neinfluențat de numărul de pasaje celulare sau de vârsta donorilor. Din aceste motive, celulele derivate din periost sunt recomandate în alegerea modalităților de tratament ale bolilor cartilajului hialin.

În prezentul studiu a fost analizată condrogeniza in vitro, în cultură monostrat și în "buton" celular, în vederea evaluării potențialului condrogenic al celulelor derivate din periost și măduva osoasă. Matricea cartilaginoasă intens pozitivă s-a evidențiat histologic prin tehnicile de colorare cu Alcian blue și Safranin O în celulele periostale canine. Agrecanul, un proteoglican al matricii extracelulare produs de condrocite, este exprimat intens pozitiv atât în celulele derivate din măduva osoasă de șobolan, cât și în celulele derivate din măduva osoasă umană (fig.73,74). S-a remarcat aceeași tendință de formare a conglomeratelor celulare și în cazul celulelor derivate din măduva osoasă de șobolan cultivate în monostrat, în mediu cu factori condroinductivi, fapt pus în evidență prin localizarea nucleilor în imaginile de fluorescență albastră (fig.73).

Pentru 2 probe de celule derivate din măduva osoasă de șobolan cultivate în mediu de proliferare pentru celule stem mezenchimale și nu de diferențiere, am remarcat diferențierea spontană spre lineajul adipocitar începând cu ziua 8 de cultivare al pasajului 2 (fig.78). De precizat faptul că această tendință s-a manifestat doar în godeurile însămânțate la o densitate celulară cuprinsă între $4 \times 10^3/\text{cm}^2$ și $8 \times 10^3/\text{cm}^2$. La celelalte specii studiate nu s-a constatat acest aspect.

Celulele analizate în prezentul studiu au fost testate și din punct de vedere al capacității de diferențiere după crioprezervare și cultivare ulterioară. Atât celulele derivate din periost cât și celulele derivate din măduva osoasă prezintă potențial de diferențiere comparabil cu cel inițial, anterior congelării, testat până la pasajul 7 în cazul celulelor umane și până la pasajul 4 în cazul celorlalte specii. De altfel, datele din literatură confirmă acest lucru. Modificările celulare sesizate în legătură cu numărul de pasaje celulare și vârsta donorilor au fost precizate în capitolul „Studiu experimental in vitro – identificarea surselor de celule osteo- și condroprogenitoare la diferite specii. Izolarea și expandarea in vitro a acestora” din prezenta lucrare și se referă la diminuarea capacității de proliferare proporțional cu numărul de pasaje și apariția unui tip celular considerat mai "matur", cu celule mai mari, aplatizate și capacitate replicativă mai scăzută în corelație cu gradul de expandare al celulelor. Am precizat și faptul că celulele implicate în diferențiere, aflate la pasaje diferite, au un potențial proliferativ scăzut în comparație cu celulele cultivate în mediu de creștere aflate la același pasaj, confirmând rezultatele obținute în alte studii.

Prezentul studiu a reușit să demonstreze că celulele derivate din periostul canin se pot diferenția spre cele trei lineaje celulare caracteristice celulelor stem mezenchimale: osteoblastic, condrogenic și adipogenic, la fel ca și celulele derivate din măduva osoasă. Din aceste motive considerăm că celulele periostale pot fi selecționate ca sursă eficientă pentru regenerarea osoasă asemenea celulelor derivate din măduva osoasă, utilizate actual cu preponderență. Conform unor studii, potențialul osteogenic al celulelor periostale se menține chiar și în urma cultivării îndelungate în mediu osteogenic. S-a reușit cultivarea celulelor periostale pe termen lung (3-4 luni) înainte de a se realiza diferențierea finală, dovedindu-se astfel disponibilitatea acestor celule în evaluarea in vitro, pe termen lung a interacțiunii celulare din studiul biomaterialelor. De asemenea, uneori recoltarea fragmentelor de periost este mai facilă și mai puțin invazivă decât recoltarea măduvei osoase, cum ar fi de exemplu, în domeniul medicinei dentare pentru regenerarea osului alveolar afectat în periodontite sau implante dentare precum și în chirurgia reconstructivă.

Recomandăm alegerea metodei explantului pentru obținerea de celule derivate din periost, deoarece folosirea metodei migrării celulelor periostale din explant oferă cu o mai mare probabilitate celule cu potențial osteogenic decât metoda digestiei enzimaticice.

Prezentul studiu dorește să evidențieze importanța utilizării celulelor derivate din periost în comparație cu celulele derivate din măduva osoasă, celulele periostale fiind surse optime de celule osteo- și condrogenitoare, fiind recomandate în studiul capacității osteoconductive și osteoinductive a biomaterialelor, cu aplicații în medicina regenerativă.

13. TERAPII CELULARE: STUDIU TERAPEUTIC PE ANIMAL PENTRU INVESTIGAREA EFICIENȚEI TERAPIEI CU CELULE STEM MEZENCHIMALE ÎN BOLILE OSTEOARTICULARE

*✍️ Laura-Cristina Rusu, Simona Sanda Anghel,
Florina Maria Bojin, Gabriela Tănăsie*

În prezentul studiu s-au utilizat celule stem mezenchimale autologe derivate din țesut adipos de cal, la pasajul al treilea, nediferențiate, în tratamentul unei afecțiuni osteoarticulare existente la un exemplar cabalin, printr-o metodă minim invazivă.

Istoricul bolii

Artroza cronicizată în cele 8 luni de tratament clasic instituit după debutul bolii nu a răspuns favorabil medicației pe bază de acid hialuronic, condroitină, glucozamină și boswellină. Nici infiltrațiile cu Diprophos nu au ameliorat simptomatologia, animalul ajungând într-o stare generală precară din cauza apetitului foarte scăzut și a impotenței funcționale parțiale de la nivelul membrelor anterioare și posterioare. Simptomatologia existentă înainte de instituirea terapiei celulare a constat în: inflamația zonelor articulare afectate, șchiopătură de gradul IV (imposibilitatea de a călca), scădere ponderală din cauza apetitului redus, stare generală alterată marcată. În urma analizelor microbiologice efectuate s-a constatat că lichidului sinovial este aseptice, animalul fiind normoterm, fapt care a condus la stabilirea diagnosticului de osteocondroză.

Osteocondroza este epifizita care afectează un cartilaj și uneori osul subcondral, provocată de o necroză localizată. Aceste artroze sunt cauzate de precaritatea circulației sangvine în osul subcondral în timpul puseelor de creștere și sunt agravate de microtraumatismele legate de suprasolicitările zonelor respective. Stresul prelungit la nivelul cartilajului poate afecta zona cartilajului calcificat și osul subcondral ceea ce duce la modificarea grosimii acestor zone cu îngustarea cartilajului, modificări observate în artroză.

Manifestări precoce de genul “pocniturilor” în articulații au apărut și la cazul din prezentul studiu încă din primii ani de viață și au fost amplificate de hiperactivitate, ținând cont că este un cal destinat activităților sportive și de agrement. Inflamația articulară a afectat zona tarso-metatarso-sesamofalangiană, cuprinzând și tendonul flexor al degetului II.

Alegerea variantei transplantului celular autolog a permis evitarea problemelor legate de incompatibilitatea genetică sau a celor legate de imunosupresie, terapia celulară dovedindu-se în prezentul caz deosebit de favorabilă.

Evaluarea tratamentului s-a făcut prin examen clinic, compararea simptomatologiei înainte și după terapia celulară, prin corelație cu efectele comportamentale. Tratamentul a fost administrat în două etape, la interval de 3 săptămâni.

Material și metodă

Recoltarea probelor de țesut adipos cabalin

Materialul biologic a fost recoltat de la o iapă diagnosticată cu osteocondroză manifestă la nivelul membrului posterior drept și a membrului anterior stâng (fig. 80).



Fig. 1. Animal de studiu

Izolarea și expandarea celulelor derivate din țesut adipos

În vederea izolării celulelor derivate din țesut adipos de cal s-a ales metoda digestiei enzimatice urmată de aderarea directă la suprafețe de cultură din plastic, descrisă în detaliu în capitolul „Studiu experimental in vitro – identificarea surselor de celule osteo- și condroprogenitoare la diferite specii. Izolarea și expandarea in vitro a acestora” din prezentul studiu. Celulele derivate din țesutul adipos de cal au fost expandate și pasate în mod repetat în vederea purificării populațiilor de celule stem mezenchimale.

Analiza viabilității celulare și a expresiei markerilor de tip mezenchimal

Analiza în microscopie de fluorescență cu acridin orange/bromură de etidiu

Pentru evaluarea viabilității celulelor obținute din țesutul adipos de cal s-a realizat analiza în microscopie de fluorescență cu acridin orange/bromură de etidiu, după protocolul descris în capitolul „Studiu experimental in vitro – identificarea surselor de celule osteo- și condroprogenitoare la diferite specii. Izolarea și expandarea in vitro a acestora” din prezenta lucrare.

Analiza expresiei vimentinei

Pentru caracterizarea tipurilor celulare obținute în prezentul studiu s-a analizat gradul de exprimare al vimentinei, o proteină prezentă în celulele de origine mezenchimală, identificată calitativ prin metode imunohistochimice.

Administrarea terapiei celulare

La pasajul 3, celulele stem mezenchimale derivate din țesutul adipos de cal, tripsinizate și numărate în hemacitometru cu Tripan Blue și analizate din punct de vedere al viabilității și a expresiei markerilor de tip mezenchimal, au fost repartizate în flacoane sterile, câte 2×10^6 celule vii în 1 ml tampon fosfat salin steril. După efectuarea anesteziei generale, s-a efectuat și anestezia locală cu clorhidrat de procaină, 20 ml, pentru blocajul nervului tibial. S-au injectat 5 doze, din care 4 doze în zona tarso-metatarso-sesamofalangiană și 1 doză în tendonul flexor al degetului II, deci în total în prima etapă s-au administrat 1×10^7 celule stem mezenchimale autologe vii (fig. 81, 82).



Fig. 2. Administrarea suspensiilor celulare la nivelul membrul posterior cabalin



Fig. 3. Administrarea suspensiilor celulare la nivelul membrul anterior cabalin

După 3 săptămâni, s-au injectat din nou 5 doze în aceleași zone anatomice, dar fiecare doză a conținut câte $1,8 \times 10^6$ celule stem mezenchimale autologe vii.

Rezultate

La modelul experimental cabalin, s-a reușit identificarea unei metode simple de recoltare, izolare și expandare in vitro a celulelor derivate din țesutul adipos (fig.83,84). În acest scop a fost folosit un fragment de țesut adipos obținut din regiunea flancului abdominal lateral, care a fost recoltat, procesat și expandat in vitro. Celulele obținute au fost evaluate din punct de vedere al caracteristicilor morfologice și al viabilității. A fost analizată de asemenea, capacitatea de proliferare celulară în condiții de cultură adecvate și expresia markerului de tip mezenchimal, vimentina.



Fig. 4. Celule derivate din țesut adipos de cal, ziua 13 de cultură primară (x100)

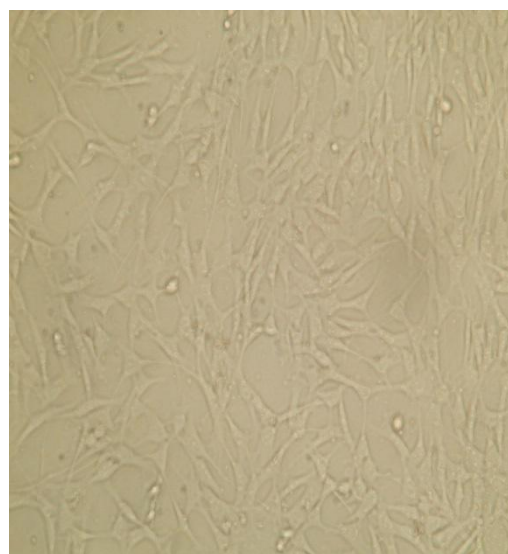


Fig. 5. Celule derivate din țesut adipos de cal, pasaj 1, ziua 7 de cultură (x200)

Evaluarea viabilității celulelor obținute din țesutul adipos de cal s-a realizat prin metoda cu acridin orange/bromură de etidiu, în microscopie de fluorescență. Celulele vii apar în fluorescență verde (cu acridin orange) iar celulele moarte apar în fluorescență oranj (cu bromura de etidiu). Celulele aflate la pasajul 3, ce au fost folosite ulterior la studiul in vivo, au fost viabile în procent de 98% (fig.85), ceea ce a asigurat o bună biodisponibilitate celulară concretizată prin îmbunătățirea substanțială a stării de sănătate și recuperarea funcțională a animalului.

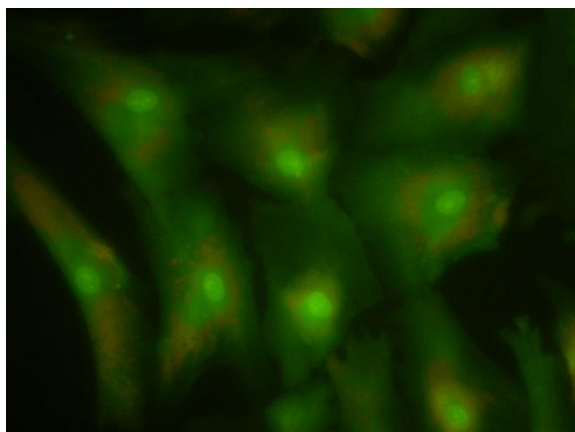


Fig. 6. Celule viabile derivate din țesut adipos de cal, în microscopie de fluorescență cu acridin orange/bromură de etidiu, la 30 de zile de cultivare (x400)

Pentru identificarea calitativă prin metode imunohistochimice a expresiei vimentinei, marker de tip mezenchimal, s-au utilizat anticorpi monoclonali anti-vimentină (Dako). Se remarcă expresia pozitivă a vimentinei în celulele derivate din țesut adipos de cal (fig.86).

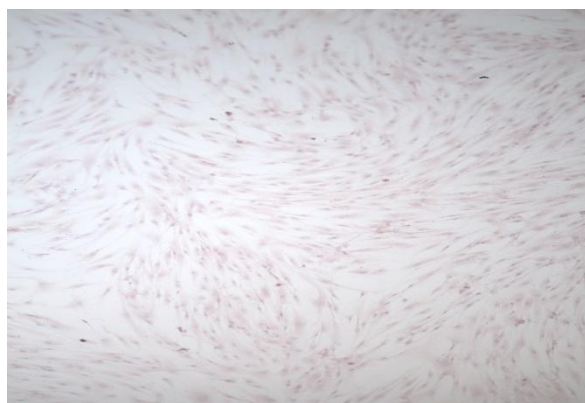


Fig. 7. Reacție imunohistochimică pozitivă pentru vimentină în celule derivate din țesut adipos cabalin (x100)

Evoluția simptomatică și evaluarea efectelor comportamentale

Începând cu ziua următoare primei injectări a celulelor stem mezenchimale autologe, animalul și-a recăpătat apetitul, înregistrându-se chiar o creștere ponderală vizibilă după câteva săptămâni. În primele zile după primul transplant autolog, animalul a început să se sprijine ușor pe membrul posterior afectat, ceea ce înainte de administrarea celulară era incapabil să execute. Totuși, după circa 7-8 zile de la prima injectare s-a observat o ușoară ezitare în sprijinirea pe membrul afectat, care s-a dovedit a fi tranzitorie (timp de 2 zile). Starea generală s-a îmbunătățit evident. Retragerea inflamației nu s-a realizat imediat, ci aproximativ după două săptămâni de la prima administrare.

După 3 săptămâni, cu ocazia celei de-a doua intervenții, mai este vizibilă o ușoară inflamație locală, dar starea generală mult îmbunătățită a calului a rămas constantă, la fel și apetitul. Animalul se poate sprijini pe membrul posterior și pe cel anterior supuse terapiei celulare.

Discuții și concluzii

În prezentul studiu s-a reușit atingerea obiectivului propus privind dezvoltarea de terapii celulare pe bază de celule derivate din țesutul adipos la modelul experimental cabalin, în vederea regenerării structurilor osteoarticulare afectate, având ca finalitate recuperarea funcțională și nu doar înlocuirea structurii lezate, ca alternativă viabilă la tratamentul clasic. Evoluția simptomatică înregistrată în cazul prezentului studiu in vivo poate fi considerată deosebit de favorabilă în comparație cu faptul că întreg tratamentul clasic administrat timp de 8 luni, descris în introducere, nu a înregistrat rezultate satisfăcătoare.

Cartilajul articular suferă procese de degradare ca urmare a agresiunii a numeroși factori: mecanici, metabolici, vasculari, genetici. Agresiunea mecanică poate fi urmarea unui singur traumatism de energie înaltă sau a unor încărcări excesive repetate și prelungite ale articulației. Aceste traume ale cartilajului produc trei tipuri de leziuni: microleziuni ale condrocitelor și matricii fără leziuni vizibile ale suprafeței cartilajului, fracturi condrale cu lezarea pe diferite adâncimi a cartilajului până la zona de cartilaj calcificat și fracturi osteocondrale care se extind până în osul subcondral. Fiecare dintre aceste tipuri de leziuni prezintă o evoluție și un tip de reparare particular. De asemenea, alți factori importanți pentru procesul de reparare a leziunilor cartilajului articular sunt mărimea suprafeței leziunii, locul acesteia, prezența leziunilor “în oglindă”, modificarea axelor mecanice ale membrului și factori generali ca vârsta, greutatea, nivelul de activitate. Creșterea solicitării funcționale a articulației produce un răspuns din partea condrocitelor în sensul creșterii anabolismului care se manifestă prin remodelarea internă și creșterea în volum a țesutului. O suprasolicitare de durată a articulației generează alterări în compoziția matricii cu o eventuală pierdere a integrității structurale și mecanice a acesteia. De asemenea, vârsta aduce alterări în activitatea metabolică a condrocitelor și deci și în compoziția matricii, determinarea unui răspuns inadecvat al țesutului la solicitare, ceea ce crește posibilitatea degenerării cartilajului.

Potențialul plastic al celulelor stem este folosit ca bază de plecare în terapiile cu celule stem nediferențiate într-o serie de afecțiuni. În ceea ce privește caracterizarea celulelor derivate din țesutul adipos de cal se poate concluziona faptul că celulele izolate, expandate și transplantate în prezentul studiu pot fi considerate celule stem mezenchimale pe baza faptului că au aderat la plastic, au prezentat o morfologie asemănătoare fibroblastelor (forma alungită, colonii în vârtej) și capacitate de autoreînnoire, au proliferat in vitro pe termen lung și au exprimat pozitiv vimentina, un marker de tip mezenchimal.

Dovada “funcțională” a faptului că în prezentul studiu celulele derivate din țesutul adipos de cal, expandate și purificate până la pasajul 3, și-au îndeplinit rolul funcțional de celule stem mezenchimale este realizarea în parametrii scontați a procesului de regenerare osteoarticulară in vivo și fără efecte adverse.

Terapia celulară reprezintă o modalitate eficace de reconstrucție osteoarticulară, mai ales dacă ținem cont de faptul că în obținerea autogrefelor osoase există un potențial invaziv și o cantitate limitată de material osos disponibil la nivel individual.

Metoda de tratament aleasă în prezentul studiu a presupus executarea unor manevre minim invazive, nu a necesitat câmp operator deschis și nici condiții speciale pentru intervenție, nu a afectat total starea de conștiență a animalului, ci doar a suprimat parțial starea funcțională fiziologică a acestuia. Aceste avantaje terapeutice corelate cu biodisponibilitatea celulelor autologe s-au concretizat în ameliorarea substanțială a stării de sănătate și recuperarea funcțională a animalului, dovedind importanța utilizării celulelor stem mezenchimale în bioingineria tisulară.

Rezultatele obținute în prezentul studiu prezintă potențial aplicativ semnificativ, contribuind la abordarea unor aspecte terapeutice inovative atât pentru medicina umană, cât și pentru medicina veterinară.

Bibliografie

1. Fridenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental hematology*,(1976), 4:267-274.
2. Thomson JA, Itskoitz-Eldorr J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocyst. *Science*,(1998), 282:1145-1147.
3. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, (1999), 284:143-147.
4. Coelho MJ, Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially, passaged human bone marrow cells cultured in α MEM and DMEM. *Biomaterial*, (2000), 21:1087-94.
5. Richards M, Huibregtse BA, Caplan AI, Goulet JA, Goldstein SA. Marrow-derived progenitor cell injections enhance new bone formation during distraction. *J Orthop Res.*, (1999),17: 900-908.
6. Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci USA*,(1995), 92:4857-4861.
7. Young RG, Butler DI, Weber W, Caplan AI, Gordon SI, Fink DJ. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Ortho Res.*,(1998),16:406-413.
8. Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast. Surg.*, (1994), 21:429-435.
9. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA*,(1999), 96: 10711-10716.
10. Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K, Imaizumi T. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest.*,(2000),105: 1527–1536.
11. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet.*,(2002), 360: 427–435.
12. www.dentistul.net
13. Wekerle T and Sykes M. Mixed chimerism and transplantation tolerance. *Annu. Rev. Med.*,(2001), 52: 353–370.
14. Sykes M. Mixed chimerism and transplant tolerance. *Immunity*, (2001),14: 417–424.
15. Fandrich F, Lin X, Chai GX, Schulze M, Ganten D, Bader M, Holle J, Huang DS, Parwaresch R, Zavazava N, and Binas B. Preimplantation-stage stem cells induce long-term allogeneic graft acceptance without supplementary host conditioning. *Nat. Med.*,(2002), 8: 171–178.
16. <http://stemcells.nih.gov/info/scireport> – “Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions”, Department of Health and Human Services, (2001).
17. Pan G, Thomson JA. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res.*,(2007), 17(1): 42-9. Review
18. Prockop DJ, Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissue, *Science*,(1997), 276:71-74.

19. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum.*, (2005); 52:2521–9.
20. Qu-Petersen Z, Deasy B, Jankowski R, Ikezawa M, Cummins J. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol.*,(2002),157:851-864.
21. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat. Cell Biol.*,(2001), 3:778-784.
22. Yang L, Li S, Hatch H, Ahrens K, Cornelius JG, Petersen BE, Peck AB. In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.*, (2002), 99 (12):8078-8083.
23. Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Muller B, Vallejo M, Thomas MK, Habener JF. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes*, (2001), 50 (3):521-533.
24. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Gehron Robey P, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells in vitro and in vivo. *Tulane*, (2000), 1-12.
25. Liew C G. et al. Human embryonic stem cells: possibilities for human cell transplantation. *Ann. Med.*,(2005), 37: 521-532.
26. Hoffman L M & Carpenter, M. K. Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.*,(2005), 23: 699-708.
27. Reyes M. et al. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*, (2001), 98:2615-2625.
18. Jiang, Y. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, (2002), 418: 41-49.
29. D'Ippolito, G. et al. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J. Cell Sci.*,(2004), 117: 2971-2981.
30. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal Stem Cells. *Biol. Med.*,(2001), 226(6):507-520.
31. Wright NA. Epithelial stem cell repertoire in the gut: clues to the origin of cell lineages, proliferative units and cancer. *Int. J. Exp. Pathol.*,(2000), 81:117-143.
32. Armstrong RJ, Svendsen CN. Neural stem cells: From cell biology to cell replacement. *Cell Transplant* (2000), 9:139-152.
33. Shambhott Mj, Axelman J, Wang S. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (1998), 95:13726-13731.
34. Gronthos S, Franklin DM, LeDy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol.*, (2001), 189:54-63.
35. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M. Comparison of multilineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*, (2003), 174:101
36. Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG, Prockop DJ. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells*, (2002), 20:530–41.

37. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, (2001), 98:7841–5.
38. Nakahara H, Bruder SP, Haynesworth SE, Holecek JJ, Baber MA, Goldberg VM. Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum. *Bone*, (1990), 11:181–8.
39. Hideya Yoshimura, Takeshi Muneta , Akimoto Nimura , Akiko Yokoyama , Hideyuki Koga, Ichiro Sekiya. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res.*, (2007), 327:449–462.
40. Zuk PA, Benhaim P, Hedrick MH. Stem Cell from Adipose Tissue. *Handbook of Stem Cells* (2004),2: 425-443.
41. Majors AK, Boehm CA, Nitto H, Midura RJ, Muschler GF. Characterization of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differentiation. *J Orthop. Res.*,(1997),15:546–557.
42. D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner. Res.* (1999),14:1115–1122.
43. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*, (1998) 279:1528–1530.
44. Reading L, Still K, Bishop N, Scutt A. Peripheral blood as an alternative source of mesenchymal stem cells. *Bone*,(2000),26 (Suppl):9S.
45. Fernandez M, Simon V, Herrera G, Cao C, Del Favero H, Minguell JJ. Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. *Bone Marrow Transplant*,(1997),20:265–271.
46. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br. J. Haematol.*,(2000),109:235–242.
47. Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J. Bone Joint Surg.*(1993), 75:532–553.
48. Beauchamp JR, Morgan JE, Pagel CN, Partridge TA. Dynamics of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source. *J Cell Biol.*, (1999),144:1113–1122.
49. Carnes DL, Maeder CL, Graves DT. Cells with osteoblastic phenotypes can be explanted from human gingiva and periodontal ligament. *J Periodontol*, (1997), 68:701–707.
50. Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells and stromal cells. *J Cell Physiol.*,(1998),176: 57-66.
51. Paunescu V., Deak E.,Herman D.,Siska I.R.,Tanasie G.,Bunu C.,Anghel S.,Tatu C.,Oprea T.,Henschler R. In vitro differentiation of human mesenchymal stem cells to epithelial lineage. *J. Cell. Mol. Med.*,(2007),3(11): 502-508.
52. Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, Caplan AI. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J. Bone Miner Res.*,(1999),14:700-709.
53. Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kappor N, Meyers P. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*,(1980), 56:289-301.

54. Piersma AH, Brockbank KG, Ploemacher RE. Characterization of fibroblastic stromal cells from murine bone marrow. *Exp. Hematol.*, (1985), 13: 237-243.
55. Prockop DJ, Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissue, *Science*, (1997), 276:71-74.
56. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol.*, (1999), 181: 67-73.
57. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* (1992), 13:69-80.
58. Bruder SP, Horowitz MC, Mosca JD, Haynesworth SE. Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone*, (1997), 21:225-235.
59. Galmiche MC, Koteliansky VE, Briere J, Herve P, Charbord P. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood*, (1993), 82:66-76.
60. Gronthos S, Simmons PJ. The growth factor requirements of STRO-1- positive human marrow stromal precursors under-deprived conditions in vitro. *Blood*, (1995), 85:929-940.
61. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA*, (2000), 97:3213-3218.
62. DiGirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: A simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol.*, (1999), 107: 275-281.
63. Phinney DG, Kopen G, Righter W, Webster S, Tremain N, Prockop DJ. Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J Cell Biochem.*, (1999), 75: 424-436.
64. Koc ON, Peters C, Aubourg P, Raghavan S. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells remain host-derived despite successful hematopoietic engraftment after allogeneic transplantation in patients with lysosomal and peroxisomal storage diseases. *Exp. Hematol.*, (1999), 27: 1675-1681.
65. Galotto M, Berisso G, Delfino L, Podesta M, Ottaggio L, Dallorso S. Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients. *Exp. Hematol.*, (1999), 27: 1460-1466.
66. Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, Stro-1. *Blood* (1991), 78:55-62.
67. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: Effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol.* (1996), 166:585-592.
68. Bruder SP, Ricalton NS, Boynton RE, Connolly TJ. Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. *J Bone Miner Res.*, (1998), 13: 655-663.
69. Satomura K, Derubeis AR, Fedarko NS, Ibaraki O'Connor K. Receptor tyrosine kinase expression in human bone marrow stromal cells. *J Cell Physiol.* (1998), 177:426-438.
70. Chichester CO, Fernandez M, Minguell JJ. Extracellular matrix gene expression by human bone marrow stroma and by marrow fibroblast. *Cell Adhes. Commun.* (1993), 1:93-99.
71. Klein G. The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. *Experientia*, (1995), 51:914-926.

72. Reese JS, Koe ON, Gerson SL. Human mesenchymal stem cells provide stromal support for efficient CD34+ transduction. *J. Hematother Stem Cell Res.* (1999),8:515-523.
73. Minguell JJ. Is hyaluronic acid the “organizer” of the extracellular matrix in marrow stroma? *Exp. Hematol.* (1993),21: 7-8.
74. Yamazaki M, Nakajima F, Ogasawara A, Moriya H. Spatial and temporal distribution of CD44 and osteopontin in fracture callus. *J Bone Joint Surg. Br.* (1999),81:508-515.
75. Herzog EL, Chai Li, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*,(2003),(102)10:3483-3493.
76. Jiang Y, Vaessen B, Linvik T, Blackstad M, reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle and brain. *Exp Hematol*, (2002),30:896-904.
77. Muraglia A., Cancedda R., Quarto R., Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model, *J. Cell Sci.*, (2000),113:1161-1166.
78. Liechty, K.W., MacKenzie, T.C., Shaaban, A.F., Radu, A., Moseley, A.B., Deans, R., Marshak, D.R., and Flake, A.W. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat. Med.*,(2000), 6:1282–1286.
79. Yuehua Jiang, Balkrishna N. Jahagirdar, R. Lee Reinhard, Robert E. Schwartz, C. Dirk Keenek, Xilma R. Ortiz-Gonzalez, Morayma Reyes, Todd Lenvik, Troy Lund, Mark Blackstad, Jingbo Du, Sara Aldrich, Aaron Lisberg, Walter C. Lowk, David A. Largaespada, Catherine M. Verfaillie, Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow, *Nature* ,(2002),418: 41-49.
80. Toma C., Mark F. Pittenger, Kevin S. Cahill, Barry J. Byrne, Paul D. Kessler. Human Mesenchymal Stem Cells Differentiate to a Cardiomyocyte Phenotype in the Adult Murine Heart Circulation., (2002),105:93-98.
81. Sanchez-Ramos, J., Song, S., Cardozo-Pelaez, F., Hazzi, C., Stedeford, T., Willing, A., Freeman, T.B., Saporta, S., Janssen, W., Patel, N., Cooper, D.R., and Sanberg, P.R. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp. Neurol.*,(2000),164: 247–256.
82. Wakitani, S., Saito, T., and Caplan, A.I. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine 754. *Muscle. Nerve.* (1995),18: 1417–1426.
83. Makino, S., Fukuda, K., Miyoshi, S., Konishi, F., Kodama, H., Pan, J., Sano, M., Takahashi, T., Hori, S., Abe, H., Hata, J., Umezawa, A., and Ogawa, S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J. Clin. Invest.*,(1999)103, 697–705.
84. Woodbury, D., Schwarz, E.J., Prockop, D.J., and Black, I.B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.*, (2000),61, 364–370.
85. Baksh D, L. Song R S. Tuan. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy, *J. Cell. Mol. Med.*,(2004), 8:(3) 301-316.
86. Bianchi G, Banfi A, Mastrogiacomo M, Notaro R, Luzzatto L, Cancedda R, Quarto R. Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2, *Exp. Cell Res.*,(2003),287: 98-105.
87. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications, *Stem Cells*, (2001)19: 180-192.

88. Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, Lazarus HM. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy, *J Clin. Oncol.*,(2000),18: 307-316.
89. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,(2002)99: 8932-8937.
90. Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, Oudina K, Sedel L, Guillemain G. Tissue-engineered bone regeneration, *Nat. Biotechnol.*,(2000),8: 959-963.
91. Noth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells, *J. Orthop. Res.*,(2002), 20: 1060-1069.
92. Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering, *Arthritis Res. Ther.*,(2003),5: 32-45.
93. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation, *J. Cell Biochem.*, (1997),64:278-294.
94. Doi M, Nagano A, Nakamura Y, Molecular cloning and characterization of a novel gene, EMILIN-5, and its possible involvement in skeletal development, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,(2004),313:888-893.
95. Song L, Webb NE, Song Y, Tuan RS. Identification and Functional Analysis of Candidate Genes Regulating Mesenchymal Stem Cell Self-Renewal and Multipotency. *Stem cells*, (2006), 24:1707-1718.
96. Roelen BA, Dijke P. Controlling mesenchymal stem cell differentiation by TGF beta family members, *J. Orthop. Sci.*,(2003),8: 740-748.
97. Song L, Tuan RS. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, *FASEB J*,(2004),18: 980-982.
98. Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, Pollak C, Bourguignon M, Oudina K, Sedel L, Guillemain G. Tissue-engineered bone regeneration, *Nature Biotechnology* (2000), 18: 959-963.
99. Gori F, Thomas T, Hicok KC, Spelsberger TC, Riggs B. Differentiation of human marrow stromal precursor cells: bone morphogenetic protein-2 increases OSF2/CBFAL enhances osteoblast commitment and inhibits late adipocyte maturation. *J. Bone Miner Res.*,(1999),14: 1522-1535.
100. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, OSF2/CBFAL A transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*,(1997),89: 743-754.
101. Stein GS, Lian JB. Molecular mechanism mediating proliferation/ differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev.*,(1993),14:424-442.
102. Ailhaud G. Extracellular factors, signalling pathways and differentiation of adipose precursor cells. *Curr Opin Cell Biol.*,(1990), 2:1043-1049.
103. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* (1994), 79:1147-1156.
104. Liu F, Malaval L, Aubin JE. Global amplification PCR reveals novel transitional stages in osteoprogenitor cells undergoing differentiation in vitro., *J. Cell Sci.*,(2003), nr.116.

105. Fedarko NS, Bianco P, Vetter U, Gehron R.P. Human bone cell enzyme expression and cellular heterogeneity: correlation of alkaline phosphatase enzyme activity with cell cycle., *J.Cell Physiol.*,(1990),nr.144.
106. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamagushi A, Sasaki K, Degushi K, Shimizu Y, Bronson R.T, Gao Y.H, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. Targeted disruption of *Cbfa1* results in complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts., *Cell* (1997), nr.89.
107. Lim SM, Choi YS, Shin HC, Lee CW, Kim DI. Isolation of human periosteum-derived progenitor cells using immunophenotypes for chondrogenesis. *Biotechnol Lett.*, (2005), 27:607–611.
108. Chen FH, Tuan RS. Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. *Arthritis Research & Therapy*, (2008), 10:223.
109. Wolfe M, Pochampally R, Swaney W, Reger RL. Isolation and Culture of Bone Marrow-Derived Human Multipotent Stromal Cells. *Mesenchymal Stem Cells – Methods and Protocols*, Humana Press, (2008), 1:3-7.
110. Breitbart AS, Grande DA, Kessler R, Ryaby JT, Fitzsimmons RJ, Grant RT. Tissue engineered bone repair of calvarial defects using cultured periosteal cells. *Plast. Reconstr. Surg.*, (1998), 101:567-76.
111. Solchaga LA, Cassie`de P, Caplan AI. Different response to osteo-inductive agents in bone-marrow and periosteum-derived cell preparations. *Acta Orthop. Scand.*, (1998), 69(4): 426-32.
112. Iwasaki M, Nakahara H, Nakata K, Nakase T, Kimura T, Ono K. Regulation of proliferation and osteochondrogenic differentiation of periosteum-derived cells by transforming growth factor- β and basic fibroblast growth factor. *J. Bone Joint Surg.*,(1995), 77-A(4): 543-54.
113. Perka C, Schultz O, Spitzer R, Lindenhayn K, Burmester G, Sittinger M. Segmental bone repair by tissue engineered periosteal cell transplants with bioresorbable fleece and fibrin scaffolds in rabbits. *Biomaterials*, (2000), 21: 1145-53.
114. Arnold U, Lindenhayn K and Perka C. In vitro-cultivation of human periosteum derived cells in bioresorbable polymer-TCP-composites. *Biomaterials*, (2002), 23: 2303-10.
115. Majumdar MK, Banks V, Peluso DP, Morris EA. Isolation, characterization, and chondrogenic potential of human bone marrow-derived multipotential stromal cells. *J. Cell. Physiol.*, (2000), 185: 98-106.
116. Fickert S, Fiedler J, Brenner RE. Identification, quantification and isolation of mesenchymal progenitor cells from osteoarthritic synovium by fluorescence automated cell sorting. *Osteoarthr. Cartil.*, (2003), 11: 790-800.
117. Gang EJ, Hong SH, Jeong JA, Hwang SH, Kim SW, Yang IH, Ahn C, Han H, Kim H. In vitro mesengenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,(2004), 321:102-107
118. Nakahara H, Bruder SP, Goldberg VM, Caplan AI. In vivo osteochondrogenic potential of cultured cells derived from the periosteum. *Clin Orthop.*, (1990), 259:223–32.
119. De Bari C, Dell’Accio F, Luyten FP. Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. *Arthritis Rheum.*, (2001), 44:85–95.
120. Izumi T, Scully SP, Heydemann A, Bolander ME. Transforming growth factor β 1 stimulates type II collagen expression in cultured periosteum-derived cells. *J. Bone Miner. Res.*,(1992), 7(1): 115–121.

121. Hanada K, Solchaga LA, Caplan AI, Hering TM, Goldberg VM, Yoo JU, Johnstone B. BMP-2 induction and TGF-beta1 modulation of rat periosteal cell chondrogenesis. *J. Cell Biochem.*,(2001), 81: 284–294.
122. Ito Y, Fitzsimmons JS, Sanyal A, Mello MA, Mukherjee N, O_Driscoll SW Localization of chondrocyte precursors in periosteum. *Osteoarthr. Cartil.*,(2001), 9: 215-223.
123. Agata H, Asahina I, Yamazaki Y, Uchida M, Shinohara Y. Effective Bone Engineering with Periosteum-derived Cells. *J. Dent. Res.*, (2007), 86 (1):79-83.
124. Tanahashi, M, Kamiya, K, Suzuki, T, Nasu H. Fibrous hydroxyapatite grown in the gel system: effects of pH of the solution on the growth rate and morphology. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, (1992), 3 (1), 48–53.

14. FINANȚAREA CERCETĂRII

✍️ Laura-Cristina Rusu, Oana Lobont

Cercetarea științifică este o formă complexă de investigare a realității printr-un proces amplu de căutare sistematică în vederea identificării de noi elemente ale cunoașterii prin revelații semnificative care să asigure suport pentru dezvoltarea tehnologică care să impacteze bunăstarea economică-socială pe termen lung. Tocmai de aceea cercetarea științifică trebuie să fie o inițiativă națională prioritară și finanțată într-o măsură semnificativă din fonduri publice (guvernamentale).

14.1. Cadrul general de reglementare și organizare a activității de cercetare-dezvoltare și inovare

În România, Guvernul (Legea nr. 324/2003) promovează, susține, dezvoltă și stimulează activitatea de cercetare-dezvoltare ca prioritate națională cu rol determinant în strategia de dezvoltare economică durabilă, considerând în egală măsură cercetarea fundamentală, cercetarea aplicativă, dezvoltarea tehnologică și inovarea. În acest scop, la nivel național, autoritățile publice guvernamentale adoptă politici de stimulare și coordonare a activității de cercetare-dezvoltare și inovare, asigură surse de finanțare și instituie structuri organizatorice corespunzătoare pentru administrarea fondurilor respective, elaborează politici și emit reglementări pentru crearea în economie a unui mediu favorabil, pentru protecția patrimoniului științific național, pentru difuzarea, absorbția și valorificarea rezultatelor activității de cercetare-dezvoltare. (OG 57/2002).

Sistemul național de cercetare-dezvoltare (CDI) este constituit din ansamblul unităților și instituțiilor de drept public și de drept privat cu personalitate juridică, care au în obiectul de activitate cercetarea-dezvoltare, structurat în:

- sistemul de cercetare-dezvoltare de interes național;
- unități și instituții de drept public
- unități și instituții de drept privat

Tabel 1. Structura Sistemului național de cercetare-dezvoltare

Sistemul național de cercetare-dezvoltare	
1. Unități și instituții de drept public	2. Unități și instituții de drept privat
a) institute naționale de cercetare-dezvoltare;	a) instituții de învățământ superior particulare acreditate sau structuri de cercetare-dezvoltare ale acestora, fără personalitate juridică, constituite conform Cartei universitare;
b) instituții de învățământ superior de stat acreditate sau structuri de cercetare-dezvoltare ale acestora, fără personalitate juridică, constituite conform Cartei universitare;	b) institute sau centre de cercetare-dezvoltare fără scop patrimonial, recunoscute de utilitate publică;
c) institute, centre sau stațiuni de cercetare-dezvoltare din subordinea Academiei Române sau a academiilor de ramură;	c) alte institute, centre sau stațiuni de cercetare-dezvoltare organizate ca persoane juridice de drept privat, fără scop patrimonial;

Sistemul național de cercetare-dezvoltare	
1. Unități și instituții de drept public	2. Unități și instituții de drept privat
d) alte institute, centre sau stațiuni de cercetare - dezvoltare organizate ca instituții publice ori de drept public;	d) alte organizații neguvernamentale, fără scop patrimonial, care au ca obiect de activitate și cercetarea-dezvoltarea sau structuri ale acestora legal constituite;
e) centre internaționale de cercetare-dezvoltare înființate în baza unor acorduri internaționale;	
f) institute sau centre de cercetare-dezvoltare organizate în cadrul societăților naționale, companiilor naționale și regiilor autonome;	e) societăți comerciale care au ca principal obiect de activitate cercetarea-dezvoltarea;
g) alte instituții publice sau de drept public care au ca obiect de activitate și cercetarea-dezvoltarea ori structuri ale acestora legal constituite.	f) societăți comerciale care au în obiectul de activitate și cercetarea-dezvoltarea sau structuri ale acestora legal constituite.

Sursa: Ordonanța Guvernului nr. 57/2002 privind cercetarea științifică și dezvoltarea tehnologică, art. 7 și art. 8 (modificată și actualizată prin Ordonanța nr. 6/2011 publicată în Monitorul Oficial, Partea I nr. 80 din 31/01/2011)

Unitățile de cercetare-dezvoltare din sistemul național de cercetare-dezvoltare sunt fie unități cu personalitate juridică, fie structuri de cercetare-dezvoltare fără personalitate juridică care sunt constituite în cadrul unei persoane juridice, a căror activitate de cercetare-dezvoltare poate fi desfășurată și în cadrul unor forme asociative sau individuale, în regim economic, de către persoane fizice autorizate, conform prevederilor legale.

Potrivit OG nr. 6/2011 (art 16), unitățile și instituțiile de cercetare-dezvoltare care beneficiază de finanțare și din fonduri publice sunt obligate să asigure:

- a) dezvoltarea bazei tehnico-științifice, actualizarea documentației științifice de interes național, precum și utilizarea acestora cu prioritate pentru activitatea de cercetare-dezvoltare;
- b) urmărirea realizării transferului tehnologic;
- c) adoptarea unor structuri organizatorice și a unui management performante, urmând cele mai bune practici utilizate pe plan mondial;
- d) eliminarea posibilităților de generare a unor acte de concurență nelocală;
- e) condiții optime de activitate și de dezvoltare profesională pentru personalul de cercetare, cu respectarea prevederilor legale;
- f) sprijin administrativ pentru personalul de cercetare-dezvoltare, astfel încât să permită acestuia focalizarea pe activitățile științifice, iar timpul alocat pentru activități administrative de către personalul de cercetare-dezvoltare care nu ocupă funcții de conducere sau administrative să nu depășească, în medie, 10% din timpul de lucru al acestuia.

Activitatea de cercetare-dezvoltare reprezintă un criteriu de evaluare și clasificare pe o perioadă de cel mult 5 ani și pe nivelurile A+, A, A- a unităților și instituțiilor din sistemul național de cercetare-dezvoltare, în atribuțiile Colegiul Consultativ pentru Cercetare-Dezvoltare și Inovare. Normele metodologice pentru evaluarea și clasificarea unităților și instituțiilor din sistemul național de cercetare-dezvoltare se elaborează de către autoritatea de stat pentru cercetare-dezvoltare, cu consultarea Colegiului consultativ, a Academiei Române și a academiilor de ramură, a Consiliului Național al Cercetării Științifice din Învățământul Superior, a altor consilii consultative de nivel național din domeniul cercetării-dezvoltării, a organizațiilor profesionale neguvernamentale din domeniul cercetării-dezvoltării și a mediului economic, și se aprobă prin hotărâre a Guvernului.

Potrivit Ministerul Educației și Cercetării Științifice (2013), sistemul de cercetare, dezvoltare tehnologică și inovare din România este constituit din 263 organizații de cercetare, dezvoltare tehnologică și inovare publice și circa 600 de întreprinderi. Dintre organizațiile publice, 56 sunt universități publice autorizate, 46 sunt institute CD naționale (majoritatea coordonate de Ministerul Educației și Cercetării Științifice), iar 65 sunt instituții de cercetare și centre ale Academiei Române. Rețeaua Națională pentru Inovare și Transfer Tehnologic (ReNITT) cuprinde 50 organizații specifice: centre de transfer tehnologic, centre de informații tehnologice, incubatoare de tehnologie și afaceri, 4 parcuri de știință și tehnologie.

Este important de reținut că, începând cu anul 2013, Ministerul Educației și Cercetării Științifice (MECS) a fost reorganizat, prin hotărâre de guvern, devenind autoritate de stat pentru cercetare științifică, dezvoltare tehnologică și inovare, cu toate responsabilitățile, funcțiile și atribuțiile ce decurg din aceasta. Acesta colaborează cu ministerele responsabile pentru activități CD&I specifice sectoarele lor de activitate, precum Ministerul Economiei, Ministerul Agriculturii, Ministerul Comunicării și Societății Informaționale, Ministerul Mediului și Ministerul Sănătății.

Pentru probleme de politici CDI specifice învățământului superior, MECS beneficiază de consultanță din partea:

- Consiliilor consultative proprii de la nivel național: Colegiul Consultativ pentru Cercetare-Dezvoltare și Inovare (CCCDI), principalul organism consultativ de specialitate, Consiliul Național de Statistică și Prognoză a Învățământului Superior (CNSPIS), Consiliul Național de Atestare a Titlurilor, Diplomelor și Certificatelor Universitare (CNATDCU), Consiliul Național al Cercetării Științifice (CNCS), Consiliul Național pentru Finanțarea Învățământului Superior (CNFIS), Consiliul Național al Bibliotecilor Universitare (CNBU), Consiliul de Etică și Management Universitar (CEMU) și Consiliul Național de Etică a Cercetării Științifice, Dezvoltării Tehnologice și Inovării (CNECSDTI);
- Consiliilor consultative partenere de la nivel național: Consiliul Național al Rectorilor (CNR).

Ministerul Educației și Cercetării Științifice, în calitate de autoritate de stat pentru cercetare-dezvoltare, prin *Autoritatea Națională pentru Cercetare Științifică și Inovare* (ANCSI), are rol de sinteză și coordonare în aplicarea Strategiei și Programului de guvernare în domeniul cercetării științifice, dezvoltării tehnologice și inovării. În mod concret, potrivit HG nr. 26 (2015, art 2) Ministerul Educației și Cercetării Științifice organizează și conduce sistemul național de educație, învățământ, cercetare științifică, dezvoltare tehnologică și inovare, exercitându-și atribuțiile stabilite prin legi și prin alte acte normative din sfera sa de activitate, și realizează, după caz, împreună cu ministerele de resort politica guvernamentală în domeniile sale de activitate. Trebuie reținut faptul că, Ministerul Educației și Cercetării Științifice (HG nr. 26/2015, art 8) poate constitui și alte structuri organizatorice necesare în vederea realizării reformei învățământului și cercetării, în conformitate cu Programul de guvernare, cu obligațiile asumate prin acorduri cu organisme internaționale și prin programele europene.

În conformitate cu HG 929 (2014), s-a înființat un organism consultativ al Guvernului, și anume Consiliul Național pentru Politica Științei, Tehnologiei și Inovării (CNPSTI), în coordonarea prim-ministrului, în temeiul OG nr. 57/2002 (art. 40) privind cercetarea științifică și dezvoltarea tehnologică, aprobată cu modificări și completări prin Legea nr. 324/2003, cu modificările și completările ulterioare.

Alte instituții implicate în coordonarea activităților de cercetare, dezvoltare tehnologică și inovare sunt *Academia Română*, care este forumul științific național suprem, de consacrare științifică, cu rol major în științele socio-economice și umaniste, *Academia de Științe Agricole și Silvicultură (ASAS)*, *Academia de Științe Medicale (ASM)* și *Academia de Științe Militare*, care asigură coordonarea științifică a activităților de cercetare din unitățile de profil. La acestea se adaugă autorități și instituții cu rol de coordonare științifică în domenii de interes strategic, ca, de exemplu, cele din domeniul nuclear (*Institutul de Fizică Atomică*), al securității naționale și spațiului (*Agenția Spațială Română*).

Remarcăm astfel că, în acest moment, în România, producția științifică este împărțită între universități (într-un procent de peste 50%), instituții naționale de cercetare-dezvoltare și *Academia Română*.

Tabel 2. Cadrul instituțional, coordonarea națională și planificarea politicilor publice pentru CDI

Instituția	Cadrul de manifestare în domeniul cercetării științifice, dezvoltării tehnologice și inovării
Ministerul Educației și Cercetării Științifice (Ministerul Educației Naționale - MEN)	Rol
	Responsabilități
	<ul style="list-style-type: none"> - este autoritatea de stat pentru cercetare științifică, dezvoltare tehnologică și inovare - definește obiectivele strategice specifice domeniului; - definește, aplică, monitorizează și evaluează politicile necesare în vederea realizării acestor obiective; - asigurarea coerenței politicilor guvernamentale din domeniu și armonizarea acestora cu politicile de dezvoltare sectoriale și, respectiv, cu cele de dezvoltare regională;
	Atribuții
Consiliul Național pentru Politica Științei, Tehnologiei și Inovării (CNPSTI)	Rol
	<ul style="list-style-type: none"> - organism consultativ al Guvernului, în coordonarea prim-ministrului; - coordonează și corelează politicile din domeniul cercetării-dezvoltării și inovării cu cele de dezvoltare la nivel sectorial și, respectiv, regional, în cadrul unui sistem național de inovare
	Atribuții și Responsabilități
	<ul style="list-style-type: none"> - evaluează implementarea strategiei naționale CDI prin politicile specifice domeniului și elaborează pe această bază un raport anual, care cuprinde concluzii și recomandări privind orientarea strategică și evoluția pe termen mediu și scurt a sistemului național CDI

Tabel 3. Cadrul instituțional cu rol consultativ privind sprijinirea MEN în procesul de planificare, monitorizare și evaluare a implementării activității CDI

Instituția	Cadrul de manifestare în domeniul cercetării științifice, dezvoltării tehnologice și inovării
Academia Română (AR)	Rol
	- forul suprem de consacrare științifică, ce coordonează rețeaua proprie de institute și centre de cercetare
	<p style="text-align: center;">Atribuții și Responsabilități</p> <p>- stabilesc proiectele de cercetare, organizează și îndrumă cercetarea științifică din profilul său; au autonomie în ceea ce privește lucrările lor de specialitate;</p> <p>- propun înființarea de unități de cercetare, comitete naționale, comisii de specialitate și colective de lucru ale Academiei Române în profilul de specialitate și le coordonează activitatea;</p> <p>- coordonează activitatea unităților de cercetare ale Academiei Române din profilul secției, îndrumă, supraveghează și controlează activitatea fiecărei unități de cercetare din subordine, adoptând măsurile de rigoare pentru buna funcționare a acestor unități și urmăresc modul în care se realizează programele lor de cercetare, precum și viața științifică internă a institutelor;</p>
Colegiul Consultativ pentru Cercetare-Dezvoltare și Inovare (CCCDI)	Rol
	- principalul organism consultativ de specialitate al MEN
	<p style="text-align: center;">Atribuții și Responsabilități</p> <p>Formulează recomandări și propuneri privind stabilirea direcțiilor și obiectivelor strategice, precum și elaborarea, finanțarea și implementarea politicilor la nivel național privind:</p> <ul style="list-style-type: none"> - cercetarea aplicativă, dezvoltarea experimentală, transferul tehnologic și inovarea; - evaluarea performanțelor organizațiilor de cercetare cu activitate preponderentă în aceste domenii; - cooperarea științifică internațională; - structura, obiectivele și implementarea programelor și instrumentelor relevante pentru aceste domenii în cadrul planului național CDI; - stabilirea de criterii și proceduri de alcătuire și actualizare a bazelor de date integrate, specializate pe domenii de cercetare, privind proiectele derulate și rezultatele de cercetare obținute în cadrul programelor din planul național CDI.
Consiliul Național al Cercetării Științifice (CNCS)	Rol
	<p>- este un organism consultativ de nivel național, fără personalitate juridică, care asistă Ministerul Educației și Cercetării Științifice (MEN), precum și Autoritatea Națională pentru Cercetare Științifică (ANCS) în coordonarea, finanțarea, monitorizarea și evaluarea activităților de cercetare științifică din România.</p> <p style="text-align: center;">Atribuții și Responsabilități</p>

Instituția	Cadrul de manifestare în domeniul cercetării științifice, dezvoltării tehnologice și inovării
	<p>Formulează recomandări și propuneri privind stabilirea direcțiilor și obiectivelor strategice, precum și elaborarea, finanțarea și implementarea politicilor la nivel național privind:</p> <ul style="list-style-type: none"> - cercetarea fundamentală și de frontieră; - evaluarea performanțelor universităților și ale institutelor a căror activitate de cercetare se înscrie preponderent în aceste domenii; - dezvoltarea resurselor umane pentru cercetare; - structura, obiectivele și implementarea programelor și instrumentelor relevante pentru aceste domenii în cadrul planului național CDI; - stabilirea de criterii și proceduri de alcătuire și actualizare a bazei de date privind cercetătorii și corpul de evaluatori din România.
<p>Consiliul Național de Statistică și Prognoză a Învățământului Superior și CDI (CNSPIS-CDI)</p>	<p>Rol</p>
	<p>- este un organism consultativ la nivel național, care își desfășoară activitatea în conformitate cu prevederile Legii educației naționale nr. 1/2011</p>
	<p>Atribuții și Responsabilități</p>
<p>- formulează recomandări și propuneri privind stabilirea și actualizarea procedurilor și indicatorilor de monitorizare și evaluare a implementării Strategiei Naționale pentru Cercetare, Dezvoltare și Inovare 2014- 2020 (SNCDI 2020) și a Planului național de cercetare-dezvoltare și inovare pentru perioada 2015-2020 (PNCDI III);</p> <p>- elaborează și actualizează permanent indicatorii de monitorizare a învățământului superior și realizează prognoza evoluției acestora în raport cu dinamica pieței muncii.</p>	
<p>Unitatea Executivă pentru Finanțarea Învățământului Superior, a Cercetării, Dezvoltării și Inovării</p>	<p>Rol</p>
	<p>- este o instituție publică cu personalitate juridică, aflată în subordinea Ministerului Educației și Cercetării Științifice (MEN), iar funcțional, consiliilor consultative ale MEN cu atribuții în domeniul învățământului superior, cercetării științifice, dezvoltării și inovării.</p>
	<p>Atribuții și Responsabilități</p>
<p>- asigură activitatea executivă a Consiliului Național de Statistică și Prognoză a Învățământului Superior, Consiliului Național al Cercetării Științifice, Consiliului Național pentru Finanțarea Învățământului Superior, Consiliului Național al Bibliotecilor Universitare, Consiliului de Etică și Management Universitar, inclusiv activitățile de alocare a resurselor financiare de la bugetul de stat și din alte venituri, precum și desfășurarea altor activități privind implementarea în sistem descentralizat a politicilor și programelor MEN privind învățământul superior, cercetarea, dezvoltarea și inovarea;</p> <p>- realizează și implementează proiecte de dezvoltare instituțională și de sistem, referitoare la învățământul superior, cercetare, dezvoltare și inovare, cu finanțare națională și internațională, cu avizul MECS;</p> <p>- oferă consultanță și asistență tehnică pentru elaborarea și conducerea de proiecte la programele interne și internaționale de cercetare științifică, dezvoltare tehnologică și stimulare a inovării.</p>	

Tabel 4. Cadrul instituțional cu rol operativ în procesul de planificare, monitorizare și evaluare a implementării activității CDI

Instituția	Cadrul de manifestare în domeniul cercetării științifice, dezvoltării tehnologice și inovării
<p>Direcția generală programe CDI (DGP-CDI) din cadrul MEN - Unitatea de politici CDI (UP-CDI) în cadrul Direcției generale programe CDI</p>	<ul style="list-style-type: none"> - analizează și evaluează evoluția sistemului național CDI în ansamblu, în corelare cu sistemul de indicatori utilizat la nivel european și internațional; - susține procesele de fundamentare, elaborare și implementare a politicilor CDI; - monitorizează și evaluează implementarea Strategiei și PNCDI III; - analizează și prelucrează statistic datele colectate, pentru a determina valorile anuale realizate, precum și valorile prognozate, pentru indicatorii analitici referitori la evaluarea sistemului național, a politicilor și a programelor naționale CDI, stabiliți de MEN, la propunerea CNSPIS-CDI

Organisme europene din domeniul cercetării și inovării:

- Centrul Comun de Cercetare (CCC) - este un serviciu al Comisiei care oferă suport tehnic și științific independent, bazat pe date sigure, pentru dezvoltarea politicilor UE;
- Consiliul European pentru Cercetare (CEC) - sprijină în special proiectele de cercetare ambițioase și creative;
- Agenția Executivă pentru Cercetare (AEC) - gestionează aproape jumătate din granturile pentru cercetare acordate de UE;
- Agenția Executivă pentru Întreprinderi Mici și Mijlocii (EASME) - gestionează mai multe programe ale UE menite să sprijine întreprinderile;
- Agenția Executivă pentru Inovare și Rețele (INEA) - gestionează implementarea rețelelor transeuropene de transport;
- Institutul European de Inovare și Tehnologie (EIT) - stabilește parteneriate între instituții de învățământ superior și organisme din domeniul cercetării/inovării, cunoscute sub numele de „comunități ale cunoașterii și inovării”.

Un atribut important al politicii de cercetare îl reprezintă menținerea și dezvoltarea potențialului uman de cercetare-dezvoltare și a bazei de cunoștințe în domeniu corelate cu bunele practici pentru activitățile de cercetare-dezvoltare din țările Uniunii Europene și ale Organizației pentru cooperare și dezvoltare economică. În acest sens, în OG nr. 6/2011 (art 30) găsim reglementată activitatea Autorității de stat pentru cercetare-dezvoltare în vederea creșterii potențialului național de cercetare în colaborare cu Academia Română și academiile de ramură, instituțiile de învățământ superior, institutele naționale și instituțiile publice din sistemul național de cercetare-dezvoltare prin elaborarea și aplicarea unor programe privind formarea și dezvoltarea resurselor umane utilizate în cercetare, sintetizate în Strategia resurselor umane din activitatea de cercetare-dezvoltare, parte componentă a Strategiei naționale.

Asigurarea consistenței și continuității activității de cercetare științifică presupune un *cadru legislativ adecvat*, o abordare strategică națională care să reducă decalajul dintre prioritățile instituțiilor științifice și nevoile societății. România se confruntă încă cu instabilitate legislativă, tergiversări, consultări publice cu ecouri reduse și provocări societale majore.

Tabel 5. Sinteza privind cadrul legislativ specific activității de cercetare, dezvoltare tehnologică și inovare din România

Anul adoptării	Act normativ
1999	Ordonanța nr. 62 din 24 august 1999 privind înființarea Unității Executive pentru Finanțarea Învățământului Superior și a Cercetării Științifice Universitare
2002	Ordonanța nr. 57 din 16 august 2002 privind cercetarea științifică și dezvoltarea tehnologică actualizată martie 2013
2002	Ordonanța de Urgență nr. 194 din 12 decembrie 2002 privind regimul străinilor în România cu modificările și completările ulterioare
2004	Hotărâre nr. 1265 din 13 august 2004 pentru aprobarea Normelor metodologice privind contractarea, finanțarea, monitorizarea și evaluarea programelor, proiectelor de cercetare-dezvoltare și inovare
2007	Hotărâre nr. 551 din 6 iunie 2007 pentru aprobarea Criteriilor și standardelor, precum și a Metodologiei de evaluare și atestare a capacității de a desfășura activități de cercetare-dezvoltare
2007	Hotărâre nr. 475 din 23 mai 2007 privind aprobarea Planului național de cercetare-dezvoltare și inovare II, pentru perioada 2007-30 iunie 2014, acutalizat 13 iulie 2015
2007	Precizări privind regimul taxei pe valoarea adăugată aplicabil activității de cercetare – dezvoltare” emisă de Ministerul Finanțelor Publice
2007	Decizie privind aprobarea schemei de ajutor de stat Finanțarea proiectelor CD&I conform Planului Național de Cercetare, Dezvoltare și Inovare 2
2007	Ordin nr. 2414/2007 pentru aprobarea Normelor metodologice privind procedura de avizare a acordului de primire pentru cercetătorii din țări terțe în scopul desfășurării în România de activități de cercetare-dezvoltare
2010	Ordin nr. 2086/4504 din 6 august 2010 pentru aprobarea Normelor privind deducerile pentru cheltuielile de cercetare-dezvoltare la determinarea profitului impozabil
2010	Ordonanța de Urgență nr.74 din 30 iunie 2010 pentru modificarea unor acte normative din domeniul educației și cercetării
2011	Hotărâre nr.133 din 16 februarie 2011 privind modificarea și completarea unor acte normative referitoare la Planul național de cercetare-dezvoltare și inovare
2011	Hotărâre nr.134 din 16 februarie 2011 pentru aprobarea Normelor metodologice privind stabilirea categoriilor de cheltuieli pentru activități de cercetare-dezvoltare și de stimulare a inovării
2011	Ordin Nr. 3794 din 1 martie 2011 privind înființarea Consiliului Național al Cercetării Științifice, precum și pentru aprobarea regulamentului de organizare și funcționare a acestuia
2012	Ordonanța de Urgență nr. 96/2012 privind stabilirea unor măsuri de reorganizare în cadrul administrației publice centrale și pentru modificarea unor acte normative
2013	HG 1244 din 4 ianuarie 2013 privind modificarea și completarea unor acte normative referitoare la Planul național de cercetare – dezvoltare și inovare
2013	Ordonanța nr. 8/2013 pentru modificarea și completarea Legii nr. 571/2003 privind Codul fiscal și reglementarea unor măsuri financiar-fiscale
2013	Hotărâre nr. 750 din 2 octombrie 2013 pentru completarea Hotărârii Guvernului nr. 327/2003 privind plafoanele pe baza cărora se calculează costurile salariale directe la contractele de finanțare încheiate din fonduri bugetare, precum și pentru modificarea și completarea Hotărârii Guvernului nr. 475/2007 privind aprobarea Planului național de cercetare-dezvoltare și inovare II, pentru perioada 2007-2013

Anul adoptării	Act normativ
2013	Hotărâre nr. 1123 din 18 decembrie 2013 pentru modificarea Hotărârii Guvernului nr. 475 din 2007 privind aprobarea Planului național de cercetare-dezvoltare și inovare II, pentru perioada 2007-2013
2014	Hotărâre nr. 518 din 26 iunie 2014 pentru completarea art. 1 din Hotărârea Guvernului nr. 475 din 2007 privind aprobarea Planului național de cercetare
2014	Hotărâre nr. 1093 din 10 decembrie 2014 pentru prorogarea termenului prevăzut la art. 1 alin. (2) din Hotărârea Guvernului nr. 475/2007 privind aprobarea Planului național de cercetare-dezvoltare și inovare II, pentru perioada 2007-30 iunie 2014
2014	Hotărâre nr. 929 din 21 octombrie 2014 privind aprobarea Strategiei naționale de cercetare dezvoltare și inovare 2014-2020
2014	Hotărâre nr. 61 din 19 noiembrie 2014 privind aprobarea opiniei referitoare la Comunicarea Comisiei către Parlamentul European, Consiliu, Comitetul Economic și Social European și Comitetul Regiunilor - Cercetarea și inovarea ca surse de reînnoire a creșterii - COM (2014) 339
2015	Hotărâre nr. 521 din 8 iulie 2015 pentru prorogarea termenului prevăzut la art. 1 alin. (2) din Hotărârea Guvernului nr. 475/2007 privind aprobarea Planului național de cercetare-dezvoltare și inovare II, pentru perioada 2007-30 iunie 2014
2015	Ordin nr. 256 din 10 martie 2015 pentru modificarea și completarea Normelor privind deducerile pentru cheltuielile de cercetare-dezvoltare la determinarea profitului impozabil, aprobate prin Ordinul ministrului finanțelor publice și al ministrului educației, cercetării, tineretului și sportului nr. 2.086/4.504/2010
2015	Hotărâre nr. 252 din 15 aprilie 2015 pentru modificarea Hotărârii Guvernului nr. 475/2007 privind aprobarea Planului național de cercetare-dezvoltare și inovare II, pentru perioada 2007-30 iunie 2014
2015	Hotărâre nr. 583 din 22 iulie 2015 pentru aprobarea Planului național de cercetare-dezvoltare și inovare pentru perioada 2015-2020 (PNCDI III)

Strategia națională stabilește obiectivele de interes național în concordanță cu obiectivele Programului de guvernare și ale strategiilor sectoriale și cuprinde mijloacele pentru realizarea acestora, vizând:

- a) promovarea și dezvoltarea sistemului național de cercetare-dezvoltare pentru susținerea dezvoltării economice și sociale a țării și a cunoașterii;
- b) integrarea în comunitatea științifică internațională;
- c) protecția patrimoniului tehnico-științific românesc;
- d) dezvoltarea resurselor umane din activitatea de cercetare;
- e) dezvoltarea bazei materiale și finanțarea activității de cercetare.

Strategia națională se actualizează periodic, în funcție de evoluția economico-socială, astfel, pentru perioada 2014-2020, prin HG nr. 929 din 21 octombrie 2014 s-a aprobat Strategia națională de cercetare, dezvoltare și inovare 2014-2020 (SNCDI 2020) și prin HG nr. 583 din 22 iulie 2015 s-a aprobat Planul național de cercetare-dezvoltare și inovare pentru perioada 2015-2020 (PNCDI III). Elaborarea acestor documente strategice s-a desfășurat în contextul mai larg al strategiei Europa 2020 (Europe 2020, (2010)), în mod particular al inițiativei O Uniune a inovării (Innovation union, (2013)) și al principalului instrument de implementare - Orizont 2020 (Horizon, 2011), precum și în contextul corelării cu politicile de coeziune.

Tabel 6. Pachet legislativ privind Programul Cadru de Cercetare și Inovare "ORIZONT 2020" (2014 - 2020)

Anul adoptării	Act normativ
30 noiembrie 2011	Comunicarea CE privind Programul Cadru pentru Cercetare și Inovare "ORIZONT 2020"
30 noiembrie 2011	Propunerea de Regulament al Consiliului privind Programul Cadru pentru Cercetare și Inovare "ORIZONT 2020"
30 noiembrie 2011	Propunere de Decizie a Consiliului privind Programul specific de implementare a Programului Cadru pentru Cercetare și Inovare "ORIZONT 2020"
30 noiembrie 2011	Propunere de Regulament al Consiliului privind Programul de cercetare și instruire EURATOM complementar Programului Cadru pentru Cercetare și Inovare "ORIZONT 2020"
5 December 2011	Propunere de Regulament al Consiliului privind regulile de participare la Programul Cadru pentru Cercetare și Inovare "ORIZONT 2020"

Ca urmare a unor angajamente asumate de România, au fost identificate zonele în care România poate avea contribuții semnificative și, în același timp, prin care poate beneficia de rezultatele științei și ale inovării în creșterea competitivității, conturând un set de obiective generale specifice și transversale și un set de direcții de acțiune care să contureze o cale de transformare sistemică și evoluție a principalilor operatori CDI.

Tabel 7. Obiectivele generale și specifice ale Strategiei naționale de cercetare, dezvoltare și inovare 2014-2020

Obiective	Scopul urmărit
Obiective generale	
Og1. Creșterea competitivității economiei românești prin inovare	<ul style="list-style-type: none"> ↳ vizează susținerea performanței operatorilor economici pe lanțurile globale de valoare; ↳ susține tranziția de la competitivitatea bazată pe costuri la cea bazată pe inovare. Aceasta presupune dezvoltarea capacității firmelor de a absorbi tehnologie de ultimă generație, de a adapta aceste tehnologii la nevoile piețelor deservite și de a dezvolta, la rândul lor, tehnologii sau servicii care să le permită progresul pe lanțurile de valoare
Og2. Creșterea contribuției românești la progresul cunoașterii de frontieră.	<ul style="list-style-type: none"> ↳ vizează creșterea vizibilității internaționale a cercetării și dezvoltării experimentale din România. Activitățile CD la frontiera cunoașterii presupun formarea unei mase critice de cercetători în domeniile cele mai promițătoare, menținerea avansului în domeniile de nișă, unde cercetarea românească are deja avantaj comparativ - consacrat sau emergent -, standarde internaționale de evaluare pentru proiectele de cercetare și inițiative științifice de anvergură, precum cele dezvoltate în jurul marilor infrastructuri.
Og3. Creșterea rolului științei în societate	<ul style="list-style-type: none"> ↳ urmărește atât rezolvarea problemelor societale prin soluții inovatoare, cât și furnizarea de expertiză în elaborarea politicilor publice
Obiective specifice	
Os1. Crearea unui mediu stimulativ pentru inițiativa sectorului privat	<ul style="list-style-type: none"> ↳ prin instrumente de antrenare a antreprenoriatului și a comercializării rezultatelor CD, precum și prin credibilizarea parteneriatelor dintre operatorii publici și cei privați

Os. Susținerea specializării inteligente	↳ prin concentrarea resurselor în domenii de cercetare și inovare cu relevanță economică și cu potențial CDI demonstrat, prin parteneriate public-public - care să conducă la concentrare, eficiență și eficacitate, și public-privat, care să deblocheze potențialul identificat
Os. Concentrarea unei părți importante a activităților CDI pe probleme societale	↳ pentru dezvoltarea capacității sectorului CDI public de a solicita și adopta rezultatele cercetării și de a răspunde unor teme legate de provocările globale de importanță pentru România
Os 4. Susținerea aspirației către excelență în cercetarea la frontiera cunoașterii	↳ prin internaționalizarea cercetării din România, evaluare internațională, creșterea atractivității sistemului CDI românesc, prin mobilitate și parteneriate
Obiective specifice transversale	
Os 5. Atingerea până în 2020 a masei critice de cercetători necesară pentru transformarea CDI într-un factor al creșterii economice	↳ prin asigurarea unei evoluții rapide și sustenabile, numerice și calitative, a resurselor umane din cercetare, dezvoltare și inovare
Os 6. Dezvoltarea unor organizații de cercetare performante, capabile să devină operatori regionali și globali	↳ prin stimularea defragmentării sistemului CDI, concentrarea resurselor și prioritizarea alocării lor, încurajarea parteneriatelor public-public și public-privat, finanțarea științei și evaluarea impactului acesteia, noi modele de finanțare pentru a facilita inovarea.

Sursa: Hotărârea nr. 929 din 21 octombrie 2014 privind aprobarea Strategiei naționale de cercetare dezvoltare și inovare 2014-2020

Strategia națională de cercetare, dezvoltare și inovare 2014 – 2020 consideră noul ciclu de politici publice implementate printr-o serie de instrumente, în principal prin Planul național de cercetare, dezvoltare tehnologică și inovare 2014-2020 și prin Programul Operațional “Competitivitate” - Axa Prioritară „Cercetare, dezvoltare tehnologică și inovare pentru susținerea afacerilor și competitivitate”, alături de alte politici publice în sectoare conexe (fiscale, educaționale, etc.), desfășurate prin instrumente de tipul Program Operațional Regional, Program Operațional „Capacități Umane”, Programul Operațional Dezvoltarea Capacității Administrative și Programul Național pentru Dezvoltare Rurală.

Direcțiile de acțiune strategică implică un set integrat de măsuri „policy mix” care să cuprindă principalele dimensiuni ale politicii în domeniul CDI: *i)* politici fiscale, *ii)* politici de achiziție publică de cercetare și inovare, *iii)* politici de finanțare competitivă a CDI pentru sectorul public și privat, *iv)* politici privind normele de proprietate intelectuală, *v)* politici privind colaborarea și concentrarea, *vi)* politici de finanțare instituțională, *vii)* politici privind capitalul uman, *viii)* politici privind guvernarea sistemului CDI.

Tabel 8. Instrumentele principale și politici sectoriale specifice pentru implementarea Strategiei naționale de cercetare, dezvoltare și inovare 2014 – 2020

Instrumentul, planul sau politica sectorială	Componenta
Planul Național de Cercetare, Dezvoltare și Inovare 2015-2020;	
Programul Operațional Competitivitate	Obiectivul "Creșterea capacității sistemului CDI pentru perioada 2014-2020"
Programul Operațional Capital Uman	Componenta de "Educație și instruire"
Programul Operațional Regional	Componenta de "Competitivitate și mediul de afaceri pentru IMM-uri"
Programul Operațional Dezvoltare Rurală	Componenta de "Investiții în dezvoltarea agriculturii și a mediului rural"
Planurile sectoriale ale ministerelor de ramură	
Planurile Academiei Române și ale unităților din subordine	
Alte politici sectoriale (coordonate de CNPSTI)	

În conformitate cu SNCDI 2020, accesul la fondurile structurale pentru finanțarea activităților CDI, depinde de stabilirea, la nivel național, a unui set limitat de priorități strategice. Prin SNCDI 2020 au fost identificate zonele în care România poate avea contribuții semnificative și, în același timp, prin care România poate beneficia de rezultatele științei și ale inovării în creșterea competitivității, vizând următoarele priorități:

- ↳ Prioritățile de specializare inteligentă presupun definirea și consolidarea unor domenii de competență ridicată, în care există avantaje comparative reale, sau potențiale, și care pot contribui semnificativ la PIB. Prin concentrarea de resurse și mobilizarea unei mase critice de cercetători, aceste domenii pot asigura, inclusiv în dimensiunea lor regională, competitivitatea pe lanțurile de valoare adăugată regionale și/sau globale.
- ↳ Prioritățile cu relevanță publică vizează alocarea de resurse în domenii în care cercetarea și dezvoltarea tehnologică răspund unor nevoi sociale concrete și presante. Aceste priorități presupun dezvoltarea capacității sectorului public de a supraveghea spațiul tehnologiilor emergente și de a solicita soluții inovatoare de la operatorii CDI publici și privați. Cercetarea fundamentală rămâne prioritară în cadrul SNCDI 2020 – incluzând disciplinele umaniste și socio-economice – ca sursă pentru cercetarea de frontieră și interdisciplinară.

Specializarea inteligentă susține reorientarea politicilor CDI către acele activități de cercetare care oferă rezultate cu relevanță economică, prin:

- stimularea unui anumit tip de comportament economic, cu ambiții și orientare regionale sau globale;
- înțelegerea impactului social al științei, tehnologiei și al activităților economice în sectoarele relevante;
- cercetarea și dezvoltarea interdisciplinară.

Domeniile de specializare inteligentă pentru ciclul strategic 2014-2020, identificate pe baza potențialului lor științific și comercial, în urma unui amplu proces de consultare, sunt specifice: *i*) bioeconomiei, *ii*) tehnologiei informației și a comunicațiilor, spațiu și securitate, *iii*) energiei, mediu și schimbări climatice și *iv*) eco-nanotehnologiilor și materialelor avansate. Principalele direcții de acțiune sunt orientate către dezvoltarea de proiecte inițiate de firme, centre de competență, infrastructură de inovare (acceleratoare și incubatoare de afaceri, centre de transfer tehnologic), programe de doctorat și postdoctorat în domenii prioritare, infrastructuri de cercetare ("roadmap" național), performanță și concentrare organizațională, un mecanism de orientare strategică (HG 383/2015: art 4(2)).

Domeniile de specializare inteligentă pentru ciclul strategic 2014-2020, identificate pe baza potențialului lor de concentrare a resurselor în domenii cu relevanță publică directă, stimulând atât cererea publică de soluții inovatoare, cât și oferta din partea organizațiilor CD, sunt specifice sectoarelor: *i) sănătate, ii) patrimoniu și identitate culturală și iii) tehnologii noi și emergente (HG 383/2015: art 4(3)).*

Pentru recuperarea decalajelor față de UE în sectorul de cercetare, dezvoltare și inovare, România are nevoie de redimensionarea și recalibrarea componentelor sistemice - resurse umane, organizații și infrastructuri de cercetare. Acțiunile transversale deservește simultan, direct și indirect, atât știința exploratorie și cercetarea fundamentală, cât și prioritățile de specializare inteligentă și cu relevanță socială. Principalele direcții de acțiune sunt orientate către creșterea capacității și performanței instituționale, piața muncii în cercetare, internaționalizare, infrastructuri, educație în științe, tehnologie și comunicarea științei.

Planul Național de Cercetare, Dezvoltare și Inovare 2015-2020 (PNCDI III - HG. 383/2015) este unul dintre instrumentele principale de implementare a SNCDI 2020, care, în conformitate cu obiectivele sale, este compus din programe și subprograme:

- Programul 1: Dezvoltarea sistemului național de cercetare-dezvoltare
- Programul 2: Creșterea competitivității economiei românești prin cercetare, dezvoltare și inovare
- Programul 3: Cooperare europeană și internațională
- Programul 4: Cercetare fundamentală și de frontieră
- Programul 5: Cercetare în domenii de interes strategic

Atribuțiile de conducere ale programelor, inclusiv elaborarea documentelor specifice privind planificarea, programarea, monitorizarea, evaluarea și raportarea implementării programelor, se realizează cu respectarea prevederilor prezentului plan, completate cu prevederile specifice cuprinse în Normele metodologice privind contractarea, finanțarea, monitorizarea și evaluarea programelor, proiectelor de cercetare-dezvoltare și inovare și a acțiunilor cuprinse în Planul național de cercetare-dezvoltare și inovare, aprobate prin Hotărârea Guvernului nr. 1.265/2004, cu modificările și completările ulterioare.

Obiectivele generale ale PNCDI III corespund particularităților etapei actuale de dezvoltare a României, în context european și internațional și sunt structurate pe obiective specifice stabilite conform SNCDI 2020:

**Tabel 9. Obiectivele generale și specifice ale
Planului Național de Cercetare, Dezvoltare și Inovare 2015-2020**

Obiective generale	
a) creșterea competitivității economiei românești prin inovare;	
b) creșterea contribuției românești la progresul cunoașterii;	
c) creșterea rolului științei în societate.	
Obiective specifice	Măsuri
a) transformarea sistemului național de cercetare-dezvoltare și inovare în subsistem socio-economic cu performanțe și impact la nivelul mediei europene pentru sistemele din această categorie, măsurat prin convergența indicatorilor intensivi ai sistemului de cercetare către media UE, stabiliți ca ținte ale indicatorilor din PNCDI III;	a ₁) stimularea cooperării sinergice și pe termen lung între instituțiile din sistemul public de CDI și operatorii economici
	a ₂) focalizarea activității de CDI și a investiției publice și private asociate în domeniile prioritare, în care România are deja potențial, care susțin domeniile de specializare inteligentă ale economiei sau care reprezintă un interes național specific, conform SNCDI 2020
	a ₃) stimularea exploatării comerciale a invențiilor și a altor rezultate științifice, în special de către persoane juridice române
	a ₄) determinarea apariției unui flux suficient de cunoaștere, a unor realizări tehnice originale, rezultate de cercetare aplicativă și personal creativ de înaltă calificare, care să facă posibile și rentabile investițiile în comercializarea cercetării, activitate ce se va finanța prin POC
b) asigurarea masei critice de cercetători din sistem;	b ₁) creșterea atractivității organizațiilor de cercetare pentru cercetători, reducerea exodului personalului și atragerea cercetătorilor din străinătate prin modernizarea, clarificarea și predictibilizarea mecanismelor administrative
	b ₂) susținerea direcțiilor de cercetare exploratorie necesare formării și atragerii cercetătorilor în sistemul național de CDI
	b ₃) menținerea personalului atras în cadrul proiectelor exploratorii prin programul de finanțare instituțională PNCDI III
c) creșterea nivelului și a eficienței finanțării publice;	c ₁) stimularea, prin cofinanțare publică, a cheltuielilor private de CDI în domeniile prioritare de specializare inteligentă
	c ₂) optimizarea gradului de utilizare a infrastructurii de CDI, atât a celei în care s-a investit anterior, cât și a celei în care se investește prin PNCDI III
	c ₃) creșterea eficienței investițiilor pe termen lung prin adoptarea unui drum de parcurs pentru dezvoltarea infrastructurii de CDI în organizațiile de drept public
	c ₄) atragerea din sectorul privat, până în 2020, a unor investiții în cercetare de 1% din PIB
d) perfecționarea și modernizarea administrației cercetării;	d ₁) monitorizare și gestionare informatizată
	d ₂) formarea și perfecționarea unor structuri de conducere profesionale de organizații de cercetare
	d ₃) reglementarea pe bază contractuală a ocupării posturilor de conducere în organizațiile publice de cercetare
e) creșterea capacității administrației centrale.	e ₁) fundamentarea științifică a politicilor în domeniu
	e ₂) îmbunătățirea capacității de predicție a evoluției sistemului de CDI
	e ₃) îmbunătățirea comunicării rezultatelor de CDI către publicul larg
	e ₄) promovarea rolului științei în societate, inclusiv prin generalizarea fundamentării științifice a elaborării normativelor și deciziilor executive

Sursa: Hotărârea nr. 583 din 22 iulie 2015 pentru aprobarea Planului național de cercetare-dezvoltare și inovare pentru perioada 2015-2020 (PNCDI III)

Sistemul de cercetare, dezvoltare și inovare din România are rolul de a dezvolta știința și tehnologia cu scopul de a crește competitivitatea economiei românești, de a îmbunătăți calitatea socială și de a spori cunoașterea cu potențial de valorificare și largire a orizontului de acțiune. Comisia Europeană a demarat finanțarea unor proiecte cadru, cu arii tematice prestabilite. În luna august 2014, Comisia Europeană a adoptat Acordul de Parteneriat 2014 - 2020 cu România, care vizează următoarele provocări și priorități aferente:

- promovarea competitivității și a dezvoltării locale, în vederea consolidării sustenabilității operatorilor economici și a îmbunătățirii atractivității regionale;
- dezvoltarea capitalului uman prin creșterea ratei de ocupare a forței de muncă și a numărului de absolvenți din învățământul terțiar, oferind totodată soluții pentru provocările sociale severe și combaterea sărăciei, în special la nivelul comunităților defavorizate sau marginalizate ori în zonele rurale;
- dezvoltarea infrastructurii fizice, atât în sectorul TIC, cât și în sectorul transporturilor, în vederea sporirii accesibilității regiunilor din România și a atractivității acestora pentru investitori;
- încurajarea utilizării durabile și eficiente a resurselor naturale prin promovarea eficienței energetice, a unei economii cu emisii reduse de carbon, a protecției mediului și a adaptării la schimbările climatice;
- consolidarea unei administrații publice moderne și profesioniste prin intermediul unei reforme sistemice, orientată către soluționarea erorilor structurale de guvernare.

Acordul de parteneriat 2014 - 2020 (2014) include cinci fonduri structurale și de investiții europene (fonduri ESI): Fondul european de dezvoltare regională (FEDR), Fondul de coeziune (FC), Fondul social european (FSE), Fondul european agricol pentru dezvoltare rurală (FEADR) și Fondul european pentru pescuit și afaceri maritime (EMFF).

Remarcăm ca o caracteristică a mediului de cercetare, dezvoltare și inovare, fragmentarea sistemului public de cercetare-dezvoltare, care se caracterizează printr-un număr mare de operatori, dar cu rezultate modeste comparativ cu media europeană. Cercetarea și inovarea reprezintă unul din cele 5 obiective strategice ale Strategiei Europa 2020 reprezentat prin inițiativa proiritară „O Uniune a inovării” pentru a îmbunătăți condițiile-cadru și accesul la finanțările pentru cercetare și inovare, astfel încât să se garanteze posibilitatea transformării ideilor inovatoare în produse și servicii care creează creștere și locuri de muncă.

14.2. Surse de finanțare a activității de cercetare-dezvoltare și inovare

Investigațiile pe care le propunem vizează identificarea și sintetizarea programelor naționale de finanțare a activității de cercetare-dezvoltare și inovare, valoarea alocărilor de la buget pentru această activitate în perioada 2015-2020, împreună cu caracteristici ale acestor programe. De asemenea vom urmări să reperăm și principalele surse private de finanțare a activității de cercetare-dezvoltare, specifice întreprinderilor economice care au și activitate de cercetare.

Atât prioritățile de specializare inteligentă, cât și prioritățile cu relevanță publică au în vedere, pe lângă dezvoltarea de tehnologii și soluții inovatoare, stimularea anumitor tipuri de comportament din partea operatorilor relevanți și înțelegerea impactului social al științei, tehnologiei și al activităților economice în sectoarele vizate. Ca atare, aceste două clase de priorități presupun activități de cercetare și dezvoltare interdisciplinare, dincolo de demarcațiile disciplinare tradiționale.

Nivelul de dezvoltare al societății românești a impus diversificarea surselor de finanțare pentru activitatea de cercetare-dezvoltare și inovare desfășurată de unitățile și instituțiile din cadrul sistemului național de cercetare, acestea constituindu-se din:

- fonduri de la bugetul de stat;
- fonduri atrase de la agenți economici;
- fonduri provenite din programe și/sau cooperări internaționale;
- fonduri acordate de fundații sau provenind din alte surse private;
- alte fonduri constituite conform legii.

Strategia CDI 2014-2020 consideră o premisă necesară, dar nu suficientă pentru atingerea excelenței științifice necesitatea internaționalizării mediului de cercetare din România prin defragmentări implicate de reducerea redundanțelor și optimizarea investițiilor. Urmând principiul „resursele urmează excelența”, internaționalizarea, și concentrarea vor cataliza colaborările interdisciplinare și, prin intermediul lor, vor stimula știința cu rezultate care răspund problemelor de interes general.

Principalele *surse de finanțare a cercetării, dezvoltării și inovării* în România sunt bugetul public și fondurile Uniunii Europene, la care se adaugă și o formă indirectă de finanțare a CDI sub forma facilităților fiscale introduse în anul 2010 în Ordinul nr. 2086/4504 din 2010, sub forma deducerilor pentru cheltuieli de cercetare, dezvoltare și inovare în limita a 20% a cheltuielilor efectuate de contribuabili pentru activitățile de cercetare-dezvoltare, precum și aplicarea metodei de amortizare accelerată în cazul aparaturii și echipamentelor destinate activităților de cercetare-dezvoltare.

Autoritatea de stat pentru cercetare-dezvoltare prevede anual în proiectul bugetului propriu resursele financiare necesare realizării politicilor în domeniul cercetării și în domeniul stimulării inovării. *Finanțarea activităților de cercetare-dezvoltare și inovare din fonduri de la bugetul de stat* se face astfel:

- a) prioritar, în sistem competițional, pe programe și proiecte;
- b) în sistem direct.

Din fonduri publice se vor aloca sume pentru *acțiuni finanțate pe bază de programe*, utilizându-se cu prioritate pentru finanțarea obiectivelor din Strategia națională și Planul național, precum și pentru finanțarea activităților unităților de cercetare care obțin finanțare parțială pe programe internaționale, la care statul român contribuie cu fonduri, conform acordurilor încheiate cu partenerii străini:

- Planul Național de Cercetare, Dezvoltare tehnologică și Inovare 2014-2020;
- Programul Operațional “Competitivitate” - Axa Prioritară „Cercetare, dezvoltare tehnologică și inovare pentru susținerea afacerilor și competitivitate”;
- Politici publice în sectoare conexe și alte programe (competitivitate, industrială, financiară, fiscală, de concurență, de ajutor de stat, educaționale, etc.), desfășurate prin instrumente de tipul Program Operațional Regional, Program Operațional „Capacități Umane”, Programul Operațional Competitivitate, Programul Operațional Dezvoltarea Capacității Administrative, Programul Național pentru Dezvoltare Rurală.

Fondurile alocate Componentei CDI a programelor se vor concentra pe cele 4 priorități tematice pentru specializare inteligentă și cele 3 priorități tematice selectate ca domenii de interes național pentru România, sănătate, patrimoniu și identitate culturală, tehnologii noi și emergente.

Procesul de specializare inteligentă este unul dinamic, ce presupune culegerea și analiza permanentă de date, la nivel regional și național, cu un mecanism complet de monitorizare în cadrul ciclului strategic.

Tabel 10. Priorități tematiche de specializare inteligentă

Priorități de specializare inteligentă pentru România	Descriere domeniu de specializare inteligentă
A1. BIOECONOMIE	Domeniul beneficiază de potențialul uriaș al agriculturii românești, în contextul unei industrii alimentare locale tot mai active și cu standarde în creștere, al cercetării aplicative de succes din domeniu și din industria farmaceutică, precum și în contextul unor tendințe globale ca cererea ridicată de produse alimentare. Siguranța și optimizarea produselor alimentare, dezvoltarea sectoarelor horticola, forestier, zootehnic și piscicol sau valorificarea biomasei și a biocombustibililor reprezintă subdomenii cu potențial evident.
A2. TEHNOLOGIA INFORMAȚIEI ȘI A COMUNICAȚIILOR, SPAȚIU ȘI SECURITATE	Domeniul este unul dintre cele mai dinamice din țară. Industria este sprijinită de experiența antreprenorială acumulată în ultimele decenii, de calitatea ridicată a învățământului superior și a cercetării academice din disciplinele tehnice relevante, precum și de prezența unor companii multinaționale importante. Dezvoltarea de software, de tehnologii pentru internetul viitorului și calculul de înaltă performanță, joacă un rol central în rezolvarea marilor probleme societale. Dezvoltarea de aplicații spațiale dedicate și/sau integrate, tehnologiile și infrastructurile spațiale, misiunile spațiale proprii și internaționale, reprezintă elemente cheie pentru creșterea competitivității în activități economice și sociale. Securitatea societală se bazează pe dezvoltarea de tehnologii, produse, capacități de cercetare și sisteme pentru securitate locală și regională, protecția infrastructurilor și serviciilor critice, “intelligence”, securitate cibernetică, securitatea internă și a cetățeanului, managementul situațiilor de urgență și al crizelor de securitate, precum și pentru combaterea terorismului, amenințărilor transfrontaliere, crimei organizate, traficului ilegal, toate acestea pe fondul dezvoltării culturii de securitate.
A3. ENERGIE, MEDIU ȘI SCHIMBĂRI CLIMATICE	Cercetările în domeniul energiei susțin reducerea dependenței energetice a României, prin valorificarea superioară a combustibililor fosili, diversificarea surselor naționale (nucleară, regenerabile, curate), transport multifuncțional (“rețele inteligente”) și mărirea eficienței la consumator. Prezervarea mediului înconjurător constituie o prioritate a tuturor politicilor actuale în condițiile unor investiții masive care urmează să fie făcute în tehnici de depoluare și de reciclare, în administrarea resurselor de apă și a zonelor umede. Conceptul „orașul inteligent” oferă soluții de infrastructuri integrate pentru nevoile populației în aglomerări urbane.

Priorități de specializare inteligentă pentru România	Descriere domeniu de specializare inteligentă
A4. ECO-NANO-TEHNOLOGII ȘI MATERIALE AVANSATE	<p>Domeniul aparține Tehnologiilor Generice Esențiale (TGE), prioritară la nivel european, care utilizează intensiv CDI. Domeniul este antrenat de competitivitatea internațională a industriei auto din România, de infuzia ridicată de capital și de dinamica exporturilor din acest sector. Perspectivele industriei de echipamente agricole sunt promițătoare, iar investițiile în cercetare pentru combustibili, materiale noi și/sau reciclate pot dinamiza activitățile CDI dedicate eco-tehnologiilor care conservă proprietățile apei, aerului și solului. Nanotehnologiile au un mare potențial inovativ, susțin IMM-urile și asigură competitivitatea tehnologică a României. Cresc șansele de a atrage investiții străine și de a dezvolta sectoarele tehnologiilor înalte. Domeniul este susținut de un învățământ tehnic dezvoltat, cu contribuții importante la sectoarele industriale amintite. Există un număr mare de institute naționale, institute ale Academiei Române, alte tipuri de organizații, care au măcar unul din domeniile principale de activitate cercetarea în domeniul materialelor. Aceste institute au beneficiat în ultimii ani de investiții importante în infrastructură, prin programele cu finanțare națională și internațională, posedând baza materială pentru desfășurarea unor cercetări semnificative, cu potențial economic ridicat.</p>

Sursa: Hotărârea nr. 929 din 21 octombrie 2014 privind aprobarea Strategiei naționale de cercetare dezvoltare și inovare 2014-2020

Principalele direcții de acțiune sunt orientate către dezvoltarea de proiecte inițiate de firme, centre de competență, infrastructură de inovare (acceleratoare și incubatoare de afaceri, centre de transfer tehnologic), programe de doctorat și postdoctorat în domenii prioritare, infrastructuri de cercetare (“roadmap” național), performanță și concentrare organizațională, un mecanism de orientare strategică.

Au fost identificate, prin procesul de consultare extinsă folosit și pentru prioritățile de specializare inteligentă, următoarele domenii de prioritate publică pentru actualul ciclu strategic:

Tabel 11. Priorități tematiche de prioritate publică

Priorități de prioritate publică pentru România	Descriere domeniu de prioritate publică
SĂNĂTATE	Sănătatea reprezintă un domeniu cu impact critic asupra calității vieții și a resurselor publice. Numai impactul economic indirect al stării de sănătate a populației este estimat la câteva procente din PIB. În acest domeniu, cercetarea și dezvoltarea experimentală au o contribuție esențială, influențând dramatic nu numai bunăstarea individuală și generată, ci și perspectivele economice ale unei societăți.
PATRIMONIU ȘI IDENTITATE CULTURALĂ	Domeniul este consistent cu obiectivele esențiale ale Uniunii Europene, de promovare a patrimoniului cultural și lingvistic al fiecărei țări membre, de protecție a limbilor/idiomurilor minoritare și a celor pe cale de dispariție, de afirmare a identităților de grup în coordonatele multiculturalității. Domeniul vizează o gamă largă de teme de cercetare științifică, de la impactul social al științei și tehnologiei la dezvoltarea sistemului de educație, înțelegerea trecutului și anticiparea provocărilor societale, locale ori globale.
TEHNOLOGII NOI ȘI EMERGENTE	Știința și tehnologia pot susține opțiunile de dezvoltare ale României indiferent de domeniul acestora. Este important, de aceea, ca dezvoltarea și adoptarea de noi tehnologii să aibă și o componentă deschisă, orientată spre rezolvarea de probleme specifice și capabilă să alimenteze nevoia publică indiferent unde apare aceasta. Componenta este puternic axată pe achiziția publică pre-comercială de inovare, susținând oportunitățile relevante strategic.

Sursa: Hotărârea nr. 929 din 21 octombrie 2014 privind aprobarea Strategiei naționale de cercetare dezvoltare și inovare 2014-2020

A. Planul național de cercetare, dezvoltare tehnologică și inovare 2014-2020

Autoritatea de stat pentru cercetare-dezvoltare stabilește plafoanele de angajare ale fondurilor bugetare pe programele componente ale Planului național de cercetare-dezvoltare și inovare pentru perioada 2015-2020 (PNCDI III) și, după caz, pe subprograme și domenii prioritare, pe perioade multianuale, cu respectarea modelului investițional asociat PNCDI III. Bugetul total al PNCDI III pentru întreaga perioadă de implementare este de maximum 15 miliarde lei.

Finanțarea programelor și proiectelor din cadrul PNCDI III se efectuează cu respectarea normelor metodologice privind contractarea, finanțarea, monitorizarea și evaluarea programelor, proiectelor de cercetare-dezvoltare și inovare în vigoare. Sumele alocate de la bugetul de stat pentru finanțarea PNCDI III și a programelor componente se repartizează astfel:

- a) minimum 95% pentru finanțarea activităților de cercetare, desfășurate în cadrul proiectelor de cercetare-dezvoltare și inovare, în scopul realizării obiectivelor planului;
- b) maximum 5% pentru conducerea PNCDI III și a programelor componente.

Însă, Statul acceptă și existența eșecului în cercetare și în acest caz preia riscul producerii acestuia în cadrul contractelor de finanțare a proiectelor care se desfășoară în cadrul programelor PNCDI III (2015), în condițiile prevăzute de lege. Criteriile în funcție de care statul acceptă eșecul în cercetare, pentru care nu există obligativitatea recuperării fondurilor cheltuite de la buget, sunt precizate în pachetele de informații, la fiecare tip de proiect. Cauzele și responsabilitatea în privința producerii eșecului în cercetare și, după caz, obligativitatea recuperării fondurilor cheltuite de la buget se stabilesc de către comisii de evaluare constituite în acest scop de către conducătorii de programe.

**Tabel 12. Sinteza Programelor și Subprogramelor
Planului Național de Cercetare, Dezvoltare și Inovare 2015-2020**

Program	Subprogram	Scopul constituirii programului
Programul 1 Dezvoltarea sistemului național de cercetare-dezvoltare	Subprogramul 1.1. Resurse umane; Subprogramul 1.2. Performanță instituțională; Subprogramul 1.3. Infrastructuri de cercetare-dezvoltare; Subprogramul 1.4. Suport	pentru creșterea capacității sale în resurse, performanțe și calitate a activităților CDI
Programul 2 Creșterea competitivității economiei românești prin cercetare, dezvoltare și inovare	Subprogramul 2.1. Competitivitate prin cercetare, dezvoltare și inovare; Subprogramul 2.2. Transfer tehnologic în sprijinul competitivității;	pentru creșterea productivității întreprinderilor prin CDI în cadrul unui sistem național de inovare
Programul 3 Cooperare europeană și internațională	Subprogramul 3.1. Bilateral/multilateral; Subprogramul 3.2. Orizont 2020; Subprogramul 3.3. Sprijinirea participării românești la inițiative europene de programare comună (JPI); Subprogramul 3.4. Sprijinirea participării la inițiativele tehnologice comune (JTI/JU); Subprogramul 3.5. Alte inițiative și programe europene și internaționale; Subprogramul 3.6. Suport;	pentru circulația cunoștințelor și ideilor, prin participare la programe și instituții internaționale de cercetare și acces la resurse de cercetare care nu sunt disponibile în România
Programul 4 Cercetare fundamentală și de frontieră	- nu este structurat pe subprograme de cercetare	pentru menținerea domeniilor de nișă unde cercetarea fundamentală românească are avantaj comparativ și masă critică de cercetători sau unde există posibilități de colaborare internațională, care să adauge cercetării fundamentale românești dimensiunea "de frontieră", prin obținerea unor rezultate științifice și tehnologice de vârf, cu perspective de comercializare
Programul 5 Cercetare în domenii de interes strategic	Subprogramul 5.1. Programul de cercetare, dezvoltare și inovare pentru tehnologii în domeniul laserilor de ultra-înaltă putere - ELI-RO; Subprogramul 5.2. Participare la organismele și programele internaționale de cercetare în domeniul atomic și subatomic; Subprogramul 5.3. Programul de cercetare, dezvoltare și inovare pentru tehnologie spațială și cercetare avansată - STAR; Subprogramul 5.4. Programul de cercetare, dezvoltare și inovare pentru sistemele fluvii, delte, mări - "Danubius";	programe-suport conduse de instituții cu relevanță științifică, cu rol de coordonare științifică în domenii de interes strategic, pentru formarea și dezvoltarea instituțiilor de cercetare și a competențelor naționale în domeniile de interes strategic pentru România

Sursa: Hotărârea nr. 583 din 22 iulie 2015 pentru aprobarea Planului național de cercetare-dezvoltare și inovare pentru perioada 2015-2020 (PNCDI III)

În cadrul fiecărui program se organizează *competiții de propuneri de proiecte* care pun în practică **instrumentele de finanțare prin tipuri de proiecte** destinate anumitor grupuri-țintă și anumitor tipuri de activități.

Tematicile pentru competiții, precum și instrumentele de finanțare și tipurile de proiecte ce vor fi utilizate în cadrul competiției sunt stabilite de autoritatea de stat pentru cercetare-dezvoltare pe baza propunerilor conducătorului de program și sunt descrise prin pachetele de informații elaborate de conducătorul de program, pe care autoritatea de stat le aprobă.

**Tabel 13. Obiectivele programelor componente ale
Planului Național de Cercetare, Dezvoltare și Inovare 2015-2020**

Program	Obiectivele programului
Programul 1	<ul style="list-style-type: none"> a) dezvoltarea resurselor umane, a infrastructurii și a instituțiilor de profil; b) creșterea eficienței utilizării resurselor în organizațiile publice, prin dezvoltarea mecanismelor de monitorizare și evaluare a calității și relevanței activităților CDI; c) creșterea atractivității sistemului și deschiderea organizațiilor de cercetare către comunitatea internațională; d) modernizarea administrației publice din sectorul cercetării.
Programul 2	<ul style="list-style-type: none"> a) stimularea progresului întreprinderilor pe lanțurile de valoare și a parteneriatelor cu universitățile publice, prin maximizarea valorii adăugate din producția de bunuri inovatoare (tehnologii, produse, servicii) bazate pe cercetare științifică (proprie sau externalizată); b) creșterea capacității întreprinderilor de a absorbi tehnologie de ultimă generație și de a adapta aceste tehnologii la nevoile piețelor-țintă; c) crearea unui mediu stimulatoriu pentru inițiativa sectorului privat, prin instrumente de antrenare a antreprenoriatului, de sprijin pentru comercializarea rezultatelor de cercetare-dezvoltare și de constituire a parteneriatelor dintre operatorii economici, organizațiile de cercetare și diseminare a cunoștințelor, și, eventual, autoritățile publice locale; d) susținerea proceselor de specializare inteligentă, prin concentrarea resurselor în sectoare cu relevanță economică și cu potențial de cercetare demonstrat, prin parteneriate public-public și public-privat - care să conducă la concentrare, eficiență și eficacitate și la deblocarea potențialului identificat; e) dezvoltarea activităților CDI în domenii de interes social general, pentru a mări capacitatea sectorului public de cercetare de a răspunde provocărilor globale care afectează economia României.
Programul 3	<ul style="list-style-type: none"> a) creșterea competitivității internaționale a cercetării românești în atragerea finanțării externe pentru cercetare; b) consolidarea sistemului național de cercetare-dezvoltare și inovare prin intensificarea cooperării științifice internaționale; c) participarea României la Programul-Cadru de cercetare și inovare al UE - Orizont 2020, la Inițiativele Comune de Programare (JPI), la Parteneriatele Europene pentru Inovare (EIP), la alte inițiative, programe, organizații și convenții europene și internaționale bi- și multilaterale; d) reprezentarea României în organizații și programe paneuropene și internaționale de cercetare; e) creșterea vizibilității României în domeniul cercetării, dezvoltării și inovării.

Program	Obiectivele programului
Programul 4	a) dezvoltarea cercetării fundamentale în domeniile în care România și-a stabilit priorități naționale prin SNCDI 2020; b) creșterea performanțelor calitative și îmbunătățirea vizibilității internaționale a rezultatelor științifice în domeniile în care România are potențial de cercetare și în care au fost obținute rezultate comparabile cu cele ale țărilor UE - creșterea contribuției României la dezvoltarea Spațiului European al Cercetării (ERA); c) dezvoltarea domeniilor în curs de apariție în care România are interes să desfășoare activități de cercetare științifică de frontieră, cu contribuții la dezvoltarea tehnică și tehnologică și la îmbunătățirea calității vieții; d) adoptarea standardelor internaționale de evaluare pentru proiectele de cercetare fundamentală.
Programul 5	a) susținerea participării instituțiilor de cercetare din România la instituțiile și programele științifice internaționale pentru creșterea capacității naționale de cercetare în domeniile de interes strategic; b) identificarea de nișe de cercetare, tehnologice și industriale la nivel național, european și mondial; c) utilizarea resurselor internaționale de cercetare-dezvoltare prin participarea în comun, în cadrul organizațiilor și programelor științifice europene, la soluționarea problemelor de interes strategic pentru România; d) obținerea de rezultate științifice vizibile și cu impact, prin cooperare internațională, transfer de cunoștințe și tehnologii cu aplicații strategice; e) promovarea inovării industriale în sectoarele de interes strategic, dezvoltarea și diversificarea de aplicații ale cercetărilor în activități industriale; f) comunicarea eficientă între instituțiile de cercetare, de învățământ, industriale și economice din România, prin popularizarea rezultatelor științifice în domeniile și sectoarele de interes strategic.

Sursa: Hotărârea nr. 583 din 22 iulie 2015 pentru aprobarea Planului național de cercetare-dezvoltare și inovare pentru perioada 2015-2020 (PNCDI III)

Fiecare program conține subprograme, cu obiective specifice, în cadrul cărora se vor organiza competiții de propuneri de proiecte care pun în practică instrumentele de finanțare prin tipuri de proiecte destinate anumitor grupuri țintă și anumitor tipuri de activități.

În vederea atingerii obiectivelor programelor/subprogramelor se lansează trei tipuri de competiții, cu tematici încadrate în domeniile prioritare ale PNCDI III, respectiv:

- ↳ competiție de tip "de jos în sus" ("bottom-up") - propunerile de proiecte se depun în cadrul unor tematici generale, încadrate în domeniile prioritare ale PNCDI III;
- ↳ competiție de tip "țintită" ("targeted") - propunerile de proiecte se depun în cadrul unor tematici orientate, focalizate pe subdomenii restrânse, încadrate în domeniile prioritare ale PNCDI III;
- ↳ competiție de tip "de sus în jos" ("top-down") - propunerile de proiecte se depun în cadrul unor tematici particularizate, definite concret, care se încadrează în domeniile prioritare ale PNCDI III și care au obiective, rezultate și cerințe specifice de realizare precizate în detaliu, prin termeni de referință

**Tabel 14. Obiectivele subprogramelor componente
ale Planului Național de Cercetare, Dezvoltare și Inovare 2015-2020**

Subgram	Obiectivele programului
Subprogramul 1.1	<ul style="list-style-type: none"> - creșterea numărului de cercetători și formarea unor generații deschise către mediul științific european și internațional, în conformitate cu obiectivele Spațiului European de Cercetare; - creșterea atractivității carierei de cercetare prin crearea unui cadru instituțional similar cu cel al organizațiilor de cercetare din țările dezvoltate (promovare în carieră pe baze etice și de performanță); - îmbunătățirea performanțelor grupurilor de cercetători; - crearea și operarea Registrului național al cercetătorilor
Subprogramul 1.2	<ul style="list-style-type: none"> - susținerea planurilor de dezvoltare instituțională în vederea creșterii performanțelor în domeniul de activitate, la nivelul departamentelor și colectivelor de cercetare; - dezvoltarea capacității proprii a organizațiilor publice de cercetare în următoarele direcții: <ul style="list-style-type: none"> - valorificarea și difuzarea cunoștințelor și rezultatele de cercetare; - acordarea de asistență tehnică și de servicii științifice și tehnologice de înalt nivel în domenii prioritare; - inițierea și dezvoltarea colaborărilor viabile cu parteneri din mediul economic public și privat; - creșterea gradului de implicare și vizibilitate pe plan internațional
Subprogramul 1.3	<ul style="list-style-type: none"> - modernizarea infrastructurilor de cercetare-dezvoltare existente și optimizarea gradului de utilizare a acestora; - creșterea eficacității investiției în infrastructuri de cercetare-dezvoltare (orientarea investițiilor spre cele care completează ori integrează investiții anterioare sau unde încărcarea celor existente este maximă); - stimularea formării și dezvoltării clusterelor de inovare în jurul marilor infrastructuri de cercetare; - crearea și menținerea Registrului național al infrastructurilor de cercetare -dezvoltare.
Subprogramul 1.4	<ul style="list-style-type: none"> - furnizează instrumente de sprijin indirect necesare bunei funcționări a sistemului național de cercetare-dezvoltare (inclusiv dezvoltarea resurselor umane specializate în administrarea și comercializarea rezultatelor cercetării).
Subprogramul 2.1	<ul style="list-style-type: none"> - intensificarea parteneriatelor pentru activități de cercetare industrială și dezvoltare experimentală finanțate de afaceri; - realizarea de produse/tehnologii/metode/servicii noi sau semnificativ îmbunătățite și introducerea acestora în circuitul productiv; - ascensiunea pe lanțurile de valoare prin creșterea valorii adăugate și ridicarea nivelului tehnologic în întreprinderi; - completarea lanțurilor de valoare de la furnizori primari până la comercializarea bunului finit; - promovarea culturii inovatoare în afaceri; - promovarea agendelor și planurilor strategice de dezvoltare comună; - optimizarea utilizării resurselor de cercetare (infrastructuri și personal); - impulsivarea brevetării la nivel național și internațional; - concentrarea investițiilor (maximizarea valorii banilor investiți); - perfecționarea personalului de cercetare din întreprinderi, angajarea de personal de cercetare.
Subprogramul 2.2	<ul style="list-style-type: none"> - creșterea ofertei de servicii de informare și brokeraj tehnologic; - asistență pentru capacitate administrativă și gestionarea proprietății intelectuale.
Subprogramul 3.1	<ul style="list-style-type: none"> - cooperarea bilaterală sau multilaterală în domeniul cercetării științifice; - consolidarea sistemului național de CDI prin intensificarea cooperării internaționale - lansarea de apeluri tematice comune în parteneriat cu alte țări, activități comune de cercetare, echipele de cercetare mixte, în vederea accesării altor fonduri disponibile din programele de cercetare-dezvoltare la nivel internațional.
Subprogramul 3.2	<ul style="list-style-type: none"> - sprijinirea participării la proiectele din cadrul Orizont 2020; - consolidarea sistemului național de CDI prin intensificarea colaborării în cercetarea europeană de excelență; - creșterea vizibilității României în domeniul cercetării și inovării.

Subprogram	Obiectivele programului
Subprogramul 3.3	<ul style="list-style-type: none"> - integrarea cercetării românești în spațiul european al cercetării în domeniile abordate de Inițiativele de Programare Comună (Joint Programming Initiatives - JPI); - participarea organizațiilor de cercetare românești la identificarea de soluții/măsuri comune pentru provocările societale ce afectează în mod diferit comunitățile europene.
Subprogramul 3.4	<ul style="list-style-type: none"> - sprijinirea participării entităților din România la inițiativele tehnologice comune; - crearea unor condiții favorabile investițiilor în domeniul cunoașterii și al inovației la nivel național, pentru a stimula competitivitatea la nivel european, creșterea economică și ocuparea forței de muncă.
Subprogramul 3.5	<ul style="list-style-type: none"> - susținerea participării românești la inițiativele europene și internaționale: EUREKA, EUROSTARS, NATO, art. 185 al TFUE și altele asemenea; - stimularea performanțelor tehnologice și economice ale companiilor românești, prin finanțarea acelor entități care au capacitatea de a transforma idei în produse și tehnologii inovative cu potențial de piață real; - realizarea de către operatorii economici a unor produse și tehnologii noi, care au la bază rezultate ale cercetării și care prezintă potențial de exploatare comercială pe piața internă și internațională; - stimularea IMM-urilor de a considera inovarea drept o strategie de dezvoltare, atât prin dezvoltarea de capacități proprii de cercetare, cât și prin accesarea facilităților experimentale disponibile în entitățile de cercetare din România; - susținerea cooperării dintre organizații de cercetare și industrie, astfel încât acestea să colaboreze în toate etapele, respectiv: idee, concept, proiectare, model experimental, prototip, testare, proiectare tehnologică, producție de serie, promovare, marketing și vânzare de produse inovative cu valoare adăugată mare; - întărirea și consolidarea capacității de inovare a întreprinderilor pentru crearea de noi produse/sisteme/tehnologii/bazate pe valorificarea rezultatelor cercetării.
Subprogramul 3.6	<ul style="list-style-type: none"> - sprijin pentru formarea de consorții cu parteneri internaționali; - stimularea participării și susținerea reprezentării României în organizații, programe și inițiative internaționale de cercetare (de exemplu, la Orizont 2020, EUREKA, NATO, COST, EIT, EIP, JPI, JTI etc.).
Programul 4 nu este structurat pe subprograme	
Subprogramul 5.1	<ul style="list-style-type: none"> - dezvoltarea activităților de cercetare-dezvoltare-inovare în domeniile specifice fizicii nucleare și aplicațiilor cu lasere de mare putere și fascicule gamma foarte intense, în corelare cu programul științific al viitoarei infrastructuri paneuropene de cercetare ELI-NP, descris în cadrul ELI-NP White Book; - pregătirea programelor de experimente pentru ELI-NP: pregătirea tehnică (inclusiv proiectare) și organizatorică a experimentelor respective, în acord cu cerințele incluse în cadrul ELI-NP White Book; - formarea de competențe științifice și tehnice necesare derulării experimentelor și stimularea formării noilor generații de cercetători și a echipelor de cercetare specializate pe domeniile și tematicile de cercetare dezvoltate în cadrul ELI-NP; - derularea de teste și experimente științifice relevante la echipamente și infrastructuri din domeniile vizate, accesibile în prezent; - dezvoltarea cooperării și parteneriatelor pe plan național și internațional în domeniile de interes pentru programul științific ELI-NP.

Subprogram	Obiectivele programului
Subprogramul 5.2	<ul style="list-style-type: none"> - creșterea vizibilității cercetării românești prin participarea la organisme și programele internaționale de cercetare în domeniul nuclear și al particulelor elementare; - întărirea cooperării științifice și industriale, a transferului de cunoștințe și tehnologii de vârf, la nivel european și internațional, în domeniul nuclear și al particulelor elementare; - promovarea inovării industriale în sectorul energiei nucleare; - obținerea de tehnologii nucleare prin întărirea colaborării dintre România (prin Institutul de Fizică Atomică - IFA București) și organizații partenere la nivel internațional (de exemplu, CEA din Franța); - asigurarea unei platforme de comunicare eficientă între instituțiile de cercetare, învățământ, industriale și economice din România și organisme internaționale de cercetare în domeniul nuclear și al particulelor elementare.
Subprogramul 5.3	<p>Programul STAR pentru susținerea participării la programele și activitățile Agenției Spațiale Europene este inițiat, aprobat și aflat în implementare pentru perioada 2012-2019, conform prevederilor art. 6 alin. (1) din Legea nr. 262/2011, și se va susține și în actualul ciclu de planificare strategică și de finanțare multianuală, până în anul 2019. În conformitate cu prevederile art. 6 alin. (2) din Legea nr. 262/2011, ROSA asigură conducerea programului, implementarea acestuia fiind făcută cu instrumentele specifice stabilite prin ordine și instrucțiuni emise de către autoritatea de stat pentru cercetare-dezvoltare.</p>
Subprogramul 5.4	<ul style="list-style-type: none"> - dezvoltarea activităților de cercetare-dezvoltare-inovare, în vederea întăririi competențelor în domeniile specifice studiului sistemelor fluvii-delte-mări, în corelare cu cerințele viitoarei infrastructuri paneuropene DANUBIUS-RI (Centrul internațional pentru cercetări avansate "Fluvii, Delte, Mări «Danubius»"); - pregătirea programelor de cercetare-dezvoltare-inovare care se vor derula în cadrul viitoarei infrastructuri paneuropene DANUBIUS-RI; - creșterea potențialului științific românesc prin infrastructura paneuropeană DANUBIUS-RI, prin proiecte de cercetare și activități-suport derulate cu alte organizații membre din România sau alte țări membre ale UE; - dezvoltarea cooperării cu organizații de cercetare științifică, organizații de învățământ superior și utilizatori din consorțiul DANUBIUS-RI și din afara lui, din Uniunea Europeană și din alte zone geografice, în vederea realizării de noi sisteme de management durabil și adaptativ al ecosistemelor fluvii-delte-mări pentru a asigura dezvoltarea socioeconomică a acestor regiuni, incluzând și utilizarea rațională a resurselor naturale biologice, geologice și energetice, convenționale sau neconvenționale, în condițiile schimbărilor climatice globale, precum și pentru creșterea vizibilității internaționale; - asigurarea comunicării între instituțiile de cercetare, învățământ, industriale și economice din România și organisme internaționale de cercetare în domeniile specifice sistemelor fluvii-delte-mări.

Sursa: Hotărârea nr. 583 din 22 iulie 2015 pentru aprobarea Planului național de cercetare-dezvoltare și inovare pentru perioada 2015-2020 (PNCDI III)

Programele cuprinse în Planul național, aprobat prin hotărâre a Guvernului, se evaluează și se detaliază anual de către autoritatea de stat pentru cercetare-dezvoltare. Planurile sectoriale în domeniul cercetării-dezvoltării conțin programe și proiecte de interes prioritar pentru domeniul respectiv, sunt aprobate prin ordin al ordonatorilor principali de credite și se finanțează din bugetul acestora. Programele și proiectele din planurile sectoriale sunt avizate de autoritatea de stat pentru cercetare-dezvoltare.

Eficiența programelor dezvoltate în sfera competitivității economice bazată pe cercetare științifică și progres tehnologic în scopul creșterii calității vieții, va fi evaluată prin indicatorii de rezultat și de impact estimați în PNCDI III:

- a) Indicatori de rezultat:
 - Locuri de muncă în cercetare finanțate (ENI);

- Produse/Tehnologii/Metode/Servicii noi sau semnificativ îmbunătățite realizate (număr, pe categorii) și transferate în mediul economic (număr, pe categorii);
- Brevete solicitate la nivel național și internațional (număr);
- Alte forme de DPI solicitate: desene, mărci (număr);
- Articole științifice publicate în reviste și volume indexate (număr);
- Copublicații (număr);
- Infrastructuri CDI de interes național, european sau regional (număr, pe categorii; valoare totală investiții, pe categorii; valoare finanțată de la buget/atrasă prin cofinanțare în total investiție, valori totale pe categorii);
- Număr de întreprinderi, din care IMM, participante la programele din plan;
- Număr de firme lansate (start-up, spin-off) susținute prin plan;
- Număr de clustere inovative promovate;
- Număr de proiecte în programe finanțate de Comisia Europeană (număr, pe programe);
- Entități de inovare și transfer tehnologic susținute prin plan (număr, pe categorii);
- Mobilități susținute prin plan (om x lună);
- Valoarea fondurilor publice (buget de stat) investite anual în PNCDI III;
- Valoarea fondurilor private investite anual de întreprinderi în PNCDI III;
- Valoarea contribuției Comisiei Europene pentru participanții din România (valoare totală, pe programe);
- Pondere fonduri externe în total buget plan (%).

b) Indicatori de impact

- Cercetători (/1.000 persoane civile);
- Cercetători (/1.000 persoane civile angajate);
- Investiție publică totală anuală în cercetare-dezvoltare (GovERD: valoare, % PIB);
- Investiții totale anuale în cercetare-dezvoltare ale întreprinderilor (BERD: valoare, % PIB);
- Pondere IMM-uri inovatoare (număr, % din total);
- Cheltuieli de cercetare-dezvoltare ale întreprinderilor (% mediu în total cheltuieli);
- Cheltuieli de inovare ale întreprinderilor (% mediu în total cheltuieli);
- Copublicații (număr/1 milion locuitori);
- Organizații de cercetare din România prezente în clasamente internaționale (număr);
- Jurnale științifice românești indexate în clasamente internaționale (număr);
- Angajați în domenii "knowledge-intensive" din total angajați de 15-64 de ani (%);
- Pondere produse "hi-tech" și "medium-tech" în balanța comerțului exterior (%);

Programele prevăzute în PNCDI III pot include instrumente financiare destinate obținerii unor rezultate de prestigiu, precum și valorificării acestora, inclusiv prin parteneriat internațional, așa cum sunt prevăzute în Tabelul nr. 15.

Tabel 15. Indicatori de rezultat ai programelor componente ale Planului Național de Cercetare, Dezvoltare și Inovare 2015-2020

Program	Indicatori de rezultat ai programului
Programul 1	<ul style="list-style-type: none"> - articole științifice publicate în reviste și volume indexate (număr); - brevete solicitate la nivel național și internațional (număr); - recunoașteri internaționale la nivel individual (premii internaționale, număr); - doctoranzi (număr de absolvenți); - burse postdoctorale (număr); - locuri de muncă în cercetare susținute prin plan (ENI); - mobilități susținute prin program (om x lună); - investiții în infrastructuri CDI de interes european sau regional localizate în România (lei, pondere în valoare atrasă prin cofinanțare în totalul investiției); - ponderea veniturilor din servicii CD furnizate în totalul necesar funcționării unei instalații (ultimii 4 ani, total); - evenimente de comunicare și popularizarea științei susținute prin program (număr); - instituții finanțate care și-au crescut sau menținut nivelul de certificare CDI (număr); - produse/tehnologii/metode/sisteme/servicii noi sau semnificativ îmbunătățite.
Programul 2	<ul style="list-style-type: none"> - locuri de muncă în cercetare susținute prin program (ENI); - creșterea valorii adăugate brute în întreprindere sau în regiune (%); - ponderea cheltuielilor de cercetare-dezvoltare în total cheltuieli; - ponderea cheltuielilor de cercetare-dezvoltare ale sectorului privat în totalul cheltuielilor de cercetare-dezvoltare; - brevete solicitate la nivel național și internațional (număr); - număr de întreprinderi nou-create (pe tipuri); - productivitatea întreprinderii/sector (mii lei/ENI); - produse/tehnologii/metode/servicii noi sau semnificativ îmbunătățite realizate (număr, pe categorii) și transferate în mediul economic (număr, pe categorii)
Programul 3	<ul style="list-style-type: none"> - valoarea contribuției externe pentru participanții din România; - ponderea finanțării externe în totalul cheltuielilor de cercetare-dezvoltare; - ponderea cheltuielilor de cercetare-dezvoltare a sectorului privat în totalul cheltuielilor de cercetare-dezvoltare în proiecte internaționale; - număr de proiecte internaționale cu participanți instituții românești; - număr de burse internaționale cofinanțate; - copublicații (număr); - brevete solicitate la nivel național și internațional, cu proprietari români (număr); - alte forme de DPI cu proprietari români solicitate: desene, mărci (număr); - publicații în cele mai citate 10% publicații din baze de date consacrate (număr); - locuri de muncă în cercetare susținute prin plan (ENI); - apeluri comune la care participă România (număr); - număr "start-up"-uri înființate prin program (JTI).
Programul 4	<ul style="list-style-type: none"> - articole științifice publicate în reviste și volume indexate (număr); - brevete solicitate la nivel național și internațional (număr); - copublicații (număr); - articole publicate în top 10% cele mai citate publicații (număr); - alte forme de DPI solicitate: desene, mărci (număr); - locuri de muncă cercetători susținute prin program (ENI); - rata de succes la programele de cercetare de frontieră ale Uniunii Europene (%);

Program	Indicatori de rezultat ai programului
Programul 5	<ul style="list-style-type: none"> - articole științifice publicate în reviste și volume indexate (număr); - copublicații (număr); - articole publicate în top 10% cele mai citate publicații (număr); - brevete solicitate la nivel național și internațional (număr); - alte forme de DPI solicitate: desene, mărci în domeniul strategic (număr); - rata de recuperare a contribuției obligatorii naționale (%); - companii naționale aflate în lanțul de furnizori pentru marii integratori de produse (număr); - număr de posturi cercetători echivalent normă întreagă (ENI) susținute; - rată de succes la programele de cercetare de frontieră UE (%); - productivitate sector strategic (mii lei/ENI); - rata de recuperare a contribuției obligatorii și stadii intermediare (%); - număr de nișe CDI identificate; - proiecte realizate în cadrul programelor/experimentelor dezvoltate la marile infrastructuri de cercetare din domeniul atomic, subatomic și al energiilor ultra-înalte la care participă România (de exemplu: ELI, CERN, ITER, FAIR etc.) (număr, valori totale, pe program/experiment); - număr de programe opționale ESA la care participă România; - număr de misiuni spațiale ESA cu participare națională; - număr de experimente și sarcini utile îmbarcabile la bordul misiunilor ESA; - număr de proiecte realizate în parteneriat internațional în domeniile de profil (număr, valori totale, pe domenii); - număr de centre de profil înființate; - număr de organizații de cercetare și entități din industrie participante la program; - număr de companii naționale aflate în lanțul de furnizori pentru marii integratori de produse din domeniile de profil; - număr de activități comerciale sustenabile, pentru servicii și aplicații în domeniile de profil; - număr de cursuri de instruire sau de perfecționare realizate.

Sursa: Hotărârea nr. 583 din 22 iulie 2015 pentru aprobarea Planului național de cercetare-dezvoltare și inovare pentru perioada 2015-2020 (PNCDI III)

Finanțării în sistem competițional, pe programe, a activităților de cercetare-dezvoltare și inovare presupune ca autoritatea de stat pentru cercetare-dezvoltare să elaboreze, să planifice și să execute:

- a) bugetul multianual total, necesar realizării Planului național, detaliat pe programele componente, care se aprobă prin hotărâre a Guvernului o dată cu aprobarea Planului național;
- b) alocația bugetară anuală pentru Planul național, încadrată în limita bugetului multianual total aprobat, actualizat cu rata inflației, după caz, precum și în prevederile anuale ale bugetului de stat;
- c) plafonul anual de autorizare a angajării fondurilor pentru programele din Planul național, o dată cu legea bugetului de stat;
- d) alocațiile bugetare anuale pentru alte programe sau sisteme de finanțare competițională care nu se includ în Planul național;
- e) alocațiile bugetare anuale pentru alte categorii de cheltuieli

Alocația bugetară anuală pentru Planul național se constituie ca buget anual de plăți și se detaliază pe programele în derulare sau care se lansează în anul respectiv, în funcție de necesarul de plăți estimat pentru fiecare program. Stabilirea bugetelor anuale de plăți pentru programele din Planul național, în conformitate cu legile bugetare anuale, se face prin ordin al conducătorului autorității de stat pentru cercetare-dezvoltare, după aprobarea prin lege a bugetului de stat.

Categoriile de cheltuieli care pot fi efectuate se stabilesc astfel încât să se asigure corespondența cu cele stabilite în cadrul programelor internaționale la care România este parte. Din fondurile alocate autorității de stat pentru cercetare-dezvoltare de la bugetul de stat pentru activitatea de cercetare se pot finanța și următoarele categorii de cheltuieli:

- a) cheltuieli pentru participarea și reprezentarea în cadrul programelor internaționale din domeniul cercetării și inovării, inclusiv la activitățile de coordonare și corelare a acestora;
- b) cheltuieli pentru funcționarea organismelor consultative de nivel național pentru cercetare-dezvoltare și inovare și a comisiilor organizate de acestea;
- c) cheltuieli pentru premierea unor realizări deosebite în domeniul științei și tehnologiei, ale căror quantum și număr se aprobă prin hotărâre a Guvernului, la propunerea autorității de stat pentru cercetare-dezvoltare;
- d) cheltuieli pentru întreținerea, exploatarea, funcționarea și paza instalațiilor și obiectivelor speciale de interes național;
- e) cheltuieli pentru informare și documentare;
- f) cheltuieli pentru subvenționarea literaturii tehnico-științifice;
- g) cheltuieli pentru cotizarea, reprezentarea și participarea la activitățile organismelor, organizațiilor și instituțiilor internaționale de profil;
- h) cheltuieli pentru organizarea de manifestări tehnico-științifice;
- i) cheltuieli pentru organizarea de târguri și expoziții tehnico-științifice interne și internaționale;
- j) cheltuieli pentru burse de cercetare;
- k) cheltuieli pentru mobilitatea specialiștilor din sistemul de cercetare-dezvoltare de interes național.
- l) cheltuieli pentru demontarea și/sau dezafectarea instalațiilor de cercetare-dezvoltare;
- m) cheltuieli pentru reparații curente, reparații capitale și consolidări ale bunurilor proprietate a statului, aflate în administrarea unităților de cercetare-dezvoltare

Pentru a sprijini realizarea politicilor de cercetare-dezvoltare și de stimulare a inovării, autoritatea de stat pentru cercetare-dezvoltare prevede anual în bugetul propriu și sume necesare contractării unor servicii de consultanță și expertiză, pentru realizarea de studii, analize, monitorizări, evaluări, precum și pentru activități similare ce țin de atribuțiile autorității de stat pentru cercetare-dezvoltare, evaluarea și controlul conducerii programelor/proiectelor, organizarea de seminarii și mese rotunde, acțiuni promoționale, de imagine și diseminare de informații, traduceri și altele asemenea

În mod concret, tipurile de proiecte pentru care se vor organiza competiții în vederea finanțării subprogramelor PNCDI III sunt sintetizate în Tabelul nr. 16.

Tabel 16. Tipuri de proiecte finanțate în cadrul subprogramelor componente ale Planului Național de Cercetare, Dezvoltare și Inovare 2015-2020

Subprogram	Tipuri de proiecte
Subprogramul 1.1	<ul style="list-style-type: none"> - proiecte de cercetare pentru doctorat/postdoctorat, inclusiv pentru doctorat industrial; - proiecte de cercetare pentru stimularea tinerelor echipe independente; - proiecte complexe de reintegrare a cercetătorilor din diaspora; - burse pentru cercetători debutanți; - proiecte de mobilitate a cercetătorilor; - premiere rezultate cercetare.
Subprogramul 1.2	<ul style="list-style-type: none"> - proiecte de dezvoltare instituțională; - proiecte suport.
Subprogramul 1.3	<ul style="list-style-type: none"> - proiecte de investiții în infrastructuri de cercetare-dezvoltare (de interes regional, național, paneuropean); - proiecte de investiții în infrastructuri de cercetare-dezvoltare complementare (cu cele existente local); - proiecte de integrare și conectare a rețelelor naționale la infrastructuri de cercetare-dezvoltare similare și/sau complementare internaționale
Subprogramul 1.4	<ul style="list-style-type: none"> - centre de competență (proiecte de specializare pe domenii științifice și tehnologice și domeniile suport asociate: politici CDI, proprietate intelectuală, transfer tehnologic, brokeri de tehnologii, comercializare etc.); - proiecte de achiziții - modernizare și informatizare capacitate administrativă pentru managementul activității de CD; - proiecte suport pentru fundamentarea politicilor de CDI, pentru informare-documentare științifică, pentru comunicarea și popularizarea științei.
Subprogramul 2.1	<ul style="list-style-type: none"> - proiect experimental-demonstrativ (demonstrare concept) - sprijin pentru realizarea de modele/soluții pentru produse/tehnologii/metode/sisteme/servicii noi sau semnificativ îmbunătățite. Se concretizează prin modele experimentale, modele funcționale, tehnologii de laborator etc.; - proiect de dezvoltare experimentală - sprijin pentru realizarea proiectelor pentru execuția de prototipuri/instalații-pilot etc. (echivalent: planuri de lucrări, planuri de implementare etc.); se concretizează prin realizarea documentațiilor tehnice de execuție pentru prototipuri/instalații-pilot etc.; - proiect de transfer la operatorul economic - sprijin pentru cercetare externalizată, în parteneriat cu organizații de cercetare publice, pentru elaborarea/fabricarea de prototipuri/instalații-pilot etc., pentru produse/tehnologii/metode/servicii noi sau semnificativ îmbunătățite (sau echivalente pentru planuri de lucrări, planuri de dezvoltare etc.); se concretizează prin omologarea de prototipuri/instalații-pilot etc. premergătoare seriei zero; - proiect de valorificare la operatorul economic - sprijin pentru cercetarea externalizată, în parteneriat cu organizații de cercetare publice, pentru punerea în fabricație/aplicare/operare a produselor/tehnologiilor/metodelor/sistemelor noi la operatorul economic sau alte categorii de beneficiari (de exemplu, organisme ale administrației publice, organizații publice etc.); pentru lucrări echivalente (planuri de lucrări, planuri de dezvoltare etc.) se va urmări autorizarea execuției acestora; - cecuri de inovare - sprijin pentru facilitarea achiziționării de servicii de cercetare-dezvoltare și inovare de la organizații publice de cercetare; rezultatul este cel puțin la nivel de model experimental; - soluții - oferă soluții sub formă de bun (produs/serviciu/proces de fabricație) inovator, ca răspuns la necesitatea identificată în sectorul public (achiziții publice pentru inovare). Soluția este dată de către conducătorul consorțiului (organizația publică de cercetare) la o problemă ridicată de administrația publică. Tema se definește pe baza unui dialog la nivelul entităților publice comanditate. Proiectele se

Subprogram	Tipuri de proiecte
	<p>segmentează în faze (explorare, dezvoltare, testare funcțională, fezabilitate acceptabilitate);</p> <ul style="list-style-type: none"> - utilizare infrastructură CD - instalații - sprijin pentru utilizarea infrastructurilor de cercetare existente pentru absorbția, asimilarea și adaptarea bunului (produs/serviciu/proces de fabricație) inovativ la nevoile pieței deservite, prin parteneriat cu organizațiile de cercetare care dețin/administrează instalații/laboratoare de cercetare; - compartiment CD în întreprinderi - sprijin pentru constituirea de compartimente de cercetare-dezvoltare proprii pentru absorbția, asimilarea și adaptarea bunului (produs/serviciu/proces de fabricație) inovativ la nevoile pieței deservite, prin mobilități (detașare) de cercetători în întreprinderi; - platforme tehnologice - din organizații de cercetare, industriale și academice, cu scopul de stabili agende de CDI comune, în domeniile prioritare ale PNCDI III; - interconectare - sprijin pentru interconectarea funcțională a companiilor și a organizațiilor de cercetare și inovare din cadrul clusterului, prin promovarea utilizării în comun a echipamentelor și a schimbului de cunoștințe de specialitate, în scopul formării lanțului de aprovizionare complet în cadrul sectorului industrial specific; - centru de competență - atragerea cercetătorilor pentru cercetări de frontieră. Activitățile se desfășoară în universități sau institute de cercetare-dezvoltare selectate pe bază de competiție (criteriile-cheie de selecție includ perspectivele domeniilor propuse, condițiile de găzduire și acordurile de acces la diverse infrastructuri de cercetare din țară, iar finanțarea susține asigurarea costurilor curente, a celor cu personalul permanent și a programului de burse internaționale); - organizare și dezvoltare cluster - management pentru organizarea, reprezentarea și promovarea clusterului, dialog profesional și social, cu scopul de a corela și orienta eforturile operatorilor economici și ale comunității de cercetare științifică ("triple helix") din domeniile de profil, ale utilizatorilor-țintă, precum și ale administrației publice locale, în direcția consolidării clusterelor, prin stabilirea obiectivelor CDI comune și dezvoltarea planurilor de implementare asociate, bazate pe utilizarea în comun a resurselor; - concursuri - pentru antrenarea tinerilor în activități de cercetare industrială și încurajarea antreprenoriatului.
Subprogramul 2.2	<ul style="list-style-type: none"> - oficiu de legătură cu industria - crearea sau modernizarea unui oficiu pentru brokeraj tehnologic; - centru de informare tehnologică - crearea sau modernizarea unei infrastructuri de CDI care desfășoară activități de diseminare și brokeraj tehnologic în scopul stimulării valorificării rezultatelor CDI.
Subprogramul 3.1	<ul style="list-style-type: none"> - proiecte complexe - domeniile de cooperare științifică și tipul activităților derulate în comun sunt stabilite pe o perioadă determinată în cadrul documentelor încheiate la nivelul autorităților de stat responsabile cu activitatea de cercetare-dezvoltare; - proiecte de mobilități - mobilitățile în cadrul proiectelor comune (deplasări și primiri) sunt finanțate conform prevederilor și limitelor stabilite prin documentele încheiate cu țările partenere.
Subprogramul 3.2	<ul style="list-style-type: none"> - proiecte de sprijin pentru participarea la proiecte Orizont 2020 (de exemplu, Marie Curie COFUND și altele); - proiecte ERA-NET.
Subprogramul 3.3	<ul style="list-style-type: none"> - proiecte CDI - proiecte selectate în vederea finanțării în urma apelurilor comune; - proiecte-suport.
Subprogramul 3.4	<ul style="list-style-type: none"> - proiecte demonstrative, integrate, inovative ale întreprinderii comune - se desfășoară, de regulă, pe întreaga durată a întreprinderii comune, la care entitățile juridice participă în calitate de "membri", "asociați", "parteneri principali" etc. selectați în urma unei cereri de participare/apeluri specifice;

Subprogram	Tipuri de proiecte
	- proiecte de CDI și suport specifice - se derulează, de regulă, pe o perioadă limitată, fiind selectate de întreprinderea comună în urma unor apeluri deschise și competiții de propuneri.
Subprogramul 3.5	- Proiect EUREKA tradițional; - Proiect EUREKA-Cluster; - Proiect EUROSTARS; - Proiecte NATO-STO (Science and Technology Organization); - Proiecte NATO-SPS (Science for Peace and Security); - proiecte specifice așa cum sunt prevăzute în programele europene în baza art. 185 al TFUE.
Subprogramul 3.6	- proiecte-suport pentru participarea reprezentanților României la reuniuni ale organizațiilor, organismelor și inițiativelor europene și internaționale; - proiecte-suport pentru organizarea în România a unor reuniuni ale organizațiilor, organismelor și inițiativelor europene și internaționale de cercetare în care România este reprezentată; - proiecte-suport pentru organizarea sau participarea la activități pregătitoare în vederea formării de consorții pentru depunerea de noi proiecte europene (Orizont 2020); - proiecte-suport pentru stimularea participării la inițiative paneuropene și internaționale CDI, inclusiv la parteneriatele europene pentru inovare (EIP, JPI); - premii - acordate participanților români în proiecte Orizont 2020 în calitate de responsabili de pachete de lucru și/sau coordonatori de proiecte.
Programul 4	- proiecte de cercetare fundamentală; - școală de studii avansate; - proiecte de cercetare de frontieră - instrument de susținere a rezultatelor științifice cu potențial aplicativ, pentru accelerarea transformării în tehnologii noi, cu valoare economică sau socială; - proiecte complexe de cercetare de frontieră (inclusiv ERC-like, cu menținerea instituției gazde românești și a bugetului propus, condiție de păstrare a valabilității evaluării ERC); - "Workshop"-uri exploratorii - destinate identificării nișelor de cercetare.
Subprogramul 5.1	- proiecte de cercetare-dezvoltare-inovare; - experimente, modelări, măsurători sau analize specifice (neincluse în categoria proiecte CDI); - proiecte-suport pentru cercetare; - proiecte-suport de management.
Subprogramul 5.2	- proiecte de cercetare-dezvoltare (F4E, CERN-RO, FAIR-RO, CEA-RO etc.); - proiecte de cercetare-dezvoltare - proiecte finanțate mixt de la bugetul de stat și de organizații partenere la nivel internațional (de exemplu, CEA); - proiecte-suport de management (F4E, CEA-IFA, altele similare).
Subprogramul 5.3	- proiecte de cercetare, dezvoltare și inovare pentru tehnologie spațială și cercetare avansată – STAR.
Subprogramul 5.4	- proiecte de cercetare-dezvoltare-inovare; - experimente, modelări, măsurători sau analize specifice (neincluse în categoria proiecte CDI); - proiecte-suport pentru cercetare; - proiecte-suport de management.

Sursa: Hotărârea nr. 583 din 22 iulie 2015 pentru aprobarea Planului național de cercetare-dezvoltare și inovare pentru perioada 2015-2020 (PNCDI III)

Atribuirea contractelor de finanțare pentru conducerea și execuția de proiecte de cercetare-dezvoltare și inovare se realizează în condițiile și cu respectarea prevederilor Ordonanței Guvernului nr. 57/2002, aprobată cu modificări și completări prin Legea nr. 324/2003, cu modificările și completările ulterioare, ale Hotărârii Guvernului nr. 1.265/2004, cu modificările și completările ulterioare, și ale Ordonanței de urgență a Guvernului nr. 34/2006 privind atribuirea contractelor de achiziție publică, a contractelor de concesiune de lucrări publice și a contractelor de concesiune de servicii, aprobată cu modificări și completări prin Legea nr. 337/2006, cu modificările și completările ulterioare.

Mecanismul de alocare a fondurilor de la bugetul de stat pentru PN CDI III intră în atribuțiile autorității de stat pentru cercetare-dezvoltare, care stabilește plafoanele de angajare a fondurilor bugetare pe programele componente ale PNCDI III și, după caz, pe subprograme și domenii prioritare, pe perioade multianuale, cu încadrarea în bugetele anuale aprobate.

Alocarea fondurilor de la bugetul de stat pentru PNCDI III se face cu respectarea prevederilor următoare (HG. 383/2015):

- a) prevederile stabilite prin Ordonanța Guvernului nr. 57/2002, aprobată cu modificări și completări prin Legea nr. 324/2003, cu modificările și completările ulterioare;
- b) sumele alocate de la bugetul de stat pentru finanțarea PNCDI III și a programelor componente se repartizează astfel:
 - minimum 95% pentru finanțarea activităților, derulate prin proiecte CDI, în scopul realizării obiectivelor planului. Finanțarea se realizează prin contracte de finanțare având ca obiect finanțarea realizării activităților din cadrul proiectului;
 - maximum 5% pentru conducerea PNCDI III și a programelor componente. Pentru conducerea PNCDI III, autoritatea de stat pentru cercetare-dezvoltare efectuează cheltuieli pentru:
 - promovarea la nivel național și regional a PNCDI III și a programelor componente, prin editarea de materiale promoționale, publicitate, organizarea și/sau participarea la seminare dedicate, sesiuni de instruire a evaluatorilor și altele asemenea;
 - tariful aferent serviciilor specifice necesare conducerii programelor componente;
 - participarea la acțiuni și activități organizate de Comisia Europeană și statele membre, care sunt în acord cu scopul și obiectivele PNCDI III și ale programelor componente, în conformitate cu reglementările legale în vigoare;
 - servicii de consultanță, expertiză, asistență tehnică și dotări independente necesare pentru coordonarea și controlul implementării programelor componente și evaluarea PNCDI III;
- c) autoritatea de stat pentru cercetare-dezvoltare stabilește modalitățile de plată și cuantumurile sumelor reprezentând indemnizații, cheltuieli de diurnă și transport, precum și alte cheltuieli necesare pentru activitățile de evaluare independentă realizate de experții individuali, inclusiv din străinătate, selectați de autoritatea de stat pentru cercetare-dezvoltare sau de entitățile care asigură conducerea programelor componente, în condițiile legii;
- d) selecția experților evaluatori se face potrivit procedurilor stabilite prin pachetul de informații pentru programul/subprogramul în cauză, având la bază principiile și procedurile de bună practică utilizate la nivel internațional, din lista de experți evaluatori constituită pentru competiție. Anual, fiecare conducător de program face publică, pe pagina web proprie, lista cuprinzând numele experților folosiți pentru evaluarea proiectelor de la competițiile din anul precedent;

- e) cheltuielile eligibile care pot fi angajate din bugetul alocat proiectelor finanțate în cadrul programelor componente ale PNCDI III respectă reglementările în vigoare privind stabilirea categoriilor de cheltuieli pentru activități de cercetare-dezvoltare și de stimulare a inovării, finanțate de la bugetul de stat.

**Tabel 17. Modelul investițional asociat
Planului Național de Cercetare, Dezvoltare și Inovare 2015-2020**

Programul	Nivelul de ajustare a bugetului unui program
- Programul 1: Dezvoltarea sistemului de cercetare-dezvoltare	minimum 35% din bugetul anual alocat pentru PNCDI III;
- Programul 2: Creșterea competitivității economiei românești prin cercetare, dezvoltare și inovare	minimum 10% din bugetul anual alocat pentru PNCDI III;
- Programul 3: Cooperare europeană și internațională	maximum 20% din bugetul anual alocat pentru PNCDI III;
- Programul 4: Cercetare fundamentală și de frontieră	minimum 15% din bugetul anual alocat pentru PNCDI III;
- Programul 5: Cercetare în domenii de interes strategic	maximum 20% din bugetul anual alocat pentru PNCDI III.

Sursa: Hotărârea nr. 583 din 22 iulie 2015 pentru aprobarea Planului național de cercetare-dezvoltare și inovare pentru perioada 2015-2020 (PNCDI III)

Potrivit HG 134/2011 categoriile de cheltuieli pentru activități de cercetare-dezvoltare și de stimulare a inovării, care pot fi finanțate de la bugetul de stat, sunt următoarele:

- cheltuieli cu personalul care cuprind salarii și venituri asimilate salariilor, respectiv contribuții aferente salariilor și veniturilor asimilate acestora, potrivit legii;
- cheltuieli cu logistica, care cuprind cheltuieli de capital, cheltuieli privind stocurile și cheltuieli cu servicii executate de terți;
- cheltuieli de deplasare care includ transport, cazare, diurnal, taxe de participare la manifestări științifice și altele asemenea;
- asigurări de sănătate pentru deplasările în străinătate, taxe de viză și altele asemenea;
- cheltuieli indirecte (regie).

Plafoanele salariale pentru proiectele și acțiunile realizate în cadrul PNCDI III sunt prevăzute în tabelul nr. 18. limitele maxime stabilite în cadrul acestora fiind la venitul brut cumulativ obținut de o persoană, prin participarea la proiecte în cadrul PNCDI III.

Tabel 18. Plafoane costurile salariale directe la contractele de finanțare din fonduri bugetare alocate PNCDI III

Nr. crt.	Categoria de activități	Nivelul studiilor	Funcția/gradul profesional	Limita maximă în euro/(om x lună) (considerat la 1 ENI - echivalent normă întreagă)
1.	Activități ce presupun nivel înalt al creativității și/sau experiență și abilitate de conducere	superioare	CS I, CS II, IDT I, IDT II, profesor universitar, conferențiar universitar, membru în echipa de management, director program/proiect	4.300
2.	Activități ce presupun cunoașterea aprofundată a metodelor de analiză și sinteză, precum și abilități de utilizare a acestora	superioare	CS III, IDT III, CS, IDT, lector universitar, asistent universitar, șef program/proiect, responsabil juridic/tehnic/achiziții/financiar proiect	2.900
3.	Activități ce presupun cunoașterea metodelor de analiză și sinteză a metodelor de cercetării, precum și abilități de utilizare a acestora	superioare	Asistent de cercetare, doctorand, masterand	1.900
4.	Activități-suport	superioare sau medii	TI, TII, TIII, TS, altele	1.000

Sursa: Hotărârea nr. 583 din 22 iulie 2015 pentru aprobarea Planului național de cercetare-dezvoltare și inovare pentru perioada 2015-2020 (PNCDI III)

Obiectivul final al tuturor acestor programe vizează creșterea performanțelor CDI și îmbunătățirea eficienței în gestionarea fondurilor publice, beneficiind de o proiecție bugetară multianuală de până la 1% din PIB în anul 2020.

Tabel 19. Proiecția bugetară multianuală pentru finanțarea implementării Strategiei naționale pentru cercetare, dezvoltare și inovare 2014-2020

Proiecție	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Fonduri publice (% din PIB)	0,41	0,56	0,57	0,63	0,72	0,83	0,97
Fonduri publice (mii lei)	2.730.911	3.870.244	4.176.023	4.846.341	5.670.831	6.684.955	7.932.327
Din care fonduri publice pentru infrastructuri prioritare la nivelul Uniunii Europene	225.000	486.000	234.000	240.000	255.000	85.000	86.000

Sursa: Hotărârea nr. 929 din 21 octombrie 2014 privind aprobarea Strategiei naționale de cercetare dezvoltare și inovare 2014-2020

B. Programul Operațional “Competitivitate” - Axa Prioritară „Cercetare, dezvoltare tehnologică și inovare pentru susținerea afacerilor și competitivitate”;

În conformitate cu Decizia de punere în aplicare a comisiei din 19.12.2014 de aprobare a anumitor elemente din programul operațional „Competitivitate” pentru sprijinul din partea Fondului european de dezvoltare regională în temeiul obiectivului referitor la investițiile pentru creștere și locuri de muncă în România, *Programul Operațional Competitivitate* are alocat un buget de 1,58 mld euro, din care 1,33 mld euro finanțare nerambursabilă FEDR, respectiv un buget 952.571.099 euro (60% din POC) alocat pentru Axa prioritară 1: Cercetare, dezvoltare tehnologică și inovare în sprijinul competitivității economice și dezvoltării afacerilor (Axa prioritară 1 - CDI).

Axa prioritară 1 - CDI va sprijini domeniile de specializare inteligentă contribuind în mod direct la implementarea Strategiei Naționale de Cercetare-Dezvoltare Inovare 2014-2020 aprobată prin HG nr. 929/2014 și susține Acordului de Parteneriat 2014-2020, în special prin contribuția directă la realizarea obiectivului tematic 1 - Dezvoltarea cercetării, dezvoltării tehnologice și inovării.

Axa prioritară 1 – CDI se implementează de către Organismul Intermediar pentru Cercetare din cadrul Autorității Naționale pentru Cercetare Științifică și Inovare în baza Acordului de Delegare dintre Autoritatea de Management POC și Organismul Intermediar pentru Cercetare.

Tabel 20. Structura programatică a Axei prioritare 1 – Cercetare, dezvoltare tehnologică și inovare în sprijinul competitivității economice și dezvoltării afacerilor

Priorități de investiții	Obiective specifice	Acțiuni
PI1a: Îmbunătățirea infrastructurilor de C&I și a capacităților de excelență	1.1. Creșterea capacității științifice în domeniile de specializare inteligentă și sănătate	Acțiune 1.1.1: Mari infrastructuri de CD Acțiune 1.1.2: Dezvoltarea unor rețele de centre CD, coordonate la nivel național și racordate la rețele europene și internaționale de profil și asigurarea accesului cercetătorilor la publicații științifice și baze de date europene și internaționale
	1.2. Creșterea implicării în cercetarea la nivelul UE	Acțiune 1.1.3: Crearea de sinergii cu acțiunile de CDI ale programului-cadru ORIZONT 2020 al Uniunii Europene și alte programe CDI internaționale Acțiune 1.1.4: Atragerea de personal cu competențe avansate din străinătate pentru consolidarea capacității CD
PI1b: promovarea investițiilor în C&I, dezvoltarea de legături și sinergii între întreprinderi, centrele de cercetare și dezvoltare și învățământul superior	1.3. Creșterea investițiilor private în CDI	Acțiune 1.2.1: Stimularea cererii întreprinderilor pentru inovare prin proiecte de CDI derulate de întreprinderi individual sau în parteneriat cu institutele de CD și universități, în scopul inovării de procese și de produse în sectoarele economice care prezintă potențial de creștere Acțiune 1.2.2: Credite, garanții și măsuri de capital de risc în favoarea IMM-urilor inovative și a organizațiilor de cercetare care răspund cererilor de piață
	1.4. Creșterea transferului de cunoștințe, tehnologie și personal cu competențe CDI între mediul public de cercetare și cel privat	Acțiune 1.2.3: Parteneriate pentru transfer de cunoștințe

Sursa: Ghidul solicitantului, Programul Operațional Competitivitate 2014-2020, Axa prioritară 1 - Cercetare, dezvoltare tehnologică și inovare (CDI) în sprijinul competitivității economice și dezvoltării afacerilor

Programul Operațional Competitivitate - axa prioritară Cercetare, dezvoltare tehnologică și inovare pentru susținerea afacerilor și competitivitate va contribui la dezvoltarea colaborărilor și parteneriatelor public-public și public-privat, print-o serie de proiecte care se vor adresa întreprinderilor cu activitate în domeniul CD, clusterelor de inovare, întreprinderi inovatoare de tip start-up și spin-off și instituții publice de CD și universități.

Tabel 21. Tipuri de proiecte specifice Programului Operațional Competitivitate 2014-2020, Axa prioritară 1 - CDI

Tip proiect	Acțiunea	Categoriile de proiecte (activități) eligibile
Investiții pentru departamentele de CD ale întreprinderilor	Acțiunea 1.1.1	Proiecte de construcții pentru crearea de noi departamente de CD (centre/laboratoare de cercetare în cadrul întreprinderii) însoțite obligatoriu de achiziționarea de noi instrumente și echipamente, pentru extinderea ariei de activitate sau deschiderea de noi direcții de cercetare.
		Proiecte de modernizare, extindere, consolidare și schimbare de destinație a unui departament de CD existent însoțite obligatoriu de achiziționarea de noi instrumente și echipamente, pentru extinderea ariei de activitate sau deschiderea de noi direcții de cercetare.
		Proiecte de achiziție de echipamente și instrumente pentru cercetare. Pentru această categorie de proiecte sunt acceptate și lucrări exceptate de la autorizare (dacă este cazul).
Proiecte pentru cluster de inovare	Acțiunea 1.1.1	Investiții în facilități CD comune ale clusterului: <ul style="list-style-type: none"> - achiziționarea de teren; - construcție/modernizare/extindere/consolidare/modificare/schimbare destinație clădiri destinate unor institute/centre/laboratoare CD; - achiziționarea de active fixe corporale pentru CD: clădiri și/sau spații, instalații, utilaje, echipamente pentru cercetare-dezvoltare etc; - achiziționarea de active fixe necorporale pentru CD;
		Activități de inovare în cluster (eligibile dacă și numai dacă organizația clusterului și solicitantul, acolo unde acesta e o entitate diferită, respectă definiția IMM): <ul style="list-style-type: none"> - obținerea, validarea și protejarea brevetelor și altor active necorporale care aparțin organizației clusterului; - detașarea de personal cu înaltă calificare la solicitant; - achiziționarea de servicii de consultanță în domeniul inovării; - achiziționarea de servicii de sprijinire a inovării;
		Activități de exploatare a clusterului <ul style="list-style-type: none"> - animarea clusterului pentru a facilita colaborarea, schimbul de informații și furnizarea sau direcționarea serviciilor specializate și personalizate de sprijin pentru întreprinderi; - promovarea clusterului pentru a spori participarea unor noi întreprinderi sau organizații și pentru a beneficia de o mai mare vizibilitate; - gestionarea instalațiilor aparținând clusterului de inovare; - organizarea de programe de formare, de ateliere și de conferințe pentru a sprijini schimbul de cunoștințe și stabilirea de contacte, precum și cooperarea transnațională.
Proiecte pentru întreprinderi inovatoare de tip start-	Acțiunea 1.2.1	Activități de cercetare-dezvoltare (cercetare industrială și/sau dezvoltare experimentală);
		Achiziția de servicii pentru cercetare-dezvoltare (cercetare industrială și/sau dezvoltare experimentală);
		Achiziția de servicii de consultanță pentru inovare referitoare la: asistență tehnologică; transfer tehnologic; achiziția, protecția și comercializarea drepturilor de proprietate industrială; utilizarea standardelor;

Tip proiect	Acțiunea	Categoriile de proiecte (activități) eligibile
up și spin-off		Achiziția de servicii suport pentru inovare referitoare la: încercări și testări în laboratoare de specialitate; marcarea calității, testare și certificare; studii de piață;
		Activități de procurare de materii prime și materiale necesare realizării proiectului (pentru activități de cercetare dezvoltare și activități de introducere în producție și realizare produs/ proces/ tehnologie/ serviciu);
		Activități de informare și publicitate privind proiectul;
		Activități pentru înființarea și înregistrarea SPIN-OFF-urilor.
Proiecte pentru întreprinderi nouînființate inovatoare care vizează inovare de produs sau de proces	Acțiunea 1.2.1	Activitățile de cercetare industrială;
		Activitățile de dezvoltare experimentală;
		Activitățile de inovare;
		Activități pentru introducerea în producție a rezultatelor cercetării-dezvoltării;
Atragerea de personal cu competențe avansate din străinătate	Acțiunea 1.1.4	Activități de cercetare fundamentală;
		Activități de cercetare industrială;
		Activități de dezvoltare experimentală;
		Activități privind realizarea de studii de fezabilitate pregătitoare pentru activitățile CD;
		Activități pentru obținerea, validarea și protejarea drepturilor de proprietate industrială (numai pentru organizații de cercetare și IMM-uri);
		Activități de informare și publicitate pentru proiect (numai pentru organizații de cercetare);
Proiecte de investiții pentru instituții publice de CD/ universități	Acțiunea 1.1.1	Proiecte de construcții pentru crearea de noi departamente de CD (centre/laboratoare de cercetare în cadrul instituției) însoțite obligatoriu de achiziționarea de noi instrumente și echipamente, pentru extinderea ariei de activitate sau deschiderea de noi direcții de cercetare;
		Proiecte de modernizare, extindere, consolidare și schimbare de destinație a unui departament de CD existent însoțite obligatoriu de achiziționarea de noi instrumente și echipamente, pentru extinderea ariei de activitate sau deschiderea de noi direcții de cercetare;
		Proiecte de achiziție de echipamente și instrumente pentru cercetare. Pentru această categorie de proiecte sunt acceptate și lucrări exceptate de la autorizare (dacă este cazul).
Parteneriate pentru transfer de cunoștințe	Acțiunea 1.2.3	Activități pentru stimularea transferului de cunoștințe;
		Activități privind accesul întreprinderilor la facilitățile, instalațiile, echipamentele organizațiilor de cercetare pentru realizarea de analize, testări, experimente, caracterizări, etichetarea calității și certificare pentru dezvoltarea unor produse/tehnologii/metode noi sau îmbunătățite;
		Activități de transfer de abilități/competențe de cercetare-dezvoltare și de sprijinire a inovării;
		Activități de cercetare industrială și/sau dezvoltare experimentală realizate în colaborare efectivă cu o întreprindere;
		Activități de management de proiect (inclusiv activități de informare și publicitate privind proiectul).

Sursa: Ghidul solicitantului, Programul Operațional Competitivitate 2014-2020, Axa prioritară 1 - Cercetare, dezvoltare tehnologică și inovare (CDI) în sprijinul competitivității economice și dezvoltării afacerilor

Tabel 22. Valoarea finanțării pe tipuri de proiecte

Tip proiect	Buget alocat și condiții de finanțare
Investiții pentru departamentele de CD ale întreprinderilor	Valoarea finanțării publice nerambursabile, pentru un proiect, este cuprinsă între 4.500.000 lei și 90.000.000 lei
	Valoarea finanțării publice nerambursabile pe proiect nu va depăși: - 22.500.000 lei în Municipiul București; - 67.500.000 lei în regiunea Vest și județul Ilfov; - 90.000.000 lei în celelalte regiuni ale României (Sud Est, Nord Est, Nord Vest, Centru, Sud Muntenia, Sud Vest).
	Valoarea totală a proiectului (costuri eligibile și neeligibile) nu poate depăși 225.000.000 lei (50 milioane euro).
Proiecte pentru clustere de inovare	Valoarea finanțării publice nerambursabile, pentru un proiect, este cuprinsă între 4.500.000 lei și 30.000.000 lei (max. 20.000.000 lei dacă proiectul conține activități de inovare pentru cluster).
	Valoarea finanțării publice nerambursabile nu va depăși echivalentul în lei a 7.500.000 euro sau, în cazul în care proiectul conține activități de inovare pentru cluster, echivalentul în lei a 5.000.000 euro.
Proiecte pentru întreprinderi inovatoare de tip start-up și spin-off	Asistența financiară nerambursabilă pe proiect: max. 840.000,00 lei și nu poate depăși echivalentul în lei a 200.000,00 Euro, la data semnării contractului de finanțare, pe o perioadă de trei ani fiscali consecutivi, indiferent dacă ajutorul a fost acordat din surse naționale sau comunitare.
	Pentru beneficiarii care își desfășoară activitatea în sectorul transportului rutier, valoarea totală a asistenței financiare nerambursabile este de max. 420.000 lei și nu poate depăși echivalentul în lei a 100.000 Euro, la data semnării contractului de finanțare, pe o perioadă de trei ani fiscali consecutivi, indiferent dacă ajutorul a fost acordat din surse naționale sau comunitare.
	Valoarea grantului va reprezenta maxim 90% din valoarea totală a costurilor eligibile ale proiectului. Restul de 10% din costurile eligibile ale proiectului va reprezenta contribuția proprie a beneficiarului din fonduri private.
Proiecte pentru întreprinderi nou înființate inovatoare care vizează inovare de produs sau de proces	Asistența financiară nerambursabilă pe proiect: max. 4.500.000 lei (echivalentul în lei a 1 milion euro) pentru regiunea București-Ilfov și max. 6.750.000 lei (echivalentul în lei a 1,5 milioane euro) pentru celelalte regiuni ale României.
Atragerea de personal cu competențe avansate din străinătate	Valoarea asistenței financiare nerambursabile este de maximum 9.000.000 lei.
	Valoarea asistenței financiare nerambursabile acordate nu poate depăși echivalentul în lei a 2 milioane de euro.
Proiecte de investiții pentru instituții publice de CD/ universități	Valoarea finanțării publice nerambursabile, pentru un proiect, va fi cuprinsă între 4.500.000 lei și 90.000.000 lei.
	Valoarea totală a proiectului (costuri eligibile și neeligibile) nu poate depăși 225.000.000 lei (50 milioane euro).
Parteneriate pentru transfer de cunoștințe	Valoarea finanțării publice nerambursabile, pentru un proiect, este cuprinsă între 4.500.000 lei și 13.500.000 lei.

Sursa: Ghidul solicitantului, Programul Operațional Competitivitate 2014-2020, Axă prioritară 1 - Cercetare, dezvoltare tehnologică și inovare (CDI) în sprijinul competitivității economice și dezvoltării afacerilor

În Ghidul solicitantului specific Programului Operațional Competitivitate 2014-2020, Axa prioritară 1 - Cercetare, dezvoltare tehnologică și inovare (CDI) în sprijinul competitivității economice și dezvoltării afacerilor, se pot identifica detaliile privind finanțarea fiecărui tip de proiect, prezentarea generală a fiecărui tip de proiect, condițiile de eligibilitate a solicitanților, proiectelor, activităților și cheltuielilor, condițiile privind verificarea, evaluarea și selecția proiectelor lansate în competiție, respectiv o serie de indicații specifice privind completarea cererilor de finanțare pentru fiecare tip de proiect.

Finanțarea proiectelor în cadrul Programului Operațional Competitivitate 2014-2020 constituie ajutor de stat de CDI și se face în conformitate cu prevederile schemei de ajutor de stat ‘Finanțarea activităților cercetare-dezvoltare și inovare (Ordinul nr. 3822/2015), elaborată în conformitate cu Regulamentul 651/2014 al Comisiei de declarare a anumitor categorii de ajutor compatibile cu piața comună în aplicarea art. 107 și art. 108 din tratat (Regulament general de exceptare pe categorii).

Schema de ajutor de stat pentru cercetare-dezvoltare și inovare (CDI) „Finanțarea activităților de cercetare-dezvoltare și inovare și a investițiilor în CDI prin Programul Operațional Competitivitate” cuprinde următoarele categorii de ajutoare:

- (a) ajutoare pentru cercetare, dezvoltare și inovare;
- (b) ajutoare regionale pentru investiții;
- (c) ajutoare pentru accesul IMM-urilor la finanțare (ajutoare pentru întreprinderile nou-înființate).

Ajutorul se acordă sub formă de granturi (asistență financiară nerambursabilă în una sau mai multe tranșe). Plata ajutorului către beneficiarii schemei se poate face până la 31 decembrie 2023. Contractele de finanțare vor fi încheiate cel târziu până pe 31 decembrie 2020. Ajutorul de stat se acordă prin decontarea cheltuielilor eligibile conform contractului de finanțare, fără a depăși intensitatea ajutorului de stat aplicabilă.

Cererea de ajutor/finanțare conține cel puțin următoarele informații:

- denumirea întreprinderii și dimensiunea acesteia;
- descrierea proiectului, inclusiv data începerii și a încheierii acestuia;
- locul de desfășurare a proiectului;
- lista costurilor proiectului;
- valoarea finanțării publice (grantului) necesare pentru proiect.

Alte criterii de eligibilitate a proiectelor vizează următoarele:

- scopul și obiectivele proiectului să fie în conformitate cu unul sau mai multe din obiectivele specifice ale POC, precum și cu unul sau mai multe din obiectivele acțiunii așa cum sunt descrise în cererea (apelul) de proiecte;
- proiectul să fie derulat în România;
- dimensiunea finanțării nerambursabile solicitate să se încadreze în limitele menționate în cererea de proiecte;
- să conțină activități eligibile definite pentru acțiune în cererea de proiecte;
- durata să se încadreze în limitele menționate în cererea de proiecte;
- rezultatele să fie clar definite și măsurabile;
- activitățile să nu fie sau să nu fi fost finanțate din alte surse publice.

Tabel 23. Tipurile de activități finanțate în cadrul schemei

Activități finanțabile prin schemă	Acțiuni POC care conțin activitatea	Finanțarea maximă în cadrul unui proiect (EUR)	Beneficiari
Ajutoare pentru cercetare, dezvoltare și inovare			
Cercetare fundamentală	A1.2.1, A1.2.3 A1.1.3, A1.1.4	10.000.000	Întreprinderi cu activitate de CD
Cercetare industrială	A1.2.1, A1.2.3 A1.1.3, A1.1.4	10.000.000	Întreprinderi cu activitate de CD
Dezvoltare experimentală	A1.2.1, A1.2.3 A1.1.3, A1.1.4	10.000.000	Întreprinderi cu activitate de CD
Realizarea de studii de fezabilitate pregătitoare pentru activitățile de CD	A1.2.1, A1.2.3 A1.1.3, A1.1.4	5.000.000/ studiu	Întreprinderi cu activitate de CD
Activități de inovare pentru IMM: - obținerea, validarea și protejarea brevetelor și altor active necorporale; - detașarea de personal cu înaltă calificare; - achiziția de servicii de consultanță în domeniul inovării; - achiziția de servicii de sprijinire a inovării.	A1.2.1, A1.2.3 A1.1.1, A1.1.3 A1.1.4	5.000.000	IMM-uri cu sau fără activitate de CD Entitățile juridice care exploatează clusterul de inovare (organizația clusterului)
Inovare de proces și organizațională (pentru IMM)	A1.2.1	5.000.000	IMM-uri cu sau fără activitate de CD
Construcția și modernizarea infrastructurilor de cercetare	A1.1.1 A1.1.3	20.000.000	Entitățile juridice care dețin și exploatează infrastructura de cercetare
Activități specifice clusterelor de inovare: - investiții în clustere; - activități de exploatare în clustere (animarea și promovarea clusterului, gestionarea instalațiilor clusterului, organizarea de programe de formare, ateliere, conferințe).	A1.1.1	7.500.000	Entitățile juridice care exploatează clusterul de inovare (organizația clusterului)

Activități finanțabile prin schemă	Acțiuni POC care conțin activitatea	Finanțarea maximă în cadrul unui proiect (EUR)	Beneficiari
Ajutoare regionale pentru investiții			
Investiții inițiale pentru departamentele de CD	A1.2.1 A1.1.1	5.000.000 (municipiul București) 15.000.000 (regiunea Vest și județul Ilfov) 20.000.000 (celelalte regiuni ale României)	Întreprinderi cu activitate de CD (întreprinderile mari din regiunea București-Ilfov trebuie să demonstreze că investițiile inițiale sunt în favoarea unei noi activități economice)
Investiții inițiale pentru inovare în vederea introducerii în producție a rezultatelor obținute din CD	A1.2.1	Pentru această activitate se vor acorda până la 1.500.000 EUR	Întreprinderi cu activitate de CD, dar pentru care activitatea principală nu este activitate de CD (întreprinderile mari din regiunea București-Ilfov trebuie să demonstreze că investițiile inițiale sunt în favoarea unei noi activități economice)
Ajutoare pentru întreprinderi nou înființate			
Toate activitățile care susțin introducerea în producție, producerea și livrarea pe piață a produsului (bun sau serviciu) sau procesului	A1.2.1	1.200.000 (regiunea București-Ilfov) 1.600.000 (celelalte regiuni ale României)	Întreprinderi nou-înființate inovatoare pentru care activitatea principală nu este activitate de CD (pot să nu aibă deloc activitate de CD).

Sursa: Ordinul nr. 3822/2015 pentru aprobarea schemei de ajutor de stat "Finanțarea activităților de cercetare-dezvoltare și inovare (CDI) și a investițiilor în CDI prin Programul operațional Competitivitate (POC)"

Ajutorul de stat nu va depăși pragurile de notificare specificate în Regulamentul (UE) nr. 651/2014:

- 40 milioane euro per întreprindere per proiect în cazul proiectelor în care predomină activitatea de cercetare fundamentală;
- 20 milioane euro per întreprindere per proiect în cazul proiectelor în care predomină activitatea de cercetare industrială;
- 10 milioane euro per întreprindere per proiect în cazul proiectelor în care predomină activitatea de dezvoltare experimentală;
- 7,5 milioane euro per studiu pentru acoperirea costurilor cu studii de fezabilitate pentru pregătirea activităților de CD;
- 5 milioane euro per întreprindere per proiect în cazul proiectelor care conțin activități de inovare destinate IMM-urilor;
- 7,5 milioane euro per întreprindere per proiect în cazul proiectelor care conțin activități de inovare de proces și organizațională;
- 20 de milioane euro per infrastructură de cercetare în cazul proiectelor pentru investiții în infrastructuri de cercetare care primesc ajutoare pentru cercetare, dezvoltare și inovare;

- 7,5 milioane euro per cluster pentru proiectele dedicate clusterelor de inovare;
- 25 milioane euro per proiect în cazul proiectelor care primesc ajutoare regionale pentru investiții în regiunile Nord-Vest, Centru, Nord-Est, Sud-Est, Sud-Muntenia, Sud-Vest Oltenia;
- 17,5 milioane euro per proiect în cazul proiectelor care primesc ajutoare regionale pentru investiții în regiunea Vest și în județul Ilfov;
- 5 milioane euro per proiect în cazul proiectelor care primesc ajutoare regionale pentru investiții în municipiul București;
- 1,6 milioane euro per întreprindere pentru proiectele dedicate întreprinderilor nou-înființate inovatoare (1,2 milioane euro pentru regiunea București-Ilfov).

Cotele de bază de finanțare a activităților de CD sunt, per beneficiar, ca procent din costurile eligibile, următoarele:

- 100% pentru cercetarea fundamentală;
- 50% pentru cercetarea industrială;
- 25% pentru dezvoltarea experimentală.

Pentru cercetarea industrială și dezvoltarea experimentală se va acorda la cotele de bază un bonus de 10% pentru întreprinderile mijlocii și de 20% pentru întreprinderile mici, până la o intensitate maximă a ajutorului de 80% din costurile eligibile. De asemenea, tot pentru aceste tipuri de activități se va acorda la cotele de bază un bonus de 15%, până la o intensitate maximă a ajutorului de 80% din costurile eligibile, dacă este îndeplinită una dintre următoarele condiții:

- a) proiectul implică o colaborare efectivă:
 - între întreprinderi dintre care cel puțin una este IMM și niciuna dintre întreprinderi nu suportă singură mai mult de 70% din costurile eligibile; sau
 - între o întreprindere și una sau mai multe organizații de cercetare, în cazul în care aceste organizații suportă cel puțin 10% din costurile eligibile și au dreptul de a publica rezultatele cercetărilor proprii;
- b) rezultatele proiectului sunt difuzate pe scară largă prin conferințe, prin publicări, prin registre cu acces liber sau prin intermediul unor programe informatice gratuite sau open source.

Pentru *activitățile de cercetare fundamentală, industrială și de dezvoltare experimentală* sunt eligibile următoarele tipuri de costuri:

- costurile cu personalul: cercetători, tehnicieni și alți membri ai personalului auxiliar, în măsura în care aceștia sunt angajați în proiect;
- costurile instrumentelor și ale echipamentelor, în măsura în care acestea sunt utilizate în cadrul proiectului și pe durata acestei utilizări. În cazul în care aceste instrumente și echipamente nu sunt folosite pe întreaga lor durată de viață în proiect, sunt considerate eligibile doar costurile de amortizare corespunzătoare duratei proiectului, calculate pe baza principiilor contabile general acceptate;
- costurile cu clădirile și terenurile, în măsura utilizării acestora în cadrul proiectului și pe durata perioadei acestei utilizări. În ceea ce privește clădirile, sunt considerate eligibile doar costurile de amortizare corespunzătoare duratei proiectului, calculate pe baza principiilor contabile general acceptate. În cazul terenurilor, sunt eligibile costurile transferului comercial sau costurile de capital efectiv suportate;
- costurile aferente cercetării contractuale, cunoștințelor și brevetelor cumpărate sau obținute cu licență din surse externe, în condiții de concurență deplină, precum și

costurile aferente serviciilor de consultanță și serviciilor echivalente folosite exclusiv pentru proiect;

- cheltuielile de regie suplimentare și alte costuri de exploatare, inclusiv costurile materialelor, consumabilelor și ale altor produse similare, suportate direct ca urmare a proiectului.

Pentru *activitățile de inovare în IMM-uri* sunt eligibile următoarele costuri:

- costurile obținerii, validării și protejării brevetelor și altor active necorporale;
- costurile pentru detașarea de personal cu înaltă calificare de la o organizație de cercetare sau de la o întreprindere mare, care efectuează activități de CDI, într-o funcție nou-creată în cadrul întreprinderii beneficiare, fără să se înlocuiască alți membri ai personalului. Sunt eligibile toate costurile de personal aferente închirierii și încadrării în muncă a personalului cu înaltă calificare, inclusiv costurile aferente folosirii unei agenții de recrutare și indemnizația de deplasare pentru personalul detașat. Costurile unor servicii de consultanță prestate de personalul cu înaltă calificare, fără ca acesta să fie angajat la beneficiar, nu sunt eligibile;
- costurile pentru serviciile de consultanță în domeniul inovării (costuri cu servicii de consultanță, asistență și formare profesională în ceea ce privește transferul de cunoștințe, achiziția, protecția și valorificarea activelor necorporale, utilizarea standardelor și a reglementărilor care le conțin);
- costurile pentru serviciile de sprijinire a inovării (costuri cu spații de lucru, bănci de date, biblioteci, cercetare de piață, laboratoare, etichetare de calitate, testarea și certificarea calității în scopul dezvoltării de produse, procese sau servicii mai eficiente).

Costurile eligibile pentru *inovarea de proces și organizațională* sunt următoarele:

- costurile cu personalul;
- costurile instrumentelor, echipamentelor, clădirilor și terenurilor, în măsura în care acestea sunt utilizate în cadrul proiectului și pe durata acestei utilizări;
- costurile aferente cercetării contractuale, cunoștințelor și brevetelor cumpărate sau obținute cu licență din surse externe în condiții de concurență deplină;
- cheltuielile de regie suplimentare și alte costuri de exploatare, inclusiv costurile materialelor, ale consumabilelor și ale altor produse similare suportate direct ca urmare a proiectului.

Costurile eligibile pentru *investiții în clusterelor de inovare* sunt costurile de investiții în active corporale și necorporale.

Costurile eligibile în cazul *ajutoarelor de exploatare pentru clusterelor de inovare* sunt costurile cu personalul și costurile administrative (inclusiv cheltuielile de regie) legate de:

- animarea clusterului pentru a facilita colaborarea, schimbul de informații și furnizarea sau direcționarea serviciilor specializate și personalizate de sprijin pentru întreprinderi;
- promovarea clusterului pentru a spori participarea unor noi întreprinderi sau organizații și pentru a beneficia de o mai mare vizibilitate;
- gestionarea instalațiilor aparținând clusterului de inovare;
- organizarea de programe de formare, de ateliere și de conferințe pentru a sprijini schimbul de cunoștințe și stabilirea de contacte, precum și cooperarea transnațională.

Costurile eligibile pentru *investiții inițiale pentru departamentele de CD* sunt costurile investițiilor în active corporale (clădiri, spații, instalații, utilaje, echipamente) și în active necorporale necesare pentru departamentele/unitățile de CD ale beneficiarilor.

Costurile eligibile în cadrul proiectelor pentru *întreprinderi nou-înființate inovatoare* vor fi prezentate ulterior în documentele aferente competițiilor de proiecte.

Înainte de acordarea de finanțare în cadrul schemei se va verifica respectarea tuturor criteriilor menționate în schemă de către autoritatea care administrează schema care va verifica îndeplinirea criteriilor de eligibilitate ale beneficiarilor, eligibilitatea proiectelor, precum și eligibilitatea activităților și costurilor.

Procedura de implementare și derulare a schemei se desfășoară după cum urmează:

1. lansarea cererii de proiecte;
2. primirea și înregistrarea cererilor de finanțare și a documentelor însoțitoare;
3. verificarea formală (verificarea conformității cererilor și a documentelor însoțitoare) - numai proiectele care trec de această etapă vor putea face obiectul etapei următoare;
4. verificarea eligibilității beneficiarilor - numai proiectele care trec de această etapă vor putea face obiectul etapei următoare;
5. verificarea eligibilității proiectelor (inclusiv efectul stimulat) - numai proiectele care trec de această etapă vor putea face obiectul etapei următoare;
6. evaluarea și selecția proiectelor;
7. întocmirea și semnarea contractului de finanțare;
8. depunerea cererii de rambursare însoțită de documentele justificative;
9. acordarea finanțării nerambursabile se face numai pe bază de documente justificative, după verificarea cheltuielilor;
10. monitorizarea implementării proiectelor conform prevederilor contractuale și ale Ordonanței de urgență a Guvernului nr. 77/2014, aprobată cu modificări și completări prin Legea nr. 20/2015, cu modificările ulterioare.

Criteriile de evaluare pentru proiectele finanțate prin schemă vizează:

- a) relevanța științifică și impactul economic al proiectului;
- b) calitatea și maturitatea proiectului;
- c) sustenabilitatea proiectului și capacitatea de implementare și operaționalizare.

Autoritatea care administrează schema este Autoritatea Națională pentru Cercetare Științifică și Inovare, prin Direcția generală organism intermediar pentru cercetare (OI Cercetare), iar furnizorul de ajutor de stat este Ministerul Fondurilor Europene, prin Autoritatea de management a Programului Operațional Competitivitate (POC).

C. Politici publice în sectoare conexe și alte programe

În perioada de programare 2014 – 2020, România va beneficia de fonduri europene în valoare de aproximativ 43 miliarde de euro, din care 22,4 miliarde de euro sunt alocate pentru politica de coeziune (FEDR, FSE, Fondul de coeziune). Pe fondul strategiei europene pentru o creștere inteligentă, durabilă și favorabilă incluziunii (Strategia Europa 2020) și pornind de la analiza nevoilor de dezvoltare realizată la nivel tematic și sectorial și de la prioritățile de finanțare, Programul Operațional Competitivitate 2014 – 2020 răspunde, în primul rând, provocării Dezvoltarea competitivității și dezvoltare locală și complementară, contribuie la atingerea obiectivelor altor trei provocări de dezvoltare, respectiv: Oameni și societate, Infrastructură și Administrație și Guvernare, permițând astfel intervenții orizontale în economie și societate.

La nivelul celor *4 programe cu alocări destinate și pentru finanțarea activității de cercetare-dezvoltare și inovare*, din cele 11 programe operaționale aprobate de Comisia Europeană (Programul Operațional Infrastructură Mare - POIM - Infrastructura de anvergură -

transport, mediu și energie, Programul Operațional Regional - POR, Programul Operațional Capital Uman - POCU, Programul Operațional Competitivitate, Programul Operațional Capacitate Administrativă, Programul Operațional Asistența Tehnică, Plăți directe în agricultură, Programul Național pentru Dezvoltare Rurală - PNDR, Programul Operațional Pescuit și Afaceri Maritime, Programele de Cooperare Teritorială Europeană, Facilitatea “Conectarea Europei”), alocările financiare sunt următoarele:

Tabel 24. Alocări financiare pentru programele sectoriale destinate finanțării activității de cercetare-dezvoltare și inovare

Program operațional	Sprrijinul financiar din partea Uniunii	Contrapartidă națională
Programul Operațional Capital Uman Componenta de "Educație și competențe"	4.326.838.744 lei	732.616.623 lei
Programul Operațional Regional Componenta de "Competitivitate și mediul de afaceri pentru IMM-uri"	6,7 mld. euro	1,55 mil. euro
Programul Operațional Dezvoltarea Capacității Administrative	553,19 mil. euro	105,1 mil. euro
Programul Național pentru Dezvoltare Rurală Componenta de "Investiții în dezvoltarea agriculturii și a mediului rural"	8.128,00 mld. euro	1.344,65 mld. euro

Sursa: Ministerul Fondurilor Europene, Programe operaționale, accesat la adresa <http://www.fonduri-ue.ro/documente-programare/programe-operationale> accesibil la adresa

Decizia de punere în aplicare a Comisiei din 25.2.2015 de aprobare a anumitor elemente din programul operațional „Capital Uman” pentru sprijinul din partea Fondului social european și alocării specifice pentru Inițiativa „Locuri de muncă pentru tineri” în temeiul obiectivului referitor la investițiile pentru creștere și locuri de muncă în România;

Programul Operațional Capital Uman (POCU 2014 – 2020) stabilește prioritățile de investiții, obiectivele și acțiunile asumate de către România în domeniul resurselor umane, continuând investițiile realizate prin FSE în perioada 2007-2013 și contribuind la atingerea obiectivului general al AP 2014- 2020, acela de a reduce disparitățile de dezvoltare economică și socială dintre România și SM ale Uniunii Europene.

Programul Operațional Regional (POR 2014-2020) își propune să asigure continuitatea viziunii strategice privind dezvoltarea regională în România, completând și dezvoltând direcțiile și prioritățile de dezvoltare regională conținute în PND și CNSR 2007–2013 și implementate prin POR 2007–2013 și alte programe naționale.

Programul Operațional Dezvoltarea Capacității Administrative (POCA 2014 – 2020) va promova crearea unei administrații publice moderne, capabilă să faciliteze dezvoltarea socio-economică, prin intermediul unor servicii publice competitive, investiții și reglementări de calitate, contribuind astfel la atingerea obiectivelor Strategiei Europa 2020.

Programul Național de Dezvoltare Rurală (PNDR 2014 – 2020) este destinat dezvoltării economico – sociale a spațiului rural din România și cuprinde 15 măsuri de finanțare și va avea alocat un buget în valoare de 9,85 miliarde de euro.

Până în anul 2013 finanțarea politicii de cercetare și inovare a Uniunii Europene s-a bazat pe programele-cadru multianuale, pe seama a șapte programe-cadru (PC1-PC7), însă, începând din anul 2014 a fost lansat noul program de cercetare și inovare al UE, Orizont 2020. Acest nou program a fost aprobat de guvernele statelor membre ale UE și de Parlamentul European, care au

convenit că investițiile în cercetare și inovare sunt esențiale pentru viitorul Europei, plasând o astfel în centrul strategiei Europa 2020.

Programul nu prevede sume prestabilite pentru fiecare stat membru, prin urmare, proiectele din toate statele membre UE trebuie să concureze pentru a beneficia de sprijin în cadrul programului „Orizont”.

Programul „Orizont”, pentru susținerea cercetării și dezvoltării în 2014 – 2020 se bazează pe trei piloni:

Tabel 25. Structura Programului Cadru Orizont 2020

Pilonul I Exelență științifică	Consiliul European pentru Cercetare (ERC);
	Tehnologii viitoare și emergente;
	Acțiunile Marie Skłodowska-Curie;
	Infrastructuri de cercetare.
Pilonul II Poziția de lider în sectorul industrial	Tehnologiile informației și comunicațiilor (TIC);
	Nanotehnologii și materiale avansate;
	Spațiu;
	Accesul la finanțarea de risc;
	Inovarea în IMM-uri.
Pilonul III Provocări societale	Tehnologii generice esențiale (KET)
	Sănătate, schimbări demografice și bunăstare;
	Securitate alimentară, agricultură durabilă, cercetare marină și maritimă și bioeconomie;
	Surse de energie sigure, ecologice și eficiente;
	Mijloace de transport inteligente, ecologice și integrate;
	Combaterea schimbărilor climatice, utilizarea eficientă a resurselor și a materiilor prime;
	Societăți favorabile incluziunii, inovatoare și reflexive;
Societăți sigure - protejarea libertății și securității Europei și cetățenilor săi.	
Răspândirea excelenței și lărgirea participării	Teaming (Teaming of excellent research institutions and low performing RDI regions);
	Twinning (Twinning of research institutions);
	ERA chairs;
	Sprijinirea dezvoltării de strategii de specializare inteligentă (Policy Support Facility (PSF));
	Accesul la rețele internaționale prin intermediul COST.
Știința cu și pentru societate	Educație și cariere științifice mai atractive pentru tineri (Making Science Education and Careers Attractive for young people) - SEAC;
	Promovarea egalității de gen (Promoting Gender Equality in Research and Innovation) - GERI;
	Integrarea societății în știință și inovare (Integrating Society in Science and Innovation) - ISSI;
	Politici de guvernare pentru dezvoltarea conceptului de Cercetare și Inovare Responsabilă (Developing Governance for the Advancement of Responsible Research and Innovation) GARRI.
Euratom	Euratom.

Sursa: HORIZON 2020, The EU Framework Programme for Research and Innovation, accesat la adresa <http://ec.europa.eu/programmes/horizon2020/>

Programele și proiectele de cercetare-dezvoltare și inovare, acțiunile cuprinse în Planul național, planurile sectoriale și alte programe de cercetare-dezvoltare, precum și finanțarea instituțională de bază și finanțarea instituțională complementară de susținere a performanței se realizează pe bază de contracte de finanțare.

Remarcăm că România a înțeles că investițiile în cercetare și inovare au un puternic efect multiplicator și încearcă să găsească soluții la provocările societale, stimulând în același timp creșterea și competitivitatea prin încercările de a dezvolta o rețea complet funcțională de excelență în cercetare, asigurând proceduri deschise și transparente de finanțare a activității de cercetare, dezvoltare și inovare.

Acknowledgment

This work was supported by a grant from Iceland, Liechtenstein and Norway through the project 14-SEE-PC-RO TIMISOA01 "Transnational cooperation for research consolidation through knowledge and innovation transfer - KnowReset" co-funded from the the EEA Financial Mechanism 2009-2014 - Inter-institutional cooperation projects, Contract no. 2/21/07.2014

Bibliografie

1. Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions: Research and innovation as sources of renewed growth, Brussels, 10 iunie 2014 COM(2014) 339 final
- Horizon 2020, The EU Framework Programme for Research and Innovation, Brussels, 30 noiembrie 2011 COM (2011) 808 final.
2. Decizia de punere în aplicare a comisiei din 19.12.2014 de aprobare a anumitor elemente din programul operațional „Competitivitate” pentru sprijinul din partea Fondului european de dezvoltare regională în temeiul obiectivului referitor la investițiile pentru creștere și locuri de muncă în România, Bruxelles, 19.12.2014, C(2014) 10233 final.
3. Decizia de punere în aplicare a comisiei din 25.2.2015 de aprobare a anumitor elemente din programul operațional „Capital Uman” pentru sprijinul din partea Fondului social european și alocării specifice pentru Inițiativa „Locuri de muncă pentru tineri” în temeiul obiectivului referitor la investițiile pentru creștere și locuri de muncă în România, Bruxelles, 25.2.2015 C(2015) 1287 final.
4. Decizie privind aprobarea schemei de ajutor de stat „Finanțarea proiectelor CD&I” conform Planului Național de Cercetare - Dezvoltare și Inovare 2.
5. Europe 2020, (2010) A strategy for smart, sustainable and inclusive growth, Brussels, 3 martie 2010 COM(2010) 2020.
6. Ghidul solicitantului, Programul Operațional Competitivitate 2014-2020, Axa prioritară 1 - Cercetare, dezvoltare tehnologică și inovare (CDI) în sprijinul competitivității economice și dezvoltării afacerilor.
7. HORIZON 2020, The EU Framework Programme for Research and Innovation, accesat la adresa <http://ec.europa.eu/programmes/horizon2020/>
8. Hotărâre de Guvern nr. 1.265/2004 pentru aprobarea Normelor metodologice privind contractarea, finanțarea, monitorizarea și evaluarea programelor, proiectelor de cercetare-

- dezvoltare și inovare și a acțiunilor cuprinse în Planului Național de Cercetare - Dezvoltare și Inovare.
9. Hotărâre de Guvern nr. 26 din 14 ianuarie 2015 privind organizarea și funcționarea Ministerului Educației și Cercetării Științifice, Guvernul României, Monitorul Oficial nr. 53 din 22 ianuarie 2015.
 10. Hotărâre nr. 61 din 19 noiembrie 2014 privind aprobarea opiniei referitoare la Comunicarea Comisiei către Parlamentul European, Consiliu, Comitetul Economic și Social European și Comitetul Regiunilor - Cercetarea și inovarea ca surse de reînnoire a creșterii - COM (2014) 339.
 11. Hotărâre nr. 133 din 16 februarie 2011 privind modificarea și completarea unor acte normative referitoare la Planului Național de Cercetare - Dezvoltare și Inovare.
 12. Hotărâre nr. 134 din 16 februarie 2011 pentru aprobarea Normelor metodologice privind stabilirea categoriilor de cheltuieli pentru activități de cercetare-dezvoltare și de stimulare a inovării, finanțate de la bugetul de stat.
 13. Hotărâre nr. 134 din 16 februarie 2011 pentru aprobarea Normelor metodologice privind stabilirea categoriilor de cheltuieli pentru activități de cercetare-dezvoltare și de stimulare a inovării.
 14. Hotărâre nr. 252 din 15 aprilie 2015 pentru modificarea Hotărârii Guvernului nr. 475/2007 privind aprobarea Planului Național de Cercetare - Dezvoltare și Inovare II, pentru perioada 2007-30 iunie 2014.
 15. Hotărârea nr. 383/2015 pentru aprobarea Strategiei naționale privind incluziunea socială și reducerea sărăciei pentru perioada 2015-2020 și a Planului Strategic de Acțiuni pentru perioada 2015-2020.
 16. Hotărâre nr. 475 din 23 mai 2007 privind aprobarea Planului Național de Cercetare - Dezvoltare și Inovare 2, pentru perioada 2007-2013.
 17. Hotărâre nr. 475 din 23 mai 2007 privind aprobarea Planului Național de Cercetare - Dezvoltare și inovare II, pentru perioada 2007-30 iunie 2014 actualizat 13 iulie 2015.
 18. Hotărâre nr. 518 din 26 iunie 2014 pentru completarea art. 1 din Hotărârea Guvernului nr. 475 din 2007 privind aprobarea Planului Național de Cercetare.
 19. Hotărâre nr. 521 din 8 iulie 2015 pentru prorogarea termenului prevăzut la art. 1 alin. (2) din Hotărârea Guvernului nr. 475/2007 privind aprobarea Planului Național de Cercetare - Dezvoltare și inovare II, pentru perioada 2007-30 iunie 2014.
 20. Hotărâre nr. 551 din 6 iunie 2007 pentru aprobarea Criteriilor și standardelor, precum și a Metodologiei de evaluare și atestare a capacității de a desfășura activități de cercetare-dezvoltare.
 21. Hotărâre nr. 583 din 22 iulie 2015 pentru aprobarea Planului Național de Cercetare - Dezvoltare și Inovare pentru perioada 2015-2020 (PNCDI III).
 22. Hotărâre nr. 750 din 2 octombrie 2013 pentru completarea Hotărârii Guvernului nr. 327/2003 privind plafoanele pe baza cărora se calculează costurile salariale directe la contractele de finanțare încheiate din fonduri bugetare, precum și pentru modificarea și completarea Hotărârii Guvernului nr. 475/2007 privind aprobarea Planului Național de Cercetare - Dezvoltare și Inovare II, pentru perioada 2007-2013.
 23. Hotărâre nr. 929 din 21 octombrie 2014 privind aprobarea Strategiei Naționale de Cercetare - Dezvoltare și Inovare 2014-2020.
 24. Hotărâre nr. 929 din 21 octombrie 2014 privind aprobarea Strategiei Naționale de Cercetare - Dezvoltare și Inovare 2014-2020.

25. Hotărâre nr. 1093 din 10 decembrie 2014 pentru prorogarea termenului prevăzut la art. 1 alin. (2) din Hotărârea Guvernului nr. 475/2007 privind aprobarea Planului Național de Cercetare - Dezvoltare și Inovare II, pentru perioada 2007-30 iunie 2014.
26. Hotărâre nr. 1123 din 18 decembrie 2013 pentru modificarea Hotărârii Guvernului nr. 475 din 2007 privind aprobarea Planului Național de Cercetare - Dezvoltare și Inovare II, pentru perioada 2007-2013.
27. Hotărâre de Guvern nr. 1244 din 4 ianuarie 2013 privind modificarea și completarea unor acte normative referitoare la Planul Național de Cercetare - Dezvoltare și Inovare.
28. Hotărâre nr. 1265 din 13 august 2004 pentru aprobarea Normelor metodologice privind contractarea, finanțarea, monitorizarea și evaluarea programelor, proiectelor de cercetare-dezvoltare și inovare.
29. Innovation union (2013), A pocket guide on a Europe 2020 initiative, Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2013.
30. Legea nr. 1/2011, publicată în Monitorul Oficial Partea I nr. 18 din 10 ianuarie 2011.
31. Legea 20/2015 pentru aprobarea OUG 77/2014 privind procedurile naționale în domeniul ajutorului de stat, precum și pentru modificarea și completarea Legii concurenței nr. 21/1996.
32. Legea nr. 262/2011 pentru ratificarea Acordului dintre România și Agenția Spațială Europeană (ESA) privind aderarea României la Convenția pentru înființarea Agenției Spațiale Europene și termenii și condițiile aferente, semnat la București la 20 ianuarie 2011, pentru aderarea României la Convenția pentru înființarea Agenției Spațiale Europene, semnată la Paris la 30 mai 1975, pentru aderarea României la Acordul dintre statele părți la Convenția pentru înființarea Agenției Spațiale Europene și Agenția Spațială Europeană privind protecția și schimbul de informații clasificate, semnat la Paris la 19 august 2002.
33. Legea nr. 324 din 8 iulie 2003 pentru aprobarea Ordonanței Guvernului nr. 57/2002 privind cercetarea științifică și dezvoltarea tehnologică.
34. Ministerul Educației Naționale (2013) Raportului anual 2013 privind Politicilor Guvernamentale de cercetare dezvoltare și inovare în România, accesat la: <http://www.research.ro/uploads/politici-cd/politici-nationale/politicile-cd-i-guvernamentale-raport-2013.pdf>.
35. Norma metodologică privind contractarea, finanțarea, monitorizarea și evaluarea programelor-nucleu de cercetare-dezvoltare din 06.02.2003.
36. Ordin nr. 256 din 10 martie 2015 pentru modificarea și completarea Normelor privind deducerile pentru cheltuielile de cercetare-dezvoltare la determinarea profitului impozabil, aprobate prin Ordinul ministrului finanțelor publice și al ministrului educației, cercetării, tineretului și sportului nr. 2.086/4.504/2010.
37. Ordin nr. 2086/4504 din 6 august 2010 pentru aprobarea Normelor privind deducerile pentru cheltuielile de cercetare-dezvoltare la determinarea profitului impozabil.
38. Ordin nr. 2414/2007 pentru aprobarea Normelor metodologice privind procedura de avizare a acordului de primire pentru cercetătorii din țări terțe în scopul desfășurării în România de activități de cercetare-dezvoltare.
39. Ordin nr. 3794 din 1 martie 2011 privind înființarea Consiliului Național al Cercetării Științifice, precum și pentru aprobarea regulamentului de organizare și funcționare a acestuia

40. Ordin nr. 3822/2015 pentru aprobarea schemei de ajutor de stat "Finanțarea activităților de cercetare-dezvoltare și inovare (CDI) și a investițiilor în CDI prin Programul operațional Competitivitate (POC)".
41. Ordonanța de urgență a Guvernului nr. 34/2006 privind atribuirea contractelor de achiziție publică, a contractelor de concesiune de lucrări publice și a contractelor de concesiune de servicii, aprobată cu modificări și completări prin Legea nr. 337/2006, cu modificările și completările ulterioare.
42. Ordonanța de Urgență nr.74 din 30 iunie 2010 pentru modificarea unor acte normative din domeniul educației și cercetării.
43. Ordonanța de Urgență nr. 96/2012 privind stabilirea unor măsuri de reorganizare în cadrul administrației publice centrale și pentru modificarea unor acte normative.
44. Ordonanța de Urgență nr. 194 din 12 decembrie 2002 privind regimul străinilor în România cu modificările și completările ulterioare.
45. Ordonanța Guvernului nr. 57 din 16 august 2002 privind cercetarea științifică și dezvoltarea tehnologică, Guvernul României, Monitorul Oficial, nr. 643 din 30 august 2002.
46. Ordonanța nr. 6/2011 publicată în Monitorul Oficial, Partea I nr. 80 din 31 ianuarie 2011.
47. Ordonanța nr. 8/2013 pentru modificarea și completarea Legii nr. 571/2003 privind Codul fiscal și reglementarea unor măsuri financiar-fiscale.
48. Ordonanța nr. 57 din 16 august 2002 privind cercetarea științifică și dezvoltarea tehnologică actualizată martie 2013.
49. Ordonanța nr. 62 din 24 august 1999 privind înființarea Unității Executive pentru Finanțarea Învățământului Superior și a Cercetării Științifice Universitare.
50. Precizări privind regimul taxei pe valoarea adăugată aplicabil activității de cercetare – dezvoltare” emisă de Ministerul Finanțelor Publice.
51. Regulamentul nr. 651/2014 de declarare a anumitor categorii de ajutoare compatibile cu piața internă în aplicarea articolelor 107 și 108 din tratat.
52. Strategia Națională de Cercetare, Dezvoltare și Inovare 2014 – 2020 http://www.research.ro/uploads/politici-cd/strategia-cdi-2014-2020/strategia-cdi-2020_-proiect-hg.pdf.

Abrevieri

AEC - Agenția Executivă pentru Cercetare
ANCS - Autoritatea Națională pentru Cercetare Științifică
ANCSI - Autoritatea Națională pentru Cercetare Științifică și Inovare
AR - Academia Română
ASAS - Academia de Științe Agricole și Silvice
ASM - Academia de Științe Medicale
CCC - Centrul Comun de Cercetare
CCCDI - Colegiul Consultativ pentru Cercetare-Dezvoltare și Inovare
CD - cercetare-dezvoltare
SCDI - Sistemul Național de Cercetare Dezvoltare Inovare
CDI - cercetare-dezvoltare și inovare
CE - Comisia Europeană
CEA - Comisariatul pentru Energie Atomică și Energii Alternative
CEC - Consiliul European pentru Cercetare
CEMU - Consiliul de Etică și Management Universitar
CERN - Consiliul Organizației Europene pentru Cercetare Nucleară
CNATDCU - Consiliul Național de Atestare a Titlurilor, Diplomelor și Certificatelor Universitare
CNBU - Consiliul Național al Bibliotecilor Universitare
CNCS - Consiliul Național al Cercetării Științifice
CNSR - Cadrul Național Strategic de Referință
CNECSDTI - Consiliul Național de Etică a Cercetării Științifice, Dezvoltării Tehnologice și Inovării
CNFIS - Consiliul Național pentru Finanțarea Învățământului Superior
CNPSTI - Consiliul Național pentru Politica Științei, Tehnologiei și Inovării
CNR - Consiliul Național al Rectorilor
CNSPIS - Consiliul Național de Statistică și Prognoză a Învățământului Superior
CNSPIS-CDI - Consiliul Național de Statistică și Prognoză a Învățământului Superior și CDI
CS - cercetător științific
DGP-CDI - Direcția Generală Programe CDI
EASME - Agenția Executivă pentru Întreprinderi Mici și Mijlocii
EIP - Parteneriatele Europene pentru Inovare
EIT - Institutul European de Inovare și Tehnologie
ELI-NP - Infrastructura pentru Lumină cu Strălucire Extremă - Fizică Nucleară
EMFF - Fondul European pentru Pescuit și Afaceri Maritime
ENI - Instrumentul European de Vecinătate
ERA - Spațiului European al Cercetării

ESA - Agenției Spațiale Europene
EURATOM - Comunitatea Europeană a Energiei Atomice
FAIR - Facilitatea de Cercetare pentru Antiprotoni și Ioni
FC - Fondul de coeziune
FEADR - Fondul European Agricol pentru Dezvoltare Rurală
FEDR - Fondul European de Dezvoltare Regională
FSE - Fondul Social European
HG - Hotărâre de Guvern
IMM - Întreprinderi Mici și Miclocii
INEA - Agenția Executivă pentru Inovare și Rețele
JPI - Inițiativele Comune de Programare
MECS - Ministerul Educației și Cercetării Științifice
MEN - Ministerul Educației Naționale
MEN - Ministerul Educației Naționale
NATO - Organizația Tratatului Atlanticului de Nord
OG - Ordonanța de Urgență
PC - Program Cadru
PIB - Produs Intern Brut
PNCDI III - Planul Național de Cercetare-Dezvoltare și Inovare pentru perioada 2015-2020
PND - Planul Național de Dezvoltare
PNDR - Programul Național de Dezvoltare Rurală
POC - Program Operațional Competitivitate
POCA - Programul Operațional Dezvoltarea Capacității Administrative
POCU - Programul Operațional Capital Uman
POR - Programul Operațional Regional
ReNITT - Rețeaua Națională pentru Inovare și Transfer Tehnologic
SNCDI 2020 - Strategia Națională pentru Cercetare, Dezvoltare și Inovare 2014- 2020
STAR - Tehnologie Spațială și Cercetare Avansată
TFUE - Tratatul privind funcționarea Uniunii Europene
TGE - Tehnologi Generice Esențiale
TIC - Tehnologia informației și a comunicațiilor
UE - Uniunea Europeană
UP-CDI - Unitatea de politici CDI