

THE EFFECT OF CIA ON SERUM IgA LEVELS IN WISTAR RATS

Mire Spasov

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

Abstract: Rheumatoid arthritis is a chronic, evolving inflammatory disease with joint destruction and systemic manifestations, which begins gradually, and usually first affects the metatarsophalangeal and radiocarpal joints. The body's immune system creates antibodies to defend against bacteria, viruses and other microorganisms, while in autoimmune diseases the immune system reacts with its antibodies against the cells of its own tissue. The etiology of RA has a genetic and epigenetic history. It is assumed that some genetic factors, infectious diseases, and mostly viral infections are the reason for the appearance of the disease. It has been proven that it is about activating the patient's immune system in such a way that the own cells are recognized as foreign, which results in an autoimmune response. The process begins when lymphocytes as immune cells are activated and produce cytokines as chemical messengers. The subject of our interest in this study was to experimentally monitor the level of IgA after RA induced by collagen type-II in two experimental periods of treatment, at one and two months, compared to the control groups of both sexes of experimental animals. For this purpose, we used eight-week-old Wistar rats, raised in standard conditions at a temperature of 20°C, with food and water - ad libitum. They were divided into four groups; group of control males, control females, treated males and treated females. We applied the prepared collagen according to a standard protocol and purified form in an amount of 100 µl collagen solution and 20 µl physiological solution in the right hind joint of each treated animal. The examination of the IgA level was performed in both periods after immunization by the method of column chromatography on the Dimension RL Max device from the manufacturer Siemens, according to a defined work procedure. We finally calculated the content of immunoglobulins according to the obtained absorbance at 280 nm and the total volume of the eluate. The obtained values for IgA show that regardless of gender in the treated experimental groups there are no significant statistical changes for this parameter, while, for example, in the treated male group on the thirtieth and on the sixtieth day of the experiment CIA has almost no effect on the level of IgA in comparison with the control group of male animals. A result that stands out is the increase in the level of IgA on the 60th day of treatment in the female arthrosis group, compared to the control group by 30%. The obtained results lead to the conclusion that CIA type-II has the effect of a statistically insignificant decrease in the level of IgA in the serum at the end of the experimental period, i.e. on the 60th day in arthritic male animals compared to the control, while in the same period in female animals non-significant increase in IgA value compared to the control group.

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

ЕФЕКТОТ НА СИА ВРЗ НИВОТО НА IgA ВО СЕРУМОТ КАЈ WISTAR СТАОРЦИ

Мире Спасов

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

Резиме: Ревматоидниот артритис е хронична, еволутивна инфламаторна болест со зглобна деструкција и системски манифестации, која започнува постепено, а најчесто прво ги зафаќа метатарзофалангеалните и радиокарпалните зглобови. Имунолошкиот систем на организмот создава антителиа за одбрана од бактерии, вируси и други микроорганизми, додека при автоимуните заболувања имунолошкиот систем реагира со своите антителиа против клетките на сопственото ткиво. Етиологијата на RA е со генетска и епигенетска историја. Се претпоставува дека некои генетски фактори, заразни заболувања, а најчесто вирусни инфекции се причина за појавата на болеста. Докажано е дека станува збор за активирање на имунолошкиот систем на пациентот на тој начин што сопствените клетки се препознаваат како туѓи, што резултира со автоимун одговор. Процесот почнува кога лимфоцитите како имунолошки клетки се активираат и продуцираат цитокини како хемиски гласници. Предмет на наш интерес во оваа студија беше експериментално да се следи нивото на IgA после индуциран RA со колаген тип-II во два експериментални периоди од третманот, на еден и два месеци, споредени со контролните групи на двата пола од експериментални животни. За таа цел користевме Wistar стаорци на возраст од осум недели, одгледувани во стандардни услови на температура од 20°C, со режим на храна и вода - ad libitum. Истите беа поделени на четири групи; група

контролни машки, контролни женски, третирани машки и третирани женски. Подготвениот колаген по стандарден протокол и прочистена форма во количина од 100 μ раствор на колагенот и 20 μ l физиолошки раствор го аплициравме во задниот десен зглоб од секое третирано животно. Испитувањето на нивото на IgA се вршеше во двата периоди после имунизацијата со методата на хроматографија во колона на апаратот Dimension RL Max од производителот Siemens, по дефинирана постапка за работа. Содржината на имуноглобулините на крајот ја пресметувавме според добиената апсорбација на 280 nm и вкупниот волумен на елуатот. Добиените вредности за IgA покажуваат дека без разлика на полот кај третираните експериментални групи нема значајни статистички промени за овој параметар при што, на пример, кај третираната машка група на триесетиот и на шеесетиот ден од експериментот CIA е скоро без ефект врз нивото на IgA во споредба со контролната група на машки животни. Резултат кој се издвојува е зголемувањето на нивото на IgA на шеесетиот ден од третманот кај женската артروزна група, во споредба со контролната група за 30%. Добиените резултати наведуваат на заклучок дека CIA тип-II има влијание за статистички незначајно намалување на нивото на IgA во серумот на крајот од експерименталниот период, односно на шеесетиот ден кај артروزните машки животни во споредба со контролата, додека во истиот период кај женските животни се бележи несигнификантно зголемување на вредноста за IgA во споредба со контролната група.

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

1. ВОВЕД

Ревматоидниот артритис (RA) е автоимуна, прогресивна инфламаторна болест со зглобна деструкција и системска зафатеност. При RA создадените антитела го напаѓаат синовиумот, односно ткивото кое ги обвиткува зглобовите и ја создава синовијалната течност, при што настанува воспалителен процес како во зглобот, така и околу него. Најчесто се зафатени малите зглобови на палците од рацете и нозете, но може да биде зафатен и било кој друг зглоб на телото. Кај некои луѓе може да бидат зафатени мал број на зглобови, а кај други многу повеќе и најчесто симетрично. Една од потешките форми на болеста е јувенилниот идиопатски артритис кој се јавува кај деца помлади од шеснаесет години а најчесто од предучилишната возраст. Факторите за појавата на болеста се генетски и епигенетски. Се претпоставува дека некои генетски фактори, заразни заболувања, најчесто вирусни се иницијацијата за ова заболување. Основата на јувенилниот идиопатски артритис најверојатно е со автоимун механизам на развој, но досега не се воспоставени сите патофизиолошки механизми кои водат до појавата на болеста. Несомнено е дека станува збор за активирање на имунолошкиот систем на пациентот на тој начин што сопствените клетки почнуваат да се препознаваат како туѓи што резултира со автоимуна реакција. Процесот почнува кога лимфоцитите се активираат и во заболените области се појавуваат цитокини како хемиски гласници. Имуноглобулините во овој процес играат важна улога. Конкретно во овој труд предмет на наш интерес беше експериментално да се следи нивото на IgA при состојба на индуциран RA со колаген тип-II во два експериментални периоди од третманот, споредбено со контролните групи на животни од двата пола.

2. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

Како експериментален модел користевме Wistar стаорци од двата пола, на возраст од осум недели, чувани во стандардни лабораториски услови, со храна и вода по желба.

Истите беа поделени во групи;

- 20 контролни машки,
- 20 контролни женски,
- 30 машки третирани,
- 30 женски третирани.

Колагенот беше подготвен по стандарден протокол, во прочистена форма и аплициран во десниот зглоб на задната нога кај сите животни освен контролните. беше боцкано 100 μ l раствор од колагенот со 20 μ l физиолошки раствор. Во првиот термин од истражувањето крвта за анализа ја земавме од опашката на животните, а после 60иот ден од имунизацијата тие беа жртвувани, кога и земавме крв за анализите. Коагулираната крв се центрифугираше а серумот се декантираше во моновети. Определувањето на IgA беше со хроматографија во колона по дефинирана постапка за работа на апаратот Dimension RL Max. Содржината на имуноглобулините на крајот се пресметуваше според добиената апсорбација и волуменот на елуатот.

3. РЕЗУЛТАТИ

Резултати за IgA од двата пола се прикажани на првиот и вториот график.

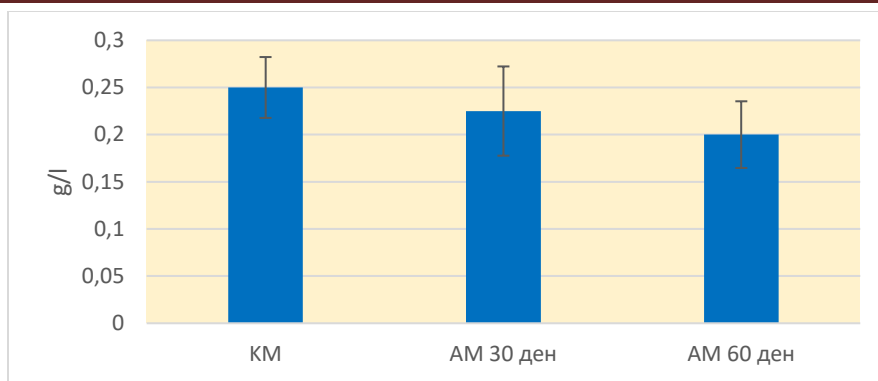


График 1. Серумска вредност за IgA кај машките

Кај машката артروزна група на триесетиот ден IgA е со пониско ниво споредено со контролата, со вредности кои немаат статистичка важност (n.s., $p=0.972$). Ова се забележува и на шеесетиот ден од третманот (n.s., $p=0.894$). Добиените вредности од резултатите во овие два експериментални периоди споредени помеѓу себе даваат незначајна статистичка разлика ($p=0.972$).

Резултатите за серумските вредности на IgA добиени кај женските, после CIA на триесетиот ден во однос на контролата немаат никакви промени ($p=1.000$), при што се добиени исти вредности или вредности многу блиски со контролата.

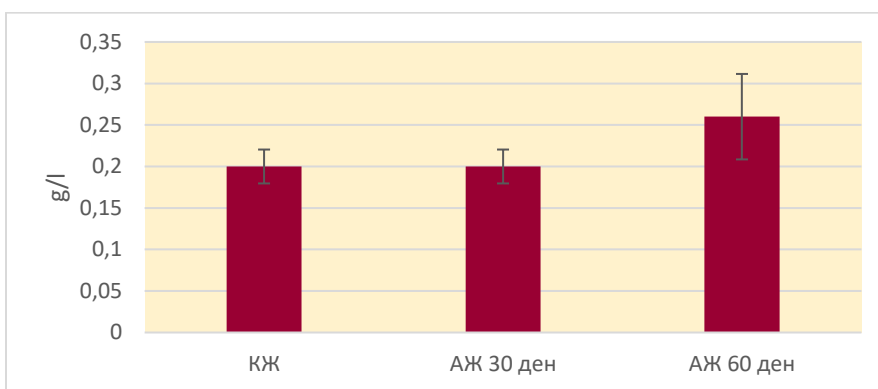


График 2. Серумска вредност за IgA кај женските

На шеесетиот ден од третманот се забележува не сигнификантно зголемување во однос на контролната група ($p=0.842$). Споредени помеѓу себе вредностите од двата експериментални периоди за артروزната женска група даваат разлика без статистичка значајност ($p=0.842$).

Ако вредностите за IgA се споредат помеѓу половите се гледа перманентно намалување на вредноста за IgA кај машките како на триесетиот, така и на шеесетиот ден, а кај женските има идентична или приближна вредност за IgA со контролата на триесетиот ден ($p=1.000$), а на шеесетиот има несигнификантно зголемување на вредноста, споредена со триесетиот ден и со контролата ($p=0.842$).

4. ДИСКУСИЈА

Со цел да се види каков ефект предизвикува CIA врз имунолошкиот статус кај експерименталната група на животни, вршење испитување и на некои имуноглобулини, меѓу кои и на IgA. Каков е ефектот врз овој параметар кај машките и женските експериментални животни се гледа од графичките прикази број 1 и 2. Добиените вредности за IgA покажуваат дека без разлика на полот кај третираните експериментални групи нема значајни статистички промени за овој параметар во однос на контролата, на пример кај третираната машка група споредени првиот и вториот период од експериментот CIA е скоро без ефект врз нивото на IgA во однос на контролна група (30ти ден, $p= n.s$; 60ти ден, $p= n.s$). Вредноста на овој параметар во споредба со контролата отстапува за 10% во првиот експериментален период и за 20% во вториот период после имунизацијата со колаген. Ова значи дека не е во доменот на статистичка важност. Резултатите за IgA кај двете групи женски експериментални животни се гледаат на вториот график. Од истиот се забележува дека

кај артрозните животни од женски пол ефектот од третманот со колаген тип-II, на триесетиот ден од постимунизацијата е со вредност иста или блиска до контролата, но има покачување на нивото на IgA на шеесетиот ден (30ти ден, $p=1$; 60ти ден, $p>0.05$). Ако добиените резултати се прикажат во проценти, тогаш артрозните женски единки на шеесетиот ден споредено со контролната бележат 30% повисока вредност на серумскиот IgA, но сепак со вредноста за $p>0.842$, што значи дека се без статистичка важност. Литературните податоци сугерираат дека постојат два вида на артритис. Првиот е ран каде симптомите траат помалку од три месеци, и подоцнежен или дијагностициран ревматоиден артритис со сите симптоми на инфламација, оток и промени во зглобовите. Релативно краткиот период за развојот на болеста после третирањето со колаген е едно од можните објаснувањата зошто нема развој на болеста и поголеми поместувања во вредностите за IgA.

5. ЗАКЛУЧОЦИ

Добиените вредности за CIA од типот II покажуваат статистички не значајно намалување на вредностите за IgA во серумот кај машките на крајот од експериментот со CIA, во споредба со контролата. Во истиот период женските експериментални животни имаат не сигнификантно зголемување на вредноста за IgA во однос на контролната група.

ЛИТЕРАТУРА

- Arnett, F.C. (2021). The American Rheumatism Association 1987 Revised Criteria for the Classification of Rheumatoid Arthritis *Rheum* 31:315.
- 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.
- Davidson, D., Blanc, A., Filion, D., Wang, H., Plut, P., Pfeffer, G., Buschmann, M.D., Henderson, J.E. (2020). Fibroblast growth factor (FGF) 18 signals through FGF receptor 3 to promote chondrogenesis. In: The Journal of biological chemistry. Band 280, S. 20509–20515.
- 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.
- Hammond, A., Prior, Y., Cotterill, S., Sutton, C., Camacho, E., Heal, C., Adams, J., Hough, Y., O'Neill, T.W., Firth, J. (2021). *BMC Musculoskelet Disord*. 22(1):47. doi: 10.1186/s12891-020-03917-8. PMID: 33419426 Free PMC article. *Clinical Trial*.
- Hammond, A., Prior, Y., Adams, J., Firth, J., O'Neill, T., Hough, Y. (2023). *Musculoskeletal Care*. 21(2):405-416. doi: 10.1002/msc.1709. Epub 2022 Oct 31. PMID: 36317276 *Clinical Trial*.
- Hetland, G. (2011). The Mushroom *Agaricus blazei* Murill Elicits Medicinal Effects on Tumor, Infection, Allergy, and Inflammation through Its Modulation of Innate Immunity and Amelioration of Th1/Th2 Imbalance and Inflammation. In: *Advances in pharmacological sciences*.
- Ishii, K.J., Uematsu, S., Akira, S. (2006). Toll gates for future immunotherapy (Review). *Current Pharmaceutical Design*. 12(32): 4135-4142.
- 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.
- McAlindon, T. (2004). Effectiveness of glucosamine for symptoms of knee osteoarthritis: results from an internet-based randomized double-blind controlled trial. In: Am J Med. 117, S. 643–649.
- Moore, E.E., Bendele, A.M., Thompson, D.L., Littau, A., Wag gie, K.S., Reardon, B., Ellsworth, J.L. (2005). Fibroblast growth factor-18 stimulates chondrogenesis and cartilage repair in a rat model of injury-induced osteoarthritis. In: *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. Band 13, S. 623–631.
- 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.
- Prior, Y., Sutton, C., Cotterill, S., Adams, J., Camacho, E., Arafin, N., Firth, J., O'Neill, T., Hough, Y., Jones, W., Hammond, A. (2017). *BMC Musculoskelet Disord*. 18(1):224. doi: 10.1186/s12891-017-1583-4. PMID: 28558734 Free PMC article. *Clinical Trial*.
- Saris, D.B. (2008). Characterized Chondrocyte Implantation Results in Better Structural Repair When Treating Symptomatic Cartilage Defects of the Knee in a Randomized Controlled Trial Versus Microfracture. In: *Am J Sports Med*. 36, S. 235–246.

- Sawitzke, A.D., (2008). The effect of glucosamine and/or chondroitin sulfate on the progression of knee osteoarthritis: A report from the glucosamine/chondroitin arthritis intervention trial. In: Arthritis & Rheumatism. 58, 2008, S. 3183–3191.
- 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.
- Usha, P.R., Naidu, P.U.R. (2004). Randomised, Double-Blind, Parallel, Placebo-Controlled Study of Oral Glucosamine, Methylsulfonylmethane and their Combination in Osteoarthritis. 24, str. 353–363.
- 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.
- 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.