

**Универзитет „ Св. Кирил и Методиј “ - Скопје**

**Природно – математички факултет**

**Институт за Биологија**

**Спасов Мире**

**ВЛИЈАНИЕТО НА КОЛАГЕН ИНДУЦИРАНИОТ  
АРТРИТИС ВРЗ АКТИВНОСТА НА *AST* И *ALT* КАЈ  
БЕЛИОТ ЛАБОРАТОРИСКИ СТАОРЕЦ**

**- магистерски труд -**

**Скопје, 2008 година**

**Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ - Скопје**

**Природно – математички факултет**

**Институт за Биологија**

**Спасов Мире**

**ВЛИЈАНИЕТО НА КОЛАГЕН ИНДУЦИРАНИОТ  
АРТРИТИС ВРЗ АКТИВНОСТА НА *AST* И *ALT* КАЈ  
БЕЛИОТ ЛАБОРАТОРИСКИ СТАОРЕЦ**

**- магистерски труд -**

**Скопје, 2008 година**

**Ментор:** Проф. Д-р Ицко Ѓоргоски

**Членови на комисијата:** Проф. Д-р Ицко Ѓоргоски  
Проф. Д-р Јорданка Димовска  
Проф. Д-р Сузана Диневска-  
Ќовкаровска

**Датум на одбрана:** .....

**Датум на промоција:** .....

**Научна област:** Биологија

**Оваа студија се работеше на Природно-математичкиот факултет,  
на Институтот за биологија во Скопје.**

**Голема благодарност до Проф. Д-р Ицко Ѓоргоски, мојот ментор,  
за советите, сугестиите и упатствата  
во текот на изработката на магистерската работа,  
како и при конечното оформување на истата,  
со кои ми помогна во нејзината реализација.**

**Благодарност должам и за сите други кои на директен или  
индиректен начин помогнаа за изработката на трудот.**

**Благодарност за сопругата Верица и синот Христијан  
за поддршката.**

*Магистерската работа ја посветувам на мојот татко -  
постхумно*

# **ВЛИЈАНИЕТО НА КОЛАГЕН ИНДУЦИРАНИОТ АРТРИТИС ВРЗ АКТИВНОСТА НА AST И ALT КАЈ БЕЛИОТ ЛАБОРАТОРИСКИ СТАОРЕЦ**

## **Абстракт:**

Промените што настануваат кај организмот во борбата за зачувување на внатрешната хомеостаза и одбрана на истиот, како од надворешните фактори, така и од навлезени агенси во него, се одбрамбени механизми со кои се овозможува преживување на истиот во таква состојба. Меѓутоа, манифестирањето на тие промени зависи од карактерот, интензитетот и времетраењето на дејствувањето на агенсот, како и од физиолошките карактеристики: пол, возраст, здравствена состојба, и истите не секогаш се успешни за да организмот преживее. Колаген-индуцираниот артритис доведува до автоимунно инфламаторно воспаление, што пак, од своја страна, не само што доведува до отоци, деформитети и ограничена подвижност на зглобовите, туку предизвикува и изместување како на хематолошките така и на биохемиските параметри во крвта, односно, во серумот кај организмот.

Испитувани беа ефектите на колаген-предизвиканиот артритис, односно автоимуната реакција и воспалението, врз некои параметри на црниот дроб, како протеините, DNA, RNA, нуклеарниот индекс, нуклеарниот волумен, активноста на AST и ALT во серум од крв на експериментални во однос на контролни животни. За таа цел, како експериментални и контролни животни, беа користени бели лабораториски стаорци од сојот Wistar.

Од испитувањата се дојде до сознание дека активноста на аспартатамино трансферазата и на аланинамино трансферазата кај контролната група на стаорци, кај сите единки, се движи околу некоја нормална референтна вредност, додека кај третираните експериментални животни со индуцирањето на артритисот сигнификантно се зголемува AST, додека вредностите на ALT се зголемени, но остануваат на ниво поблиску до контролната група. Релативната содржина на протеините во црниот дроб и нуклеарниот индекс се намалуваат, додека релативната содржина на DNA, RNA и нуклеарниот волумен се зголемуваат.

**Клучни зборови:** Реуматоиден артритис, колаген-индуциран артритис, инфламација, Wistar стаорец, протеини, DNA, RNA, аспартат аминотрансфераза, аланин аминотрансфераза.

# **THE INFLUENCE OF COLLAGEN INDUCED ARTHRITIS OVER THE AST AND ALT ACTIVITY IN THE WHITE LABORATORY RAT**

## **Summary:**

The changes that happen in organism in its struggle to keep the inner homeostasis and its defense, due to external factors and penetration agents, are defensive mechanisms that make the organism alive in that situation. However, the manifestation of these changes depends on the character, the intensity and the duration of the agents' activity, and on the physiological characteristics as well like gender, age, health condition, and they are not always successful for organism's survival. Collagen induced arthritis leads to autoimmune inflammatory response, that results not only to swellings, deformities and limited moving of the wrists (joints), but also results in changes (shifts) in both the hematological and biochemical parameters in the blood, that is in the organism's serum.

The effects of the collagen-induced arthritis were analyzed, that is the autoimmune reaction and the inflammation, over some parameters in liver, as well as the proteins, DNA, RNA, the nuclear index, the nuclear volume, the AST and ALT activity in blood's serum of experimental animals related to control animals. For that purpose, white laboratory rats from the Wistar race were used as experimental and control animals.

The research revealed that AST and ALT activity in the control group of rats, in each individual, is about some normal referent value, while in the treated experimental animals by inducing the arthritis the AST is significantly increased, while the ALT values are increased but stay on the level closer to the control group. The relative content of liver's proteins and nuclear index decreases, while the relative content of DNA, RNA and nuclear volume increases.

**Keywords:** Rheumatoid arthritis, collagen-induced arthritis, inflammation, Wistar rat, proteins, DNA, RNA, aspartat aminotransferase, alanine aminotransferase.

## Содржина

<b>1. Вовед .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1. Зглобови - градба и функција .....</b>	<b>9</b>
<b>1.2. Инфекција и инфламација .....</b>	<b>11</b>
<b>1.3. Реуматоиден артритис, почеток и развивање на болеста, видови на артритис .....</b>	<b>14</b>
<b>1.4. Црн дроб .....</b>	<b>23</b>
<b>1.5. <i>AST ( ASPARTAT AMINOTRANSFERAZA )</i> - аналитички карактеристики и дијагностичко значење .....</b>	<b>25</b>
<b>1.6. <i>ALT ( ALANIN AMINOTRANSFERAZA )</i> - аналитички карактеристики и дијагностичко значење .....</b>	<b>27</b>
<b>2. Цели на трудот .....</b>	<b>28</b>
<b>3. Материјал и методи на работа .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1. Експериментални животни .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2. Подготовка на колагенот за апликација .....</b>	<b>29</b>
<b>3.3. Постапка за аплицирање на колагенот .....</b>	<b>31</b>
<b>3.4. Земање на крв за анализа од експерименталните животни и добивање на серум .....</b>	<b>31</b>
<b>3.5. Одредувани параметри .....</b>	<b>32</b>
<b>3.6. Методи за одредување на параметрите .....</b>	<b>32</b>
<b>3.6.1. Определување на вкупните протеини по методата на Гоа .....</b>	<b>32</b>
<b>3.6.2. Одредување на вкупна содржина на DNA во ткиво по методата на Cerioty .....</b>	<b>33</b>
<b>3.6.3. Одредување на вкупна содржина на RNA во ткиво по методата на Mungo .....</b>	<b>34</b>
<b>3.6.4. Хистолошка обработка на материјалот .....</b>	<b>35</b>
<b>3.6.5. Метода за одредување на Аспартат аминотрансфераза .....</b>	<b>36</b>
<b>3.6.6. Метода за одредување на Аланин аминотрансфераза .....</b>	<b>37</b>
<b>3.7. Статистичка обработка на податоците .....</b>	<b>38</b>
<b>4. Резултати .....</b>	<b>40</b>



4.1. Влијанието на индуцираниот реуматоиден артритис врз некои параметри на црниот дроб .....	40
4.2. Содржина на протеините во црниот дроб .....	41
4.3. Содржина на DNA во црниот дроб .....	44
4.4. Содржина на RNA во црниот дроб .....	47
4.5. Цитометриски анализи кај црниот дроб .....	50
4.6. Активност на AST .....	52
4.7. Активност на ALT .....	54
5. Дискусија .....	56
5.1. Влијанието на индуцираниот реуматоиден артритис врз содржината на протеините во црниот дроб .....	56
5.2. Влијанието на индуцираниот реуматоиден артритис врз содржината на DNA и RNA во црниот дроб .....	60
5.3. Влијанието на индуцираниот реуматоиден артритис врз нуклеарниот индекс (Ni) и нуклеарниот волумен (Vn) кај црниот дроб .....	62
5.4. Влијанието на индуцираниот реуматоиден артритис врз активноста на AST и ALT во црниот дроб .....	63
6. Закључоци .....	65
7. Литература .....	67

# 1. Вовед

## 1.1. Зглобови – градба и функција

Повеќето зглобови имаат едноставна градба. Тие се состојат од два или повеќе коскени краеве покриени со ‘рскавица, споени со густо сврзувачко ткиво и артикуларна капсула. Капсулата е покриена со интимален слој со различна микроскопска структура, кој се нарекува синовија или синовијална мембрана (Слика бр. 1). Во оваа затворена празнина се наоѓа мала количина на бистра синовијална течност. Околу зглобовите се наоѓаат тетиви, обвивки на тетивите и бурза. Овие структури се од големо значење за нормалното механичко функционирање на зглобот, кои при реуматоидниот артритис, како и при повеќе други болести, се примарно или секундарно зафатени (Moritz, 1942).

Артикуларна ‘рскавица е хијалинска ‘рскавица која ги покрива краевите на коските во зглобовите. Тоа е еластично, аваскуларно ткиво сиромашно со клетки. Главен, ако не и единствен, извор на храна му е синовијалната течност, која се наоѓа во шуплината на зглобот. Во споредба со другите сврзни ткива, артикуларната ‘рскавица има мала способност за регенерација и репарација после повреда (Moritz, 1942). За нормално функционирање на артикуларната ‘рскавица потребно е нејзината површина да биде мазна, што е доста тешко да се одржи поради тоа што таа прима механички удари и амортизира разни вибрации, кои од надворешната средина се вршат врз коските. Таа, освен тоа, е подложна и на разни оштетувања од токсични агенси и акутни повреди и ерозија на нејзината површина при болести како што е реуматоидниот артритис (Baueг и сор., 1940).

Синовијалната мембрана, за разлика од ‘рскавицата, има изразена способност за регенерација. Истражувањата со експериментални животни покажале дека од 30 до 100 дена после синовијектомија доаѓа до потполна репарација (Key, 1925; Wolcott, 1927). Се мисли дека таа е сврзувачко ткиво кое претрпело извесни промени во функционалните и структуралните карактеристики. Функција на синовијалната мембрана е создавање на синовијален муцин и регулирање на размената на материите помеѓу крвта, лимфата и синовијалната течност (Baueг и сор., 1940).

За разлика од другите мембрани, уште одамна било докажано дека синовијалната мембрана има зголемена пропустливост (Baueг и сор., 1933; Shaffer и Bennett, 1939; Bennett, 1939). На тој начин туѓите материи и колоидни честички се пренесуваат низ мембраната за да се отстранат од зглобот. Капсулата на зглобот се состои од густо фиброзно ткиво зајакнато со тетиви,

мускули и фасцијални слоеви, чија главна функција е поврзување на краевите на коските кои влегуваат во составот на зглобот (Moritz, 1942).

Синовијалната течност во нормален зглоб е бистра, бледожолта леплива течност, сиромашна со клетки и малку по количина (Coggeshall и сор., 1940). Од нормално колено на возрасен човек може да се аспирира просечно околу 0,45 ml на синовијална течност (Coggeshall и сор., 1940). Дистрибуцијата на електролити и неелектролити помеѓу крвниот серум и синовијалната течност е во согласност со концепцијата според која синовијалната течност е дијализат на крвната плазма која содржи албумин, глобулин и муцин. Муцилот најверојатно се создава во функционално специјализирани клетки во синовијалното ткиво. Промена на количината и изгледот на синовијалната течност и нејзините физички и хемиски карактеристики се резултат на повреди и болести (Coggeshall и сор., 1941; Ropes и Bauer, 1953). Таквите промени можат да помогнат при поставување на дијагноза и лечење на болестите на зглобовите.

Зглобовите се анатомски и функционално така градени да овозможат брзо движење, стабилност и координација на телото, но притоа ‘рскавичните површини и синовијалните ткива се изложени на чести повреди од механичка, токсична и метаболичка природа. Артикуларната површина претрпува важни регресивни промени и при секојдневното трошење и природно физиолошко стареење. Овие промени можат доста да ги забрзаат и штетните агенси, трауми кои се повторуваат, нарушена механика при нарушување во одењето или држењето на телото, но и болести како гихт или ревматоиден артритис (Bennett и сор., 1942).



Слика бр. 1 Градба на зглоб

(www.thepittsburghchannel.com – превземено јули 2008 г.)

## 1.2. Инфекција и инфламација

За термините воспаление и инфекција, честопати погрешно се мисли дека означуваат иста работа. Тоа не е секогаш случај. Инфекциите можат, и предизвикуваат воспалителни реакции, но воспаленијата се чести и без инфекции. Во телото, секое ткивно оштетување резултира со воспалителен одговор карактеризиран со црвенило на нападнатата област, зголемена температура, локализиран едем и болка или јадеж (Christen, 2005). Според истиот автор, инфективните микроорганизми навлегуваат преку одбрамбените телесни бариери со што може да предизвикаат оштетување на ткивото, и тоа да резултира со воспаление во различни ткива и органи. Но, микроорганизмите не се секогаш виновници. На пример, дегенеративното оштетување на 'рскавицата на зглобот може да предизвика воспаление на зглобот (асептичен дегенеративен артритис) без микробни навлегувања (Davidson и Diamond, 2001). Физиолошките нарушувања, кои продуцираат знаци и симптоми на воспаление, се основни за да се разбере воспалителниот процес. Многу од знаците и симптомите се резултат на локалните промени во кардиоваскуларното снабдување со крв на нападнатата област.

Црвенилото и зголемената температура резултира со локална вазодилатација во нападнатата област каде внесуваат зголемени количини на топлина и ја покачуваат внатрешната температура на крвта во областа. Зголемената пропусност на капиларите во воспалените ткива резултираат со зголемена филтрација и локализирано црвенило (Kamradt и Volkmer-Engert, 2004). Според истите автори, овие кардиоваскуларни промени може да бидат протолкувани како обид на организмот да го засили протокот на крвта во нападнатата област испорачувајќи повеќе леукоцити и состојки за поправка на штетата. Болката и чешањето се појавуваат кога рецепторите за болка се стимулирани и дефинитивно се локализирани во областа на оштетеното ткиво. Манифестирајќи ги овие знаци на воспаление и знаејќи дека базофилните леукоцити се активираат кога маст-клетките преовладуваат во сите ткива, можат да настанат некои важни физиолошки врски. Имено, базофилите и маст-клетките содржат и може да ослободат материја наречена хистамин (Vanham и сор., 2006; Ishii и сор., 2006), при што е интересно дека хистаминот е способен да продуцира ефекти опишани претходно како симптоми на воспаление, но и некои други ефекти. Хистаминот кој е ослободен во иницијалната фаза на оштетување на ткивото, е еден вид заштитна мерка на телото да го забрза закрепнувањето од повреди. Според истражувањата на Christen (2005), како резултат на ова ослободување, зголемениот проток на крв во областа го поправа повреденото ткиво. Но, во некои случаи и хистаминот, сам по себе, може да предизвика оштетување во организмот. На пример, IgE антителата се поврзани со

хиперсензитивни алергични реакции и тие предизвикуваат дегранулација на маст-клетките со ослободување на хистамин (Christen, 2005).

Механизмот на воспалението на молекуларно ниво е една од посебните области на имунологијата. Имено, при воспалителниот процес во акутната фаза, прв одговор е растењето на протеините од акутната фаза, кои стимулираат каскаден процес за синтеза на имуномедијатори–молекули од типот на цитокини и интерлеукини. Воспалителниот одговор, проследен со зголемена синтеза на наведените супстанции, доведува до промена на ткивото на крвните садови и учествува во процесот на артериосклероза, промени во пропусливоста на цревната слузокожа, но и до промена во структурата на зглобовите, предизвикувајќи реуматски артритис или артроза (Bethesda, 1999).

Постојат голем број на литературни податоци и добиени резултати од истражувања кои упатуваат на тоа дека причинителите за инфекција можат да предизвикаат локална или системска инфламација на сите структури на коскено-мускулниот состав (Christen и Von Herrath, 2004; Kamrdat и сop., 2005). Освен тоа, докажано е дека инфекцијата може директно да предизвика автоимунa реакција, иако со сигурност не е јасно кој тип на инфекција индуцира или инхибира автоимунa реакција (Davidson и Diamond, 2001; Markelevic, 2006).

Притоа, взаемната поврзаност на инфекцијата и автоимуната реакција е комплексна и отвора прашања дали инфекцијата и автоимуноста се две страни на едно исто нарушување? (Christen, 2005). Клеточниот имунолошки одговор на различни микроорганизми и други антигени, може да доведе до оштетување на ткивата на местото каде се појавила инфекцијата или друг надворешен антиген. Инфламацијата и фиброзата можат да доведат до поголемо разорување на ткивата и смалување на нивната функција (Markelevic, 2006).

Од посебна важност, при испитувањата на појавата на инфекциите и автоимуните реакции, се истражувањата на заштитната улога на Т-лимфоцитите како и истражувањата на таканаречените Toll-рецептори, односно, трансмембрански протеини, кои препознаваат патогени молекули при интеракција со различни лиганди кои делуваат како агонисти или антагонисти на истите (Banham и сop., 2006; Ishii и сop., 2006).

Заедничка карактеристика за сите реуматски болести е негнојна воспалителна реакција на сврзувачкото ткиво со основни клинички знаци како: воспаление, црвенило, оток, локална топлина, болка и ограничена моторна подвижност (Christen, 2005). Се појавуваат болки во мускулите, се зголемуваат слезената и хепарот (hepatosplenomegalija), може да дојде до воспалување на срцевиот мускул (perikarditis), и белодробната кошулица (pleuritis). Во првите шест месеци од траењето на болеста, артритисот е присутен на пет или повеќе зглобови, но општи знаци на болеста нема. Реуматоидните воспаленија, автоимуните болести и автоимуните синдроми припаѓаат на посебна група на

болести во хуманата патологија, кои манифестираат клинички, серолошки и патохистолошки знаци на активација на автореактивните клонови на лимфоцитите. Активирањето на имунолошкиот состав кај тие болести се гледа во појавата на автоантитела на еден или повеќе автоантигени, а настануваат кога имунолошкиот систем ќе изгуби контрола над делот на лимфоцитите кои се специфично автореактивни со клетките на сопствениот организам функциските и ткивните антигени, односно, рецептори (Banham и сор., 2006; Ishii и сор., 2006). Отсуството на контрола е последица на подолго време нарушена регулација на фид-бек контролираните функции на нервно-ендокрино-хуморалниот и микроваскуларниот систем кај генетски предиспонираните личности. Генетската предиспозиција се однесува на координираното делување на различните гени кои меѓусебно „како оркестар“ ја контролираат експресија на одредени гени, одговорни за активација на хуморални и целуларни компоненти на имунолошкиот систем при воспалителни процеси (Davidson и Diamond, 2001). При воспалителните процеси, неуроендокрината регулација на имуноста ја подразбира хомеостазата помеѓу централниот и периферниот нервен систем, односно, хормоналниот циклус, клеточните и хуморалните интеракции со цитокинините и неврпептидите (Burnet, 1959; Oldstone, 2005).

Вирусите, исто така, можат да бидат едни од провокативните причинители кои поттикнуваат лачење на автореактивни антитела поради својата молекуларна мимикрија. Теоријата на молекуларната мимикрија во последно време еволуираше од сознанијата за сличности во секвенците помеѓу сопствените и вирусните антигени, до некои денешни сознанија за „структурна хомологија“ која упатува на директна поврзаност помеѓу инфекцијата и автоимуното воспалување (Kamradt и Volkmer-Engert, 2004).

Со текот на времето, инфламаторните болести, како што се реуматоидниот артритис, полимиозитис, реактивниот артритис, еволуираат една во друга, или се појавуваат истовремено кај еден пациент со синдром на преклопување, мешање на сликите на болестите, на серопозитивните и серонегативните артритиси, со што уште повеќе се комплицира состојбата на дијагностицирање и третман на болеста (Schumacher, 1994; Davidson и Diamond, 2001; Markelevic, 2005). Луѓе инфицирани со бета-хемолитички стрептокок од групата А се изложени на поголем ризик од појава на ревматска грозница, што претставува и еден од најочигледните примери за послеинфекциската автоимуност настаната со мимикрија помеѓу лизоганглиозидите на домакилот и антигенските структури на причинителот (Guilherme и сор., 2001). Интересни се истражувањата во Gabon, каде е докажано дека децата кои преболеле од паразитарна инфекција, не заболуваат од автоимунни болести (Vocanegra, 1994; Zampieri и сор., 2004; Ebringer и Rashid, 2006).

### **1.3. Ревматоиден артритис, почеток и развивање на болеста, видови на артритис**

Ревматоидниот артритис е хронична системска автоимуна болест, која најчесто се одликува со неспецифично, симетрично воспалување на малите периферни зглобови, тетиви и синовија, но со воспалителниот процес може да бидат зафатени и срцето, срцевите обвивки, мускулите, белите дробови, периферните нерви, очите, кожата и многу ретко крвните садови (Davidson и Diamond, 2001). Отоците и деформитетите можат да ја ограничат подвижноста на зглобовите, но сепак и во најтешките форми на ревматоиден артритис, подвижноста на зглобовите, иако минимална, се задржува.

Ревматоидниот артритис спаѓа во групата на таканаречени системски болести на сврзувачкото ткиво (Markeljevic, 2006). Воспалувањето започнува во синовијата која ја обложува внатрешноста на зглобот и која обезбедува исхрана на зглобната 'рскавица и создавање на зглобната течност. Притоа, се развива имунолошки процес на автоагресија предизвикувајќи прво дифузен васкулитис, а потоа и синовитис, зголемувајќи го бројот на клетките карактеристични за воспаление, како на пример, полиморфонуклеарните леукоцити. Од синовијалниот слој во зглобната празнина се излачува воспалителна течност.

Болеста почнува постепено и има подмолен тек. Таа е широко распространета и е присутна кај скоро секој стоти жител на земјината топка, односно, 2-3 % од вкупната светска популација или околу 180 милиони луѓе во светот. Почесто се јавува кај женската популација, и тоа, во периодот помеѓу четвртата и шестата деценија на животот, но може да се појави и во било кој период од животот. Доколку болеста се појави под шеснаесетгодишна возраст тогаш е позната како јувенилен идиопатски артритис (Young и сор., 2000).

Примарно, процесот започнува да се развива во подрачјето на синовијалната мембрана на зглобот. Главна причина за настанување на болеста е автоимуна реакција, а зафатеноста на зглобовите е симетрична. Воспалението е предизвикано од имуниот систем на организмот кој го напаѓа ткивото кое ги обвиткува зглобовите (Kamradt и Volkmer-Engert, 2004). Како последица на ова, доаѓа до создавање на сврзувачко и гранулациско ткиво, познато како *panus* - пролиферативно ткиво од воспалената синовијална мембрана кое има злоќудни својства. Имено, според Kamradt и Volkmer-Engert (2004) *panusot* има способност да ја лизира зглобната 'рскавица, коскените краеве во зглобот, но и сите други структури на зглобот. Сето ова доведува до болки, вкочанетост, деформација и нарушување на функцијата на заболените зглобови. Можно е некои артритогени предизвикувачи да послужат само како „trigger“-почетни иницијатори на имунолошките реакции кај имунолошки предиспонираните лица, создавајќи автоантитела на сопствените протеини (Kamradt и Volkmer-Engert, 2004). Некои

видови на вируси и бактерии можат да бидат надворешни причинители, после предизвикана инфекција, и ризик-фактори за појава на болеста, исто како што може да биде и староста, наследните фактори (Davidson и Diamond, 2001), потоа полот односно хормоналните фактори, како и пушењето, иако со сигурност не е потврдено. Се мисли дека кај генетски предиспонираниите единки под влијание на надворешните фактори, најверојатно некои бактерии или вируси, доаѓа до појава на болеста. Кога се зборува за наследните фактори, некои автори како Davidson и Diamond (2001), потенцираат дека постои склоност спрема заболувањето на луѓето со специфични генетски карактеристики, како што е шифрата HLA DR 4, кое е одредено место на генската мапа.

Научните откритија на ова поле, во последно време се големи, и логички се наметнува и атрактивната идеја за можната генетска терапија на оваа болест. Се претпоставува дека во зглобот, односно во синовијалната мембрана, доаѓа до реакција помеѓу надворешен навлезен агенс - антиген, кој може да биде дел од некоја бактерија или вирус, и најзначајните клетки на имунолошкиот систем Т-лимфоцитите (Cohen, 1993). Тогаш во содејство со другите имунолошко активни клетки, како макрофаги и фибробласти, доаѓа до синтезирање на супстанции кои овозможуваат нивна понатамошна комуникација и истовремено започнува процесот на инфламација. Овие супстанции се нарекуваат цитокини, а помеѓу нив најзначајни се TNF-alfa и interleukin-1. Внатрешната синовијална мембрана на зглобот, поради воспалувањето, повеќекратно се здебелува, отечува и се формираат нови крвни садови. Ревматоидните воспаленија, автоимуните болести и автоимуните синдроми припаѓаат на посебна група на болести во хуманата патологија, кои манифестираат клинички, серолошки и патохистолошки знаци на активација на автореактивните клонови на лимфоцитите. Активирањето на имунолошкиот состав кај тие болести се гледа во појавата на автоантитела на еден или повеќе автоантигени, а настануваат кога имунолошкиот систем ќе изгуби контрола над делот на лимфоцитите кои се специфично автореактивни со клетките на сопствениот организам-функциските и ткивните антигени, односно, рецептори (Banham и сор., 2006; Ishii и сор., 2006). Како резултат на воспалението, се ослободуваат протеини кои ги оштетуваат 'рскавиците, коските, лигаментите и, на крај, зглобот ја губи својата форма (Markeljevic, 2006).

Радиолошката слика на заболениите зглобови е карактеристична. Во почетокот на болеста нема радиографски промени, но после извесно време од траење на болеста, се детектира остеопороза на соседните коски во зглобот и на крајот има деструкција на зглобот (Graudal и сор., 1998). Според овие автори, деструкцијата е дифузна со ерозија на зглобната површина, намалување на зглобниот простор, периартикуларна остеопороза и оток на зглобот. Болка при пасивно придвижување на зглобот е еден од можните знаци за постоење на



воспаление во зглобот. Отокот на зглобот е последица на пролиферација на синовијалното ткиво. Карактеристични деформации на зглобовите кај ревматоидниот артритис се улнарна девијација на прстите на шаката, протрузија на улнарните глави и деформација на прстите на дланката. На стапалата е карактеристично проширувањето на предниот дел и канцести деформитети на прстите од стапалото. Деструкцијата на зглобовите настанува за една до две години од почетокот на болеста, а за време на траење на болеста, бројот на заболените зглобови се зголемува. Во понапреден стадиум на болеста, радиографски се присутни видливи знаци на луксација и сублуксација на зглобот (Graudal и сор., 1998).

Кај понапреднати стадиуми на болеста има појава на ревматоидни јазли (Слика бр. 2) како најкарактеристични манифестации за болеста и се јавуваат во околу 20-30% од заболените пациенти, потоа кардиопулмонарни проблеми со можно зафаќање на белодробната кошулица, а симптомите можат да се совпаднат и со други белодробни заболувања. Карактеристични се и таканаречените очни манифестации, односно, зафатеноста на рожницата и коњуктивата на окото-кератокоњуктивитис, каде болниот има чувство на суви очи, болка и црвенило на заболеното око - iridociklitis. Причините кои ги поврзуваат воспалувањето на окото со ревматоидниот артритис не се познати, но важно е да се знае дека тие можат да се појават и независно.

Кај системскиот облик на јувенилниот идиопатски артритис може да се појави и зголемување на хепарот, слезенката и лимфните жлезди. Ако болеста не се лекува, таа непречено и сигурно напредува.

Постојат две хипотетички теории за развојот на ревматоидниот артритис. Спрема првата теорија, Т-лимфоцитите, клетки кои припаѓаат на имунолошкиот систем, стапуваат во интеракција со сеуште непознат антиген. Т-лимфоцитите се одговорни за почетокот на болеста како и за нејзината хронична природа. Оваа теорија е базирана на истражувањата кои го поврзаа ревматоидниот артритис со составот на HLA-B27 антигенот, голем број на CD4+ Т-лимфоцити и нарушени рецептори за Т-лимфоцити во зглобовите (Shoenfeld, 1989; Cohen, 1993). Според втората теорија, Т-лимфоцитите се причина само за почеток на болеста, а хроничното воспалување на зглобовите е резултат на активноста на макрофагите и фибробластите.



Слика бр. 2 Деформитети предизвикани од ревматоиден артритис

(www.themoneytimes.com - превземено јули 2008 г.)

Во процесот на развојот на ревматоидниот артритис можеби најважна е генетската предиспозиција. Имунолошкиот одговор на цитолитичките Т-лимфоцити на вирусните инфекции може да доведе до оштетување на ткивата, убивајќи ги заразените клетки, дури иако вирусот сам по себе нема цитопатски ефект врз организмот. Основна физиолошка функција на цитолитичките Т-лимфоцити е елиминација на интрацелуларните микроорганизми, првенствено вируси. Некои вируси директно ја оштетуваат заразената клетка, но има и такви вируси кои го немаат тој ефект. Цитолитичките Т-лимфоцити не можат однапред да прават разлика помеѓу цитопатските и нецитопатските вируси, и затоа тие ги убиваат заразените клетки со вирус, без разлика дали инфекцијата е штетна за организмот или не. Пример за вирусна инфекција, каде доаѓа до оштетување на ткивото, после имунолошкиот одговор на сопствените цитолитички Т-лимфоцити, иако самиот вирус не предизвикува оштетување на ткивото е limfocitniot horiomeningitis. Поради промени во клетките на зглобната рскавица

Т-лимфоцитите, клетките на зглобната 'рскавица ги препознаваат како туѓи тела и ги напаѓаат. Тогаш започнува доста комплициран и недоволно разјаснет воспалителен процес во кој учествуваат и макрофагите, ткивните фибробласти, Б-лимфоцитите, неутрофилните гранулоцити, а исто така и цела низа на воспалителни медијатори (простагландини) и цитокини (interleukini, алфа-TNF), протеази и друго (Samarko и Vaiopoulos, 2005). Цитокините како координатори на имунолошкиот систем ја стимулираат активацијата на НК-клетките, IL-2 и TNF-alfa. Медијаторите на воспалението и цитокините, посебно interleukin IL-1 и alfa-TNF кои се клучни иницијатори на ревматоидниот артритис, го стимулираат понатамошниот развој на болеста која добива хроничен тек. Протеазите колагеназа, стромелизин и гелатиназа ја разоруваат зглобната 'рскавица и коската. Во исто време се зголемува и количината на зглобната течност, што доведува до оток на зглобот и на меките ткива околу него и на допир местото е болно а подвижноста е ограничена (Samarko и Vaiopoulos, 2005).

Карактеристичен знак на болеста е вкочанетост што се јавува после продолжен одмор, и појавата на krepitacija - чкрипење во зглобовите при движење. Со уништување на структурата на зглобовите, доаѓа до нивна нефункционалност и деформација (Markeljevic, 2006). Околу воспалените зглобови атрофираат мускулите, што е карактеристично за ревматоидниот артритис, а во мускулите може да настане полесен миозитис. Нема сигурни докази дека храната влијае врз текот и резултатот на болеста.

Од компликациите, ревматоидниот артритис предизвикува болка и вкочанетост на зглобовите, но истовремено го зголемува ризикот од остеопороза, посебно кај луѓето кои примаат кортикостероиди за лечење. Во минатото, луѓето со ревматоиден артритис завршувале во инвалидски колички поради големото оштетување на зглобовите, но со денешните можности за лечење, со соодветен третман и најтешките форми на ревматоиден артритис можат да се стават под контрола. Други компликации се зафаќање на другите органските системи и прогресија на болеста.

За дијагностицирање на ревматоидниот артритис е важна седиментационата рата која дава покачено ниво и посочува на воспалителен процес во организмот, иако таа не е специфична. Друг лабораториски тест кој се изведува е ревма-факторот, кој претставува антитело кое се јавува кај пациентите со реуматоиден артритис, но може да отсуствува во почетокот на болеста, а исто така можно е присуство на ревма-фактор во отсуство на симптоми на ревматоиден артритис (Schumacher, 1994; Davidson и Diamond, 2001; Markeljevic, 2005). Други методи, кои се применуваат, се рентген снимањата на зафатените зглобови и одредување на CRP. HLA B27 е молекул кој спаѓа во групата на клеточни маркери и неговото присуство се одредува со посебни

анализи на крвта. Кај здрава популација, наодот е 5-8% додека кај артрозна популација се среќава дури 80 % од случаевите (Bell и сор., 1998). Во артритисите припаѓа и гихтот кој, всушност, е акутна форма на воспалителен артрит. Тој ги напаѓа малите зглобови на рацете и нозете и тоа најчесто палецот, а дури 90% заболуваат мажите. Колената, прстите на рацете, 'рбетот и колковите се зглобови кои најмногу се користат и кои најмногу се трошат и затоа и најчесто се зафатени со артритис. Од биохемиските анализи на крвта, кои се користат за дијагностицирање на болеста се: CRP, CK, LDH и биохемиска анализа на урина, а од хематолошките SE и KKS. Од имунолошките анализи се користат ANA, HLA B27, RF, ANF, од радиографските RTG, CT, MR, а поради дијагностички потреби се прави и интраартикуларна пункција.

Според авторот Slobodan (2003), прогнозата за ревматоидниот артритис зависи од неговата тежина, времетраењето и лекувањето. Лекувањето трае сè додека е присутна и болеста.

Траењето на болеста е непредвидливо и нејзиниот тек е проследен со периоди на влошување и спонтано смирување на болеста од што зависи и терапевскиот режим. Целта при лечењето на болните од ревматоиден артритис е да им се овозможи што покомфорен живот со максимално намалување на болката, намалување на степенот на деформација на зглобовите, односно, спречување или смалување на степенот на инвалидноста на болните. Според истиот автор, најчесто применувани тераписки мерки се нестероидни антиревматски или антиинфламациски (NSAIL)-антиревматици. Овие лекови го смируваат воспалението и покачената температура, но не можат потполно да го сопрат воспалителниот процес. Гликокортикоидите се најмоќни лекови во спречувањето на воспалителните процеси во организмот. Меѓутоа, нивната употреба треба да биде временски ограничена, затоа што при подолга примена може да доведе до несакани ефекти, како што е остеопорозата, а при третман кај јувенилниот идиопатски артритис до заостанување во растот. Се мисли дека кортикостероидите не влијаат на текот на болеста, но некои студии укажуваат на тоа дека во мали дози можат да имаат модифирачки ефекти на болеста (Schumacher, 1994; Davidson и Diamond, 2001; Markeljevic, 2005). Иако не постои лек за ревматоиден артритис за потполно излекување, со соодветен третман и заштита на зглобовите и промена на животните навики, болеста може да се стави под контрола, така да пациентите и покрај болеста, можат да имаат долг и продуктивен живот. Во најтешките случаи се применуваат ортопедски операции, како корективни операции на коските, транспозиција на тетивите или тотална замена со зглобни протези, кога постои тешко оштетување на зглобот, но и хируршки интервенции на меките ткива во случај на трајни контрактурни деформитети.

Колаген-индуцираниот артритис почетно бил развиван употребувајќи Wistar стаорци (Trentham и соp., 1977 ). Моделот бил развиван и врз глувци (Courtenay и соp., 1980), и на други нечовечки примати (Cathcart и соp., 1986). Споредено со глувците, разните видови на стаорци се поподложни на Collagen-induciraniot артрит и развиваат артритис до ограничени размери. Генерално земено, свинскиот тип-II колаген е најпотентниот артритогенетски вид од типот-II колаген, потоа следи говедскиот, а на крај е пилешкиот кој е најмалку артритогенетски (Wooley, 1988). Квалитетот на животните, исто така, е многу важен фактор (Griffiths, 1988). Воглавно, цревната бактериска флора, без оглед на тоа дали е патогенична или непатогенична, влијае значително на имунолошката реакција на домаќинот. Стаорците, кои немаат бацили, се многу подложни за прифаќање на поттикнатиот артритис, додека конвенционалните стаорци се помалку подложни на тоа. Исто така, познато е дека диетата влијае на видот и различноста на Collagen-induciraniot артритис кај глувците (Wooley, 1988). Но сепак, ова не е пошироко испитувано и третирано кај стаорците.

Според Wooley (1988), постојат неколку начини за предизвикување на артритис со висока зачестеност, од кои поважни се два, а сè во зависност од целта на експериментот.

а) Предизвикување на артритис со една имунизација без инекција за побудување. Протоколот се користи за подготовка на емулзија, која се инјектира на ист начин, а артритисот ќе се развие за 2-3 седмици после имунизацијата во зависност од видот на лабораториските стаорци. Процентот на предизвикан артритис ќе биде од 80-100% кај оние видови кои се со високо ниво на одговор.

б) Предизвикување на артритис со инекција за побудување. За да се обезбеди висок степен на предизвикување на артритис инекција за побудување може да се даде седмиот ден после имунизацијата.

Животинските модели на експериментален артритис се широко употребувани за да се истражи патогенезата на ревматолошкиот артритис како и за развивање на нови терапии.

Почетокот на артритис кај стаорците е многу побрз отколку кај глувците, а ефекти на клинички очигледен артритис, со пропаднати зглобови, се појавува на 2-3 седмици после првата имунизација. Почетокот на артритисот кај ВВ стаорците е побрз отколку кај другите видови стаорци, околу 12-14 дена, ако имунизацијата е ефикасна, а 100% од стаорците развиваат артритис во рок од околу 3 седмици. Според литературните податоци, сите стаорци се жртвуваат најдоцна на 30-тиот ден од пост-имунизацијата со колаген тип-II. Секое животно кое ќе покаже знаци на стрес (неактивност, мало тимарење, коњуктивитис, губење на тежината повеќе од 20%), треба да се изврши еутаназација (Winter и соp., 1962). Болеста започнува 18-20 ден после имунизацијата, со црвенило и отекување

на периферните интерфалангијални завршетоци и задните канци со напредување, а во повеќето случаи со отекување на сите 4 канци (потребно е 5-10 дена за да се појави). Истражувањата на Winter и сор. (1962) покажале дека кај повеќето третирани стаорци ќе се појави краткотрајно мало губење на тежината (помалку од 5%), почнувајќи од вториот или третиот ден од појавата на болеста и трае до деветтиот ден. Првобитните патолошки промени во артрозните зглобови се дијагностички недиференцирани, и тешко може да се разликуваат од другите форми на хронични воспалителни артрити, како реактивниот артритис и лимфните болести, но сигурно е дека го ексцитираат и го мобилизираат имуниот систем (Gardner, 1992). Фокалните или делумните васкуларни промени се редовна појава кај ревматоидниот синовитис, со манифестација на венска надуеност, капиларна опструкција или тромбоза и периваскуларна хеморагија (Rothschild и Masi, 1982). При микроскопија на синовиумот, откриени се абнормалности или благи, неспецифични воспалителни промени, кои се често, придружени со хиперплазија на синовијалните клетки (Roy, 1967).

Синовијалната површина со 'рскавица и коска е примарната „зона за напад“ кај нарушувањата како ревматоиден артритис (Gardner, 1992; Firestein, 1994). Координацијата на васкуларните и клеточните реакции, зависи од бројот на активни медијатори кои се наоѓаат во плазмата, подвижните воспалителни клетки или погодените зглобни клетки. Важните медијатори вклучуваат пајаковидни метаболити на киселина, примерок на реактивен кислород, комплементарни компоненти, протеази и цитокини. Овие медијатори предизвикуваат едема на ткивото и силен пропуст на крвни садови кои може да бидат набљудувани во првите недели од ревматоидното воспаление (Marr и сор., 1995 ; Stevens и сор., 1991). Циркулирајќи леукоцитите, посебно Т-клетките, влегуваат во синовиумот низ HEV. Тоа станува познато во последните години, кога екстраваскуларната емиграција на клетките, кои партиципираат во имуната реакција и нејзините следни реакции, бараат серија од сврзувачки интеракции, прво со емигрирањето на клетките со HEV и подоцна со екстраваскуларните клетки (Springer, 1990). Како што болеста влегува во хронична фаза, синовијалната сврзувачка хиперплазија станува доволно истакната кај голем број од А и Б тип на клетки (Firestein, 1994). Најистакнатата промена во хроничната фаза е прекумерната инфилтрација на еднојадрени клетки, вклучувајќи ги Т-клетките, Б-клетките, макрофагите и плазматичните клетки. Лимфоцитите се собираат во периваскуларниот регион, кој содржи 80 % од лимфоцитите, од кои најголем број се Т-клетки (Cush и сор., 1992; Panayi и сор., 1992; Firestein, 1994). Т-лимфоцитите се присутни околу 30-50 % од воспалителните клетки во синовијалното ткиво. Неутрофилите може да бидат активирани од неколку фактори во средината на синовијалните флуиди, вклучувајќи го IL-8, стимулативен фактор на гранулоцитната колонија

макрофаги. По лизирањето на имуните комплекси, клетките можат да ја ослободат содржината на лизозомски ензими, да генерираат деструктивни радикали на кислород кои можат да ги оштетат 'рскавицата и потпорните структури на зглобот и да доведат до последици врз физиологијата и нормалната функција на другите системи (Kitsis и Weissmann, 1991).

Цитокините се протеини слични на хормони кои, заедно со директен контакт клетка-клетка, ги вклучуваат клетките на имуниот систем во комуникацијата. Многу реакции може да се сметаат како локално предизвикани активности на цитокините со зголемена продукција на истите кај пациенти со ревматоиден артритис. Во воспалениот синовиум, зголемената лепливост на пост-капиларните венули за циркулационите моноклеарни клетки може делумно да се даде ефект на цитокините. In vitro експериментите индицираат адхезија и хемотаксија на Т-клетките, макрофагите и неутрофилите се зголемени со трансформација на факторите на големината, IL-8 и TNF-alfa.

Активацијата и размножувањето на Т-клетките е примарно поврзана со акцијата на IL- 2, IL- 6, и TNF-alfa кои, исто така, можат да ги засилат реакциите. Локалната активација на макрофагите е индуцирана од одреден број на цитокини, вклучувајќи интерферон-гама и макрофаги. Б-клетките активно продуцираат имуноглобулини, следејќи ја стимулацијата со IL-4 и IL-6.

Ревматските болести, спрема класификацијата, се поделени на:

- воспалителни ревматски болести (reumatska groznica, reumatoiden arthritis, psoriaticen arthritis, anksilozen spondiloarthritis, lupus eritematodus, skleroderma и други.)
- дегенеративни реуматски болести (hondroza, osteoarthritis, osteohondroza, spondilitis и spondiloarthriytis )

Дегеративниот ревматизам се карактеризира со фокални акумулации со не така јак интензитет особено изразени во цервикален и лумбален 'рбет. Аваскуларна некроза (особено на колкот) се јавува како резултат на траума, стероидна терапија, зрачење, васкуларна повреда, српеста анемија и алкохолизам. Главата на фемурот особено е подложна на аваскуларна некроза, и тоа, после фрактура со дислокација. Дегеративниот ревматизам е како последица на промените кои настануваат во организмот во поодминати години поради „дотрајаноста“ на зглобовите и недостаток на глукозамин, во постара возраст.

- вонзглобен ревматизам (fibromijalgija, burzitis, tendinitis, panikulitis и друго.)

## 1.4. Црн дроб

Од многу одамна се знае дека црниот дроб е орган кој е вклучен со голем број од своите функции во одржувањето на функционалната хомеостаза на организмите. Сепак, според Jungermann и Katt (1989), најкратко тој може да се дефинира како орган одговорен за одржување на енергетската хомеостаза и контролна станица за ендокриниот систем во организмот. Вклученоста на црниот дроб во големиот број на функции во организмот, го прави неопходен и за нормалниот раст и развој во најраните развојни стадиуми. Оттука воопшто не треба да зачудуваат податоците кои укажуваат на тоа дека црниот дроб почнува да се формира на самиот почеток од ембрионалниот развој, и дека тој е орган на кого отпаѓа најголем дел од масата на телото (во феталниот развој околу  $1/18$ , а во адултните организми околу  $1/40$  од телото (Begic-Janeva, 1991).

Црниот дроб е паренхиматозен орган сместен на десната страна на абдоминалната шуплина, и е најголем внатрешен орган во човечкото тело. Црниот дроб е жлезда и со најголем број на функции, над 500. Тежината кај возрасен човек изнесува околу 1200 до 1600 g, а кога е полн со крв и до 2400g, и се состои од два лобуси од кои десниот е околу шест пати поголем од левиот. Црниот дроб со својот двостран циркулациски систем е богато снабден со крв и протокот изнесува околу 1,5 литри во минута (Corless и Middleton, 1983).

Во градбата на црниот дроб влегуваат повеќе видови на клетки. Така, главните клетки, на кои отпаѓа 72-78% од градбата на црниот дроб, се со паренхимско потекло, и се т.н. хепатоцити. Покрај овие клетки, има и непаренхимски клетки (ендотелни клетки, Kupffer-ови и Pit-клетки) застапени со околу 5 %. За црниот дроб карактеристично е и присуството на релативно голем меѓуклеточен простор (18%).

Хепатоцитот, од своја страна, како основна функционална и градбена единица на црниот дроб, е полијадрена и поларизирана клетка. На нејзината клеточна мембрана има нерамномерно распоредени, и скоро секогаш не фиксирани, хормонски рецептори, од кои најзначајни се оние за инсулин, глукагон, плазма протеини и гликопротеини (De Meyts и Hanoune, 1982). Хепатоцитите на почетокот од развојот се еднојадрени, но во текот на животот, со јасно изразена позитивна корелација во однос на ухранетоста, хепатоцитите може да бидат и двојадрени (Goswami и сор., 1974; Adler и сор., 1981). Поради важната улога во низа метаболички процеси, како катаболички така и анаболички, црниот дроб се нарекува и „централна лабораторија“ на организмот. Во него се одвиваат и важните процеси на детоксикација, коњугација и естерификација (Branch, 1982). Митохондриите содржат ензими потребни во метаболичките реакции на јаглехидратите, протеините и липидите, и во нив се одвиваат процесите на оксидативна фосфорилација и создавање на енергетски богати



соединенија. Рибозомите содржат рибонуклеинска киселина и таму се одвиват процесите на синтеза на протеини и на коњугација.

Во рапавите и мазните мембрани на ендоплазматичниот ретикулум и рибозомите се активираат аминокиселините за синтеза на протеини, се врши синтеза на холестерол, коњугација на билирубин, детоксикација на лекови и други за организмот туѓи материи (Ѓорѓоски, 1994). Лизозомите содржат разни ензими како: хидролази, протеази а некои од нив учествуваат во метаболизмот на жолчните бои, железото и бакарот. Исто така, и протромбинот непрекинато се создава во хепарот бидејќи се троши при коагулацијата на крвта.

При инфламацијата, како прв механизам за итна помош на организмот при инфекција, се создава CRP што е, исто така, супстанција која ја произведува црниот дроб, како одговор на ексцитираниот имун систем (Corless и Middleton, 1983). Иако црниот дроб поседува голема функционална резерва и регенеративна способност и може извесно време компензаторно да ја одржува функционалната способност, сепак, тој како „централна лабораторија“ на организмот е на удар при скоро сите заболувања или инфекции (Branch, 1982).

Какво влијание има ревматоидниот артритис врз некои други органи и органски системи според литературните податоци, помалку или повеќе е познато, но многу малку се такви податоци кои упатуваат на релацијата на ревматоидниот артритис со дадени параметри на црниот дроб, без разлика на возраста или полот на експерименталните животни. Со цел да видиме како ревматоидниот артритис влијае врз функцијата и некои параметри на црниот дроб, а посебно врз AST и ALT како хепатални ензими, ние индуциравме ревматоиден артритис со колаген тип-II. Кај контролната група на стаорци ја одредувавме масата на црниот дроб, концентрацијата на протеините, DNA, RNA, нуклеарниот индекс, нуклеарниот волумен, како и AST и ALT со цел да се потврди дека станува збор за нормално развиена популација врз кои ќе се изведува експериментот. Кај третираниите животни, ги испитувавме истите параметри за да ја видиме разликата помеѓу овие две експериментални групи и влијанието на болеста врз овој орган.

### 1.5. AST ( *ASPARTAT AMINOTRANSFERAZA* )

- аналитички карактеристики и дијагностичко значење

Порано ензимот бил познат како *glutamat-oxsalacetat-transaminaza* и означуван како GOT или SGOT. Ензимот ја катализира реверзибилната реакција на трансминација помеѓу L-аспарагинската киселина и 2-оксоглутарната киселина. Со оваа реакција на трансминација, кетокиселините поминуваат во аминокиселини и улогата на AST во интермедијарниот метаболизам е доста голема. AST ја има најмногу во хепарот, срцевиот мускул и скелетните мускули,

а во помали концентрации во мозокот, бубрезите, слезенката и белите дробови. Ензимот не е присутен во коските и во забите, но го има во телесните течности, крвта, урината, ликворот, жолчката.

Активноста на ензимот во крвниот серум е за околу 10 000 пати помала отколку во срцевиот мускул (Straus, 1965). Ензимот во клетката е локализиран околу 40% во цитоплазмата и околу 60% во митохондриите. Цитоплазматскиот и митохондрискиот изоензим се разликуваат по подвижноста при електрофореза, чувствителноста спрема промената на рН (Rej, 1981), термостабилноста, хроматографските и имунохемиските својства и афинитетот спрема супстратот (Kallan и Romancik, 1966). При електрофореза со фосфатен пуфер рН 7,5 се добиваат две зони на активност на AST, едната побрза која одговара на цитоплазматскиот изоензим, и друга побавна, катодна, која одговара на изоензимот од митохондриите. Митохондрискиот изоензим, кој уште се означува и како М или AST 2 има поголем афинитет спрема аспарагинската киселина, отколку цитоплазматскиот изоензим, кој се означува и како С или AST 1 изоензим. AST 1 има доста помала активност при рН 6 отколку при оптимална рН, додека AST 2 не покажува значајна промена на активноста со промена на рН вредноста во границите од 6 до 9 (Rej и Vanderlinde, 1981). AST 2 е потермолабилна од AST 1. Активноста се изразува како U/L. Поради големата разлика на каталитичката концентрација на AST во ткивата и крвниот серум, во процесите, меѓу другите и инфламациите, при кои доаѓа до лезија на ткивата кои се богати со AST, ензимот преоѓа во циркулацијата и тоа резултира со зголемена активност на ензимот во крвниот серум. Од овие причини одредувањето на активноста на AST во серумот има првенствено дијагностичко значење за болестите на срцето, и хепарот (Straus и Plasaj, 1964). Полуживотот на AST во серумот е околу 17 часа со варирање од  $\pm 5$  часа.

При состојби на miokarditis и perikarditis, активноста на ензимот може благо да се зголеми, но овде зголемената активност на ензимот подолго време се задржува на тоа ниво. Активноста на AST во серумот значајно е зголемена при muskulna distrofija, додека благо зголемување има кај miozitis. При вирусен хепатитис, активноста на ензимот е зголемена од 50 до 70 пати над нормалата, што исто е карактеристично за акутен токсичен хепатитис, додека при прогресивна muskulna distrofija и dermatomiozitis AST, понекогаш и заедно со ALT можат да се зголемат и до осум пати над нормалната вредност. Белодробната емболија може да го зголеми нивото на ензимот во крвниот серум од 2 до 3 пати, додека при акутен pankreatitis, мускулни повреди, gangrena и хемолитички болести, нивото се зголемува од 2 до 5 пати над нормалната вредност. При испитувањата на активноста на трансаминазите, важен дијагностички показател е соодносот на нивните активности во серумот. Овој сооднос AST/ALT, е наречен De Ritisov коефициент, и тој во серумот кај

здрави личности и кај повеќето болести е еднаков или поголем од 1, односно активноста на AST е обично поголема од активноста на ALT.

### 1.6. ALT(*ALANIN AMINOTRANSFERAZA*)

- аналитички карактеристики и дијагностичко значење

Порано ензимот бил познат како glutamat-piruvat-transaminaza и означуван како GPT или SGPT. Ензимот ја катализира реверзибилната реакција на трансминација помеѓу L-аланинот и 2-оксоглутарната киселина. Како и AST, и ALT има важна улога во метаболизмот на аминокиселините, протеините и јаглехидратите. ALT е ензим локализиран во цитоплазмата на клетките, а се наоѓа во сите органи, освен во коските и забите. Најмногу го има во хепарот, потоа, во скелетните мускули, срцето, бубрезите, панкреасот и еритроцитите (Wroblewski, 1958).

Ако се спореди активноста на ALT и AST ќе се види дека, иако и двата ензими се наоѓаат во многу органи, постојат разлики, така да, иако AST е позастапен ензим во хепарот, ALT претставува доста специфичен ензим за хепарот, и се наоѓа во концентрација 50 000 пати поголема отколку во крвниот serum. Бидејќи ALT е типичен цитоплазматичен ензим и при мали оштетувања на ткивата или промена на пропустливоста на клеточната мембрана, тој излегува во меѓуклеточниот простор, односно во циркулацијата.

Митохондрискиот изоензим е силно нестабилен и се наоѓа во доста ниска каталитичка концентрација. Активноста на ALT во serumот е зголемена кај разни болести на хепатобилијарниот тракт, а најголема активност во serumот е кај акутен вирусен хепатитис (Wroblewski, 1958; Richterich, 1964; Straus, 1965; Straus и сор., 1970; Schmidt и Schmidt, 1979), каде активноста расте од 70 до 100 пати над нормалната граница. За разлика од акутниот, кај хроничниот хепатитис активноста на овој ензим е обично нормална или малку покачена. Акутен и хроничен pankreatitis како и карцином на панкреасот, даваат покачено ниво на ALT, кое може да е од оштетениот панкреас или од секундарната афекција на хепарот. Кај токсичниот хепатитис, исто така, се среќаваат високи вредности на овој ензим. При срцевиот инфаркт и мускулната дистрофија, активноста на ALT во serumот обично е нормална.

## 2. Цели на трудот

Од дадениот литературен преглед и пошироко од литературните податоци за ревматоидниот артритис, како автоимуно инфламаторно заболување, појавата, развојот, текот на болеста и посебно влијанието на ревматоидниот артритис врз некои параметри на хепарот како; протеините, содржината на DNA и RNA, цитохистолошките промени на хепатоцитите, а особено влијанието врз активноста на хепаталните ензими AST и ALT, беа предмет на наше интересирање во испитувањата со следната поставена цел:

- Со апликација на колаген да се индуцира ревматоиден артритис кај експерименталните животни (бел лабораториски стаорец од сојот Wistar).
- Да се одреди апсолутната и релативната содржина на протеините во црниот дроб кај контролната група на животни во однос на групата животни кај кои е индуциран артритис.
- Да се одреди апсолутната и релативната содржина на DNA во црниот дроб кај контролната група на животни во однос на артрозната група.
- Да се одреди апсолутната и релативната содржина на RNA во црниот дроб кај контролната група на животни во однос на групата животни кај кои е индуциран артритис.
- Да се изврши споредување на цитометриски анализи кај црниот дроб на добиените резултати од цитохистолошките испитувања на хепатоцитите кај контролната група на стаорци во однос на артрозната.
- Да се одредат концентрациите, односно, активноста на AST и ALT во серум кај здрава популација на бел лабораториски стаорец (контролна група), и активноста на AST и ALT во серум кај групата бел лабораториски стаорец на која е индуциран ревматоиден артритис (третирана група).
- Да се направи споредување на добиените резултати за активноста на AST и ALT од контролната група на експериментални животни со групата на животни кај кои е индуциран артритис.

### **3. Материјал и методи на работа**

#### **3.1. Експериментални животни**

Во текот на експерименталната работа беа користени бели лабораториски стаорци од сојот Wistar. За експериментот избиравме здрави животни на возраст од околу седум недели кои се чуваа под одредени услови. Тие беа одгледувани во фармата за лабораториски животни на Заводот за физиологија и биохемија на Институтот за биологија при Природно-математичкиот факултет во Скопје. Вкупно беа употребени околу шеесет животни. Тие беа сместени во кафези (Hulskamp Alkamar Holand) под постојана контрола. Хранети се со храна од Фабриката за добиточна храна-Радобор од Битола, стандардна храна за лабораториски животни. Храна и вода беше давано по желба (*ad libitum*).

Сите стаорци се жртвуваа на 21-иот ден од пост-имунизацијата со колаген тип-II. Секое животно, кое ќе покажеше знаци на стрес како неактивност, мало тимарење, коњуктивитис, губење на тежината, беше отстранувано од експериментот.

#### **3.2. Подготовка на колагенот за апликација**

За експериментот ние употребувавме високо прочистен колаген тип-II, подготвен по дефиниран протокол, бидејќи квалитетот на колагенот има влијание врз артрогенетичноста (Michaelsson, 1994).

Подготовката се вршеше со земање од 2 до 4 mg/ml и се ставаше во 0.05M солна киселина, со благо промешување во текот на ноќта, на температура од +4°C. Колагенот го употребувавме наредниот ден по подготовката на растворот за аплицирање. Растворите на колагенот можат да се чуваат и до една седмица на температура од +4°C, но потоа треба да се чуваат на температура од -20°C. Лиофилизираниот колаген е многу стабилен ако правилно се чува на температура од -20°C и на темно место.

Chondrex, Inc. нуди комплетна линија за имунизација со колаген од типот-II. Квалитетот на емулзијата за имунизација е основен за предизвикување на високо фреквентен артритис. Емулзиите можат да се подготвуваат применувајќи различни методи. Крајниот резултат на овие методи на подготовка е стабилни емулзии кои можат ефектно да предизвикаат артритис. Подготовката на емулзијата од колагенот ја вршевме по дефиниран протокол со употреба на електричен хомогенизатор.

- 1) Се користеше хомогенизатор со мало сечило (дијаметар 5mm или помалку) за мешање на IFA и расворот на колаген. Погодно беше да се користи 5ml или 10 ml пластичен шприц кој се сече на половина. Се ставаше шприцот во држачот и се потопуваше во студена вода. Последниот чекор беше многу важен за да се спречи денатурализацијата на колагенот, бидејќи тој се загрева додека се меша. Денатуризираниот колаген нема да предизвика индуциран артрит.
- 2) Се додаваше една доза (максимум 2.5ml) од IFA во шприцот со вентил во 3 насоки. Потоа, се додаваше еднакво количество на раствор од колагенот (2mg/ml во 0.05M солна киселина) со капнување додека се мешаше на мала брзина.
- 3) Се продолжуваше со мешањето додека не се добиеше густа емулзија на максимална брзина (просечно 30000 вртежи за 2-3 минути). Потоа, се почекуваше да се излади во ладна вода пред да почне да се меша повторно. Мешањето по потреба се повторуваше уште два пати.
- 4) Стабилноста на емулзијата се тестираше со додавање на една капка во епрувета со вода. Ако емулзијата беше стабилна, капката остануваше цврста и не се губеше т.е. не се растворуваше. Ако емулзијата се растечеше по површината на водата, тогаш таа не беше стабилна. Во тој случај се додаваше уште неколку капки од IFA, повторно се промешуваше и се правеше повторен тест.
- 5) Емулзијата се префрлуваше во шприц.

### 3.3. Постапка за аплицирање на колагенот

Подготвениот колаген го аплициравме со мали, тенки, инсулински игли и шприцови во коленовиот зглоб на задната десна нога. Боцкавме малку поткожно и потоа внимателно боцкајќи навлегувавме во зглобот и го аплициравме колагенот. Количината што се инјектираше (0,1ml) беше од емулзијата на колагенот со малку физиолошки раствор, при што посебно внимававме при боцкањето да не истече течноста. После боцкањето стаорчињата ги враќавме во кафезите и се даваше нормално храна и вода-ad libitum (по желба).

Според литературните податоци инјектирање на 0.2ml од емулзија постепено може да се изврши и во опашката, на 2-3 cm од телото. Интракожното инјектирање во грбот, исто така, спрема литературните податоци, е доста

ефикасно. Во тој случај иглата се поставува закосено и паралелно со опашката (Michaelsson, 1994).

### **3.4. Земање на крв за анализа од експерименталните животни и добивање на серум**

Крвта за добивање на серум, како материјал за анализа, ја земавме од експерименталните лабораториски стаорци, и тоа од нетретираниот животни за контрола, и од третираниот животни со колаген, за анализа. Крвта ја земавме од опашката.

Постапката за земање на крв ја изведувавме така да стаорчињата со кафезот најпрво внимателно, без вознемирување, беа ставани во близина на извор на топлина (греалка) за да со загревање се предизвика лесна хиперемичка и полесно да се земе крв од опашката во количина од околу 1ml во специјални-erendorf епрувети. После ретракцијата на коагулумот и издвојувањето на серумот, означените епруветите се центрифугираа, за да се добие серум, а потоа го одделувавме истиот во посебни епрувети без крвен коагулум. Соодветно означените епрувети со одвоениот серум уште еднаш беа центрифугирани, а анализите на серумите беа изведувани на компјутеризиран, автоматизиран биохемиски анализатор COBAS Integra.

### **3.5. Одредувани параметри**

Определувањето на апсолутната и релативната маса на црниот дроб, апсолутната и релативната содржина на протеини во црниот дроб, апсолутната и релативната содржина на DNA и RNA во ткивото на црниот дроб, како и хистолошката обработка на примероците за анализа, ги вршевме по соодветни физиолошко-биохемиски и цито-хистолошки методи во соодветните лаборатории на Природно-математичкиот факултет во Скопје, како и со соодветни математички методи на пресметување за одредени параметри.

Во серумските примероци од експерименталните животни го одредувавме нивото, односно, активноста на AST и ALT. Анализите на серумите беа извршени со помош на компјутеризиран, автоматизиран биохемиски анализатор COBAS Integra со оригинални реагенси во Ургентната хируршка лабораторија во Скопје, каде овие анализи се дел од секојдневната рутинска работа.

### **3.6. Методи за одредување на параметрите**

#### **3.6.1. Определување на вкупните протеини во ткиво по методата на Goa (1953)**

Веднаш по жртвувањето на животното се земаше парче од ткивото на органот за одредување на концентрацијата на протеините. Со ножички се иситнуваше на мали парчиња во порцеланско аванче, во кое претходно беше ставано малку кварцен песок и 2-3 волумена на пуфер. Содржината беше мацерирана 20-30 минути. Хомогенатот се префрлаше во колба од 50 или 100 ml, која до ознаката беше дополнувана со пуфер. Концентрацијата на растворот требаше да е 200 mg ткиво на 1cm<sup>3</sup> пуфер. Хомогенизацијата беше вршена во фосфатно солен пуфер кој се состои од: Na<sub>2</sub>HPO<sub>2</sub> (0,1 mol/l, pH 8,0); NaCl (0,9 g/100 ml); KCl (1,15 g/100 ml); MgCl (0,154 mol/l), и никотин амид (0,4 mol/l).

Принципот на методата се базира на способноста бакарните соли во алкална средина да реагираат со соединенија кои имаат најмалку две пептидни врски и формираат виолетово обоен комплекс. Интензитетот на обојувањето, кој го дава овој комплекс, е правопрпорционален на концентрацијата на протеините и се мери фотометриски на 546 nm.

На 1 ml од испитуваниот раствор беа додавани 4 ml од биуретниот реагенс. Содржината беше промешувана и се оставаше да стои 30 минути на собна температура. По ова беше вршено мерење на апсорпцијата на светлината на бранова должина од 546 nm (зелен филтер). Паралелно со пробата беше правена калибрациона крива на стандарден раствор со концентрација 60 g/l, и контрола.

Работниот биурет реагенс се приготвуваше со разредување на матичниот биурет реагенс (60 mmol/l CuSO x 5H<sub>2</sub>O; 160 mmol/l KNaCHO x 4H<sub>2</sub>O; до 27 mmol/l KJ и до 0,25 mol/l NaOH) со реагенс за разредување (30 mmol/l KJ; 0.25 mol/l NaOH) во однос 1:5. Концентрацијата на протеините директно беше читана од стандардната калибрациона крива, а вредностите беа изразувани како mg протеини во 100 mg ткиво (mg%), и како вкупни (апсолутни) протеини во целиот орган.

#### **3.6.2. Одредување на вкупна содржина на DNA во ткиво по методата на Cerioty (1952)**

Принципот на методата е во строго специфичното поврзување на индолот со дезоксирибозата, за што е неопходна силно кисела средина на растворот и висока температура, при што интензитетот на обоеноста на растворот, кој доаѓа



од формиранит жолто-кафеавкаст комплекс, е правопрпорционален на концентрацијата на дезоксирибозата т.е. на содржината на DNA.

Што е можно побрзо после жртвувањето на животното, се земаше парче од ткивото на органот и беше ставано во епрувета со 4 ml врел раствор од 0,1 mol/l NaOH. Како ткивото комплетно би се хомогенизирано, беше оставано да стои преку ноќ на собна температура или на 37°C, а потоа се вареше во водена бања со вода која врие, 20-30 минути. На ткивото, откако ќе се хомогенизира и излади, му беше додавано 2 ml 0,04 % раствор на индол и 2 ml концентрирана HCl. Содржината добро беше промешувана и епруветите беа затворани со гумени затворачи со отвор за стаклена цевка и се носеа во водена бања со вода која врие каде беа оставани да стојат точно 10 минути.

Реакцијата се прекинуваше со пренесување на епруветите во када со ладна вода. По потполното изладување на растворот му беше додавано 4 ml хлороформ. Содржината на автоматска мешалка беше мешана до формирање на млечно бела боја на растворот. Мешавината беше оставана да стои 10 минути на ладно, после што епруветите се центрифугираа 10 минути на 2500 завртувања во минута. По ова, со аспиратор или вакуум-пумпа се отстрануваше долниот слој (хлороформот) од епруветата и миењето на растворот со хлороформ беше повторувано по потреба уште еднаш или два пати. Интензитетот на обојувањето на растворот беше мерен во кивета на колориметар со бранова должина од 490 nm.

Паралелно со анализата, беа работени и две епрувети со стандарден раствор на DNA во кои беше додавана одредена количина, и една епрувета како контрола на растворите кои ги користевме, која ни служеше и за баждарење на апаратот на мерна нула.

Концентрацијата на DNA во ткивото беше пресметувана по следната формула:

$$DNA = E_a / E_s \times K_s$$

$E_a$  - екстинција на анализата

$E_s$  - екстинција на стандардот

$K_s$  - концентрација на стандардот.

Добиените вредности за концентрацијата на DNA во ткивото беа сумирани како mg DNA/100 mg ткиво (mg%), или како вкупна содржина на DNA во даден орган.

### 3.6.3. Одредување на вкупна содржина на RNA во ткиво по методата на Munro (1963)

Најбрзо што се можеше, веднаш после жртвувањето на животното, беше земено парче од ткивото кое се ставаше во ладна дестилирана вода во однос 1:20. Парчето се иситнуваше со ножици и беше мацерирано до потполна хомогенизација на ткивото.

Од хомогенатот се земаше 5 ml (тоа да одговара на околу 250 mg свежа маса на ткиво) во епрувета за центрифугирање од 15 ml и му беше додавано 2,5 ml мраз-ладен 0,6 N раствор на  $\text{HClO}_4$ , внимателно се промешуваше и беше оставано да стои 10 минути на  $0^\circ\text{C}$ . Содржината во епруветата се центрифугираше, после што супернатантната фракција (во киселина растворлива фракција) беше собирана, а преципитатот се исперуваше уште два пати со мраз-ладен 0,2 N  $\text{HClO}_4$ . После центрифугирањето, вишокот преку филтер-хартија се префрлаше во одмерната колба со растворливата фракција во киселина.

На преципитатот му беше додавано 4 ml 0,3 N KOH, содржината се промешуваше и се оставше да се инкубира 60 минути на  $37^\circ\text{C}$  (во водена или воздушна бања). По инкубацијата на целата содржина, беше додавано 2,5 ml 1,2 N  $\text{HClO}_4$  и се оставаше да стои десет минути на ладно. Содржината се центрифугираше, по што DNA и протеините преципитираат, додека RNA останува во супернатантот. Супернатантот со RNA беше собиран, а преципитатот се измиваше уште два пати со по 5 ml 0,2 N  $\text{HClO}_4$ . Измиениот супернатант беше собиран заедно со претходно одвоената RNA фракција, во која, потоа, се додаваше уште 10 ml од 0,6 N  $\text{HClO}_4$  и одмерна колба до 100ml беше дополнувана со дестилирана вода. На овој начин се добиваше раствор на рибонуклеотиди во 0,1 N раствор на  $\text{HClO}_4$ . Со мерење на апсорпцијата на 260nm на рибонуклеотидниот раствор се пресметуваше содржината на RNA, знаејќи дека екстинција од 1.000 на 260 nm одговара на 32  $\mu\text{g RNA/ml}$ .

Добиените вредности за концентрација на RNA во ткивото беа сумирани како mg RNA/100 mg ткиво (mg%), или како вкупна содржина на RNA во органот.

### 3.6.4. Хистолошка обработка на материјалот

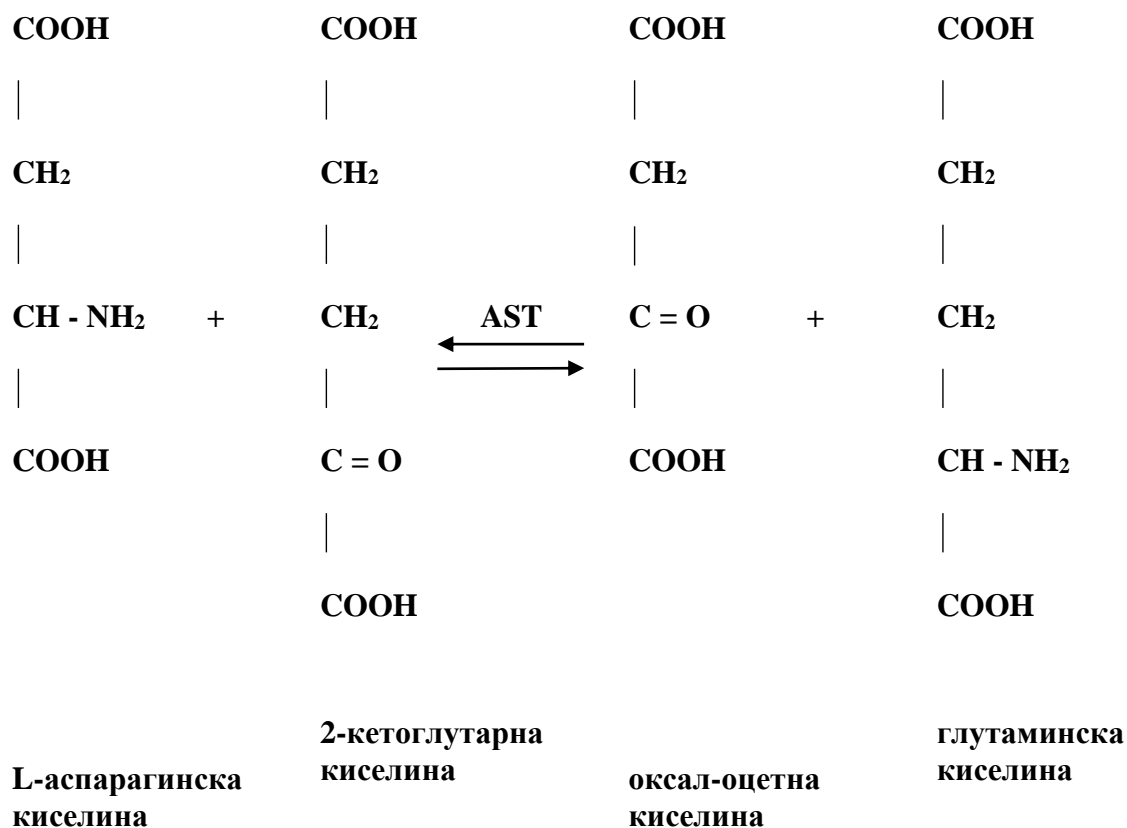
За хистолошка анализа, веднаш по жртвувањето на животните од сите експериментални групи, беше земено парче ткиво од црниот дроб. По чистењето на материјалот од околното ткиво, истото беше фиксирано во пуфериран неутрален формалин (формалин - 100 ml,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - 6,5 g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  - 4,0 g и 900 ml дестилирана вода). Со цел да се изврши дехидратација на ткивото, беше користена стандардна постапка и проплакнување со алкохол и ксилол.

Калупењето беше вршено во парафин, додека парафинските пресеци со дебелина од 4 до 7  $\mu\text{m}$  беа направени на микротом во цитохистилошката лабораторија.

За обојување на хистолошките пресеци беа користени: хематоксилин-еозин и азур II-еозин методите. Хистолошката обработка на примероците за анализа ги вршеме по соодветни цито-хистолошки методи во соодветните лаборатории на Природно-математичкиот факултет во Скопје. Цитоморфолошките и хистолошките анализи од сите испитувани групи беа изведувани со светлосна микроскопија. На хистолошките пресеци кај црниот дроб беше одредуван бројот на јадрата (нуклеарен индекс-Ni) на 50 видни полиња со површина од 1249,5  $\text{mm}^2$  како и нуклеарниот волумен-Vn кај истите на 50 јадра од секоја единица во  $\text{mm}^2$ .

### 3.6.5. Метода за одредување на аспартат аминотрансфераза

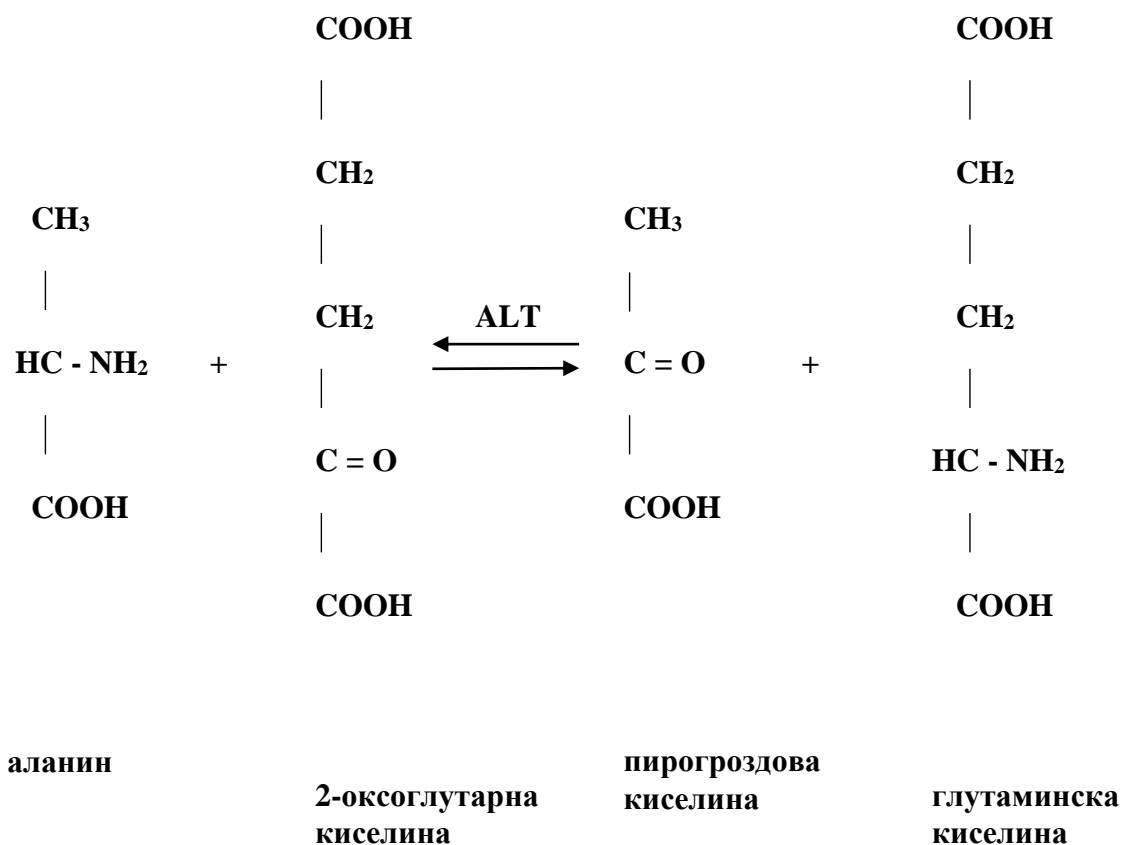
Методата за одредување на аспартат аминотрансфераза која е применета во автоматскиот биохемиски анализатор COBAS Integra претставува адаптација на ензимската метода, при што, AST ја катализира трансминацијата помеѓу аспарагинската и 2-оксоглутарната киселина. Притоа, од аспартатот настанува оксалоцетна киселина, која со  $\text{NADH}_2$  и ензимот малатдехидрогеназа (MDH) преоѓа во јаболкова киселина, а еквивалентна количина  $\text{NADH}_2$  се оксидира во NAD. Намалувањето на апсорбацијата соодветствува на преоѓањето на редуцираниот во оксидиран облик на коензимот и претставува мерка е за активноста на ензимот (Слика бр. 3).



Слика бр. 3 Принцип на методата за одредување на AST

### 3.6.6. Метода за одредување на аланин аминотрансфераза

Методата за одредување на аланин аминотрансфераза се базира на тоа ALT да ја катализира трансминацијата помеѓу L-аланин и 2-оксоглутарат. Притоа од аланинот настанува пируват, кој со NADH<sub>2</sub> и со дејството на ензимот лактатдехидрогеназа (LDH) преминува во лактат (индикаторска реакција), а еквивалентна количина на NADH<sub>2</sub> се оксидира во NAD. Намалувањето на апсорбанцијата соодветствува на преоѓањето на редуцираниот во оксидиран облик на коензимот и претставува мерка за активноста на ензимот. Важна работа при испитувањето на AST и ALT е да не се користи хемолизиран серум бидејќи активноста на AST е петнаесет пати, а на ALT седум пати поголема во еритроцитите отколку во нормален серум. Серумот ако мора да се чува подолго од 3-4 дена, најдобро е да се чува замрзнат (Слика бр. 4).



Слика бр. 4 Принцип на методата за одредување на ALT

### 3.7. Статистичка обработка на резултатите

Сите резултати кои беа добиени во текот на работата, статистички се обработени со помош на компјутер. Добиените поединечни вредности на резултатите беа сведувани на средни вредности по формулата:

$$\bar{X} = \frac{\sum nx}{n}$$

Стандардната девијација беше пресметувана по формулата:

$$\sigma \pm \sqrt{\frac{\sum (x - nx)^2}{n(n-1)}}$$

Сигнификантноста беше одредувана со Student-овиот t тест, при што при споредување на групи со ист број на животни се користеше формулата:

$$t = \frac{Mtx - Mty}{\sqrt{(\sigma mx)^2 + (\sigma my)^2}}$$

додека при споредување на групи со различен број на животни, беше користена формулата:

$$t = \frac{Mtx - Mty}{\sqrt{\left[ \frac{\sum dx^2 - \sum dy^2}{(Nx + Ny) - 2} \right] X \left[ \frac{Nx - Ny}{Nx \times Ny} \right]}}$$

Како статистички сигнификантна се смета разликата помеѓу две аритметички средини, ако е  $p < .050$  помали.

$dx^2$  и  $dy^2$  - квадратни суми на индивидуалните отстапувања од средните вредности

$\sum mx^2$  и  $\sum my^2$  - стандардни девијации

$Nx$  и  $Ny$  - број на мерења на двете групи

## 4. Резултати

### 4.1. Влијанието на индуцираниот ревматоиден артритис врз некои параметри на црниот дроб

Познато е дека при состојба на ревматоиден артритис доаѓа до зголемување на ревматоидниот фактор (RF), на антинуклеарните антитела (ANA), појава и зголемено присуство на клеточниот маркер HLA B27 (кај здрава популација се среќава од 5% до 8% додека при ревматоиден артритис се среќава и до 80% од случаевите), се зголемува седиментацијата и С-реактивниот протеин (CRP), кои го одредуваат степенот на воспалението, а од хематолошките параметри доаѓа до намалување на хемоглобинот (намалување на железото) и на тромбоцитите.

Сите досегашни испитувања даваат доста податоци за движењето на овие погоре споменати параметри, и помалку или повеќе се познати нивните промени во крвта што настануваат при ревматоиден артритис, токму затоа и не беа предмет на наше интересирање при поставувањето на експериментот, туку интерес ни беше да го испитаме влијанието на индуцираниот ревматоиден артритис врз некои параметри на црниот дроб како: протеините, DNA, RNA, нуклеарниот индекс (Ni), нуклеарниот волумен (Vn), активноста на ALT и AST во крвта, односно серумот, при состојба на ревматоидниот артритис, за што има многу малку литературни податоци. Познато е, исто така, дека кај женската популација од 2 до 3 пати е почеста појавата на ревматоидниот артритис во однос на машката. Од тие причини, ние индуциравме артритис и го испитувавме ефектот врз овие параметри без разлика на полот, при што популациите ги поделивме само на нормални и артрозни животни, со предизвикан ревматоиден артритис.

Сите животни на крај од експериментот беа на возраст од околу седумдесет дена. Кај третираните животни, од апликацијата на колагенот до жртвувањето, поминаа дваесет и еден ден, што значи, третирањето со колаген беше на околу педесетдневна возраст. Просечната телесната маса кај контролната група на експериментални животни (n=31) изнесуваше 127,8 g. Средната вредност на апсолутната маса на црниот дроб кај контролната група на експериментални животни (n=31) беше 6024,5 mg додека вредноста на релативната црнодробна маса кај контролните животни изнесуваше 4,71 mg %.

Кај артрозните животни (n=30) просечната вредност на телесната маса беше 85,6 g додека средната вредност на апсолутната маса на црниот дроб кај оваа група животни изнесуваше 2416,5 mg, а вредноста на релативната црнодробна маса беше 2,82 mg %.

Овие добиени резултати од нашите испитувања за просечните апсолутни вредности, а посебно за просечните релативни вредности, сугерираат дека ефектот на индуцираниот ревматоиден артритис се манифестира преку значајно намалување на апсолутната и релативната црнодробна маса кај артрозните во однос на контролните животни.

#### **4.2. Содржина на протеините во црниот дроб**

Добиените резултати од нашите испитувања за апсолутната и релативната содржина на протеините во црниот дроб кај контролната група и групата животни со индуциран ревматоиден артритис, се прикажани на сликите број 5 и 6.

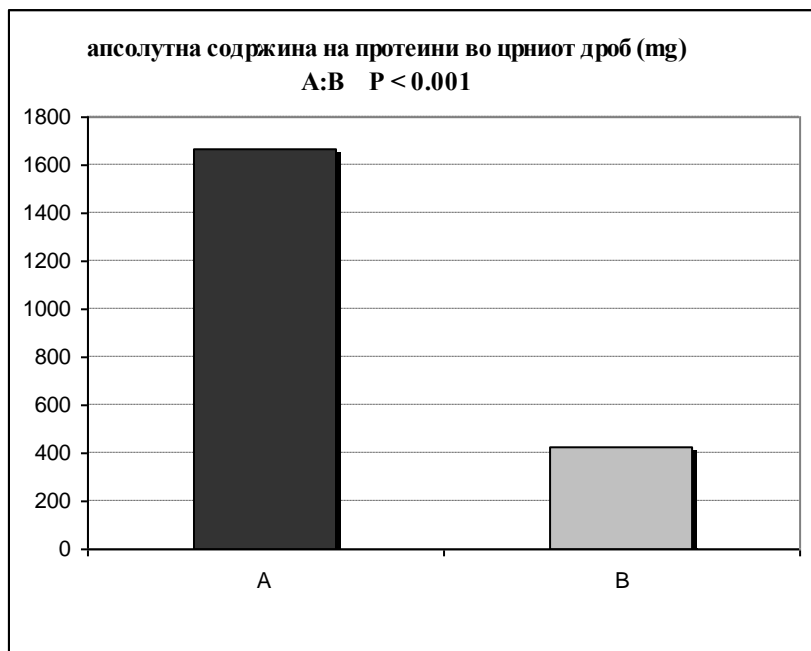
Просечната вредност на апсолутната содржина на протеини во црниот дроб кај контролната група на животни изнесуваше 1663,98 mg додека кај артрозната група беше 422,01 mg.

Резултатите покажуваат дека индуцираниот ревматоиден артритис предизвикува намалување на апсолутната содржина на протеините кај артрозната група на животни во однос на апсолутната содржина на протеините кај контролната група. Тоа се гледа и од графичкиот приказ на сликата број 5, каде е видлив ефектот врз содржината на протеините во црниот дроб кај артрозната група на стаорци. Констатираните разлики, во однос на контролната група животни, се високо сигнификантни (A:B,  $P < 0.001$ ).

Оттука предизвиканиот ревматоиден артритис условува и релативната маса на протеините во хепарот да се одржува на изразито пониско ниво во споредба со истото кај контролната група (слика број 6, A:B,  $P < 0.001$ ).

Вредноста на релативната содржина на протеини во црниот дроб кај контролата беше 27,62 mg %, додека кај третирана група изнесуваше 18,27 mg%, односно концентрацијата на протеините во црниот дроб кај животните со индуциран артритис е сигнификантно пониска во споредба со истите кај контролата.

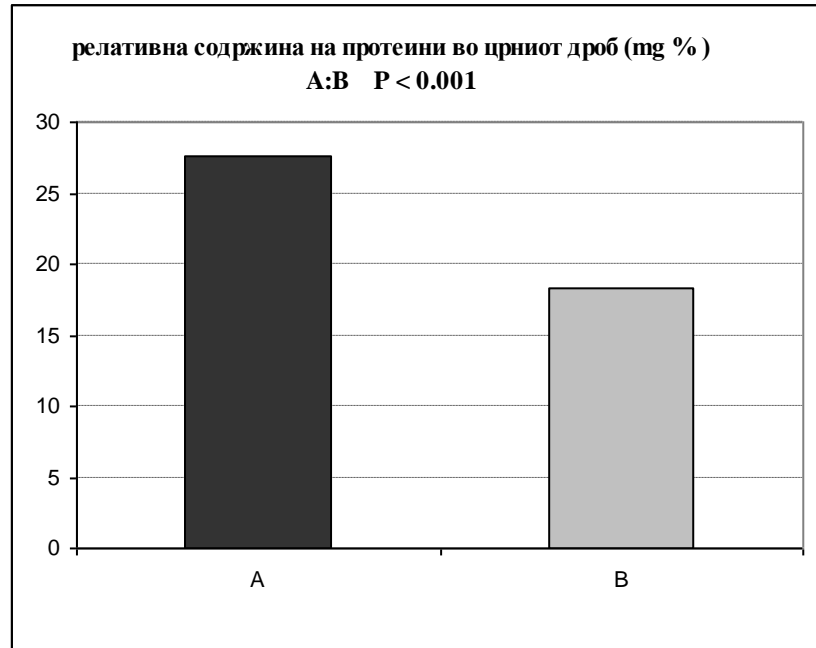




**Слика бр. 5** Апсолутна содржина на протеини во црниот дроб (mg) кај контролната и артрозната група на животни.

- контрола, А група, (животните од оваа група во текот на целиот експериментален период беа на *ad libitum* режим на храна и вода, без третман и во стандардни услови на одгледување; (n=31)-со педесетина дена старост на почетокот на експериментот)

- животни кај кои е индуциран артритис со колаген тип-II, В група, (животните и од оваа група беа цело време на *ad libitum* режим на храна и вода, но во почетокот на експериментот им индуциравме артритис; (n=30)-со педесетина дена старост на почетокот на експериментот)



**Слика бр. 6 Релативна содржина на протеини во црниот дроб ( mg %) кај контролната и артрозната група на животни.**

- контрола, А група, (животните од оваа група во текот на целиот експериментален период беа на *ad libitum* режим на храна и вода, без третман и во стандардни услови на одгледување; (n=31)-со педесетина дена старост на почетокот на експериментот)

- животни кај кои е индуциран артритис со колаген тип-II, В група, (животните и од оваа група беа цело време на *ad libitum* режим на храна и вода, но во почетокот на експериментот им индуциравме артритис; (n=30)-со педесетина дена старост на почетокот на експериментот)

Сите овие податоци нè упатуваат на тоа дека предизвиканиот ревматоиден артритис доведува до сигнификантно намалување на протеинската содржина во црниот дроб кај третираната во споредба со контролната група.

Манифестираните промени најдобро се гледаат преку релативната содржина на протеините, што значи, дека индукцијата на ревматоиден артритис кај стаорците покажува супримирачки ефект врз содржината на протеините кај артрозната во однос на контролната група (слика број 5 и 6, A:B, P < 0.001).

### 4.3. Содржина на DNA во црниот дроб

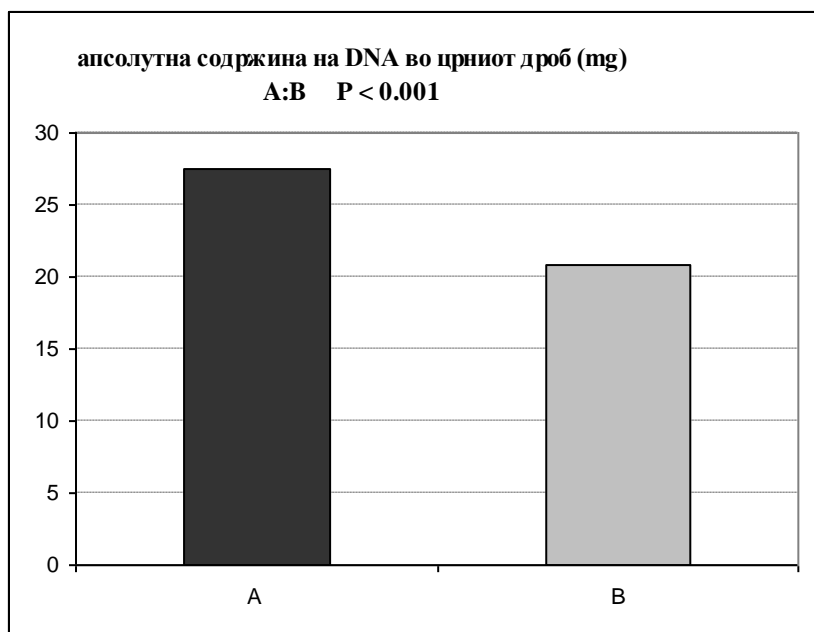
При нашите испитувања за ефектот на индуцираниот ревматоиден артритис врз некои параметри на црниот дроб важен фактор беше и содржината на DNA. Резултатите се изразени преку апсолутната и релативната содржина на DNA во црниот дроб кај контролната група (n=31) и артрозната група на стаорци (n=30) и добиените вредности графички се прикажани на сликите број 7 и 8.

Просечната вредност на апсолутната содржина на DNA во црниот дроб кај контролата изнесуваше 27,54 mg, додека вредноста на истиот параметар кај артрозната група беше 20,85 mg.

Од графиконот на слика број 7, каде е прикажана апсолутната концентрацијата на DNA во хепарот, јасно се гледа намалената апсолутна содржина на DNA кај третираните животни во однос на апсолутната содржина на DNA кај контролната група (A:B,  $P < 0.001$ ). Тоа е најверојатно поради супресиращкиот ефект на артритисот врз метаболизмот во хепарот, поточно, на ниво на хепатоцитите, како и врз нормалната функција и развој на целиот орган.

Резултатите за релативната содржина на DNA во црниот дроб се графички прикажани на сликата број 8.

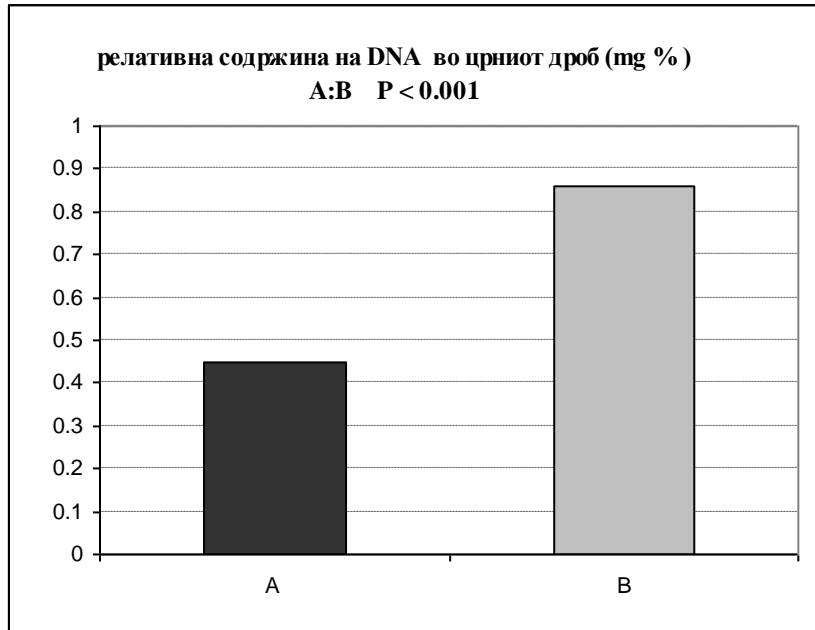
Релативната содржина на DNA во црниот дроб кај контролата е 0,45 mg %, а кај третираната група 0,86 mg %. Од истата се гледа дека кај артрозната група на животни има високо сигнификантно зголемување на релативната содржината на DNA, во споредба со контролната група (слика број 8, A:B,  $P < 0.001$ ). Од овде се гледа дека процентуалното изразување на DNA на 100 mg на хепатално ткиво кај артрозната група има зголемување на концентрацијата на DNA за скоро 100% во однос на контролата. Тоа е веројатно компензаторен механизам поради супресиращкиот ефект на артритисот врз метаболизмот во хепарот, поточно на ниво на хепатоцитите, како и врз нормалната функција и развој на целиот орган.



**Слика бр. 7** Абсолютна содржина на DNA во црниот дроб (mg) кај контролната и артрозната група на животни.

- контрола, A група, (животните од оваа група во текот на целиот експериментален период беа на *ad libitum* режим на храна и вода, без третман и во стандардни услови на одгледување; (n=31)-со педесетина дена старост на почетокот на експериментот)

- животни кај кои е индуциран артритис со колаген тип-II, B група, (животните и од оваа група беа цело време на *ad libitum* режим на храна и вода и исти услови на одгледување, но во почетокот на експериментот им индуциравме артритис; (n=30)-со педесетина дена старост на почетокот на експериментот)



**Слика бр. 8 Релативна содржина на DNA во црниот дроб (mg %) кај контролната и артрозната група на животни.**

- контрола, А група, (животните од оваа група во текот на целиот експериментален период беа на *ad libitum* режим на храна и вода, без третман и во стандардни услови на одгледување; (n=31)-со педесетина дена старост на почетокот на експериментот)

- животни кај кои е индуциран артритис со колаген тип-II, В група, (животните и од оваа група беа цело време на *ad libitum* режим на храна и вода и исти услови на одгледување, но во почетокот на експериментот им индуциравме артритис; (n=30)-со педесетина дена старост на почетокот на експериментот)

#### 4.4. Содржина на RNA во црниот дроб

Ефектот на индуцираниот ревматоиден артритис го испитувавме и врз вкупната и релативната содржина на RNA во црниот дроб кај експерименталната група на животни во однос на контролата, а резултатите графички се прикажани на сликите број 9 и 10.

Од добиените резултати за концентрацијата на RNA во хепарот може да се констатира дека промените се многу адекватни на тие за DNA.

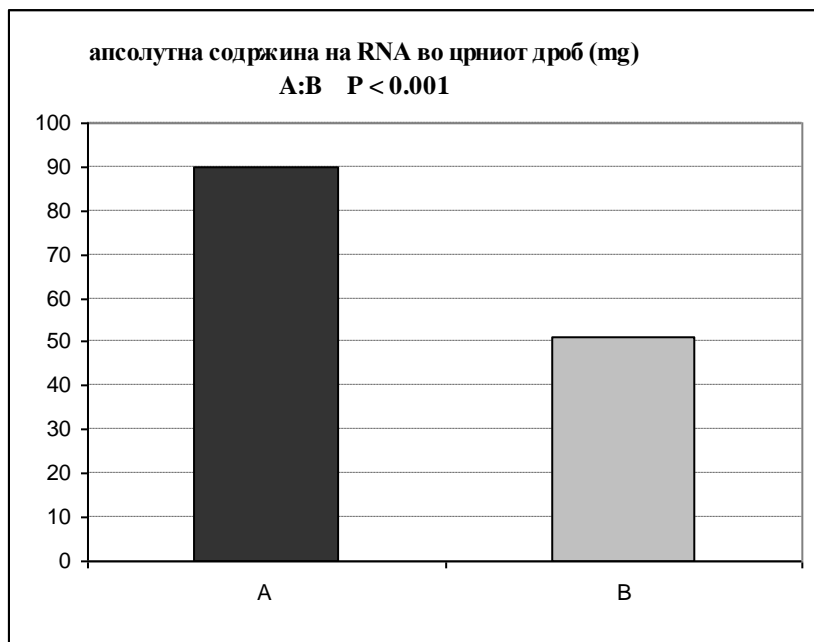
Нашите резултати покажуваат дека индуцирањето на ревматоиден артритис кај белиот лабораториски стаорец, предизвикува сигнификантно намалување на апсолутната содржината на RNA во црниот дроб кај артрозната во споредба со контролната група, што е јасно видно на сликата број 9 (A:B,  $P < 0.001$ ).

Просечната вредност на апсолутната содржина на RNA во црниот дроб кај контролната група на животни изнесуваше 89,75 mg, додека вредноста на истата кај третираната група беше 51,00 mg.

Кај третираната група на животни јасно е видно зголемувањето на релативната содржина на RNA, во однос на контролната група (слика број 10, A:B,  $P < 0.001$ ).

Релативната содржина на RNA во црниот дроб кај контролните животни изнесуваше 1,49 mg %, во споредба со артрозните каде беше 2,11 mg %. Од графичкиот приказ јасно е видно дека релативната концентрацијата на RNA во црниот дроб е на сигнификантно повисоко ниво за 41 % кај артрозната во споредба со контролната група на стаорци, што значи дека релативната концентрација на RNA изразена во mg % после развојот на артритисот кај третираните животни се зголемува и вредноста е значајно повисока, во однос на онаа кај контролната група (слика 10, A:B,  $P < 0.001$ ).

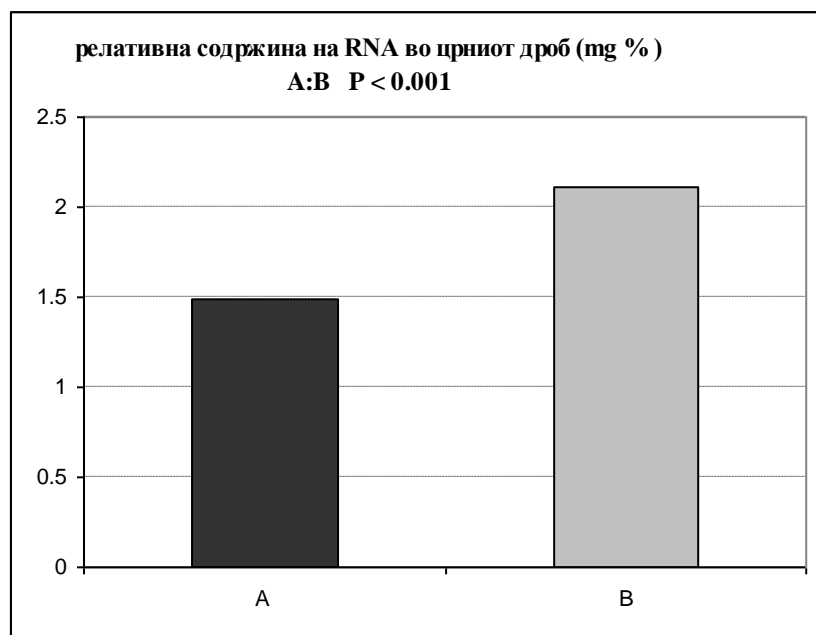
Квалитативни разлики кај графиконите за апсолутната и релативната концентрација на RNA во црниот дроб кај контролната во однос на артрозната група на експериментални животни (прикажани на сликите број 9 и 10), се манифестираат поради пресметковните изразувања на двете концентрации, на масата на целиот орган и на единица ткиво.



**Слика бр. 9 Апсолутна содржина на RNA во црниот дроб (mg) кај контролната и артрозната група на животни.**

- контрола, А група, (животните од оваа група во текот на целиот експериментален период беа на *ad libitum* режим на храна и вода, без третман и во стандардни услови на одгледување; (n=31)-со педесетина дена старост на почетокот на експериментот)

- животни кај кои е индуциран артритис со колаген тип-II, В група, (животните и од оваа група беа цело време на *ad libitum* режим на храна и вода и исти услови на одгледување, но во почетокот на експериментот им индуциравме артритис; (n=30)-со педесетина дена старост на почетокот на експериментот)



**Слика бр. 10 Релативна содржина на RNA во црниот дроб (mg %) кај контролната и артрозната група на животни.**

- контрола, А група, (животните од оваа група во текот на целиот експериментален период беа на *ad libitum* режим на храна и вода, без третман и во стандардни услови на одгледување; (n=31)-со педесетина дена старост на почетокот на експериментот)

- животни кај кои е индуциран артритис со колаген тип-II, В група, (животните и од оваа група беа цело време на *ad libitum* режим на храна и вода и исти услови на одгледување, но во почетокот на експериментот им индуциравме артритис; (n=30)-со педесетина дена старост на почетокот на експериментот)



#### 4.5. Цитометриски анализи кај црниот дроб

Со цел да го видиме ефектот на ревматоидниот артритис врз некои хистолошки параметри на хепарот, како што се промените на големината на јадрото, бројот на јадрата во хепатоцитите, земавме дел од црниот дроб и хистолошки го обработувавме. Материјалот за хистолошка анализа од контролната и експерименталната група беше земен по жртвувањето на животните, истиот беше фиксиран во пуфериран неутрален формалин и после соодветна постапка за подготовка беше мерен нуклеарниот индекс (Ni) и нуклеарниот волумен (Vn). Со нашите испитувања сакавме да видиме дали индуцираниот ревматоиден артритис кај белиот лабораториски стаорец има ефект, и каков, врз овие цитохистолошки карактеристики на хепатоцитите.

Цитометриски анализи кај црниот дроб и добиените резултати од цитохистолошките испитувања на хепатоцитите кај контролната и артрозната група на лабораториски стаорци дадени преку нуклеарниот индекс (Ni) и нуклеарниот волумен (Vn) се прикажани во табела број 1.

Од направените испитувања се гледа дека хепатоцитите во црниот дроб, кај контролната група, покажуваат нормален хистолошки изглед, односно, клетките во црниот дроб се поредени во групи и имаат едно или две еухроматични јадра со јасно видливи јадренца. Нуклеарниот индекс изнесуваше  $3,10 \pm 0,08$  додека волуменот на јадрата беше  $210,48 \pm 9,33$ .

Вредностите за нуклеарниот индекс и нуклеарниот волумен, добиени од испитувањата на црниот дроб на животните кои беа со предизвикан ревматоиден артритис, покажуваат значајни промени во однос на контролната група животни. Нуклеарниот индекс кај нив изнесуваше  $2,58 \pm 0,03$  додека волуменот на јадрата беше  $236,50 \pm 5,39$ .

Значаен ефект врз состојбата на хепатоцитите се забележува, следејќи ги вредностите на нуклеарниот индекс и волумен, кај индуцираниот ревматоиден артритис во однос на контролната група животни. Вредностите за нуклеарниот индекс и нуклеарниот волумен, добиени од испитувањата на црниот дроб на животните кои беа со предизвикан ревматоиден артритис, покажуваат значајни промени во однос на контролната група животни.

Резултатите покажуваат дека значајни промени се случуваат на нивото на хепатоцитите и притоа, бројот на јадрата се намалил за 17 %, а нивниот волумен се зголемил за скоро 13 %. Ваквите констатирани промени се сигнификантни (табела број 1,  $P < 0.005$ ).

**Табела бр. 1**

<b>Контролни животни</b>		<b>Артрозни животни</b>	
<b>Нуклеарен индекс (Ni)</b>	<b>Нуклеарен волумен (Vn)</b>	<b>Нуклеарен индекс (Ni)</b>	<b>Нуклеарен волумен (Vn)</b>
<b>3,10±0,08</b>	<b>210,48±9,33</b>	<b>2,58±0,03</b>	<b>236,50±5,39</b>

**Табела бр. 1: Нуклеарниот индекс (Ni) и нуклеарниот волумен (Vn) на хепатоцитите кај контролната и артрозната група на животни**

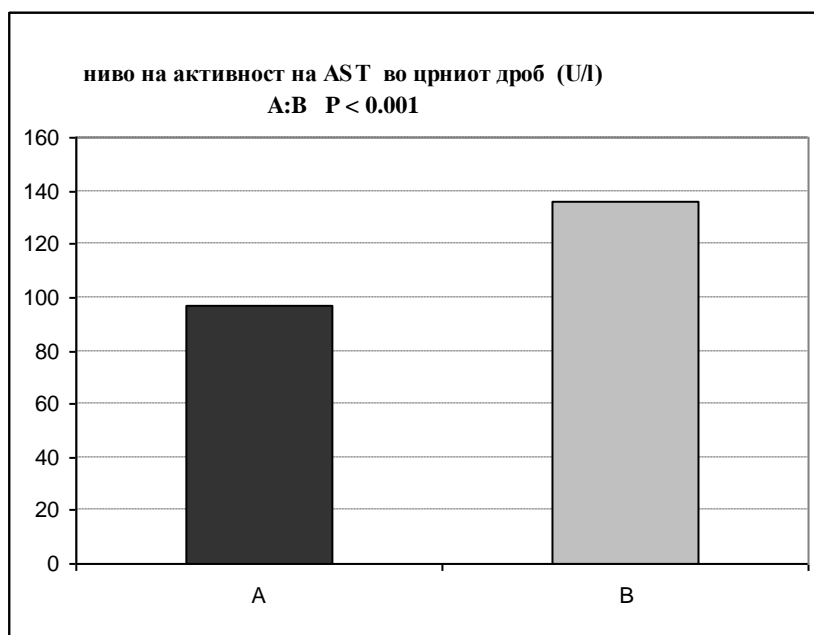
#### 4.6. Активност на AST

Ефектот на индуцираниот ревматоиден артритис врз нивото на активност на AST во црниот дроб кај контролната и артрозната група на животни е графички прикажан преку резултатите на слика број 11.

Просечната вредност на AST кај контролната група животни изнесуваше 96,8 U/L, додека просечната вредност на AST кај артрозната група животни изнесуваше 135,6 U/L. Впрочем, тоа најдобро се гледа од графиконот кој е прикажан на слика број 11.

Предизвиканиот ревматоиден артритис доведува до сигнификантно зголемување на нивото на активноста на AST кај артрозната, во споредба со контролната група на животни (A:B,  $P < 0.001$ ).

За разлика од предходно испитуваните параметри, од нашите резултати за AST, можеме да констатираме дека доаѓа до уште поголемо зголемување на добиените вредности за активноста на овој хепатален ензим, како последица на индуцираниот ревматоиден артритис. Ова нè упатува на веројатноста дека како последица на предизвиканиот артритис, доаѓа до разорување на дел од хепатоцитите, а поради нивната дезинтеграција и најверојатна лезија и пропаѓање на дел од нив, доаѓа и до зголемена активност на ензимот. Активноста кај третираната група животни изнесува 135.6 U/L, што во однос на 96,8 U/L измерени кај контролната група, е сигнификантна разлика (слика број 11, A:B,  $P < 0.001$ ).



Слика бр. 11 Ниво на активност на AST во црниот дроб (U/L) кај контролната и артрозната група на животни.

- контрола, А група, (животните од оваа група во текот на целиот експериментален период беа на *ad libitum* режим на храна и вода, без третман и во стандардни услови на одгледување; (n=31)-со педесетина дена старост на почетокот на експериментот)

- животни кај кои е индуциран артритис со колаген тип-II, В група, (животните и од оваа група беа цело време на *ad libitum* режим на храна и вода и исти услови на одгледување, но во почетокот на експериментот им индуциравме артритис; (n=30)-со педесетина дена старост на почетокот на експериментот)

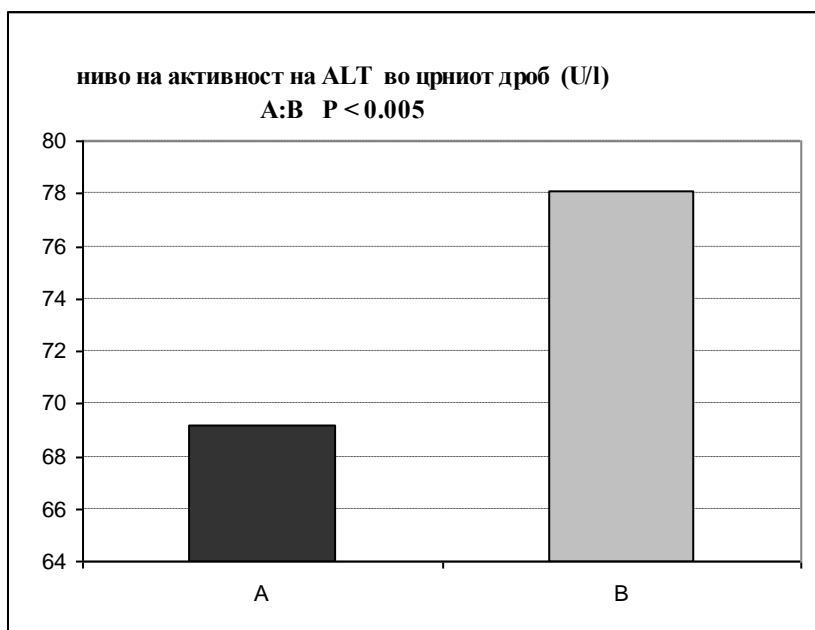
#### 4.7. Активност на ALT

При поставувањето на нашиот експеримент, главна цел ни беше да видиме како индуцираниот ревматоиден артритис има влијание врз некои параметри на хепарот, како што се: содржината на протеините, DNA, RNA, Ni, Vn, но секако најважно за нас беше да ја испитаме активноста на хепаталните ензими AST и ALT, кои се едни од важните параметри што ни даваат податоци за функционалната состојба на хепатоцитите, нивниот интегритет и активност, конкретно при состојба на индуциран ревматоиден артритис.

Ефектот на индуцираниот ревматоиден артритис врз нивото на активност на ALT во црниот дроб кај контролната и артрозната група на животни е графички прикажан преку добиените резултати од испитувањата на слика број 12.

Од графиконите може да се забележи дека нивото на нормална ALT и нивото на артрозната ALT се разликува, и при пресметките на резултатите можеше да се види дека во најголем дел има значајно отстапување, иако не толку големо и карактеристично како за AST. Ова се констатира преку споредување на добиените резултати од нашите испитувања кои се прикажани подолу.

Просечната вредност на ALT кај контролната група животни изнесува 69,15 U/L, додека просечната вредност на ALT кај артрозната група животни изнесува 78,11 U/L (слика број 12, A:B,  $P < 0.005$ ).



**Слика бр. 12** Ниво на активност на ALT во црниот дроб (U/l) кај контролната и артрозната група на животни.

- контрола, А група, (животните од оваа група во текот на целиот експериментален период беа на *ad libitum* режим на храна и вода, без третман и во стандардни услови на одгледување; (n=31)-со педесетина дена старост на почетокот на експериментот)

- животни кај кои е индуциран артритис со колаген тип-II, В група, (животните и од оваа група беа цело време на *ad libitum* режим на храна и вода и исти услови на одгледување, но во почетокот на експериментот им индуциравме артритис; (n=30) - со педесетина дена старост на почетокот на експериментот)

## 5. Дискусија

### 5.1. Влијанието на индуцираниот реуматоиден артритис врз содржината на протеините во црниот дроб

Литературните податоци артритисот го дефинираат како подмолна и подолготрајна разорна болест за зглобовите со последици и врз другите органи и органски системи, која доведува до состојба на осакатување (онеспособување), карактеризирана со отекување на зглобовите, на стапалата и на другите делови од телото, како резултат на воспаление и енормно зголемување на синовијалните мембрани и другите ткива на зглобот. Зглобната ‘рскавица, поради воспалувањето, делумно се уништува и зглобните празнини развиваат сраснувања, т.е. нивните површини се спојуваат, потоа зглобовите се вкочуваат и на крај стануваат безфункционални (Bethesda, 1999; Christen и Von Herrath, 2004; Kamrdat и сор., 2005; Markelevic, 2006).

Болеста е опишана со многу карактеристики на неред, во кој продуцираните антителата го напаѓаат нормалното ткиво на организмот. Исто така, литературните податоци од истражувањата зборуваат за тоа дека при ревматоиден артритис, било тој да е предизвикан или спонтано се појавил, а посебно при хроничен облик, кај живите организми настануваат промени како воспаление, оток, болка, отежнато движење, но и промени во крвта, односно, изместувања како на хематолошките, така и на биохемиските параметри (Kamradt и Volkmer-Engert, 2004). Радиографските промени на коската се резултат на алтерации во коскената структура, промена на содржината на коскениот минерал со промена на коскениот интегритет со што една лезија во метаболно поактивна коска да биде видлива, потребно е таа да е поголема и да има губиток на минерал за околу 50%. Коскената скинтиграфија се базира на други принципи, односно ја визуелизира променетата функција, а не структурата. Овие функционални промени настануваат порано од структуралните, и поради тоа коскениот скен е посензитивен, но со оглед на фактот дека лезии од различна природа предизвикуваат локална остеобластна реакција, реакцијата е неспецифична. Од тие причини, ние не вршеме рентгенски, ниту скинтиграфски снимања на зглобовите кај контролните и експерименталните животни.

По неколку дена од аплицирањето на колагенот, кај стаорчињата се појави извесна вознемиреност, чешање и мала саливација по што им се повлекоа овие симптоми. Немаше промени во исхраната, во смисла на зголемување или намалување на количината на храната после третманот. Колаген-индуцираниот артритис предизвика реакција кај скоро 100% од имунизираните стаорци со колаген тип-II, што е јасно и од поединечно добиените резултати како и од средните вредности.

Еден од испитуваните параметри при состојба на ревматоиден артритис во експериментот беше концентрацијата на протеините во хепарот. Од добиените резултати јасно се гледа дека предизвиканиот ревматоиден артритис покажува ефектно дејство врз намалувањето на содржината на протеините во хепарот. Имено, тоа кај артрозните животни се манифестира со сигнификантно пониски вредности во споредба со контролната група на стаорци, видливо изразени и преку апсолутната и преку релативната содржина на протеините во хепарот (A:B,  $P < 0.001$ ).

Може да се констатира дека предизвиканиот ревматоиден артритис е стресоген фактор за белиот стаорец кој доведува до одредени физиолошко-биохемиски нарушувања во хепарот, како „централна лабораторија на организмот“ меѓу кои и врз содржината на протеините во него. Нашите резултати за ефектот на индуцираниот ревматоиден артритис врз апсолутната содржина на протеините во хепарот кај белиот стаорец недвосмислено го потврдуваат тоа преку нивното сигнификантно намалување (A:B,  $P < 0.001$ ). Ваквите промени може да се објаснат, од една страна, со искористувањето на протеините за одбрамбени цели против внесениот надворешен агенс и нивното трошење во услови на вонредна состојба на организмот за одбрана при навлегување или внесување на туѓ агенс во организмот, а од друга страна, со намалената синтеза на истите, како резултат на лезија и дезинтеграција на хепатоцитите (Bethesda, 1999). Имено, при воспалителниот процес во акутната фаза, прв одговор е растењето на протеините од акутната фаза, кои стимулираат каскаден процес за синтеза на имуномедијатори–молекули од типот на цитокини и интерлеукини. Воспалителниот одговор, следен со брза реакција и зголемена синтеза на наведените супстанции, во текот на имунолошката реакција доведува до намалување на истите, со паралелна промена на внатрешниот дел од ткивото на крвните садови и учество во процесот на артериосклероза, но и до промена во структурата на зглобовите, предизвикувајќи ревматски артритис или артроза (Bethesda, 1999).

Ние во нашите испитувања, исто така, констатиравме дека индуцираниот артритис има супримирачки ефект врз синтезата и содржината на протеини во хепарот, кои ја покажуваат процентуалната застапеност на протеините во овој орган.

Резултатите за релативната содржина на протеините, подетално покажуваат дали има промени во нивната содржината на 100 mg црнодробната маса кај артрозната во однос на контролната група. Така, вредноста на испитуваниот параметар кај артрозните во споредба со контролните животни, покажуваат сигнификантно пониски вредности (A:B,  $P < 0.001$ ). Сето ова нè упатува да констатираме дека индуцираниот ревматоиден артритис има значајно супримирачко дејство врз протеинската содржина во црниот дроб.

Намалената содржина на протеините во црниот дроб може да биде резултат и на влијанието на ревматоидниот артритис врз други органи и органски системи како неврохуморалниот, хормоналниот и некои други, што сè заедно во суштина се реперкуира и врз целиот организам вклучувајќи го и хепарот. Некои од нив сеуште се со некомплетно осознаена функција и корелација помеѓу артритисот и органот или органскиот систем. Се претпоставува дека клеточниот имунолошки одговор на различни антигени, може да доведе до оштетување на ткивата на местото каде се појавила секундарна реакција со инфламација и фиброза, што доведува до разорување на ткивата, смалување на нивната функција и синтезата на протеините, која инаку, во нив нормално би се одвивала (Markelevic и сор., 2006). Ова би можело да биде последица и на привремено нарушената регулација на фид-бек контролираните функции на нервно-ендокрино-хуморалниот и микроваскуларниот систем, кој се однесува на координираното делување на различните гени кои меѓусебно контролираат експресија на одредени гени одговорни за активација на хуморални и целуларни компоненти на имуниот систем и доведува до воспалителни процеси (Davidson и Diamond, 2001). Исто така, клеточниот имунолошки одговор на различни микроорганизми и други антигени, навлезени или внесени во организмот, можат да доведат до оштетување на ткивата на местото каде се појавила, или е предизвикана инфекција и нејзино проширување низ телото, при што инфламацијата и фиброзата можат да доведат до поголемо разорување на ткивата и смалување на нивната функција и синтезата на протеини (Markelevic, 2006).

Според некои автори (Kamradt и Volkmer-Engert, 2004) можно е некои артритогени предизвикувачи да послужат само како „trigger“-почетни иницијатори на имунолошките реакции кај имунолошки предиспонираните лица, создавајќи автоантитела на сопствените протеини, кое што може да биде една од причините за нивна намалена концентрација.

Се претпоставува дека во зглобот, односно во синовијалната мембрана, доаѓа до реакција помеѓу надворешен навлезен агенс-антиген, кој може да биде дел од некоја бактерија или вирус, и најзначајните клетки на имунолошкиот систем Т-лимфоцитите (Cohen, 1993). Во содејство со другите имунолошко активни клетки како макрофаги и фибробласти, доаѓа до синтетизирање на супстанции кои овозможуваат нивна понатамошна комуникација и истовремено започнува процесот на инфламација. Овие супстанции се нарекуваат цитокини, а помеѓу нив најзначајни се TNF-alfa и interleukin-1. Ревматоидните воспаленија, автоимуните болести и автоимуните синдроми припаѓаат на посебна група на болести во хуманата патологија кои манифестираат клинички, серолошки и патохистолошки знаци на активација на автореактивните клонови на лимфоцитите. Неоваскуларизацијата е управувана од различни цитокини како TNF-alfa. Активацијата на хондроцитите и остеоκластите со продуцирање на



протеази, индуцирани од IL-1 и TNF-alfa доведува до губење на 'рскавицата и коскената матрица, како и на протеините. Главната улога на про-воспалителните цитокини во ревматоидниот артритис, го демонстрираше сеуште непознатиот терапевтски ефект на анти TNF-alfa антителата користени кај пациентите со ревматоиден артритис (Elliot и сор., 1994).

Поради промени во клетките на зглобната 'рскавица Т-лимфоцитите, истите ги препознаваат како туѓи тела и ги напаѓаат. Тогаш започнува доста комплициран и недоволно разјаснет воспалителен процес во кој учествуваат и макрофагите, ткивните фибробласти, Б-лимфоцитите, неутрофилните гранулоцити, а исто така, и цела низа на воспалителни медијатори (простагландини) и цитокини (interleukini, алфа-TNF), но и протеази кои ги разградуваат протеините и ја намалуваат нивната содржина (Samarko и Vaioroulos, 2005).

Индуцираниот ревматоиден артритис предизвикува промени во развојот и функцијата на хепарот. Ваквите промени, сигурно дека имаат одредени ефекти и врз концентрацијата на протеините во хепарот. Тоа се гледа преку квантитативно намалената концентрација на протеините во хепарот, од нашите добиени резултати, кај третираната група на животни во однос на контролната. Ова е видно и кај апсолутната и кај релативната содржина на протеините.

Во прилог на овој тератоген ефект на артритисот врз црниот дроб, одат и литературните податоци каде се наведува дека при артритис со распад на хепатоцитите доаѓа до ослободување на повеќе ензими од лизозомите на пропаднатите клетки како хидролази и протеази, чија активност е зголемена (Banham и сор., 2006; Ishii и сор., 2006).

Исто така, спрема литературните податоци, при артритисот е намален и бројот на тромбоцитите, и нивото на протромбинот кој нормално непрекинато се создава во хепарот бидејќи се троши при коагулацијата на крвта. При ревматизам е зголемен и CRP кој е продуциран во црниот дроб, како одговор на ексцитираниот имун систем, што сè заедно не упатува на тератогениот ефект на артритисот врз црниот дроб (Corless и Middleton, 1983).

## **5.2. Влијанието на индуцираниот ревматоиден артритис врз содржината на DNA и RNA во црниот дроб**

При состојба на ревматоиден артритис активноста на хепатоцитите се зголемува во борбата за одржување на нормалните биохемиско-физиолошки процеси во црниот дроб, како синтезата на нуклеински киселини, протеини, но и на други продукти за нормална функција на организмот во целина (Griffiths, 1988). Имунолошката реакција на аплицираниот колаген тип-II и последователното развивање на артритисот кај стаорците е поврзано со МНС RT1

точката и варира кај видовите кај кои се користи овој тип на колаген за имунизација (Griffiths, 1988). Имено, базофилите и маст клетките содржат и може да ослободат материја наречена хистамин (Banham и соp., 2006; Ishii и соp., 2006), при што е интересно дека хистаминот е способен да продуцира ефекти, опишани претходно, како симптоми на воспаление, но и некои други ефекти. Хистаминот кој е ослободен во иницијалната фаза на оштетувањето на ткивото, е еден вид заштитна мерка на организмот да го забрза закрепнувањето од повреди. Според истражувањата на Christen (2005), како резултат на ова ослободување, има зголемениот проток на крв во областа каде заздравува повреденото ткиво. На пример, IgE антителата се поврзани со хиперсензитивни антигенски реакции и тие предизвикуваат дегранулација на маст-клетките со ослободување на хистамин и зголемување на синтезата на нуклеинските киселини (Christen, 2005). Ова се гледа и од нашите испитувања и добиените резултати за релативната содржина на DNA и RNA кои се дадени на 100 mg ткиво и најдобро ја прикажуваат реалната состојба на зголемена синтеза на нуклеинските киселини во хепатоцитите. Според Christen (2005), при автоимуната реакција и пропаѓањето на дел од клетките на погодените органи, компензаторно со зголемена активност на функционално здравите клетки од истиот орган, така да рибозомите во тие клетките, кои содржат рибонуклеинска киселина, и таму се одвива процесот на синтеза на протеини, ја зголемуваат својата активност, а исто така доаѓа и до зголемена синтеза на рибозомалните субединици во јадрото и нивен побрз транспорт до цитоплазмата и зголемена синтеза на RNA.

Нашите резултати кои го прикажуваат ефектот на предизвиканиот ревматоиден артритис кај белиот стаорец врз вкупната и релативната содржина на DNA во црниот дроб, кај третираната во однос на контролната група ни покажуваат дека истиот предизвикува промени врз содржината на DNA во црниот дроб. Тие се манифестираат преку намалена апсолутна содржина на DNA во целокупното црнодробно ткиво, во споредба со контролната група животни, но зголемување на релативната содржина на протеините изразени на 100 mg ткиво.

Ефектот на предизвиканиот ревматоиден артритис најјасно е видлив кај резултатите добиени за релативната содржината на DNA во црниот дроб кај третираната во споредба со контролната група животни, изразени како mg % каде се гледаат сигнификантно повисоки вредности (A:B,  $P < 0.001$ ).

Во црниот дроб беше испитуван и ефектот на индуцираниот ревматоиден артритис врз вкупната и релативната содржина на RNA кај експерименталните групи на белиот лабораториски стаорец. Дискутирајќи ги резултатите забележуваме дека слични, ако не и исти, се ефектите врз апсолутната и релативната маса на RNA во хепаталното ткиво, кои индуцираниот ревматоиден артритис ги има предизвикано врз овие параметри во црниот дроб кај третираните животни во споредба со контролните (A:B,  $P < 0.001$ ). Посебно

важна е релативната содржина на RNA во црнодробното ткиво, бидејќи ја отсликува реалната промена на концентрацијата на RNA на 100 mg хепатално ткиво.

Применетиот третман, според програмата за работа, има свој ефект и врз овој параметар. Нашите резултати, во услови на колаген индуциран артритис, покажуваат сигнификантно повисоки вредности на релативната содржина на RNA кај артрозните во споредба со контролните стаорци (A:B,  $P < 0.001$ ). Стимулирачкиот ефект на индуцираниот ревматоиден артритис врз релативната содржина на RNA во црниот дроб е изразен преку сигнификантното зголемување на нејзината содржина кај третираната во однос на контролната група, што е добро видно од добиените резултати (A:B,  $P < 0.001$ ).

Ревматоидните воспаленија, автоимуните болести и автоимуните синдроми припаѓаат на посебна група на болести во хуманата патологија, кои манифестираат клинички, серолошки и патохистолошки знаци на активација на автореактивните клонови на лимфоцитите. Активирањето на имунолошкиот состав кај тие болести се гледа во појавата на автоантитела на еден или повеќе автоантигени, а настануваат кога имунолошкиот систем ќе изгуби контрола над делот на лимфоцитите кои се специфично автореактивни со клетките на сопствениот организам-функционалните и ткивните антигени односно рецептори (Banham и сор., 2006; Ishii и сор., 2006). Докажано е дека индуциран артритис може да предизвика автоимунa реакција и зголемена синтеза на нуклеински киселини, но не е јасно како се индуцира или инхибира автоимуната реакција и како се одвива процесот (Markelevic, 2006; Davidson и Diamond, 2001).

### **5.3. Влијанието на индуцираниот ревматоиден артритис врз нуклеарниот индекс (Ni) и нуклеарниот волумен (Vn) кај црниот дроб**

Во градбата на црниот дроб влегуваат повеќе видови на клетки. Така, главните клетки, на кои отпаѓа 72-78% од градбата на црниот дроб, се со паренхимско потекло, и се т.н. хепатоцити. Покрај овие клетки, има и непаренхимски клетки (ендетелни клетки, Kupffer-ови и Pit-клетки) застапени со околу 5%. Хепатоцитот, од своја страна, како основна функционална и градбена единица на црниот дроб, е полијадрена и поларизирана клетка. На нејзината клеточна мембрана има нерамномерно распоредени, и скоро секогаш нефиксирани, хормонски рецептори, од кои најзначајни се оние за инсулин, глукагон, плазма протеини и гликопротеини (De Meyts и Hanoune, 1982).

При експериментот за предизвикување на артритис кај стаорци, ние користевме триесетина контролни животни и уште толку артрозни, стари околу

десет седмици. Експериментите, според литературните податоци, треба да се ограничат на минималното време потребно за добивање на значајна информација. Ние експериментот со Wistar-стаорците го поставивме во временски рок од дваесетина дена по имунизацијата.

Со цел да го видиме ефектот на ревматоидниот артритис врз некои цитохистолошки параметри на хепарот, како што се промените на големината на јадрото и бројот на јадрата во хепатоцитите, на крајот од експериментот земавме дел од црниот дроб од контролната и артрозната група и хистолошки го обработувавме, а после соодветна постапка за подготовка на истиот, беше мерен нуклеарниот индекс (Ni) и нуклеарниот волумен (Vn). Во нашите испитувања сакавме да видиме дали индуцираниот ревматоиден артритис кај белиот лабораториски стаорец има ефект, и каков, врз некои цитохистолошки карактеристики на хепатоцитите. Цитометриските анализи кај црниот дроб, односно, добиените резултати од цитохистолошките испитувања на хепатоцитите кај контролната и артрозната група на лабораториски стаорци, изразени преку нуклеарниот индекс (Ni) и нуклеарниот волумен (Vn), покажуваат разлики.

Од испитувањата и добиените резултати се гледа дека хепатоцитите во црниот дроб кај контролната група покажуваат нормален хистолошки изглед, односно, клетките во црниот дроб се поредени во групи и имаат едно или две еухроматични јадра со јасно видливи јадренца. Нуклеарниот индекс изнесува  $3,10 \pm 0,08$ , додека волуменот на јадрата е  $210,48 \pm 9,33 \text{ mm}^3$ .

Вредностите за нуклеарниот индекс и нуклеарниот волумен добиени од испитувањата на црниот дроб кај животните кои беа со предизвикан ревматоиден артритис покажуваат значајни промени во однос на контролната група животни. Нуклеарниот индекс кај нив изнесуваше  $2,58 \pm 0,03$  додека волуменот на јадрата беше  $236,50 \pm 5,39$ . Значаен ефект врз состојбата на хепатоцитите се забележува, следејќи ги вредностите на нуклеарниот индекс и нуклеарниот волумен, кај индуцираниот ревматоиден артритис во однос на контролната група животни. Резултатите покажуваат дека значајни промени се случуваат на нивото на хепатоцитите, и притоа, бројот на јадрата се намалил за 17 %, а нивниот волумен се зголемил за скоро 13 %. Констатираните вакви промени се сигнификантни ( $P < 0.005$ ).

#### **5.4. Влијанието на индуцираниот ревматоиден артритис врз активноста AST и ALT во црниот дроб**

Сите досегашни истражувања даваат доста податоци за движењето на различни параметри за други органи, и помалку или повеќе се познати нивните промени во крвта кои настануваат при ревматоиден артритис, затоа и не беа предмет на наше интересирање при поставувањето на експериментот, туку главен интерес ни беше да ја испитаеме активноста на ALT и AST како хепатални ензими во серумот при состојба на ревматоиден артритис, за што има малку литературни податоци. Исто така познато е дека кај женската популација од 2 до 3 пати почеста е појавата на ревматоидниот артритис отколку кај машката, и затоа ние индуциравме артритис и го истражувавме нивото на активност на овие ензими при појава на болеста, без разлика на полот, при што, популациите ги поделивме само на нормални и артрозни животни. Иако црниот дроб поседува голема функционална резерва и регенеративна способност и може извесно време компензаторно да ја одржува функционалната способност, сепак, тој како „централна лабораторија“ во организмот е на удар при скоро сите заболувања или инфекции во организмот, вклучувајќи го и ревматоидниот артритис (Branch, 1982). Секако дека овие промени се одвиваат во основната единица на црниот дроб, односно хепатоцитот.

При поставувањето на нашиот експеримент, главна цел ни беше да видиме како индуцираниот ревматоиден артритис има влијание врз некои параметри на црниот дроб, но најважно ни беше да ја видиме активноста на хепаталните ензими AST и ALT, кои се едни од параметрите што ни даваат податоци за функционалната состојба на хепатоцитите, нивниот интегритет и активност, конкретно при состојба на артритис.

Ефектот на индуцираниот ревматоиден артритис, според резултатите кои ние ги добивме, врз нивото на активност на AST кај контролната и артрозната група на животни покажуваат дека нивото на ензимската активност кај артрозната група на стаорци, е зголемена и тоа високо сигнификантно (A:B,  $P < 0.001$ ). За разлика од предходно испитуваните параметри кај AST, од нашите резултати, можеме да констатираме дека доаѓа до уште поголемо зголемување на вредноста, односно активноста на овој хепатален ензим, како последица на индуцираниот ревматоиден артритис, што нè упатува на веројатноста дека како последица на предизвиканиот артритис доаѓа до разорување на дел од хепатоцитите, и најверојатно поради нивната лезија и дезинтеграција, доаѓа до излегување и до зголемена активност на ензимот во серумот.

Активноста на ензимот кај третираната група животни изнесува 135.6 U/L, што во однос на 96,8 U/L, измерени кај контролната група, е за 40 % повисока

вредност на ензимската активност, што е високо сигнификантна разлика (A:B,  $P < 0.001$ ).

Од добиените резултати за ALT може да се забележи дека нивото на нормална ALT и нивото на артрозната ALT се разликува, и во најголем дел има значајно отстапување. Ова се констатира преку добиените вредности од нашите испитувања каде просечната вредност на ALT кај контролната група животни изнесува 69,15 U/L, додека просечната вредност на ALT кај артрозната група животни изнесува 78,11 U/L, што е за околу 13 % поголема вредност. Од добиените резултати може да се заклучи дека ефект на индуцираниот ревматоиден артритис е регистриран и врз нивото на активноста на ALT (A:B,  $P < 0.005$ ).

Ензимот AST во клетката е локализиран околу 40% во цитоплазмата и околу 60% во митохондриите. Поради големата разлика на каталитичката концентрација на AST во ткивата и крвниот серум, во процесите при кои доаѓа до лезија на клетките и ткивата кои се богати со AST, ензимот преоѓа во циркулацијата и тоа резултира со негова зголемена активност во крвниот серум.

Како AST така и ALT има важна улога во метаболизмот на аминокиселините, протеините и јаглехидратите. ALT е ензим локализиран во цитоплазмата на клетките. Најмногу го има во хепарот, потоа, во скелетните мускули, срцето, бубрезите, панкреасот и еритроцитите (Wroblewski, 1958). Бидејќи ALT е типичен цитоплазматичен ензим, и при мали оштетувања на ткивата или промена во пропустливоста на клеточната мембрана, тој излегува во меѓуклеточниот простор, односно во циркулацијата, со што се зголемува и неговата активност.

## **6. Заклучоци**

Од нашите направени испитувања за ефектот на колаген-предизвиканиот артритис кај белиот лабораториски стаорец можеме да ги извлечеме следните општи заклучоци:

- констатирано е намалување на телесната маса на стаорчињата кај третираните животни со колаген тип-II, во споредба со контролната група, кои беа на иста возраст.

- индуцираниот ревматоиден артритис предизвикува намалување на масата на црниот дроб кај третирните животни во споредба со контролните.

### **6.1. Ефектот на колаген-предизвиканиот артритис врз содржината на протеините во црниот дроб:**

- предизвиканиот ревматоиден артритис доведува до значајно намалување на нивото на протеините во црниот дроб на крајот од експерименталниот период кај артрозните во однос на контролните животни.

- колаген тип-II индуцираниот артритис доведува до сигнификантно намалување на апсолутната содржина на протеините во црниот дроб, кај артрозната група во споредба со контролната.

- релативната содржина на протеините кај третираните животни во испитуваниот период, исто така, е на сигнификантно пониско ниво во однос на контролната група животни.

### **6.2. Ефектот на колаген-предизвиканиот артритис врз содржината на DNA во црниот дроб кај белиот лабораториски стаорец:**

- апсолутната концентрацијата на DNA во црниот дроб покажува квантитативно пониско ниво кај животните третирани со колаген тип-II, во споредба со контролната група на животни.

- релативната концентрацијата на DNA во црниот дроб кај животните третирани со колаген тип-II високо сигнификантно се зголемува, во однос на контролните.

**6.3. Ефектот на колаген-предизвиканиот артритис врз содржината на RNA во црниот дроб кај белиот лабораториски стаорец:**

- апсолутната содржината на RNA во црниот дроб при состојба на индуциран ревматоиден артритис е на значајно пониско ниво кај третираната во однос на контролната група.

- релативната концентрацијата на RNA во црниот дроб кај животните третирани со колаген тип-II е на сигнификантно повисоко ниво од онаа која е констатирана кај контролната група животни.

**6.4. Ефектот на колаген-предизвиканиот артритис врз цитометриските анализи кај црниот дроб:**

- индуцираниот ревматоиден артритис доведува до сигнификантно намалување на нуклеарниот индекс.

- колаген тип-II третманот доведува до сигнификантно зголемување на нуклеарниот волумен на хепатоцитите кај артритозните, во споредба со контролните животни.

**6.5. Ефектот на колаген-предизвиканиот артритис врз активноста на AST и ALT кај црниот дроб:**

- од резултатите јасно се гледа дека активноста на AST кај третираната со колаген, односно артритозната група на животни, во однос на контролната група е на сигнификантно повисоко ниво.

- нивото на активност на ALT кај артритозната група, исто така, е на значајно повисоко ниво во споредба со активноста на ALT добиена кај контролната група.



## **7. Литература**

- Adler, C.P., Ringlage, W.P., Bohm, N., (1981): DNA content and cell number in heart and liver of children. Pathol.Res.Pract., 172:25-41.**
- Banham, A. H., Powrie, F. M., Suri-Payer, E., (2006): FOXP(3) regulatory T cells: Current controversies and future perspectives (Review). European J. Immunol. 36(11): 2832- 2836.**
- Bauer, W., Ropes, M. W., and Waine, H., (1940): Physiol. Rev. 20:272.**
- Bauer, W., Short, C. L. and Bennett, G. A., (1933): J. Exper. Med. 57:419.**
- Begic-Janeva, A. Z., (1991): Patologija jetre, zucne besike i zucnih vodova. G.Milanovac., 13-19.**
- Bell, M. J. et al., (1998): A randomized controlled trial to evaluate the efficacy of community based physical therapy in the treatment of people with rheumatoid arthritis. J Rheumatol; 25: 231-237.**
- Bennett, G. A., (1939): J. Exper. Med. 70: 277.**
- Bennett, G. A., Waine, H., and Bauer, W., (1942): Changes in the knee joint at various ages with particular reference to the nature and development of degenerative joint disease, New York, The Commonwealth Fund. 146-162.**
- Bethesda, M. D., (1999): Rheumatoid Arthritis. National Institutes of Health, National Institute and Musculoskeletal and Skin Diseases.**
- Bocanegra, T., (1994): Mycobacterial, fungal and parasitic arthritides. 4.5.1-5.12. In: Klippel, J. H., et all. Rheumatology, Mosby. London.**
- Branch, R. A., (1982): Drugs as indicators of hepatic function. Hepatology., 2:97-105.**
- Burnet, F. M., (1959): The clonal selection theory of aquired immunity. Nashville, Vanderbilt University press, 143-156.**

- Cathcart, E. S., Hayes, K. C., Gonnerman, W. A., Lazzari, A. A., Franzblau. C., (1986): Eksperimental arthritis in a nonhuman primate. I. Induction by bovine type II collagen. Lab. Invest 54:26-31.**
- Christen, U., and Von Herrath, M. G., (2004): Induction, acceleration or prevention of autoimmunity by molecular mimicry. Mol immunol, 40: 113-1382.**
- Christen, U., (2005): Infections and autoimmunity – Good or Bad. J. Immunology. 174: 7481-7486.**
- Coggeshall, H. C., Warren , C. F., and Bauer, W., (1940): Anat. Rec.77:129.**
- Coggeshall, H. A., Bennett, G. A., Warren, C. F., and Bauer, W., (1941): Am. J. M. Sc. 202:486.**
- Cohen, R., (1993): The meaning of the immunological homunculus. Isr J Med. 29: 173-174.**
- Corless, J.K., and Middleton, H.M., (1983): Normal liver function: A basis for understanding hepatic disease. Arch.Intern.Med., 143:2291-2294.**
- Courtenay, J. S., Dallman, M. J., Dayan, A. D., Martin, A., Mosedale, B., (1980): Immunization against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. Nature 283:666-668.**
- Cush, J. J., Lipsky, P. E., (1991): Cellular basis for rheumatoid inflammation. Clin Orthop Rel Res. 265: 9-22.**
- Davidson, A., and Diamond, B., (2001): Autoimmune diseases. N Engl J Med. 5(345): 340-350.**
- De Meyts, P., and Hanoune, J., (1982): Plasma membrane receptors and function. In: Arias I.M., Popper, H., Schachter, D., Shafritz, D.A., eds. The liver, Biology and Pathobiology. Raven Press, New York, ch. 33, 551-589.**
- Ebringer, A., Rashid, T., (2006): Rheumatoid arthritis is an autoimmune disease triggered by Proteus urinary tract infection. Clinical & Development Immunolog, 13 (1): 41-48.**

- Elliot, M. J., Maini, R. N., Feldmann, M., Kalden, J. R., Antoni, C., Smolen, J. S., Leeb, B., Breedveld, F. C., Macfarlane, J. D., Bijl, H., Woody, J. N., (1994): Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet*. 344: 1104-1110.**
- Firestein, G. S., (1994): Rheumatoid synovitis and pannus. In: Klippel SH, Dieppe PA, eds. *Rheumatology*, Mosby-Year Book Europe limited, London, 15: 12-36.**
- Gardner, D. L., (1992): Pathological basis of the connective tissue diseases. 1st ed. London: Edward Arnold, a division of Hodder&Stoughton.**
- Goswami, T., Vu, M.L., Srivastava, U., (1974): Quantitative changes in DNA, RNA and protein content of the various organs of the young of undernourished female rats. *J.Nutr.*, 104: 1257-1264.**
- Ѓорѓоски, К. И., (1994): Влијанието на рестриктивната исхрана и високата надворешна температура врз имуниот систем за време на интраутериниот и раниот постнатален период кај белиот лабораториски стаорец. Докторска дисертација, Скопје., 172-192.**
- Graudal, N. A., Jurik, A. G., Graudal, H. K., (1998): Radiographic progression in rheumatoid arthritis: a long-term prospective study of 109 patients. *Arthritis Rheum*; 41: 1470-1480.**
- Griffiths, M. M., (1988): Immunogenetics of collagen induced arthritis in rats. *Intern Rev Immunology* 4:1-15.**
- Guilherme, L. S. E., Oshiro. K. C., Fae, E., Cunha-Neto, G., Renesto, A. C., Goldberg, A. C., Tanaka, R. M., Pomerantzeff, M. H., Kiss, C., Silva et al., (2001): T cell reactivity against streptococcal antigens in the periphery, mirrors reactivity of heart-infiltrating T lymphocytes the rheumatic disease patients. *Infekt. Imun.* 69: 5345-5351.**
- Ishii, K. J., Uematsu, S., Akira, S., (2006): >Toll<gates for future immunotherapy (Review). *Current Pharmaceutical Design*. 12(32): 4135-4142.**
- Jungermann, K., Katz, N., (1989): Functional specialization of eifferent hepatocyte populations, *Physiol. Rev.* 69(3): 709-710.**

- Kallan, J., and Romancik, W.Z., (1966): Clin.Chem., Clin. Biochem., 4:78.**
- Kamradt, T., and Volkmer-Engert, R., (2004): Cross-reactivity of T lymphocytes in infection and autoimmunity. Molekular Diversity, 8 (3): 271-280.**
- Kamradt, T., Rolf. G., Klaus, E. J., (2005): Induction, exaverbation and inhibiton of allergic and autoimmune diseases by infection. 5( 26 ): 260-267.**
- Key, J. A., (1925): J. Bone and Joint Surg. 23: 793, 1925.**
- Kitsis, E., and Weissmann, G., (1991): The role of the neutrophil in rheumatoid arthritis. Clin Orthop Rel Res. 265: 63-72.**
- Mapp, P. I., Grootveld, M. C., Blake, D. R., (1995): Hypoxia, oxidative stress and rheumatoid arthritis. Br Med Bull. 151: 419-436.**
- Markeljevic, J., (2005): Autoimunost- trenutni stavovi. Medicinar (47): 28-30.**
- Markeljevic, J., (2006): Upalne reumatske bolesti i infekcije. Infektoloski glasnik 26:4, 171-176.**
- Michaelsson, E. et al., (1994): T cell recognition of carbohydrates on type II collagen.JexpMed180:745-749.**
- Moritz, A. R., (1942): The pathology of trauma, Philadelphia, Lea and Febiger.**
- Oldstone, M. B., (2005): Molecular mimicry, microbial infection, and autoimmune disease: evolution of the concept. Current Topics in Microbiology & Immunology, 296: 1-17.**
- Panayi, G. S., Lanchbury, J. S., Kingsley, G. H., (1992): The importance of the T cell initiating and maintaining the chronic synovitis of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 35: 729-735.**
- Rej, R., and Vanderlinde, R.E., (1981): Clin. Chem., 27:213.**
- Richterich, R., (1964): Ciba Symposium, 12:114.**

- Ropes, M. W., and Bauer, W., (1953): Synovial fluid changes in joint disease, Cambridge, Harvard University Press. 202;486.**
- Rothschild, B. M., and Masi, A. T., (1982): Pathogenesis of rheumatoid arthritis. A vaskular hypothesis. Semin Arthritis Rheum. 12: 11-31.**
- Roy, S., (1967): Ultrastructure of synovial membrane in osteoarthritis. Ann Rheum Dis. 26: 517-527.**
- Samarko, M., and Vaiopoulos, G., (2005): The role of infections in the pathogenesis of autoimmune diseases. Current Drug Targets –Inflammation & Allergy, 4 (1): 99-103.**
- Schmidt, E., and Schmidt, F.W., (1979): Enzyme Diagnosis in Diseases of the Liver and Biliary System, in Schmidt, E., Schmidt, F.W., Trautschold, I., Friedel, R., Eds., Advances in Clinical Enzymology, S. Karger, Basel., 239.**
- Schumacher, H. R., (1994): Clasiffication of rheumatic diseases 1.7.1.-7.4. In: Klippel JH et all. Rheumatology, Mosby. London. 15:112.**
- Shaffer, M. F., and Bennett, G. A., (1939): J. Exper. Med. 70:293.**
- Shoenfeld, Y., (1989): The mosaic of autoimmunity. Immunol Today, 510-123-136.**
- Slobodan, B., (2003): Fizikalna terapija i kvalitet zivota kod bolesnika sa reumatoidnim artritismom. Acta reumatologica Belgradensia. ISSN 0351-7217.- God. 33, supl.1, str.55-57.**
- Springer, T. A., (1990): Adhesion receptors of the immune system. Nature. 346: 425-434.**
- Stevens, C. R., Blake, D. R., Merry, P., Revell, P. A., Levick, J. R., (1991): A comparative study by morphometry of the microvasculature in normal and rheumatoid synovium. Arthritis Rheum. 34: 1508-1513.**
- Straus, B., (1965): Farm. Glas., 21:239.**
- Straus, B., Plasaj, M., (1964): Lij. vjesn., 86:289.**
- Straus, B., Plasaj, M., (1964): Lij. vjesn., 86:299.**

**Straus, B., Plasaj, M., Rukavina, Z., Stefanovic, R., Grahovac, M., (1970): Lij. vjes., 92:1377.**

**Trentham, D. E., Towens, A. S., Kang, A. H., (1977): Autoimmunity to tipe II collagen: an experimental model of arthritis. J Exp Med 146:857-68 .**

**Winter, C. H., Risley, E. A., Nuss, G. W., (1962): Carageenan induced edema in hindpaw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. Proc Soc Exp Bio Med 111:544-547.**

**Wolcott, W.E., (1927): J. Bone and Joint Surg. 9: 67, 1927.**

**Wooley, P. H., (1988): Collagen-induced arthritis in the mouse. Methods Enzymol 162:361 -73.**

**Wroblewski, F., (1958): The clinical Significance of Alterations in Transaminase Activities of Serum and other Body Fluids, u Advances in Clinical Chemistry, Vol. 1, H. Sobotka i C.P. Stewart, Eds. Academic Press Inc., New York, London, pag. 313.**

**Young, A., Dixey, J., Cox, N., Davies, P., Devlin, J., Emery, P., et all., (2000): How does functional disability in early rheumatoid arthritis affects patients and their lives. Results of years of follow-up in 732 patients from the Early RA Study (ERAS). Rheumatol 2000; 39: 603-11.**

**Zampieri, S., Ghirardello, A., Laccarino, L., Briani, C., Sarzi-Puttini, P., Atzeni, F., Arienti, S., Todesco, S., Doria, A., (2004): Polymyositis-dermatomyositis. Biochem.J., 2: 4-13.**