

## CORELATION BETWEEN COLAGEN INDUCED ARTHRITIS AND RF IN WHITE LABORATORY RAT

Mire Spasov

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

**Abstract:** Rheumatoid arthritis is a systemic disease, which in clinical practice is defined as a long-term illness that can withdraw at certain times, but persists and reappears. There is no cure for RA, and the goal is to keep the disease under control, alleviate symptoms, and lead a more productive life for patients. A serious problem is pain in the small joints of the hands where redness, swelling, limited mobility and increased temperature in the affected joints are the main symptoms. If the disease is in a more severe form, fever and general weakness appears. Particularly problematic are rheumatic heart diseases of an acute or chronic nature, such as rheumatic fever, which causes lesions of the heart valves, insufficiency and inflammation of the myocardium and pericardium. RA is mainly defined as an autoimmune disease, in addition to which three quarters of RA patients have autoimmune problems. It is characteristic that in the polyarticular form of juvenile idiopathic arthritis the value of RF is constantly high. Several authors state that the presence of RF is not exclusively specific to RA. RFs are autoantibodies, mainly of the IgM type that are directed against the Fc fragments of IgG. As an animal model in the tests, we used white laboratory rats, of both sexes, aged about two months, kept in standard conditions with food and water regime ad libitum and the ambient temperature of stay 20 °C, with a light regime of 12:12 hours. The animals were divided into four groups: control of 20 males, control of 20 females, collagen type-II treated male group of 30 animals and treated female group of 30 animals. We applied the prepared colleague according to a standardized protocol in the back right wrist of the rats. A 0.1 ml collagen solution was given with 0.02 ml saline. We took 1 ml of blood for analysis, and after it coagulated, we centrifuged the tubes and decanted the serum into eppendorf tubes for analysis. The principle of the method is based on the RF-latex immune reaction between the RF and the analog antibodies with which the latex particles are coated, between which there is a reaction and the creation of a precipitate. Analyzes were performed on the Mini NEF TM Duinding Fait instrument. The results obtained according to the method used to determine the value for RF show that in all groups, in both genders and in both test periods, there are negative values for RF. According to this analysis method, any result obtained with a value lower than 30,380 IU/ml is taken as a negative value. We performed RF analyzes on the 30th and 60th day of RA induction, which is hypothetically likely to be a short period for the development of a more severe systemic illness, which is why there are no increased values for RF.

**Keywords:** RA, CIA, RF, immune system, rat.

## КОРЕЛАЦИЈА ПОМЕЃУ КОЛАГЕН ИНДУЦИРАНИОТ АРТРИТИС И RF КАЈ БЕЛИОТ ЛАБОРАТОРИСКИ СТАОРЕЦ

Мире Спасов

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

**Резиме:** Ревматоидниот артритис е системско заболување кое во клиничката пракса се дефинира како долготрајна болест која во одредени моменти може да се повлече, но притаено перзистира и пак се појавува. Лек за RA не постои а целта е држење на болеста под контрола, ублажување на симптомите и водење на што попродуктивен живот на пациентите. Сериозен проблем е болката во малите зглобови на рацете каде црвенилото, отокот, ограничената подвижност и покачената температура во зафатените зглобови се главните симптоми. Доколку болеста е во потешка форма се појавува треска и општа слабост. Посебно проблематични се ревматските срцеви болести од акутна или хронична природа како ревматската треска, која предизвикува лезии на срцевите залистоци, инсуфициенција и воспаление на миокардот и перикардот. Главно RA се дефинира како автоимуно заболување, во прилог на што оди и податокот дека три четвртини од пациентите со RA имаат автоимуни проблеми. Карактеристично е дека кај полиартикуларниот облик на јувенилниот идиопатски артритис вредноста на RF е постојано висока. Повеќе автори наведуваат дека присуството на RF не е исклучиво специфично само за RA. RF се автоантитела, главно од тип на IgM кои се насочени против Fc фрагментите на IgG. Како анимален модел во испитувањата користевме бели

лабораториски стаорци, од двата пола на возраст околу два месеци, чувани во стандардни услови со режим на храна и вода *ad libitum* и амбиенталната температура на престој 20 °C, со светлосен режим 12:12 часа. Животните беа поделени во четири групи и тоа: контрола од 20 машки, контрола од 20 женски, третирани со колаген тип-II машка група од 30 животни и третирана женска група од 30 животни. Приготвениот колеген по стандардизиран протокол го аплициравме во задниот десен зглоб на стаорците. Беше даден 0,1 ml раствор од колаген со 0,02 ml физиолошки раствор. Крв за анализа земавме во количина од 1ml, а откако таа ќе коагулираше, ги центрифугиравме епруветите и серумот го декантиравме во епандорф епрувети за анализа. Принципот на методата се базира на RF-латекс имунолошката реакција помеѓу RF и аналогните антителиа со кои се обложени латекс партикулите, помеѓу кои доаѓа до реакција и создавање на преципитат. Анализите се вршеа на Mini NEF TM Duinding Fait апаратот. Добиените резултати по методата со која се одредувше вредноста за RF покажуваат дека кај сите групи, кај двата пола и кај двата периоди на испитување има негативни вредности за RF. Според оваа метода за анализа како негативна вредност се зема секој добиен резултат кој што е со вредност која е помала од 30.380 IU/ml. Анализите за RF ги вршевме на триесетиот и шеесетиот ден од индукцијата на RA, што хипотетички веројатно е краток период за развивање на потешко системско заболување, поради што и нема зголемени вредности за RF.

**Клучни зборови:** RA, CIA, RF, имунолошки систем, стаорец.

## 1. ВОВЕД

Ревматоидниот артритис е системско заболување кое во клиничката пракса се дефинира како долготрајна болест која во одредени моменти може и да се повлече, но сепак и покрај тоа притаено перзистира и пак се појавува. Лек за RA не постои, а единствено решение е ублажувањето на симптомите, држење на болеста под контрола и водење на што попродуктивен, поздрав и поквалитетен живот на пациентите. Еден од посериозните проблеми е болката и абеењето на малите зглобови на рацете кое секогаш е симетрично, притоа црвенилото, отокот, ограничената подвижност и покачената температура во зафатените зглобови се главните симптоми. Доколку болеста е во потешка форма се појавува треска и општа слабост. Посебно проблематични се ревматските срцеви болести од акутна или хронична природа како ревматската треска, каде истата предизвикува лезии на срцевите залистоци, инсуфициенција или стеноза, воспаление на миокардот и перикардот со насобирање на течност во перикардот. Се појавуваат и белодробни проблеми како плеврит, инфилтрација и формирање на нодулуси. Може да се појави и анемија, потоа проблеми со ГИТ, ерозија на коските со остеопороза, деструкција на 'рскавицата, промени во бубрезите, Сјогренов синдром, васкулит како болеста на Кавасаки, грануломатозата на Вегенер, пурпурата на Хенох-Шенлајн, Фелтиев синдром и други компликации кои зависат од возраста, здравствената кондицијата на организмот, стадиумот на болеста и нејзината прогресија и инвазивност. Генерално кажано RA се дефинира како автоимуно заболување, во прилог на што оди и податокот дека три четвртини од пациентите со RA имаат автоимуни проблеми и сите истражувања во дијагностиката, но и примената на имуномодулациската терапија водат во тој правец. Литературните податоци наведуваат дека со стареењето на организмот инциденцата на RA линеарно се зголемува со возраста, особено после шестата деценија од животот и има понеповолна прогноза. Свкупно ова се доведува во корелација со функционално физиолошкото трошење на организмот, почестите системски здравствени нарушувања, што се заедно резултира со поволна подлога за перзистирањето на болеста.

Библиографските податоци бележат дека 85% од пациентите со RA имаат и позитивен RF, но постојат и податоци дека RF е позитивен и кај околу 50% од пациентите кои се над шеесет годишна возраст. Исто така, се наведува дека RF е позитивен и кај хепатитис, системски еритематозен лупус, хронични инфективни болести, полиартритис, но и кај други болести кои не се системски. Карактеристично е дека кај полиартикуларниот облик на јувенилниот идиопатски артритис вредноста на RF е постојано висока. Повеќе автори наведуваат дека присуството на RF не е исклучиво специфично само за RA, што значи дека предиктивната вредност на RF е слаба. RF се автоантитела, главно од тип на IgM кои се насочени против Fc фрагментите на IgG.

## 2. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

При истражувањето се користеа бели Wistar стаорци, од двата пола на возраст околу два месеци, чувани во стандардни услови за лабораториски испитувања, со режим на храна и вода *ad libitum*, на амбиенталната температура од 20 °C и светлосен режим 12:12 часа.

Жвотните беа поделени во четири групи:

- контрола, 20 машки.
- контрола, 20 женски.

- третирана со колаген тип-II машка група, 30 животни.

- третирана со колаген тип-II женска група, 30 животни.

Припремениот колаген по стандардизиран протокол за работа го аплициравме во десниот заден зглоб на секое животно, при што користевме само прочистен колаген, бидејќи квалитетот на колагенот и емулзијата влијаат врз фреквенцијата на артритогенезата. Ињектиравме 0,1 ml раствор од колаген со 0,02 ml физиолошки раствор. Крвта за анализа од 1ml кај првиот термин на триесетиот ден од имунизацијата ја земавме од опашката на животните, а на крајот, односно шеесетиот ден по имунизацијата животните беа жртвувани, при што земавме крв за анализи. После земањето на крвта кога таа ќе коагулираше, ги центрифугиравме епруветите, а серумот го декантиравме во епендорфи за анализа. Принципот на анализата за определување на RF се базира на RF-латекс имунолошката реакција помеѓу RF и аналогните антители со кои се обложени латекс партикулите, помеѓу кои доаѓа до реакција и создавање на преципитат. Анализите се вршеа на Mini NEF TM Duinding Fait апаратот во референтна лабораторија во Скопје, со имунотурбидиметриски есеј на 583nm.

### 3. РЕЗУЛТАТИ

Резултатите од истражувањата врз Wistar стаорците за вредноста на RF после третирањето на животните со колаген од типот II и индуцирање на ревматоиден артритис, кај двата пола и кај двата периоди на експериментот, на триесетиот и шеесетиот ден се прикажани во табелите број 1 и 2.

*Табела бр. 1: Резултати за RF кај машки стаорци*

Резултати за RF кај машки групи		
Контролна	Артроза 30ти ден	Артроза 60ти ден
негативно (<30.380 IU/ml)	негативно (<30.380 IU/ml)	негативно (<30.380 IU/ml)

Од добиените вредности за машката група со методата по која се одредувше вредноста за RF се заклучува дека кај сите групи и кај двата периоди на испитување има негативни вредности за RF. Според методата за анализа како негативна вредност се зема секој добиен резултат кој што е со вредност помала од 30.380 IU/ml. За позитивна вредност се зема секој резултат кој е поголем од оваа вредност.

Резултатите за вредностите на RF кај женските животни се дадени во табелата број 2. Се забележува дека и кај овие групи вредностите за RF се негативни и кај контролната група и кај артрозните групи и во двата периоди на анализирање, односно на триесетиот и на шеесетиот ден од имунизацијата и индуцирањето на RA.

*Табела бр. 2: Резултати за RF кај женски стаорци*

Резултати за RF кај женски групи		
Контролна	Артроза 30ти ден	Артроза 60ти ден
негативно (<30.380 IU/ml)	негативно (<30.380 IU/ml)	негативно (<30.380 IU/ml)

### 4. ДИСКУСИЈА

Повеќе автори наведуваат дека RF не е специфичен само за RA, па затоа за да се постави конечна дијагноза потребно е да се извршат и други лабораториски тестови и иследувања. Сигурно е тоа дека високи титри на RF сугерираат на агресивна форма на болеста и обично е кај помладите пациенти, кои се серопозитивни со напредна фаза и хроничен тек на болеста, додека кај постарите пациенти кои имаат серонегативна форма на болеста без покачени титри за RF, или пак благо покачени, се забележуваат полесни симптоми. Пациентите со RA имаат оштетувања на целуларниот и на хуморалниот имунитет, а кај 80% од болните има и циркулирачки автоантитела. Збунувачки е податокот дека кај околу 5% од сосема здрави лица е пронајден RF. Карактеристично кај анималните модели за испитување на RA е дека RF е позитивен кај околу 75% од единките, се создава во синовијата на зглобовите, но сепак не е сигурен показател за постоење на болеста. RF се автоантитела претежно од IgM насочени против Fc фрагментите на IgG, при што може да создаваат имунолошки комплекси со нив, да се таложат во зглобовите и другите ткива доведувајќи до воспалување и лезии на ткивото.

Резултатите кои ние ги добивме за вредностите на RF како параметар при состојба на CIA кај сите групи на машки и женски единки и во двата испитувани термини, кај контролите и кај артрозните животни се негативни. Овие резултати се совпаѓаат и со некои автори кои наведуваат дека може да има и негативни вредности за RF и дека при RA немора секогаш вредноста за RF да е позитивна, а како објаснување се наведува користењето на протеините во одбрамбени цели при состојбата на пролонгирано перзистирање на RA, или пак, можно е да има најмалената синтеза на самите протеини како последица од лезиите на клетките и промена на градбата на внатрешниот дел од ткивото кај зглобовите и крвните садови. Во секој случај присуството на RF, иако секогаш не е специфичен за RA, има значајно место во прогнозата, текот и исходот на болеста. Во прилог на ова оди и податокот дека секогаш високите титри на RF сугерираат на потешко и попрогресивно заболување со потешка клиничка слика и екстра артикуларни манифестации, што упатува на заклучок дека станува збор за понапреднат стадиум на болеста со полоша прогноза. Анализите за RF ги вршевме на триесетиот и на шеесетиот ден после имунизацијата и индукцијата на RA. Ова хипотетички може да биде краток период за развивање на потешко системско заболување, поради што нема зголемени вредности за RF како параметар во првиот па и вториот месец од третманот веројатно поради краткиот временски период.

## 5. ЗАКЛУЧОЦИ

Од испитувањата за влијанието на колаген тип-II предизвиканиот RA кај белиот Wistar стаорец можеме да заклучиме дека има негативни вредности за RF кај машките и кај женските животни, кај двата периоди од истражувањето, односно на триесетиот и шеесетиот ден од постимунизацијата. Има поединечни нотирани единки со зголемена вредност за RF во споредба со контролата, но се без статистичка значајност.

## ЛИТЕРАТУРА

- Abdel Fattah, N.S.A., Hassan, H.E., Galal, Z.A. (2018). Antibodies to cyclic citrullinated peptides in patients with psoriatic arthritis. *Egypt J Dermatol Venereol*; 28: 13-23.
- Alenius, G.M., Berglin E., Dahlqvist, S.R. (2006). Antibodies against cyclic citrullinated peptide (CCP) in psoriatic patients with or without joint inflammation. *Ann Rheum Dis*; 65: 398- 400.
- 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 $\beta$  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.
- Cooke, A., Zaccane, 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 Immunolog.* 13 (1): 41-48.
- Girbal-Neuhausser, E., Durieux, J.J., Arnaud, M., et al. (2019). The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin auto-antibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro) filaggrin by deimination of arginine residues. *J Immunol*; 162: 585-594.
- Honda, K., & Littman, D.R. (2018). “The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease,” *Nature*, vol. 535, no. 7610, pp. 75–84.
- Huynh, D., Etzel, C., Cox, V., et al. (2013). SAT0268 Anti Citrullinated Peptide Antibody (ACPA) in Patients with Psoriatic Arthritis (PSA): Clinical Relevance. *Ann Rheum Dis* 2013; 72: A673 doi:10.1136/annrheumdis-2013-eular.
- 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. *Feab. J.* 32, 6174–6185. doi:10.1096/fj.201800425r.
- Korendowych, E., Owen, P., Ravindran, J., et al. (2019). The clinical and genetic associations of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in psoriatic arthritis. *Rheumatology (Oxford)*; 44: 1056-1060.
- Maeda, Y., & Takeda, K. (2019). “Host-microbiota interactions in rheumatoid arthritis,” *Experimental & Molecular Medicine*, vol. 51, no. 12, pp. 1–6.
- Nakamura, R.M. (2020). Progress in the use of biochemical and biological markers for evaluation of rheumatoid arthritis. *J Clin Lab Anal*; 14: 305-313.

- 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.
- Spadaro, A., Riccieri, V., Scivo, R., et al. (2017). Anti-cyclic citrullinated peptide antibody determination in synovial fluid of psoriatic arthritis. *Clin Exp Rheumatol*; 25: 599-604.
- Schellekens, G.A., Visser, H., de Jong, B.A., et al. (2021). The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum*; 43: 155- 163.
- Van Boekel, M.A.M., Vossenaar, E.R., van den Hoogen, F.H.J., van Venrooij, W.J. (2021). Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Res*; 4: 87-93.
- 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*, 8<sup>th</sup> 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.