

EFFECT OF COLLAGEN INDUCED ARTHRITIS ON ANTISTREPTOLYSIN TEST IN 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 (RA) is a serious health challenge as a disease with serious health consequences and the potential to result in permanent disability. Most of the authors state that the reason for the occurrence of the disease and its persistence is multifactorial, but above all it is a genetic predisposition as a result of the disruption of the control mechanisms of the immune system. The disease can occur at any age, but it is most common in patients over sixty years of age who suffer from damage to the joints, resulting in impaired locomotion, reduced work capacity, unproductive and poor quality of life. Animal models in RA disease research are useful for studying and evaluating the effect of potential antiarthritic drugs. The study of the disease in animal models provides useful information about rheumatoid diseases and RA in humans because of the great similarity in their onset and development.

Our research aimed to see how collagen type-II induced arthritis would cause an effect on the immune system and inter alia on ASTO in Wistar rats of both sexes, on the thirtieth and sixtieth days of immunization. ASTO is also used to diagnose RA secondary to streptococcal infections. Wistar rats, healthy seven-week-old male and female animals, bred according to standard conditions for experimental animals at the laboratory animal farm at PMF-Skopje were used for the research. The experimental animals were divided into four groups; control group of male animals (n=20), control group of female animals (n=20), experimental group of male animals (n=30), which were treated with collagen type-II and experimental group of female animals (n=30), which were also treated with collagen. Analyzes of aliquots were performed on the thirtieth and sixtieth day of the test. We apply the highly purified collagen type-II according to a defined protocol in the joint of the back right leg. We took blood for analysis on the thirtieth and sixtieth day after immunization. The ASTO samples were tested on the computerized and thermostated Mini NEF TM Duinding Fait apparatus. The principle of the method is based on the fact that pathogenic beta-hemolytic streptococci of group A produce streptolysin O, which stimulate the body to produce antistreptolysin. A titer greater than 1/200 is a positive value. From the studies that were done on the influence of collagen induced arthritis type-II on the value of ASTO in both sexes of animals, in both experimental periods, it can be concluded that they are within the limits of normal values in all groups and in both sexes. All were <59,430 IU/ml. In general, these studies of RA performed in animal models provide a good parallel for the course and development of RA in the human population.

Keywords: RA, CIA, ASTO, immune system, rat.

ЕФЕКТОТ НА КОЛАГЕН ИНДУЦИРАНИОТ АРТРИТИС ВРЗ АНТИСТРЕПТОЛИЗИНСКИОТ ТЕСТ 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: Ревматоидниот артритис (РА) е сериозен здравствен предизвик како болест со сериозни последици по здравјето и можност да резултира со траен инвалидитет. Најголем број од авторите наведуваат дека причината за настанувањето на болеста и перзистирањето на истата е мултифакторијална, но пред се е со генетска predisposition како последица на пореметувањето на контролните механизми од имунолошкиот

систем. Болеста може да се јави во било која возраст, но најчеста е кај пациентки над шеесет годишна возраст кои страдаат од оштетување на зглобовите со што имаат нарушена локомоција, намалена работоспособност, непродуктивен и неквалитетен начин на живот. Животинските модели при истражувањата на RA како болест се корисни за проучување и проценката на ефектот од потенцијалните антиартритични лекови. Испитувањето на болеста кај анималните модели дава корисни информации за ревматоидните болести и RA кај човекот поради големата сличност во настанувањето и развојот на истата. Нашето истражување имаше за цел да се види како колаген тип-II индуцираниот артритис ќе предизвика ефект на имунолошкиот систем, а меѓудругото и врз ASTO кај Wistar стаорците од двата пола, на триесетиот и шеесетиот ден од имунизацијата. ASTO се користи и за дијагностицирање на RA, како последица од стрептококни инфекции. За истражувањето се користеа стаорци од сојот Wistar, здрави животни од машки и женски пол на возраст од седум недели, одгледувани според стандардни услови за експериментални животни на фармата за лабораториски животни при ПМФ-Скопје. Експерименталните животни беа поделени на четири групи; контролна група машки животни (n=20), контролна група женски животни (n=20), експериментална група машки животни (n=30), кои беа третирани со колаген тип-II и експериментална група на женски животни (n=30), кои исто така беа третирани со колаген. Анализите на примероците се изведуваа на триесетиот и шеесетиот ден од третманот. Високо прочистениот колаген тип-II според дефиниран протокол го аплицираме во зглобот од задната десна нога. Крв за анализи земавме на триесетиот и шеесетиот ден од имунизацијата. Примероците за ASTO се испитуваа на компјутеризираниот и термостатиран апарат Mini NEF TM Duinding Fait. Принципот на методата се заснова на тоа да патогените бета-хемолитички стрептококи од групата А продуцираат стрептолизин О, кои го стимулираат организмот да создава антистрептолизин. Титар кој што е поголем од 1/200 е позитивна вредност. Од испитувањата кои беа направени за влијанието на колаген индуцираниот артритис тип-II врз вредноста на ASTO кај двата пола на животни, во двата експериментални периоди, може да се заклучи дека тие се во границите на нормалните вредности кај сите групи и кај двата пола. Сите беа со вредност <59.430 IU/ml. Генерално овие испитувања на RA кои се вршат на анимални модели даваат добра паралела за текот и развивањето на RA кај човечката популација.

Клучни зборови: RA, CIA, ASTO, имунолошки систем, стаорец.

1. ВОВЕД

Ревматоидниот артритис (RA) претставува сериозен здравствен предизвик бидејќи е болест која предизвикува сериозни здравствени последици кои можат да доведат и до траен инвалидитет. Најголем број од авторите наведуваат дека причината за настанувањето на болеста и перзистирањето на истата е мултифакторијална, но пред сè е со генетска предиспозиција и со тенденција за нарушување на регулацијата на контролните механизми од имунолошкиот систем. Болеста може да се јави во било која возраст а најчеста е кај пациентки над шеесет годишна возраст кои страдаат од оштетување на нормалната функција на зглобовите, а со тоа имаат нарушена локомоција, намалена работоспособност и неквалитетен начин на живот. Животинските модели при истражувањата на RA како болест се корисни за проучување и проценка на ефектот од потенцијалните антиартритични лекови. Болеста кај анималните модели има сличност со ревматоидните болести кај човекот, а симптомите можат да бидат споредувани со хуманиот RA поради големата сличност во настанувањето и развојот на болеста. Поради ова колаген индуцираниот артритис има голема важност за предвидувањето на почетокот, развојот и текот на болеста. Анималните модели имаат капацитет релативно полесно да се предизвика RA, а текот и развојот на болеста да се следи во пократок временски интервал после процесот на имунизација. Истражувањето беше насочено во правецот на тоа да се види дали третманот со колаген тип II ќе предизвика ефект и каков кај белиот лабораториски стаорец од Wistar сојот на триесетиот и шеесетиот ден од постимунизацијата и ако предизвика кај кој биохемиски или хематолошки параметри тоа би било. Конкретно во овој труд предмет на интерес беше антистрептолизинскиот тест О (ASTO). Истражувањето и резултатите за CIA бележат различен ефект врз различните анализирани параметри и јасно се гледаат промени на некои серумски вредности, но не и кај сите.

2. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

Како експериментален модел за истражувањето се користеа стаорци од Wistar сојот, избрани здрави примероци на возраст од седум недели, чувани во стандардни услови за лабораториски животни. Истите се хранеа *ad libitum* со храна наменета за експериментални животни, а престојуваша на температура од 20 °C и режим на светлина од 12:12 часа, под постојан надзор.

Експерименталните животни беа поделени во четири групи:

- контрола од 20 машки животни, група која не беше третирана.
- контрола од 20 женски животни, исто така нетретирана група.
- експериментална група на третирани животни (n=30). Машки животни третирани со колаген тип-II. Анализите на примероците се извршени на 30-иот и 60-иот ден после имунизацијата.
- експериментална група на третирани животни (n=30). Женски третирани животни. Анализите се извршени на триесетиот и шеесетиот ден после имунизацијата, истовремено со примероците од машката група. Колагенот кој беше потребен за апликација го припремавме по дефиниран протокол и го аплициравме во задниот десен зглоб на животните. Согласно со протоколот употребувавме колаген кој е прочистен, поради тоа што квалитетот на колагенот и емулзијата имаат влијание врз фреквенцијата на артритогенезата. Количината која се инектираше беше 0,1 ml раствор на колагенот и 0,02 ml готов физиолошки раствор, со внимание да аплицираната количина при боцкањето бидејќи се со вредност помала од 59.430 IU/ml. Според методата тест со позитивна реакција е секоја вредност која што е поголема од 220 IU/ml.

3. РЕЗУЛТАТИ

Резултатите за ASTO кај машката група се прикажани во табелата број 1. Притоа, кај групата која беше контролна, но и кај третираниите групи се забележуваат негативни вредности, бидејќи се со вредност помала од 59.430 IU/ml. Според методата тест со позитивна реакција е секоја вредност која што е поголема од 220 IU/ml.

Табела бр. 1. Резултати за ASTO кај машки стаорци

ASTO кај машки групи		
Контролна	Артроза 30ти ден	Артроза 60ти ден
негативно (<59.430 IU/ml)	негативно (<59.430 IU/ml)	негативно (<59.430 IU/ml)

Резултатите кои што се добиени кај женските животни се дадени во табелата број 2. Се гледа дека вредностите на примероците кај женските стаорци се помали од 59.430 IU/ml, а тоа сугерира дека резултатите за ASTO се во нормалните граници.

Табела бр. 2. Резултати за ASTO кај женски стаорци

ASTO кај женски групи		
Контролна	Артроза 30ти ден	Артроза 60ти ден
негативно (<59.430 IU/ml)	негативно (<59.430 IU/ml)	негативно (<59.430 IU/ml)

4. ДИСКУСИЈА

При експериментот со CIA предмет на наш интерес беше и антистрептолизинскиот тест О (ASTO). Истиот е тест за одредување на степенот на прогресија или стагнирање на ревматоидните болести кои евентуално може да бидат последица и на стрептококна инфекција. ASTO е значаен и во случај да има некакво сомневање за ревматоидна грозница. Имено, некои патогени го стимулираат човековиот организам за создавање на антистрептолизин, а истиот е добар показател и за напредување на ревматоидниот артритис како болест. Добиените резултати покажуваат негативна вредност за ASTO при колаген индуциран RA. Титар над 1/200 се смета за реакција која што е позитивна. Ние имаме добиени помали вредности, значи негативни резултати за овој параметар кај машките и женските животни кои се артрозни и во двата периоди на триесетиот и шеесетиот ден, со негативни вредности и кај контролните групи. Ова сугерира на можен латентен период од развојот на болеста, но исто така може организмот да е стимулиран за создавање на

антитела, но имунолошкиот одбрамбен систем на самиот организам да го спречил развојот на болеста, а можно е и експерименталниот третман во овој временски интервал да е краток. При подолг период на експериментален третман пожелно е тестот за ASTO да се повторува на секои 2 до 4 недели. Ако вредноста на ASTO расте, значи дека болеста е притаена, активна и прогресира, ако пак се намалува значи дека болеста се смирува и стагнира. Важен момент е дека литературните податоци наведуваат и постоење на негативни вредности на аликутите, но тоа воопшто не исклучува постоење на болеста.

Резултатите добиени од нашите испитувања за RA споредени со литературните податоците покажуваат коинциденција во делот на анализите за ASTO. Добиените резултати од повеќе автори се во корелација со нашите анализи за овој параметар кај глупците како модел, но и во корелација со истражувањата кај морското прасе. Резултатите добиени кај овие автори бележат зголемени вредности кај постарите единки, што се поврзува со процесот на стареење, а други автори нотираат и докази за промени во самиот процес на имунолошка одбрана на организмот при стареењето.

5. ЗАКЛУЧОЦИ

Од истражувањата кои ги спроведовме во нашата студија заклучивме дека вредностите за ASTO кај сите групи на експериментални животни и кај двата пола на третирани единки, но и кај контролната група се со негативни вредности, иако имаше и два изолирани случаи со зголемени вредности за ASTO. Генерално овие испитувања кои се вршат на анималните модели даваат добра паралела и слика со RA кај човечката популација каде дијагнозата на истите бара интердисциплинарен пристап.

ЛИТЕРАТУРА

- 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. (2001). 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.
- Brooks, P.M., & Day, R.O. (1991). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs-differences and similarities. New Engl. J. Med. 324:1716-1722.
- Cekada, N., Sestan, M., Hosticka, E., Novoselec, M., Batnizic Varga, M., Padjen, I., Frkovic, M., Kifer, D., Anic, B., & Batinic, D. (2018). Predicting organ damage in patients with childhood-onset systemic lupus erythematosus: a retrospective study over the last 25 years // Pediatric Rheumatology. 16 (Suppl 2): 52. Lisabon, Portugal, 2018. str. P135-P135.
- Cooke, A., Zacccone, 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.
- Ebringer, A., & Rashid, T. (2006). Rheumatoid arthritis is an autoimmune disease triggered by Proteus urinary tract infection. Clinical & Development Immunology. 13 (1): 41-48.
- Honda, K., & Littman, D.R. (2018). "The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease," *Nature*, vol. 535, no. 7610, pp. 75–84.
- Joosten, L.A.B., Helsen, M.M.A., van de Loo, F.A.J., & van denBerg, W.B. (1994). Amelioration of established type II collagen induced arthritis (CIA) with anti-IL-1. Agents Actions. 41:C174-C176.
- Joosten, L.A.B., Helsen, M.M.A., van de Loo, F.A.J., & van den Berg, W.B. (1996). Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. Arthritis Rheum. 39:797-809.
- 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. *FEBS 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.
- Ozen, S., Marks, S.D., Brogan, P., Groot, N., Graeff, N. De., & Avcin, T. (2019). European consensus-based recommendations for diagnosis and treatment of immunoglobulin A vasculitis — the SHARE initiative. *Rheumatol.* 2019;(March):1607–16.
- Pullerits, R., Schierbeck, H., Uibo, K., Liivamägi, H., Tarraste, S., & Talvik, T. (2017). High mobility group box protein 1 - A prognostic marker for structural joint damage in 10- year follow up of patients with juvenile idiopathic arthritis. *Semin Arthritis Rheum.* 2017; 46(4): 444-450.
- Terato, K., Hashida, R., Miyamoto, K., Morimoto, T., Kata, Y., Kobayashi, S., Tajima, T., Otake, S., Horni, P., & Nagai, Y. (1982). Histological, immunological and biochemical studies on type II collagen arthritis in rats. *Biomed. Res.* 3:495-523.
- Wang, L.H., Wu, M.H., Chen, P.C., Su, C.M., Xu, G., & Huang C.C. (2017). Prognostic significance of high-mobility group box protein 1 genetic polymorphisms in rheumatoid arthritis disease outcome. *Int J Med Sci.* 14(13):1382–8.
- Van Vollenhoven, R.F., Soriano, A., McCarthy, P.E., Schwartz, R.L., Garbrecht, F.C., Thorbecke, G.J., & Siskind, G.W. (1988). The role of immunity to cartilage proteoglycan in adjuvant arthritis. *J. Immunol.* 141(4):1168-1173.
- 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.
- Xu, K., Ren, X., Ju, B., Aihaiti, Y., Cai, Y., & Zhang, Y. (2020). Clinical markers combined with HMGB1 polymorphisms to predict efficacy of conventional DMARDs in rheumatoid arthritis patients. *Clin Immunol.* 221:108592.
- 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.