

UDK 37

ISSN 2545 - 4439
ISSN 1857 - 923X

INTERNATIONAL JOURNAL

Institute of Knowledge Management

KNOWLEDGE



Scientific Papers
Vol. 52.3

Natural, Biotechnical & Technical and Technological sciences



KIJ

Vol. 52

No. 3

pp. 341 - 392

Skopje 2022

CONTENTS

INFLUENCE OF COLLAGEN INDUCED ARTHRITIS ON C3 AND C4 COMPONENTS ON THE COMPLEMENT AT THE WHITE LABORATORY RAT.....	355
Mire Spasov.....	355
Icko Gjorgoski.....	355
MODERN CONCEPT AND STRATEGY OF SUSTAINABLE TECHNOLOGIES IN THE FOOD INDUSTRY	361
Slobodan Glišić.....	361
Ivica Zdravković.....	361
Momčilo Conić.....	361
HYGIENE PROCESS CONTROL IN THE PRODUCTION LINE OF CARBONATED DRINKS.....	367
Biljana Trajkovska.....	367
Elena Dimchevska.....	367
Ljupcho Kochoski.....	367
EFFECT OF SWISS CHARD POWDER AND STARTER CULTURE ON SENSORY PROPERTIES OF DRY-CURED PORK LOIN	373
Aleksandra Silovska Nikolova.....	373
Daniela Belichovska.....	373
USE OF SCREENING TESTS FOR CEFTIOFUR IN EVALUATION OF RAW MILK SAFETY.....	381
Dragan Ilievski.....	381
Biljana Trajkovska.....	381
Ljupche Kochoski.....	381
FLEET MANAGEMENT AND VEHICLE FLEET OPTIMIZATION	385
Jovan Mišić.....	385
Vladimir Popović.....	385
Milica Stanković.....	385

INFLUENCE OF COLLAGEN INDUCED ARTHRITIS ON C3 AND C4 COMPONENTS ON THE COMPLEMENT AT THE WHITE LABORATORY RAT

Mire Spasov

Faculty of Medical Science, University “Goce Delcev”- Stip, Republic of North Macedonia,
mire.spasov@ugd.edu.mk

Icko Gjorgoski

Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University “St. Cyril and Methodius”- Skopje, Republic of
North Macedonia, icko.gjorgoski@gmail.com

Abstract: Rheumatoid arthritis is a special group of diseases in human pathology that manifest clinical, serological, and pathohistological signs of autoreactive activation of lymphocyte clones. Activation of the immune system in these diseases is seen in the occurrence of autoantibodies to one or more autoantigens, which most commonly occurs when the immune system will lost control of lymphocytes that are specifically autoreactive with own organism. The aim of the study was to determine whether type II collagen treatment would cause an effect on the immune system, haematological and biochemical parameters, and among others on C3 and C4 complement components in white laboratory rats of the Wistar strain, both half, on the 30th and 60th day after immunization. Induced rheumatoid arthritis leads to different effects on the individual examined parameters, and also affects the reduction of C3 and C4 components of the complement, but with values that are not in the domain of statistical significance. White laboratory rats of the Wistar breed were used as the experimental model. Healthy animals of both sexes at the age of seven weeks, bred according to keeping standards experimental animals on the laboratory animal farm at the Faculty of Natural Sciences and Mathematics-Skopje. In the experiment collagen-induced arthritis has been shown to elicit a reaction in almost 100% of immunized rats with collagen type-II. They were divided into four groups; control group (n = 20) male animals, control group (n = 20) female animals, experimental group (n = 30) male animals, which were treated with collagen type-II and experimental group (n = 30) female animals who were also treated with type II collagen. Tests were performed on the 30th and 60th day after immunization. The prepared highly purified collagen type-II according to a strictly defined protocol is applied with syringes and small needles in the knee joint of the hind right leg. We took blood for analysis on the 30th and on 60th day after immunization. To determine the C3 and C4 components of complement I we used the method of radial immunodiffusion. Check the results of the analyzes were made on the Minineph device, from the manufacturer The Binding Site from the UK with laser pointing immunoephelometric method. From the studies that were done on the impact of collagen induced arthritis on the C3 and C4 components of complement in men and females, on the 30th and 60th day of treatment it can be concluded that there are reduced values for both parameters in all groups and in both sexes of experimental animals. The resulting results suggest that values for both sexes for both the 30th and 60th day of treatment have reduced values, which are not in the domain of statistical significance. The general conclusion is that animal immunoassays in animal models and drawing a parallel with the clinical picture of rheumatoid arthritis in patients has made a great contribution to clarifying many issues related to the disease.

Keywords: RA, CIA, C3, C4, immune system, rat.

ВЛИЈАНИЕТО НА КОЛАГЕН ИНДУЦИРАНИОТ АРТРИТИС ВРЗ С3 И С4 КОМПОНЕНТИТЕ НА КОМПЛЕМЕНТОТ КАЈ БЕЛИОТ ЛАБОРАТОРИСКИ СТАОРЕЦ

Мире Спасов

Факултет за медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип, Република Северна
Македонија, mire.spasov@ugd.edu.mk

Ичко Ѓорѓоски

Природно-математички факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ - Скопје, Република
Северна Македонија, icko.gjorgoski@gmail.com

Резиме: Ревматоидните воспаленија се посебна група на болести во хуманата патологија кои манифестираат клинички, серолошки и патохистолошки знаци за активација на автореактивните клонови на лимфоцитите. Активирањето на имунолошкиот систем кај овие болести се гледа во појавата на автоантитела на еден или

повеќе автоантигени, кое најчесто се случува кога имунолошкиот систем ќе ја изгуби контролата во делот на лимфоцитите кои се специфично автореактивни со клетките на сопствениот организам. Истражувањето имаше за цел да се утврди дали третманот со колаген тип II ќе предизвика ефект врз имунолошкиот систем, хематолошките и биохемиските параметри, а меѓудругото и врз C3 и C4 компонентите на комплементот кај белите лабораториски стаорци од сојот Wistar, од двата пола, на 30-иот и 60-иот ден после имунизацијата. Се покажа дека индуцираниот ревматоиден артритис доведува до различно влијание врз поделните испитувани параметри, а влијае и врз намалувањето на C3 и C4 компонентите на комплементот, но со вредности кои не се во доменот на статистичка значајност. Како експериментален модел беа користени бели лабораториски стаорци од сојот Wistar, здрави животни од двата пола на возраст од седум недели, одгледувани според стандарди за чување на експериментални животни на фармата за лабораториски животни при ПМФ-Скопје. Во експериментот се покажа дека колаген-индуцираниот артритис предизвика реакција кај скоро 100% од имунизираните стаорци со колаген тип-II. Истите беа поделени во четири групи; контролна група (n=20) машки животни, контролна група (n=20) женски животни, експериментална група (n=30) машки животни, кои се третираа со колаген тип-II и експериментална група (n=30) женски животни кои, исто така, се третираа со колаген тип-II. Анализите беа направени на 30-иот и на 60-иот ден после имунизацијата. Припреманиот високо прочистен колаген тип-II по строго дефиниран протокол го аплицираме со шприцови и мали игли во коленовиот зглоб на задната десна нога. Крв за анализи земавме на 30-иот и на 60-иот ден после имунизацијата. За одредување на C3 и C4 компонентите на комплементот ја користевме методата на радијална имунодифузија. Проверка на резултатите од анализите беа изработени на апаратот Miniperh, од производителот The Binding Site од Велика Британија со ласерски насочена имунонефелометриска метода. Од испитувањата кои беа направени за влијанието на колаген индуцираниот артритис врз вредностите на C3 и C4 компонентите на комплементот кај машките и женските единки, на 30-иот и на 60-иот ден од третманот може да се заклучи дека има намалени вредности и за двата параметри кај сите групи и кај двата пола на експериментални животни. Добиените резултати сугерираат дека вредностите и за двата пола и за 30-иот и за 60-иот ден од третманот имаат намалени вредности, кои не се во доменот на статистичка значајност. Генералниот заклучок е дека испитувањата на автоимунитетот кај животинските модели и поставувањето на паралела со клиничката слика на ревматоидниот артритис кај пациентите има голем придонес за разјаснување на многу прашања поврзани со болеста.

Клучни зборови: RA, CIA, C3, C4, имунолошки систем, стаорец.

1. ВОВЕД

Една од најтешките форми на ревматоидните болести е ревматоидниот артритис (RA). Тој покрај болки и ограничени движења, предизвикува и деформитети на зглобовите, кои доведуваат до траен инвалидитет. Терагоениот потенцијал на RA, текот, знаците и симптомите на болеста можат да варираат, да се појавуваат и да се изгубат, но болеста во континуитет перзистира. Причината за болеста веројатно е генетска, мултифакторијална и е последица на нарушената регулација на фид-бек контролираните механизми на нервно-хуморалниот и микро-васкуларниот систем кај генетски предиспонираните индивиди. При воспалителните процеси, невроендокрината регулација на имуноста ја подразбира хомеостазата помеѓу централниот и периферниот нервен систем, хормоните, клеточните и хуморалните интеракции со цитокините и невропептидите. Ваквата контрола што ја има нервно-ендокрината функција во организмот ја одржува хомеостазата, независно од големиот број на надворешни влијанија, но во ваквите физиолошки, нормално контролирани процеси, најразновидните стресогени фактори и различни агенси значително го менуваат механизмот на споменатите процеси, па и на повеќето хормони од хипоталамусот, хипофизата и останатите ендокрини жлезди. Повеќето испитувања го констатираат терагоеното дејство на одредени агенси со епизодни фебрилни состојби со различна инциденца, а видот и остријата на дефектите ќе зависат како од зафатеноста на зглобовите, така и од времетраењето на болеста. Животинските модели за RA се корисни за изучување на патогенезата на болеста и за процена на потенцијалните антиартритични лекови. Ова го овозможуваат морфолошките сличности со човечката болест и капацитетот на анималните модели, бидејќи резултатите од животинските студии можат да бидат интерпретирани и споредувани со хуманиот RA. Колаген индуцираниот артритис (CIA)-тип II кај стаорецот, како животински модел на RA, е со докажана ефикасност и предвидливост во споредба со луѓето и има акцентирана сличност со човечкиот RA, бидејќи има капацитет да се предвиди и спореди ефикасноста на третманот кај луѓе а лесно е и изведувањето на експериментите врз стаорците со разумно времетраење на тест периодот, како и сличноста во патологијата и патогенезата со болеста кај човекот, но со доста побрз развој. Нашето истражување беше насочено кон утврдување на тоа дали третманот со колаген тип II ќе предизвика ефект врз имунолошкиот систем, хематолошките и биохемиските параметри кај белите лабораториски стаорци од сојот Wistar, од

машки и женски пол на 30-иот и 60-иот ден од постимунизацијата. Од нашите испитувања и добиените резултати после третманот со колаген тип II, се покажа дека индуцираниот RA доведува до различно влијание врз поделните испитувани параметри и се гледа дека има влијание врз промената како на хематолошките, така и на биохемиските параметри во серумот кај испитуваните животни.

2. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

Како експериментален модел се користеа бели лабораториски стаорци од сојот Wistar. Беа избрани здрави животни од двата пола, на возраст од седум недели кои се чуваа во стандардни услови за експериментални животни, хранети *ad libitum* со храна за лабораториски животни и престојуваа на собна температура од 20 °C (± 2 °C), со светлосен режим 12:12 часа, под постојана контрола.

Животните беа поделени во четири групи и тоа:

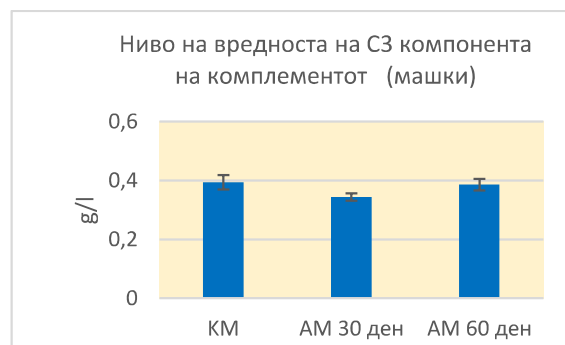
- контролна група (n=20) машки животни. Група која не беше третирана, туку само се испитуваа дадените серумски параметри за компарација со истите кај третираните животни.
- контролната група (n=20) женски животни, која исто не беше третирана туку само се испитуваа дадените серумски параметри за споредување со истите кај животните кои беа третирани.
- експериментална група (n=30) машки животни кои беа третирани со колаген тип-II. Анализите беа извршени на 30-иот и 60-иот ден после имунизацијата.
- експериментална група (n=30) женски животни, кои ги третиравме со колаген тип-II. Анализите исто така, беа на 30-иот и 60-иот ден после имунизацијата.

Колагенот се припремаше по строго дефиниран протокол, а го аплициравме со мали, тенки-инсулински игли и шприцови во коленовиот зглоб на задната десна нога. Употребувавме високо прочистен колаген тип-II, бидејќи квалитетот на колагенот и емулзијата имаат влијание врз поголема фреквенција на артритогенезата. Количината што се инјектиреше беше 0,1 ml од емулзијата на колагенот, и 0,02 ml физиолошки раствор, при што посебно внимававме да биде точна количината и при боцкањето да не истече течноста. Крвта ја земавме на 30-иот и на 60-иот ден од пост-имунизацијата. Земањето на крвта го вршевме од опашката во количина од околу 1 ml во erendorf епрувети. На крајот од експериментот, односно на 60-иот ден животните беа жртвувани. После земањето на крвта, ретракцијата на коагулумот и издвојувањето на серумот, означените епруветите се центрифугираа, а серумот го одделувавме со декантирање во други епрувети. Секое животно, кое ќе покажеше знаци на стрес беше отстранувано од експериментот.

3. РЕЗУЛТАТИ

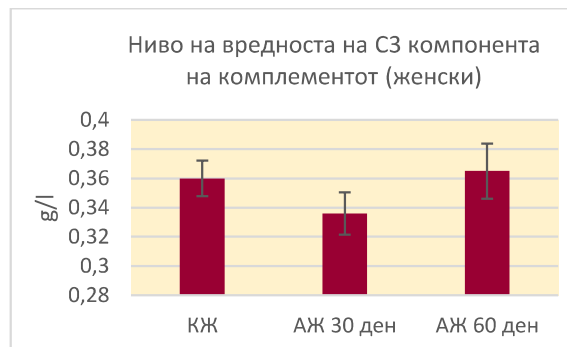
Вредностите за C3 компонентата на комплементот, кај групата на машки и женски животни со CIA се прикажани на сликите бр. 1 и 2. Од графикот за машката група се гледа дека вредноста на C3 компонентата на комплементот на 30-иот ден од третманот се намалува (KM:AM30ден, n.s., $p=0.696$). Вредноста не влегува во статистички значајни резултати. За разлика од овој временски период, вредноста која што е добиена на 60-иот ден од постимунизацијата, покажува приближно исто ниво на вредност како кај контролната група, или истата е незначително намалена, со вредност која не е во доменот на статистичка значајност (KM:AM60ден, n.s., $p=0.985$). Споредени резултатите за C3 компонентата на комплементот за артрозните животни на 30-иот и 60-иот ден од третманот, покажуваат дека разликата не е со статистичка значајност (AM30ден:AM60ден, $p=0,782$).

Слика 1. Ниво на вредноста на C3 компонентата на комплементот кај машки



Добиените вредности за животните од женската група се прикажани на сликата бр. 2. Од истата се гледа дека на 30-иот ден, исто како и кај машката група, има намалување на вредностите за нивото на С3 компонентата на комплементот, во споредба со контролата, но со вредности кои не се во доменот на статистичката значајност (КЖ:АЖ30ден, n.s., $p=0.870$). Од графикот се забележува зголемување на нивото на С3 на 60-иот ден после третманот со колаген тип II, до ниво на изедначување на вредноста со контролната група, или има сосема мала разлика без статистичка значајност (КЖ:АЖ60ден, n.s., $p=0.990$). Кога ќе се споредат артрозните женски групи на 30-иот и 60-иот ден (АЖ30ден:АЖ60ден, $p=0.780$), се гледа дека разликите во резултатите не се статистички значајни.

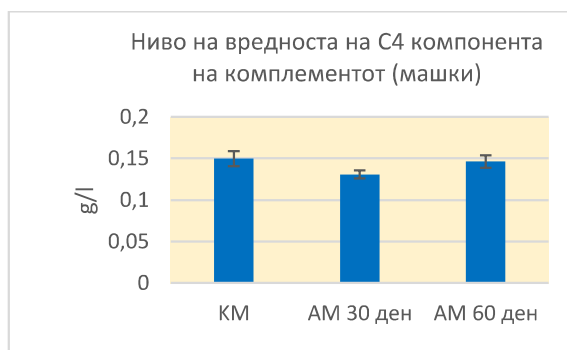
Слика 2. Ниво на вредноста на С3 компонентата на комплементот кај женски



Споредувајќи ги графиците за машката и женската група се забележува дека има идентичност во флукуацијата на вредноста за нивото на С3 компонентата на комплементот кај двете групи на животни. Скоро ист, или незначајно различен ефект на RA има кај машката и женската група, следен преку вредностите за С3 компонентата на комплементот. На 60-иот ден од третирањето со колаген тип II, кај двете групи на животни, независно од полот, се забележува дека RA е скоро без ефект врз испитуваниот параметар, споредено со контролата.

Резултатите кои ги покажуваат вредностите за С4 компонента на комплементот графички се прикажани на сликите бр. 3 и 4, соодветно за машката и женската група. Резултатите за С4 компонентата на комплементот кај машката група укажуваат на тоа дека, индуцираниот RA има влијание како и кај С3 компонентата, предизвикувајќи несигнификантни промени со намалување на вредноста на С4 компонентата на 30-иот ден од постимунизацијата, споредена со контролната група (КМ:АМ30ден, n.s., $p=0.696$). Резултатите добиени на 60-иот ден, покажуваат приближно исто ниво на вредност како и кај контролната група на животни, или истата е сосема незначително намалена (КМ:АМ60ден, $p=0.985$). Помеѓу себе споредени артрозните групи на 30-иот и на 60-иот ден (АМ30ден:АМ60ден, $p=0.782$), покажуваат дека разликата во резултатите не се со статистичка значајност.

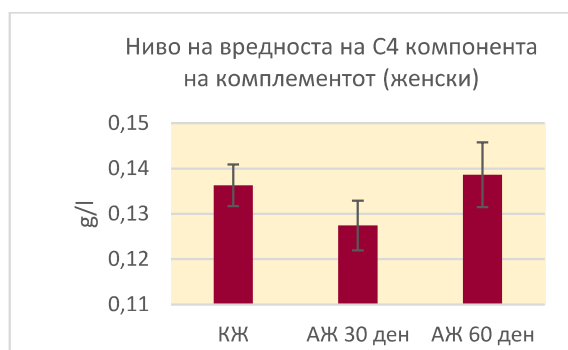
Слика 3. Ниво на вредноста на С4 компонентата на комплементот кај мажи



Кај женската група на животни добиените вредности за С4 компонентата на комплементот графички се прикажани на сликата бр. 4. Од истиот се гледа дека на 30-иот ден, исто како и кај машката група, има

намалување на вредностите за нивото на С4 компонентата на комплементот, во однос на контролната група, но со вредности кои не се статистички значајни (КЖ:АЖ30ден, $p=0.870$). Од графикот се забележува зголемување на нивото на С4 компонентата на комплементот на 60-иот ден после третманот до ниво на изедначување на вредноста со онаа кај контролната група, при што таа е речиси идентична или има сосема мала разлика, која не е во доменот на статистичка значајност (КЖ:АЖ60ден, $p=0.990$). Споредени вредностите за артрозните групи на 30-иот и 60 ден (АЖ30ден:АЖ60ден, $p=0.785$), покажуваат дека нема статистичка значајност на разликата во резултатите.

Слика 4. Ниво на вредноста на С4 компонентата на комплементот кај женски



Ако се споредат добиените резултати за машката и женската група, се гледа дека и овде се следат промените на вредноста како кај С3 компонентата на комплементот и тоа за двете групи на животни. И кај овој испитуван параметар незначително различен ефект на РА се забележува кај машката и женската група за вредностите на С4 компонентата на комплементот. Кај двете групи на 60-иот ден од третманот со колаген тип II, се гледа дека РА е скоро без никаков ефект врз испитуваниот параметар споредено со контролата.

4. ДИСКУСИЈА

Според литературните податоци улогата на комплементот во CIA кај стаорецот покажува значаен контраст во повеќето клинички ефекти кај овој модел забележани во интраартикуларната инхибиција на комплементот, зголемената поврзаност на синтезата со локалниот комплемент и активацијата на воспалените делови, кои играат улога во постојаноста на болеста. Авторите наведуваат дека РА доведува до намалување на С3 и С4 фракцијата на комплементот, во зависност од времетраењето и од активноста на воспалението и на циркулирачките имунокомплекси. Ова е во корелација со нашите добиени резултати за С3 и С4 компонентите на комплементот. Литературните податоци нотираат дека кај РА, компонентите на комплементот на плевралната течност се ниски, во споредба со серумските нивоа, кога ќе се поврзат и ќе се направи паралела со целокупната концентрација на протеините. Селективното мерење за С3 и С4 компонентата на комплементот, не дава доволно релевантни информации за другите компоненти на комплементот, за вкупниот комплемент, како и за нивната взаемна активност. Вкупниот капацитет е детерминиран не само преку концентрацијата, односно активноста на индивидуалните компоненти на комплементот, туку и преку степенот на нивното синергистичко дејство. Споредните продуктите од воспалението при РА, иницираат понатамошни ланчани имунолошки реакции и трошење на компонентите на комплементот и протеините, што севкупно може да доведе до намалување на вкупните протеини во серумот, како и намалување на продукцијата на протеините со намалување на физиолошките функции и прогресирање на болеста. Притоа, дури и ситните лезии може да имаат значајни биолошки последици, доколку репаративниот систем не може да ги отстрани. Вкупниот хемолитички комплемент, С3 и С4 се значително намалени во синовијалната течност, во однос на концентрацијата на протеините, што е резултат на активацијата на класичната патека на комплементот преку локално создадените имунокомплекси. Карактеристика за болести со имунолошки подлога како РА се намалување на С3 и С4 фракцијата на комплементот во зависност од активноста на воспалението на циркулирачките имунокомплекси. Некои автори токму ова го наведуваат како причина што РА ретко се развива кај афроамериканците, а почесто кај белците каде се присутни циркулирачките имуни комплекси, со забележана и нагласена потрошувачка на комплементот.

5. ЗАКЛУЧОЦИ

Од испитувањата кои беа направени за влијанието на колаген индуцираниот артритис врз вредностите на C3 и C4 компонентата на комплементот кај машките и женските животни од белиот лабораториски стаорец на сојот Wistar, се гледа дека има намалување на нивните вредности но статистички обработените резултати за овие компоненти на комплементот не се во доменот на статистичка значајност и кај двата пола. Главен заклучок од нашето истражување и од литературните податоци е дека испитувањата на автоимунитетот кај животинските модели и поставувањето на паралела со клиничката слика на RA кај пациентите има голем придонес за разјаснување на многу прашања поврзани со оваа болест. Сите литературни податоци наведуваат дека RA како болест бара интердисциплинарен дијагностички пристап, вклучувајќи и континуирано имплементирање на новите достигнувања во науката, како и на базичната медицина.

ЛИТЕРАТУРА

- Abd-Allah, S., Shahzad, M., Shabbir, A., & Yousaf, M. Z. (2019). Thymoquinone attenuates rheumatoid arthritis by downregulating TLR2, TLR4, TNF- α , IL-1, and NF κ B expression levels. *Biomed. Pharmacother.* 111, 958–963. doi:10.1016/j.biopha.2019.01.006
- Anthony, S.F., Dennis, L.K., Dan, L.L., Eugene, B., Stephen, L.H., Jameson, J.L., & Joseph, L. (2008). *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th edition, 2083-2092.
- Arnett, F.C. (2021). The American Rheumatism Association 1987 Revised Criteria for the Classification of Rheumatoid Arthritis *Rheum* 31:315.
- Banerjee, S., Anderson, G.D., & Luthra, H.S. (1989). Influence of complement C3, C4 and V β T-cell receptor mutations on susceptibility to collagen-induced arthritis in mice. *J. Immunol.* 142. 2237-2243.
- 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.
- Bendele, A., Chlipala, L., Sennello, R., Frazier, J., & Edwards, C. (2000). Combination benefit of treatment with soluble TNFRI and IL-1ra in rat models of arthritis. *Arthritis Rheum.* 43:2648-2659.
- Bouwman, L.H., Roep, B.O., & Roos, A. (2018). Mannose-binding lectin: Clinical implications for infection, transplantation and autoimmunity. *Human Immunology.* 67(4-5): 247-256.
- Cooke, A., Zaccone, P., Raine, T., Phillips, J.M., & Dunne, D.W. (2018). Infection and autoimmunity: Are we winning the war, only to lose the peace? *Trends in parasitology.* 20(7): 316-321.
- Honda, K., & Littman, D.R. (2018). “The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease,” *Nature*, vol. 535, no. 7610, pp. 75–84.
- Kim, E.Y., Sudini, K., Singh, A.K., Haque, M., Leaman, D., & Khuder, S. (2018). Ursolic acid facilitates apoptosis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by inducing SP1-mediated Noxa expression and proteasomal degradation of Mcl-1. *Feaeb. J.* 32, 6174–6185. doi:10.1096/fj.201800425r.
- Kirwan, J.R. (1995). The effect of glucocorticoids on joint destruction in rheumatoid arthritis. The Arthritis and Rheumatism Council Low-Dose Glucocorticoids Study Group. *Nejm*; 333: 142-146.
- Maeda, Y., & Takeda, K. (2019). “Host-microbiota interactions in rheumatoid arthritis,” *Experimental & Molecular Medicine*, vol. 51, no. 12, pp. 1–6.
- Oldstone, M.B. (2018). Molecular mimicry, microbial infection, and autoimmune disease: evolution of the concept. *Current Topics in Microbiology & Immunology*, 296:1-17.
- Verhoeven, F., Totoson, P., Maguin-Gaté, K., Prigent-Tessier, A., & Marie, C., Wendling, D., et al. (2017). Glucocorticoids improve endothelial function in rheumatoid arthritis: a study in rats with adjuvant-induced arthritis. *Clin Exp Immunol.* 2017; 188: 208–18. pmid:28152574.
- Vinay, K., Abul, K.A., Nelson, F., & Richard, N.M. (2007). *Robbins Basic Pathology*, 8th edition, 145-147.
- Yang, F., Qian, E., & Zhang, M. (2020). “ishen Tongluo formula ameliorates collagen-induced arthritis in mice by modulation of Th17/Treg balance,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 250, p. 112428.