
THE EFFECT OF CIA ON SERUM IgM VALUES IN LABORATORY WISTAR RATS OF BOTH SEXES

Mire Spasov

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

Abstract: Scientific knowledge still cannot specify the etiology of rheumatoid diseases, and the professional literature only mentions some of the risk factors. According to a number of authors, RA occurs as a result of a complex process of immune auto-aggression where the body's defense system recognizes certain transformed proteins in it as foreign and creates antibodies against them, initiating a rather complex process of immune auto-aggression and the creation of immune complexes. The process results in inflammation of the inner wall of the joints, during which the synovium hypertrophies, joint changes and destruction appear, vasculitis develops, subcutaneous nodules, skeletal muscle changes, weakened motor strength and possible changes to the heart, kidneys, lungs and nervous system. As an experimental model, we used two-month-old male and female white Wistar rats, kept in laboratory conditions with food and water ad libitum. The animals were divided into four groups; two controls with 20 male and female individuals and two groups with 30 treated male and female animals each. We applied the collagen prepared according to a defined protocol in the right back joint. 100 µl of collagen solution with 20 µl of physiological solution was applied. We took the blood for analysis from the tail of all individuals, and at the end of the research after sacrificing the animals. After coagulation of the blood, the test tubes were centrifuged, and the serum was decanted into monovets for analysis. The determination of IgM was performed using column chromatography and according to a prescribed operating procedure with Dimension RL Max, an apparatus from the Siemens product line. The immunoglobulin content at the end of the procedure is obtained according to the absorbance and the total volume of the eluate. The CIA values obtained for the male group show that there are changes in the level of serum IgM in animals that were treated compared to untreated, but these are without statistical significance. The values in the female experimental group show that CIA does not have an inhibitory effect on this immunoglobulin in the serum, and on the thirtieth day of treatment there is also an increase in the level of IgM, although this value is not statistically significant. Some authors state that even more than 80% of patients have a decrease in IgA and IgG, but an increase in IgM. Our obtained results coincide with these data and show a suppressive effect of RA on IgA and IgG, but not on the level of the serum value for IgM, where increased values without statistical significance are recorded. The conclusion of the research is that CIA has a teratogenic effect on treated male and female animals with an increase in IgM values, which are without statistical significance.

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

ЕФЕКТОТ НА CIA ВРЗ СЕРУМСКИТЕ ВРЕДНОСТИ НА IgM КАЈ ЛАБОРАТОРИСКИОТ WISTAR СТАОРЕЦ ОД ДВАТА ПОЛА

Мире Спасов

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

Резиме: Научните сознанија сеуште неможе да ја прецизираат етиологијата на ревматоидните болести, а стручната литература само ги наведува некои од ризик факторите. Според голем број на автори RA настанува како резултат на сложен процес на имунолошка автоагресија каде одбрамбениот систем на организмот одредени трансформирани протеини во истиот ги препознава како туѓи и против нив создава антитела, при што се иницира прилично сложен процес на имунолошка автоагресија и создавање на имунолошки комплекси. Процесот резултира со воспаление на внатрешниот ѕид на зглобовите, при што синовиумот хипертрофира, се појавуваат зглобни промени и разорувања, се развива васкулитис, поткожни јазли, промени во скелетната мускулатура, ослабена моторна сила и можни промени на срцето, бубрезите, белите дробови и нервниот систем. Како експериментален модел ние користевме машки и женски бели Wistar стаорци на возраст од два месеци, чувани во лабораториски услови со режим на храна и вода по желба. Животните беа поделени во четири групи; две контроли со по 20 машки и женски единки и две групи со по 30 третирани машки и женски животни. Колагенот подготвен по дефиниран протокол, го аплициравме во десниот заден зглоб. Беше аплицирано по 100 µl раствор од колаген со 20 µl на физиолошки раствор.

Крвта за анализи кај сите единки ја земавме од опашката, а на крајот од истражувањето по жртвување на животните. После коагулирањето на крвта епруветите ги центрифугиравме, а серумот го декантиравме во моновети за анализа. Определувањето на IgM го вршевме со помош на хроматографија во колона и по пропишана процедура за работа со Dimension RL Max, апарат од производната линија на Siemens. Имуноглобулинската содржина на крајот од постапката се добива според апсорбацијата и вкупниот волуменот на елуатот. Добиените вредности од CIA за машката група покажуваат дека има промени во нивото на серумскиот IgM кај животните кои беа третирани во споредба со нетретирани, но истите се без статистичка важност. Вредностите кај женската експериментална група покажуваат дека CIA нема инхибирачко влијание врз овој имуноглобулин во серумот, а на триесетиот ден од третирањето има и покачување на нивото на IgM, иако таа вредност не е статистички важна. Некои автори наведуваат дека дури кај повеќе од 80% од заболените има намалување на IgA и IgG, но зголемување на IgM. Нашите добиени резултати се совпаѓаат со овие податоци и покажуваат супресорен ефект на RA врз IgA и IgG, но не и врз нивото на серумската вредност за IgM, каде се бележат и зголемени вредности без статистичка значајност. Заклучокот од истражувањето е дека CIA има тератогено влијание врз третирани животни од машки и женски пол со зголемување на вредностите за IgM, кои се без статистичка важност.

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

1. ВОВЕД

Науката сеуште неможе да ја прецизира етиологијата на ревматоидните болести. Литературните податоци само ги наведуваат ризик факторите и можните причинители за болеста, но истите ги дефинира без сигурност. Според најголем број на автори ревматоидниот артритис настанува како резултат на сложен процес на имунолошка автоагресија каде одбрамбениот систем на организмот одредени трансформирани протеини во истиот не ги препознава како свои и против нив создава антитела, односно автоантитела. Притоа настанува комплициран процес на имунолошки одговор и напад на сопствениот организам кој што резултира со воспаление и создавање на панус пролиферативно ткиво во зглобната чашка, а севкупно резултира со системско воспалување. Литературните податоци со сигурност прецизираат дека ова е автоимун заболување. Не постои лек за ревматоидниот артритис, а терапијата главно се состои во ублажување на болката, подобрување на работната способност на болните, подобрување на квалитетот на животот и продолжување на работниот век. Имуноглобулините имаат важна улога при овој процес на имунолошка автоагресија. Предмет на интерес во трудот е флукуацијата на нивото на IgM при ревматоиден артритис.

2. МАТРИЈАЛ И МЕТОДИ

Експериментален модел за работа беа Wistar стаорци, единки со возраст од два месеци, машки и женски, чувани во услови за експериментални иследувања, групирани по групи:

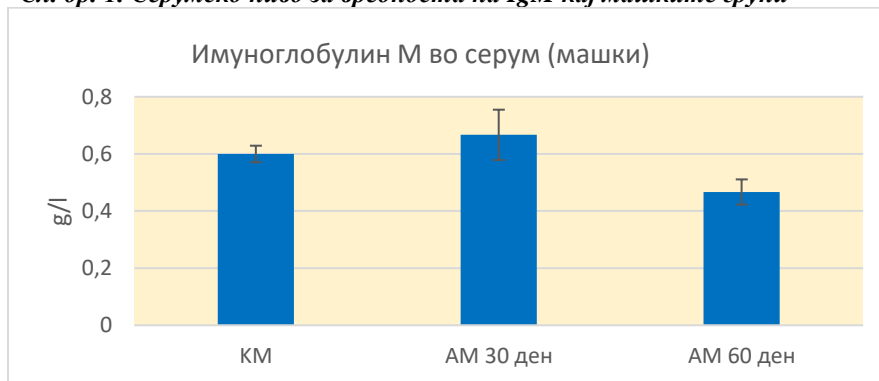
- контрола од 20 машки животни.
- контрола од 20 женски животни.
- третирана машка група со колаген тип-II, 30 животни.
- третирана женска група со колаген тип-II, 30 животни.

Колагенот го подготвувавме по стандарден и дефиниран протокол за работа, а го аплициравме во десниот зглоб од задната нога на секое животно. Користевме само прочистен колаген, од причини да квалитетот на емулзијата има влијание врз степенот на артритогенезата. Боцкавме 100 µl раствор на колагенот заедно со 20 µl на физиолошки раствор. Крвта која ја користевме за анализа, во количина од 1ml, на 30иот ден после имунизацијата беше земена од опашката а на 60иот ден после имунизацијата истите беа жртвувани, кога и земавме крв за анализи. Земената крв откако ќе коагулираше, епруветите ги центрифугиравме, а серумот го декантиравме во моновети за анализа. Определувањето на IgM беше со помош на хроматографија во колона и дефинирана процедура за работа на апаратот Dimension RL Max од производителот Simens.

3. РЕЗУЛТАТИ

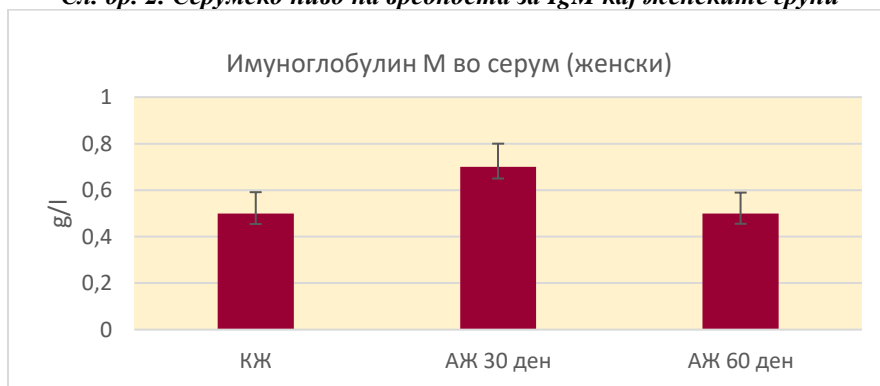
Добиените резултати за IgM се прикажани на граfiците 1 и 2.

Сл. бр. 1. Серумско ниво за вредноста на IgM кај машките групи



Графикот од првата слика на триесетиот ден за машката група покажува дека има зголемување на серумската вредност за имуноглобулинот М, иако таа е надвор од границите на статистичка важност. ($p=0.900$). CIA кај машките на шеесетиот ден, споредбено со претходниот период на триесетиот ден, нема значајно намалување на содржината на имуноглобулинот М (АМ 30ти ден : АМ 60ти ден, $p<0.469$). Ако во овој период, на шеесетиот ден се компарираат контролната и артрозната група (КМ : АМ 60ти ден, $p=0.667$), гледаме дека истата е без статистичка важност.

Сл. бр. 2. Серумско ниво на вредноста за IgM кај женските групи



Графикот на втората слика покажува дека женските артрозни стаорци на триесетиот ден после CIA имаат зголемено ниво од серумската концентрација на IgM, кое е на зголемено ниво споредено со контролата, а истата вредност е без статистичка значајност ($p=0.3699$). Крајниот период, односно шеесетиот ден после третирањето, покажува намалување во вредноста за имуноглобулинот М и вредност која е блиску до контролната група (КЖ:АЖ 60ти д. n.s., $p=1.000$). Со споредување на групите артрозни животни од женски пол на триесетиот и шеесетиот ден после CIA се забележува дека на шеесетиот ден има значајно помало ниво на IgM во споредба со триесетиот ден (АЖ 30ти ден:АЖ 60ти д. n.s., $p=0.301$).

Со споредување на вредностите од добиените анализа кај двата пола на експерименталните групи се заклучува дека CIA доведува до зголемување на серумското ниво од IgM кај двата пола и на средината и на крајот од експерименталниот период, иако вредностите не се со статистичка важност ($p=0.900$; и $p=0.369$). Крајот на експерименталниот период, односно шеесетиот ден дава незначајно намалување на вредноста за IgM споредено со артрозните групи од првиот експериментален период на триесетиот ден. Добиените вредности за третираната машка група животни на шеесетиот ден покажуваат разлики во однос на контролата, но без статистичка важност. Женската група не бележи ваква разлика.

4. ДИСКУСИЈА

Резултатите кои ги добивме за влијанието на CIA врз IgM кај лабораторискиот стаорец од сојот Wistar се дадени на графиконите 1 и 2, соодветно за машките и женските животни. Промени во вредностите кои се статистички неважни се бележат кај третираните машки животни. Ако ги споредиме резултатите во проценти се гледа дека на триесетиот ден од имунизацијата за 11 проценти е зголемена вредноста во

споредба со контролата, а за 22 проценти параметарот е помал на крајот од експериментот во однос на контролата. Овие две артрозни машки групи во двата термини помеѓу себе се ралзикуваат за 30 проценти. Резултатите од CIA врз IgM кај женските се претставени на вториот графикон кој покажува отсуство на супримирачки ефект врз серумскиот IgM, а на средината од експерименталниот период има и покачени вредности, но без статистичка важност. Овие вредности споредени се разликуваат за четерисет проценти. На шесетиот ден од третманот се нотира враќање на вредноста блиску до контролата, односно во овој дел од експерименталниот период нема процентуална разлика во споредба со контролата кај женскиот пол. Групите од женски пол споредени меѓусебно во двата експериментални периоди бележат разлика од 29 проценти во нивото на овој имуноглобулин. Библиографските податоци наведуваат дека тоа е последица на зголемениот доток на крв, оштетување на ткивото и тенденција за поправка на штетата. Истите потврдуваат дека има зголемено присуство серумски IgM речиси кај сите единки. Овие антители се познати како RF. Тоа може да биде едно од објаснувањата зошто пациентите со RA имаат проблем со клеточниот имунитет. Механизмот за настанувањето на процесот докрај не е јасен, но некои автори наведуваат дека кај дури 80 проценти од болните има намалени IgA и IgG, а зголемени IgM. Нашите резултати се соодветни на овие литературни податоци.

5. ЗАКЛУЧОЦИ

Извршените анализи за влијанието на CIA врз експерименталните лабораториски стаорци од сојот Wistar во двата експериментални периоди по имунизацијата доведуваат до заклучок дека кај двата пола на животни има статистички незначјно зголемување на вредностите за серумското ниво на IgM на триесетиот ден после третманот, додека на шесетиот ден има враќање на вредноста блиску до онаа кај контролата. Заклучок е дека CIA има тератогено влијание врз третираните животни и зголемување на вредностите за IgM кои не се статистички значјни.

ЛИТЕРАТУРА

- Arnett, F.C. (2021). The American Rheumatism Association 1987 Revised Criteria for the Classification of Rheumatoid Arthritis *Rheum* 31:315.
- Bocanegra, T. (1994). Mycobacterial, fungal and parasitic arthritides. 4.5.1-5.12. In: Klippel, J.H., et al. *Rheumatology*, Mosby. London.
- Brooks, P.M., Day, R.O. (1991). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs-differences and similarities. *New Engl. J. Med.* 324:1716-1272.
- 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.
- 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.
- 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.
- Ishii, K.J., Uematsu, S., Akira, S. (2006). Toll gates for future immunotherapy (Review). *Current Pharmaceutical Design.* 12(32): 4135-4142.
- 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. *Feaeb. J.* 32, 6174–6185. doi:10.1096/fj.201800425r.
- 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.
- 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.
- 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*, 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.
- Weyand, C.M., Goronzy, J.J. (1997). Molecular basis of rheumatoid arthritis. *J. Mol. Med.* 75: 772-85.
- 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.
- Zampieri, S., Ghirardello, A., Laccarino, L., Briani, C., Sarzi-Puttini, P., Atzeni, F., Arienti, S., Todesco, S., Doria, A. (2004). Polymyositis-dermatomyositis. *Biochem. J.*, 2:4-13.