

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

*Натали Иванова, Мире Спасов, Ицко Ѓоргоски,
Никола Хаџи-Петрушев, Марина Данилова*

ABSTRACT:

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.

ВОВЕД

Зглобовите се состојат од два или повеќе спротивни коскени краеви, покриени со артикуларна '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. 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). 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 агенци, трауми кои се повторуваат, нарушена механика при нарушување во одењето или држењето на телото, но и воспалителни болести како гихт или ревматоиден артритис (Bennett и сор., 1942). Во телото, секое ткивно оштетување резултира со воспалителен одговор карактеризиран со црвенило на нападнатата област, зголемена температура, локализиран едем и болка (Christen, 2005), притоа, базофилите и маст-клетките содржат и може да ослободат материја наречена хистамин (Banham и сор., 2006; Ishii и сор., 2006). Хистаминот кој е ослободен во иницијалната фаза на оштетување на ткивото, е еден вид заштитна мерка на организмот за забрзување на закрепнувањето од повреди. Од посебна важност, при испитувањата на појавата на инфекциите и автоимунуните 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 сор., 2006; Ishii и сор., 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). 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). Воспалувањето кај ревматоидниот артритис започнува во синовијата, која ја обложува внатрешноста на зглобот и која обезбедува исхрана на зглобната 'рскавица и создавање на зглобната течност. Доколку болеста се појави под шеснаесетгодишна возраст тогаш е позната како јувенилен идиопатски артритис (Young и сор., 2000). 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 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 краеви во зглобот, но и сите други структури на зглобот. Сето ова доведува до болки, вкочанетост, деформација и нарушување на функцијата на заболените зглобови. 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. 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 артрит 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. Најчесто применувани терапевски мерки се нестероидни антиревматски или антиинфламациски (NSAIL)-антиревматици. 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.

Ревматските болести, спрема класификацијата, се поделени на:

- воспалителни ревматски болести (reumatska groznica, reumatoiden artritis, psoriaticen artritis, anksilozen spondiloarthritis, lupus eritematodus, skleroderma).
- дегенеративни ревматски болести (hondroza, osteoarthritis, osteohondroza, spondilitis и spondiloarthrititis).
- вонзглобен ревматизам (fibromijalgija, burzitis, tendinitis, panikulitis).

Цели на трудот

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.
- 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 двете групи на животни.
- Да се одредат концентрациите, односно, активноста на AST и ALT во серум кај здрава популација на бел лабораториски стаорец, и активноста на AST и ALT во серум кај артрозната група, и да се направи споредба на резултатите.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

Во текот на експерименталната работа беа користени бели лабораториски стаорци од сојот Wistar. За експериментот избиравме здрави машки животни на возраст од околу седум недели. Тие беа сместени во кафези (Hulskamp Alkamar Holand) под постојана контрола, на фармата за лабораториски животни на Заводот за физиологија и биохемија на Институтот за биологија при Природно-математичкиот факултет во Скопје. 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). Вкупно беа употребени околу шеесет животни. Сите стаорци ги жртвувавме на 21-иот ден од пост-имунизацијата со колаген тип-II.

Подготовка на колагенот и постапка за негова апликација

За експериментот ние употребувавме високо прочистен колаген тип-II, подготвен по дефиниран протокол, бидејќи квалитетот на колагенот има влијание врз артритогенетичноста (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. Подготовката на емулзијата од колагенот ја вршевме по дефиниран протокол со употреба на електричен хомогенизатор.

- Се користеше хомогенизатор со мало сечило (дијаметар 5mm или помалку) за мешање на IFA и растворот на колаген. Погодно беше да се користи 5ml или 10 ml пластичен шприц кој се сече на половина. Шприцот се ставаше во држачот и се потопуваше во студена вода за да се спречи денатурализацијата на колагенот, бидејќи тој се загрева додека се меша, а денатурираниот колаген нема да предизвика артрит.

- 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.

- Се продолжуваше со мешањето додека не се добиеше густа емулзија на максимална брзина (просечно 30000 вртежи за 2-3 минути). Потоа, се чекаше да се излади во ладна вода пред да почне да се меша повторно.

- 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.

- Емулзијата се префрлуваше во шприц.

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 по желба (ad libitum).

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 нетретираните животни за контрола, и од третираните животни со колаген, за анализа. Крвта ја земавме од опашката во количина од околу 1ml во специјални-ependorf 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.

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 методи во соодветните лаборатории на Природно-математичкиот факултет во Скопје. Во серумските примероци од експерименталните животни ја активността на AST и ALT.

1. Опредлување на вкупни протеини во ткиво

Концентрацијата на вкупните протеини во ткивото се определуваше по методата на Goa (1953). 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 $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$; 160 mmol/l $\text{KNaCHO}_3 \times 4\text{H}_2\text{O}$; 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 протеини во целиот орган.

2. Опредлување на вкупната содржина на DNA во ткиво

Принципот е по методата на Cerioty (1952), со 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. После жртвувањето на животното, се зема парче ткиво од определениот орган (надбубрежни жлезди) и се става во епрувета со 4 ml врел раствор од 0,1 mol/l NaOH. За комплетно хомогенизирање на ткивото се остава да стои преку ноќ на собна температура или на 37°C, а потоа се вари во водена бања со вода која врие 20-30 минути. На ткивото, откако ќе се хомогенизира и излади, се додава 2 ml 0,04 % раствор на индол и 2 ml концентрирана HCl. Содржината добро се промешува и затворените епрувети со гумени затвораи со отвор за стаклена цевка се носат во водена бања со вода која врие каде стојат точно 10 минути. Реакцијата се прекинува со пренесување на епруветите во када со ладна вода. По потполното изладување на растворот се додава 4 ml хлороформ. Содржината на автоматска мешалка се меша додека се формира млечно бела боја на растворот. Мешавината стои 10 минути на ладно и потоа епруветите се центрифугираат 10 минути на 2500 завртувања во минута. После ова, со аспиратор или вакуум-пумпа, се отстранува долниот слој (хлороформот) од епруветата. Интензитетот на обојување на растворот се мери во кивета на колориметар со бранова должина од 490 nm. Паралелно со анализата, се прави и стандарден раствор на DNA. Концентрацијата на DNA во ткивото ја пресметувавме по следната формула:

$$\text{DNA} = E_a / E_s \times K_s$$

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

3. Опредлување на вкупната содржина на RNA во ткиво

Определувањето на содржината на RNA во ткиво се вршеше по методот на Munro (1963). Веднаш после жртвувањето на животното, најбрзо што може, се зема парче од ткивото и се става во ладна дестилирана вода во однос 1:20. Парчето се мацерира до потполна хомогенизација на ткивото. Од хомогенатот се земаат 5 ml (тоа да одговара на околу 250 mg свежа маса на ткиво) во епрувета за центрифугирање од 15 ml и се додава 2,5 ml мраз-ладен 0,6 N раствор на HClO_4 , внимателно се промешува и стои 10 минути на 0°C, се центрифугира, супернатантната фракција (во киселина растворлива фракција) се собира, а преципитатот се исперува уште два пати со мраз-

ладен 0,2 N HClO₄. После центрифугирањето, вишокот преку филтер-хартија, се префрла во одмерна колба, во киселина растворливата фракција. На преципитатот се додава 4 ml 0,3 N KOH, содржината се промешува и се остава да се инкубира 60 минути на 37°C (во водена или воздушна бања). После инкубацијата на целата содржина се додаваат 2,5 ml 1,2 N HClO₄ и се остава да стои 10 минути на ладно. Содржината се центрифугира, по што DNA и протеините преципитираат, додека RNA останува во супернатантот. Супернатантот со RNA се собира, а преципитатот се измива уште два пати со по 5 ml 0,2 N раствор на HClO₄. Измиениот супернатант се собира заедно со претходно одвоената RNA фракција, во која, потоа, се додава уште 10 ml од 0,6 N раствор на HClO₄ и во одмерна колба до 100ml се дополнувана со дестилирана вода. На овој начин се добива раствор од рибонуклеотиди во 0,1 N раствор на HClO₄. Со мерење на апсорпцијата на 260nm на рибонуклеотидниот раствор може да се пресмета содржината на RNA, ако се знае дека екстинција од 1.000 на 260 nm одговара на 32 µg RNA на ml. Добиените вредности за концентрација на RNA во ткивото ги пресметувавме како mg RNA/100 mg ткиво (mg%), или како вкупна содржина на RNA во органот.

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, Na₂HPO₄-6,5 g, NaH₂PO₄ x H₂O-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 µm беа направени на микротом во цитохистолошката лабораторија. За обојување на хистолошките пресеци беа користени: хематоксилин-еозин и азур II-еозин методите. Хистолошката обработка на примероците за анализа ги вршевме 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 mm како и нуклеарниот волумен-Vn кај истите на 50 јадра од секоја единка во mm.

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 NADH₂ и ензимот малатдехидрогеназа (MDH) преоѓа во јабољкова киселина, а еквивалентна количина NADH₂ се оксидира во NAD. Намалувањето на апсорбанцијата соодветствува на преоѓањето на редуцираниот во оксидиран облик на коензимот и претставува мерка е за активноста на ензимот.

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 NADH₂ и со дејството на ензимот лактатдехидрогеназа

(LDH) преминува во лактат (индикаторска реакција), а еквивалентна количина на NADH_2 се оксидира во NAD . Намалувањето на апсорбацијата 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.

7. Статистичка анализа

Добиените поединечни вредности на резултатите ги сведувавме на средни вредности, по соодветна формула, додека стандардната грешка ја пресметувавме по друга соодветна формула. Сигнификантноста ја одредувавме со Student-овиот t-test, при што при споредување на групи со ист број на животни користевме една формула, додека при споредување на групи со различен број на животни користевме друга формула. Вредностите се споредуваат од специјална табела, при што вредностите помали од $p < .050$ се сметаат како сигнификантни.

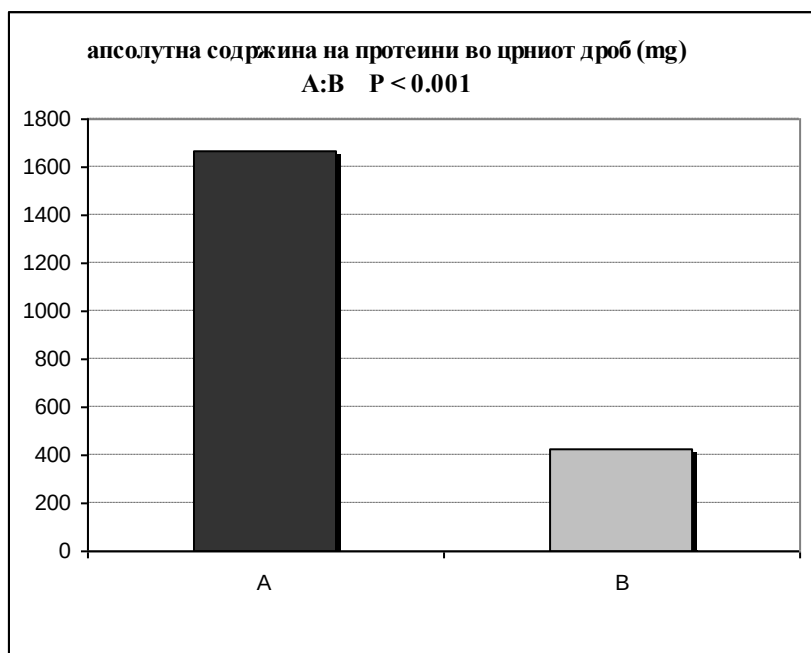
Резултати

Влијанието на индуцираниот ревматоиден артритис врз некои параметри на црниот дроб

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, односно, 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 ($n=31$) 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, средната вредност на апсолутната маса на црниот дроб кај оваа група изнесуваше 2416,5 mg, а вредноста на релативната црнодробна маса беше 2,82 mg %.

Содржина на протеините во црниот дроб

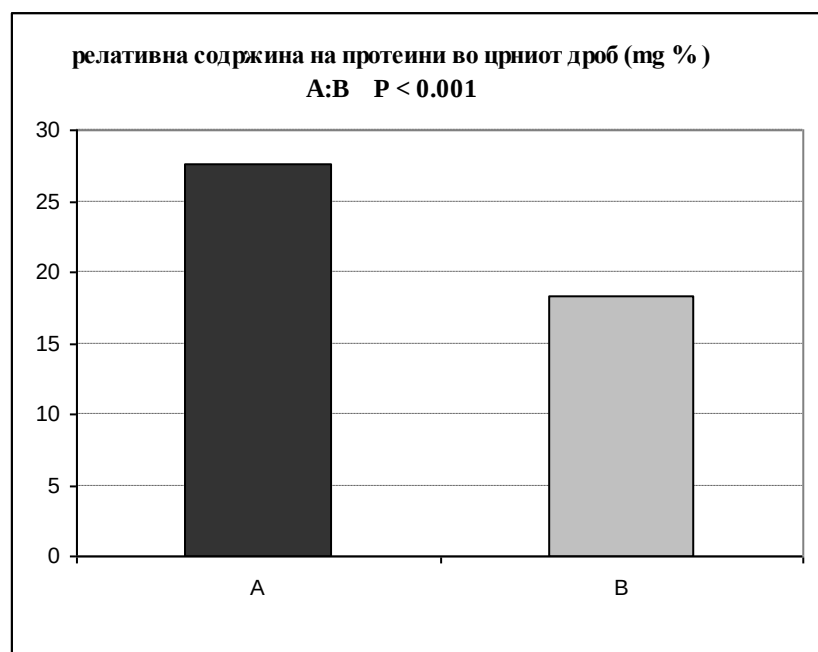
Добиените резултати од нашите испитувања за апсолутната и релативната содржина на протеините во црниот дроб кај контролната група и групата животни со индуциран ревматоиден артритис, се прикажани на сликите број 1 и 2. Просечната вредност на апсолутната содржина на протеини во црниот дроб кај контролната 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 контролата. Тоа се гледа и од графичкиот приказ на сл.1, 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, $p < .001$). 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 (сл.2, A:B, $p < .001$). 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 кај животните со индуциран артритис е сигнификантно пониска во споредба со истите кај контролата.



Слика 1. Апсолутна содржина на протеини 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, но во почетокот на експериментот им индуциравме артритис; (n=30)-со педесетина дена старост на почетокот на експериментот).

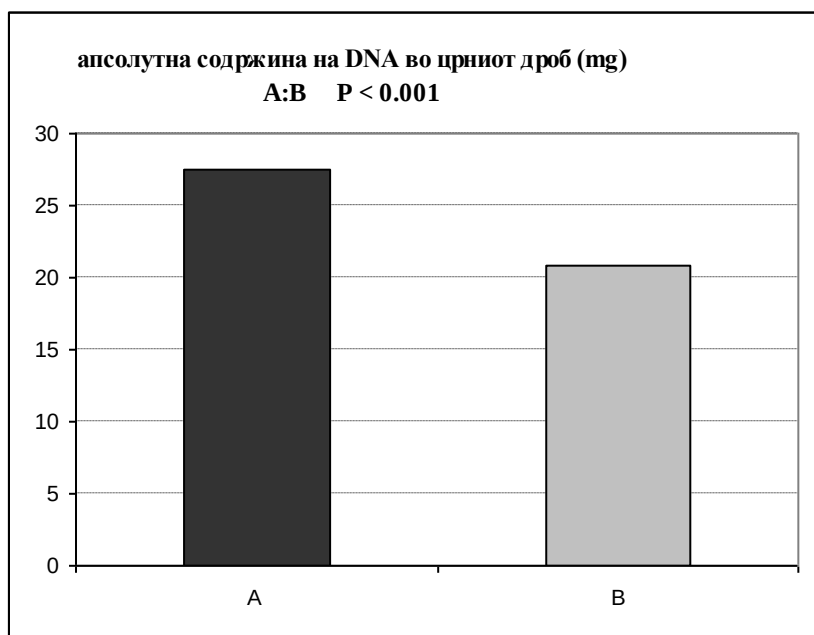


Слика 2. Релативна содржина на протеини во црниот дроб (mg %) кај контролната и артрозната група на животни. (Легендата е иста како на слика 1).

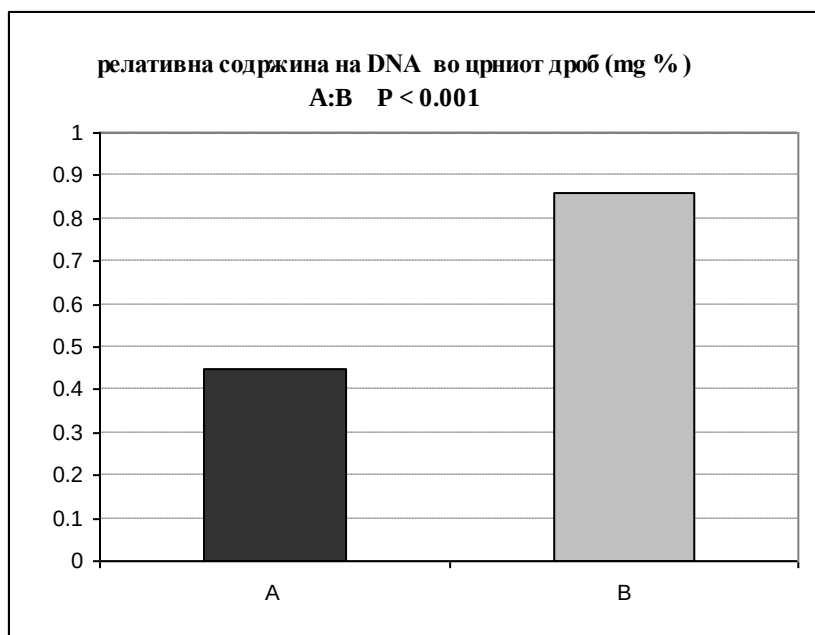
Манифестираните промени најдобро се гледаат преку релативната содржина на протеините, што значи, дека индукцијата на ревматоиден артритис кај стаорците покажува супримирачки ефект врз содржината на протеините кај артрозната во однос на контролната група (сл.1, и 2, A:B, $p < .001$).

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 ($n=30$), а добиените вредности графички се прикажани на сликите број 3 и 4. 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 сл.3, 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, $p < .001$). Тоа е најверојатно поради супресирачкиот 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 сл.4. 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 (сл.4, A:B, $p < .001$). 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 супресирачкиот ефект на артритисот врз метаболизмот во хепарот, поточно на ниво на хепатоцитите, како и врз нормалната функција и развој на целиот орган.



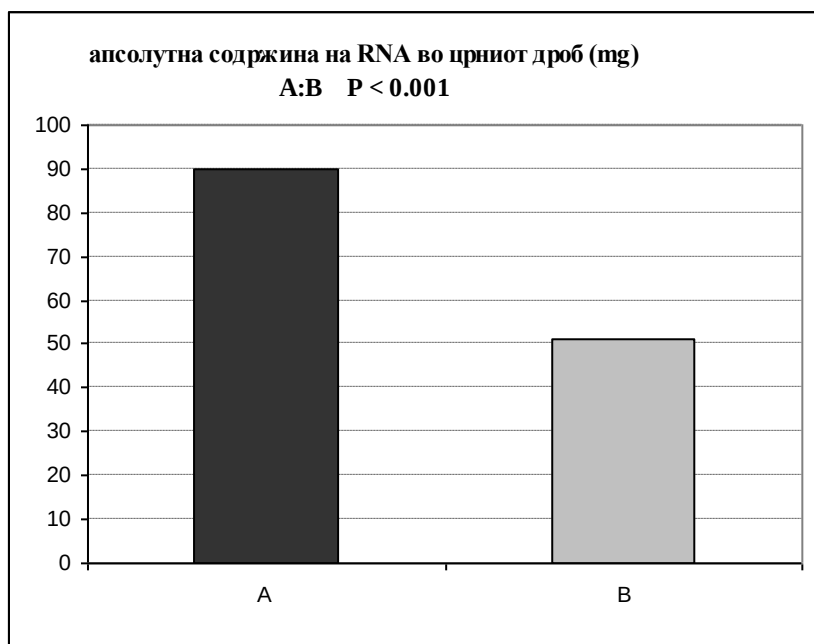
Слика 3. Апсолутна содржина на DNA во црниот дроб (mg) кај контролната и артрозната група на животни. (Легендата е истакако на слика 1).



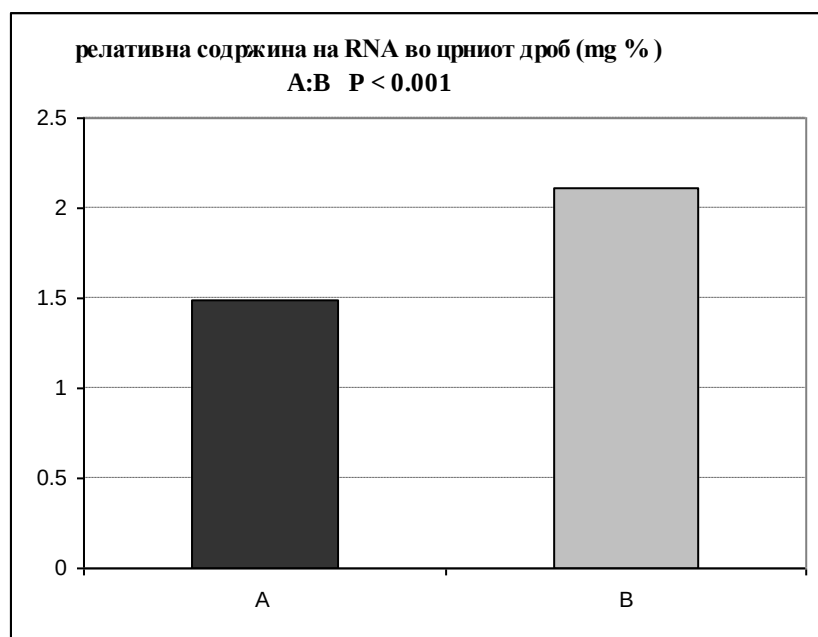
Слика 4. Релативна содржина на DNA во црниот дроб (mg %) кај контролната и артрозната група на животни. (Легендата е иста како на слика 1).

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 во однос на контролата, а резултатите графички се прикажани на сликите број 5 и 6. 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 видливо на сл.5, (A:B, $p < .001$). 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 видливо зголемувањето на релативната содржина на RNA, во однос на контролната група (сл.6, A:B, $p < .001$). 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 видливо дека релативната концентрација 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 (сл.6, A:B, $p < .001$). 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 сл.5 и 6), се манифестираат поради пресметковните изразувања на двете концентрации, на масата на целиот орган и на единица ткиво.



Слика 5. Апсолутна содржина на RNA во црниот дроб (mg) кај контролната и артритозната група на животни. (Легендата е иста како на слика 1).



Слика 6. Релативна содржина на RNA во црниот дроб (mg %) кај контролната и артритозната група на животни. (Легендата е иста како на слика 1).

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). 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 $236,50 \pm 5,39$. 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. 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 (таб.1, $p < .005$).

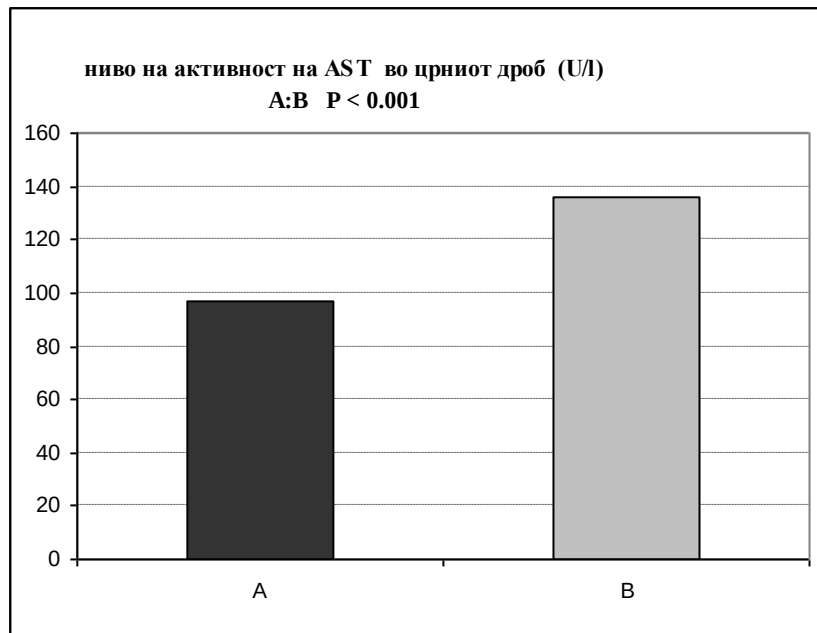
Табела бр. 1

Контролни животни		Артрозни животни	
Нуклеарен индекс (Ni)	Нуклеарен волумен (Vn)	Нуклеарен индекс (Ni)	Нуклеарен волумен (Vn)
$3,10 \pm 0,08$	$210,48 \pm 9,33$	$2,58 \pm 0,03$	$236,50 \pm 5,39$

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

Активност на AST

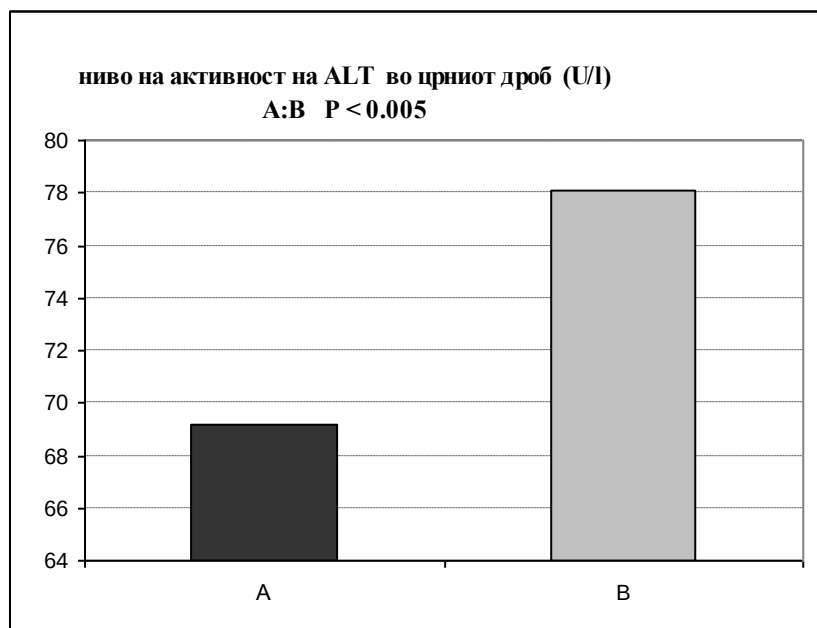
Ефектот на индуцираниот ревматоиден артритис врз нивото на активност на AST во црниот дроб кај контролната и артрозната група на животни е графички прикажан преку резултатите на слика број 7. Просечната вредност на AST кај контролната група животни изнесуваше 96,8 U/l, додека просечната вредност на AST кај артрозната група животни изнесуваше 135,6 U/l. Предизвиканиот ревматоиден артритис доведува до сигнификантно зголемување на активноста на AST кај артрозната, во споредба со контролната група на животни (A:B, $p < .001$). 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 не 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 (сл.7, A:B, $p < .001$).



Слика 7. Ниво на активност на AST во црниот дроб (U/l) кај контролната и артрозната група на животни. (Легендата е иста како на слика 1).

Активност на ALT

Ефектот на индуцираниот артритис врз активност на ALT во црниот дроб кај контролната и артрозната група на животни е графички прикажан на слика број 8. Од графиконите може да се забележи дека нивото на нормална ALT и нивото на артрозната ALT се разликува, може да се види дека во најголем дел има значајно отстапување, иако не толку големо и карактеристично како за AST. 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 (сл.8, A:B, $p < .005$).



Слика 8. Ниво на активност на ALT во црниот дроб (U/l) кај контролната и артрозната група на животни. (Легендата е иста како на слика 1).

Дискусија

Кај експерименталните животни 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 имунизираниите стаорци со колаген тип-II, што е јасно и од поединечно добиените резултати како и од средните вредности. Добиените резултати од нашите испитувања за просечните апсолутни, 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.

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, $p < .001$). 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, $p < .001$). 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. 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. Така, вредноста на испитуваниот параметар кај артрозните во споредба со контролните животни, покажуваат сигнификантно пониски вредности (A:B, $p < .001$). 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. 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 (Markalević 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 ифламацијата и фиброзата можат да доведат до поголемо разорување на ткивата и смалување на нивната функција и синтезата на протеини (Markelevic, 2006). 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 соп., 2006; Ishii и соп., 2006).

При состојба на ревматоиден артритис активната 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). Според истражувањата на Christen (2005), како резултат на ослободувањето на хистамин, има зголемен 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 клетки, 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. Ефектот на предизвиканиот ревматоиден артритис од нашите резултати најјасно е видлив кај 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, $p < .001$). 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. 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. Посебно важна е релативната содржина на RNA во црнодробното ткиво, бидејќи ја отсликува реалната промена на концентрацијата на RNA на 100 mg хепатално ткиво. 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, $p < .001$). 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, $p < .001$). 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).

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 %. На клеточната мембрана на хепатоцитот има нерамномерно распоредени, и скоро секогаш

нефиксиран, хормонски рецептори, од кои најзначајни се оние за инсулин, глукагон, плазма протеини и гликопротеини (De Meyts и Hanoune, 1982). 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). 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. Вредностите за нуклеарниот индекс и нуклеарниот волумен добиени од испитувањата на црниот дроб кај артрозните животни покажуваат значајни промени во однос на контролата. Се гледа 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 ($P < 0.005$).

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, $p < .001$). 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, $p < .001$). 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, $p < .005$). 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 (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.

Заклучоци

Од нашите испитувања за ефектот на колаген-предизвиканиот артритис кај белиот лабораториски стаорец можеме да ги извлечеме следните 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 третираните животни во споредба со контролните.
- 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 контролата.

- 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.

- 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.

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

- колаген тип-II третманот доведува до сигнификантно зголемување на нуклеарниот волумен на хепатоцитите кај артрозните, во однос на контролата.

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

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

Литература:

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.

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.

Christen, U., 2005. Infections and autoimmunity – Good or Bad. *J. Immunology.* 174: 7481-7486.

Cohen, R., 1993. The meaning of the immunological homunculus. *Isr J Med.* 29: 173-174.

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.

Griffiths, M. M., 1988. Immunogenetics of collagen induced arthritis in rats. *Intern. Rev. Immunology* 4:1-15.

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.

Ishii, K. J., Uematsu, S., Akira, S., 2006. >Toll<gates for future immunotherapy (Review). *Current Pharmaceutical Design.* 12(32): 4135-4142.

Kamradt, T., and Volkmer-Engert, R., 2004. Cross-reactivity of T lymphocytes in infection and autoimmunity. *Molecular Diversity*, 8 (3): 271-280.

Moritz, A. R., 1942. The pathology of trauma, Philadelphia, Lea and Febiger.

Michaelsson, E. et al., 1994. T cell recognition of carbohydrates on type II collagen. *JexpMed* 180:745-749.

Markeljevic, J., 2006. Upalne reumatske bolesti i infekcije. *Infektoloski glasnik* 26:4, 171-176.

Shoenfeld, Y., 1989. The mosaic of autoimmunity. *Immunol Today*, 510-123-136.

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 al., 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.