

The effects of synthetic immunostimulator polyoxidonium on methotrexate treatment in rats with adjuvant arthritis

Wpływ syntetycznego immunostymulatora polioksydonium na leczenie metotreksatem stosowane u szczurów z adiuwantowym zapaleniem stawów

Jozef Rovenský, Karol Švik, Stanislava Blažíčková, Mária Stančíková

National Institute of Rheumatic Diseases, Piešťany, Slovakia

Key words: polyoxidonium, methotrexate, adjuvant arthritis.

Słowa kluczowe: polioksydonium, metotreksat, adiuwantowe zapalenie stawów.

Summary

The purpose of this study was to evaluate the effect of polyoxidonium (POX) on prophylactic treatment of adjuvant arthritis (AA) with methotrexate (MTX) in rats. Groups of rats with AA were treated with methotrexate (1 mg/kg/week), polyoxidonium (0.1 mg/kg) or their combination for a period of 28 days from adjuvant application. Body mass, hind paw swelling, arthrograph scores and a level of serum albumin were measured as markers of inflammation and arthritis. Treatment with low doses of methotrexate significantly inhibited the markers of both inflammation and arthritis. Methotrexate and its combination with POX significantly increased body mass of arthritic rats. Polyoxidonium administered alone had no significant effect on the hind paw swelling and arthritic score. In combination with MTX, POX markedly potentiated the beneficial effects of MTX, which resulted in a more significant reduction of hind paw swelling and arthritic scores. The concentration of albumin in the serum of arthritic controls was significantly lower than in healthy controls. Both MTX alone and the combination treatment with MTX + POX significantly inhibited the decrease in serum albumin. Polyoxidonium increased the treatment efficacy of basal treatment of AA with MTX (Tables I–IV). In patients with rheumatoid arthritis this immunomodulator may prevent the secondary infections and restore impaired immunological homeostasis.

Streszczenie

Celem badania była ocena wpływu preparatu polioksydonium (POX) na leczenie adiuwantowego zapalenia stawów (*adjuvant arthritis* – AA) metotreksatem (MTX) u szczurów. Szczury z AA leczono metotreksatem (1 mg/kg m.c. na tydzień), polioksydonium (0,1 mg/kg m.c.) lub ich kombinacją przez 28 dni od podania adiuwantu. Wykonano pomiary masy ciała, obrzęku tylnych łap, oszacowano nasilenie zmian w artrogramach (tzw. *arthrogram score*) i oznaczono stężenie albumin w surowicy, czyli oceniono parametry będące markerami stanu zapalnego i zapalenia stawów. Leczenie niskimi dawkami MTX znamienne hamowało aktywność markerów zarówno stanu zapalnego, jak i zapalenia stawów. Stosowanie wyłącznie MTX oraz w skojarzeniu z POX wywoływało znamienny przyrost masy ciała szczurów z zapaleniem stawów. Zastosowanie wyłącznie POX nie wpływało istotnie na obrzęk tylnych łap ani na zmiany punktacji nasilenia zapalenia stawów. Podanie POX w skojarzeniu z MTX znacznie nasilało korzystne oddziaływanie MTX, czego wynikiem było bardziej znamienne zmniejszenie obrzęku tylnych łap i punktacji nasilenia zapalenia stawów. Stężenie albumin w surowicy zwierząt z grupy kontrolnej z zapaleniem stawów było znamienne niższe niż w grupie kontrolnej zdrowych zwierząt. Zarówno monoterapia MTX, jak i leczenie skojarzone MTX + POX znamienne hamowały zmniejszenie się stężenia albumin w surowicy. Polioksydonium zwiększyło efektywność leczenia podstawowego AA przy użyciu MTX (tab. I–IV). U pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów ten immunomodulator może zapobiegać zakażeniom wtórnym i przywracać zaburzoną homeostazę immunologiczną.

Address for correspondence:

Prof. Jozef Rovenský, MD, DSc, FRCP, National Institute of Rheumatic Diseases, Nábřežie I. Krasku 4, 921 01 Piešťany, Slovak Republic, phone number: 0042 33 7969111, fax number: 0042 33 7721192, e-mail: rovenskyjozef@nurch.sk

Submitted: 6.09.2011

Introduction

Polyoxidonium (POX) is a nontoxic, water-soluble, biodegradable synthetic polymer with immunomodulating activity. Chemically, it is a copolymer of *N*-oxidized 1,4-ethylpiperazine and (*N*-carboxyethyl)-1,4-ethylenepiperazine bromide with a molecular weight of 100 kDa. Using a method of flow cytometry it was demonstrated that POX preferentially binds to monocytes and neutrophils [1]. Using colloidal gold labelled POX and electron microscopy it has been shown that the preparation penetrates into leukocytes by endocytosis and is localized in endoplasmic vesicles of cellular cytosol. Polyoxidonium activates the phagocytic capacity of circulating neutrophils and macrophages of the reticular endothelial system. At the same time, it significantly increases the level of intracellular H₂O₂ in peripheral monocytes and neutrophils and also stimulates the production of some cytokines *in vitro*, e.g. interleukin-1 (IL-1), tumour necrosis factor α (TNF- α) and IL-6. Polyoxidonium also increases the leukocytes' ability to kill the ingested staphylococcus aureus in a dose-dependent manner. This increase was observed in leukocytes obtained from healthy individuals and from patients with chronic granulomatous disease [1, 2]. The study of spontaneous and stimulated chemiluminescence of phagocytes showed a significant antioxidant activity of POX *in vitro* [2]. In addition, POX contributes to the cooperative interaction of T and B lymphocytes, migration of hemopoietic progenitors from the central to the peripheral immune organs [3].

Polyoxidonium is indicated for children and adults in the complex therapy of the immunodeficiency associated with acute and chronic recurrent infections and inflammatory process of any aetiology, which cannot be treated by standard methods of therapy. Polyoxidonium is used as an additive therapy in pulmonology, otorhinolaryngology, urology, gynaecology, surgery; in oncology (in the process of the chemical and radiation therapy of the tumours, for correction of the immune suppression induced by tumours and specific therapy), for reduction of the hepatotoxic action of some drugs and for activation of the regeneration processes (in fractures, burns, trophic ulcers) [3–10].

Methotrexate (MTX) is an antifolate that is widely used in the treatment of rheumatic disorders and malignant tumours. The efficacy of MTX is often limited by severe side effects including the development of oxidative stress, liver damage and disturbance of immunological homeostasis associated with secondary infections [11, 12]. Polyoxidonium, with its antioxidant potential and immune regenerative effects, may be beneficial in long-term immunosuppressive therapy with MTX.

The aim of the present study was to evaluate the effect of POX on MTX treatment of rats with adjuvant arthritis.

Wprowadzenie

Polioksydonium (POX) jest nietoksycznym, rozpuszczalnym w wodzie, ulegającym biodegradacji syntetycznym polimerem, wykazującym aktywność immunomodulacyjną. Z chemicznego punktu widzenia jest to kopolimer *N*-utlenionej 1,4-etylenopiperazyny oraz bromku (*N*-karboksyetyl)-1,4-etylenopiperazyny o ciężarze cząsteczkowym 100 kDa. Za pomocą metody cytometrii przepływowej wykazano, że POX wiąże się preferencyjnie z monocytami i granulocytami obojętnochłonnymi [1]. Stosując POX znakowane złotem koloidalnym, w mikroskopie elektronowym wykazano, że preparat przenika do leukocytów na drodze endocytozy i umiejscawia się w pęcherzykach endoplazmatycznych płynu wewnątrzkomórkowego. Polioksydonium stymuluje aktywność fagocytarną krążących neutrofilów i makrofagów układu siateczkowo-śródbłonkowego. Jednocześnie znamienne zwiększa stężenie wewnątrzkomórkowego H₂O₂ w obwodowych monocytach i neutrofilach, a także stymuluje wytwarzanie niektórych cytokin *in vitro*, np. interleukiny 1 (IL-1), czynnika martwicy nowotworów (*tumour necrosis factor* α – TNF- α) oraz IL-6. Polioksydonium zwiększa także zdolność leukocytów do zabijania wchłoniętych drobnoustrojów gronkowca złocistego, zależnie od zastosowanej dawki. Taki wzrost zaobserwowano w leukocytach pobranych od osób zdrowych i od pacjentów z przewlekłą chorobą ziarniniakową [1, 2]. Badania nad spontaniczną i stymulowaną chemiluminescencją fagocytów wykazały znamienne aktywność antyoksydacyjną POX *in vitro* [2]. Ponadto POX przyczynia się do współdziałania limfocytów T i B oraz migracji krwiotwórczych komórek progenitorowych z centralnych do obwodowych narządów układu immunologicznego [3].

Polioksydonium jest wskazane do stosowania u dzieci i dorosłych w ramach kompleksowej terapii niedoborów odporności, związanych z ostrymi i przewlekłymi nawracającymi zakażeniami oraz procesem zapalnym o różnej etiologii, niepoddających się standardowym metodom leczenia. Polioksydonium znajduje zastosowanie jako terapia dodatkowa w pulmonologii, laryngologii, urologii, ginekologii, chirurgii; onkologii (w leczeniu guzów środkami chemicznymi lub naświetlaniami, w celu przywrócenia funkcji układu odpornościowego w przypadku immunosupresji wywołanej obecnością nowotworu i terapią celowaną). Jest także stosowane w ramach redukcji działania hepatotoksycznego niektórych leków oraz aktywacji procesów regeneracji (w złamaniach, oparzeniach, owrzodzeniach troficznych) [3–10].

Metotretsat (MTX) jest antagonistą kwasu foliowego, szeroko stosowanym w leczeniu chorób reumatycznych i złośliwych nowotworów. Skuteczność MTX często ograniczają poważne działania niepożądane, w tym występowanie stresu oksydacyjnego, uszkodzeń wątroby i zaburzeń homeostazy immunologicznej, związanych z wtórnymi

Material and methods

Materials. In this study, methotrexate injection solution of 10 mg/ml in sterile saline from Medac Company, Hamburg, Germany, was used. Polyoxidonium was purchased from Medigroup s.r.o. (Bratislava, Slovakia). *Mycobacterium butyricum* was purchased from Difco Laboratories Co. Ltd. (Detroit, USA) and incomplete Freund's adjuvant from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Germany).

Animals. Male Lewis rats (170–190 g) obtained from Charles River Wiga, Germany, were maintained during the experiment in standard animal facilities that comply with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. The animals were fed pelleted feed (TOP DOVO, Dobrá Voda, Slovak Republic) and had free access to both food and water. The State Veterinary Committee of the Slovak Republic and the Ethics Committee for Control of Animals Experimentation at the National Institute of Rheumatic Diseases approved the experimental protocol and all procedures.

Induction of arthritis. The rats were injected with 0.1 ml suspension of heat-killed *Mycobacterium butyricum* (12 mg/ml) in incomplete Freund's adjuvant intradermally at the base of the tail.

Treatment. Methotrexate and POX were administered in corresponding doses from day 0 (the day of immunization) to day 28 of the study. MTX was prepared by dilution with sterile saline to yield the desired concentration of 0.5 mg in 0.1 ml of saline, and applied twice a week per os (1 mg/kg in total per week). Polyoxidonium was administered gently by injection into muscle in a dosage of 0.1 mg/kg. During the first 15 days it was applied 5 times a week, then 3 times a week until the end of study to day 28. The untreated groups received the vehicle (sterile saline) in the same manner daily for 28 days.

The animals were divided into the following five groups of 8 animals: group 1 – non-arthritic untreated healthy controls, group 2 – untreated rats with AA, group 3 – AA rats treated with POX, group 4 – AA rats treated with MTX; group 5 – AA rats treated with a combination of MTX + POX.

Evaluated parameters

Body mass of rats was measured at the beginning of study and every week during the study.

Hind paw swelling. The volume of the hind paw swelling was measured with an electronic water plethysmograph (UGO BASILE, Comerio-Varese, Italy) on days 14, 21 and 28.

Arthrograph score. The severity of arthritis was quantified by scoring each paw from 0 to 5, based on increasing levels of swelling and periarticular erythema. The sum

zakażeniami [11, 12]. Polioksydonium z uwagi na potencjał antyoksydacyjny i wpływ na regenerację układu odpornościowego może mieć korzystne działanie w długoterminowej immunosupresyjnej terapii MTX.

Celem badania była ocena wpływu POX na leczenie za pomocą MTX stosowane u szczurów z adiuwantowym zapaleniem stawów.

Materiał i metody

Materiał. W przeprowadzonym badaniu MTX podawano w postaci roztworu do iniekcji 10 mg/ml w jałowej soli fizjologicznej (Medac Company, Hamburg, Niemcy). Polioksydonium zakupiono w firmie Medigroup s.r.o (Bratysława, Słowacja). *Mycobacterium butyricum* zakupiono w Difco Laboratories Co. Ltd. (Detroit, USA) a niekompletny adiuwant Freund'a w firmie Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Niemcy).

Zwierzęta. Szczury ze szczepu Lewis, samce ważące 170–190 g, wyhodowane w Charles River Wiga (Niemcy), w czasie trwania badania były przechowywane w standardowych warunkach – zgodnie z wymogami Europejskiej Konwencji w sprawie ochrony zwierząt kręgowych wykorzystywanych do celów doświadczalnych i innych celów naukowych. Zwierzęta karmiono karmą w postaci granulki (TOP DOVO, Dobrá Voda, Republika Słowacji). Miały one zapewniony wolny dostęp zarówno do pokarmu, jak i do wody. Państwowy Komitet Weterynaryjny Republiki Słowacji oraz Komisja Etyczna ds. Kontroli Eksperymentów z Udziałem Zwierząt przy Państwowym Instytucie Chorób Reumatycznych zaakceptowały protokół doświadczenia oraz wszystkie procedury.

Wywoływanie zapalenia stawów. Szczurom podano 0,1 ml zawiesiny zabitych gorącym drobnoustrojów *Mycobacterium butyricum* (12 mg/ml) z niekompletnym adiuwantem Freund'a w iniekcji śródskórnej wykonanej u podstawy ogona.

Leczenie. Metotreksat i POX podawano w odpowiednich dawkach, zaczynając od dnia 0 (dnia wykonania immunizacji), aż do 28. dnia badania. Metotreksat przygotowywano, rozcieńczając preparat w jałowej soli fizjologicznej w celu uzyskania pożądanego stężenia 0,5 mg w 0,1 ml soli fizjologicznej, i podawano dwa razy w tygodniu *per os* (łącznie 1 mg/kg m.c. na tydzień). Polioksydonium w postaci iniekcji w dawce 0,1 mg/kg m.c. podawano domięśniowo. Przez pierwsze 15 dni preparat podawano 5 razy w tygodniu, a następnie 3 razy w tygodniu, aż do zakończenia badania w 28. dniu. W grupie nieleczonej podawano *vehiculum* (jałową sól fizjologiczną) wg tego samego schematu przez 28 dni.

Zwierzęta podzielono na 5 grup po 8 zwierząt: grupa 1. (kontrolna) – zdrowe, nieleczone osobniki bez zapalenia stawów; grupa 2. – nieleczone szczury z AA; grupa 3. – szczury z AA leczone POX; grupa 4. – szczury z AA leczone MTX; grupa 5. – szczury z AA leczone kombinacją MTX + POX.

of the scores for the limbs was calculated as the arthritic index, with a maximum possible score of 20 per rat. Arthrogram scores were evaluated on days 14, 21 and 28.

Serum albumin levels were measured on days 14, 21 and 28 in the rat serum by spectrophotometric method, using SYS 1 kit (BM/Hitachi, Boehringer, Mannheim, Germany) on a Hitachi 911 automatic biochemical analyzer.

Statistical analysis of the results. One-way analysis of variance (ANOVA) was used for statistical analysis of the results, and $p < 0.05$ was considered as the significance limit for all comparisons.

Results

Body weight. In the first 7 days of the treatment, the increment in body weight was similar in all groups of rats (Table I). However, on day 14, the body mass of arthritic control rats and rats treated with POX alone was significantly lower than that of the healthy controls and arthritic rats treated with MTX and with a combination of MTX + POX. The increase of body mass in rats treated with a combination of MTX + POX was similar to that treated with MTX alone.

Oceniane parametry

Masa ciała szczurów. Pomiaru wykonano na początku badania oraz raz w tygodniu w trakcie jego trwania.

Obrzęk tylnych łap. Objętość obrzęku tylnych łap mierzone za pomocą wodnego pletyzmografu elektrycznego (UGO BASILE, Comerio-Varese, Włochy) w 14., 21. i 28. dniu.

Ocena artrogramów (arthrogram score). Nasilenie procesu zapalnego stawów oceniano ilościowo, przypisując każdej kończynie punkty od 0 do 5, w zależności od narastającego obrzęku i rumienia okołostawowego. Łączna punktacja za wszystkie kończyny stanowiła wskaźnik zapalenia stawów (arthritic index), na podstawie którego maksymalna możliwa liczba punktów u jednego szczura wynosiła 20. Artrogramy oceniano w 14., 21. i 28. dniu badania.

Stężenie albumin w surowicy oznaczano w 14., 21. i 28. dniu, stosując metodę spektrofotometryczną, przy użyciu zestawu SYS 1 (BM/Hitachi, Boehringer Mannheim, Niemcy), automatycznym biochemicznym analizatorem Hitachi 911.

Analiza statystyczna wyników. Analizę statystyczną wyników przeprowadzono na podstawie jednokierunkowej analizy wariancji (ANOVA); za granicę istotności statystycznej dla wszystkich porównań przyjęto $p < 0,05$.

Table I. The effect of MTX, POX, and their combination on body mass of rats (g)

Groups of rats	Day 1	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
healthy controls	181 ±9	232 ±5	266 ±3***	278 ±7***	292 ±11***
untreated AA controls	182 ±3	219 ±15	208 ±18	195 ±10	217 ±14
AA rats treated with:					
POX	181 ±5	224 ±7	210 ±8	202 ±8	226 ±14
MTX	182 ±7	221 ±13	241 ±16**	245 ±15***	255 ±10***
MTX + POX	180 ±4	225 ±5	254 ±8***	247 ±9***	255 ±12***

Data represent mean value and standard deviation (mean value ± SD) for groups of 8 rats. Significantly different from arthritic control rats: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Tabela I. Wpływ MTX, POX i ich kombinacji na masę ciała szczurów (g)

Grupa szczurów	Dzień 1.	Dzień 7.	Dzień 14.	Dzień 21.	Dzień 28.
zdrowe osobniki z grupy kontrolnej	181 ±9	232 ±5	266 ±3***	278 ±7***	292 ±11***
nieleczone osobniki z AA	182 ±3	219 ±15	208 ±18	195 ±10	217 ±14
szczury z AA leczone:					
POX	181 ±5	224 ±7	210 ±8	202 ±8	226 ±14
MTX	182 ±7	221 ±13	241 ±16**	245 ±15***	255 ±10***
MTX + POX	180 ±4	225 ±5	254 ±8***	247 ±9***	255 ±12***

Dane przedstawiono jako średnie wartości z odchyleniem standardowym (średnia wartość ± SD) dla grup po 8 szczurów. Znamienne różnica w stosunku do grupy szczurów kontrolnych z AA: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Hind paw swelling, arthrogram score. The clinical signs of arthritis, both hind paw swelling and periarticular erythema occurred in all treated and untreated rats with AA (Table II and III). The volume of the swollen hind paws in arthritic rats was significantly higher as compared to healthy controls on days 14, 21 and 28, as supported by the mean value for two hind paws. Statistically significant decreases of both hind paw swelling and arthrogram scores were observed in the arthritic rats treated with MTX. Polyoxidonium administered alone had no significant effects on these parameters (Table II and III). However, the combination treatment with MTX + POX statistically more significantly reduced both the hind paw swelling and arthritic score on days 21 and 28.

Serum albumin levels. Serum albumin acts as a negative acute phase reactant in both rat and human arthritis. Lower levels of serum albumin correspond to higher levels of inflammatory activity. The concentration of albumin in the serum of arthritic controls was significantly lower than in healthy controls (HC vs. AA rats, $p < 0.001$). Both MTX alone and the combination treatment with MTX + POX significantly inhibited the decrease in serum albumin in comparison with both arthritic controls and polyoxidonium treated rats (Table IV).

Wyniki

Masa ciała szczurów. W ciągu pierwszych 7 dni leczenia przyrost masy ciała był podobny we wszystkich grupach szczurów (tab. I). W 14. dniu badania masa ciała szczurów w kontrolnej grupie szczurów z zapaleniem stawów i szczurów leczonych wyłącznie POX była znamienne niższa niż masa ciała zdrowych osobników z grupy kontrolnej i szczurów z zapaleniem stawów leczonych MTX oraz kombinacją MTX + POX. Przyrost masy ciała u szczurów leczonych kombinacją MTX + POX był podobny do przyrostu masy ciała odnotowanego w grupie leczonej wyłącznie MTX.

Obrzęk tylnych łap, ocena artrogramów (arthrogram score). Objawy kliniczne zapalenia stawów, zarówno obrzęk tylnych łap, jak i rumień okołostawowy, występowały u wszystkich leczonych i nieleczonych szczurów z AA (tab. II i III). Objętość obrzękniętych tylnych łap u szczurów z zapaleniem stawów była znamienne większa w porównaniu ze zdrowymi osobnikami z grupy kontrolnej w 14., 21. i 28. dniu, co potwierdziły średnie wartości dla dwóch tylnych łap. Stwierdzono znamienne statystycznie zmniejszenie obrzęku obu tylnych łap i punktacji analizowanych artrogramów u wszystkich szczurów z zapaleniem stawów leczonych MTX. Podanie wyłącznie polioksydonium nie wpłynęło istotnie na te parametry (tab. II i III), natomiast leczenie skojarzone MTX + POX

Table II. The effect of MTX, POX and their combination on hind paw swelling (ml) in AA rats

Groups of rats	Day 14	Day 21	Day 28
healthy controls	1.34 ±0.02***	1.41 ±0.04***	1.42 ±0.04***
untreated AA controls	1.98 ±0.23	2.41 ±0.25	2.19 ±0.15
AA rats treated with:			
POX	2.09 ±0.14	2.43 ±0.22	2.21 ±0.26
MTX	1.44 ±0.04***	2.14 ±0.13*	1.94 ±0.19*
MTX + POX	1.44 ±0.03***	1.88 ±0.32**‡	1.81 ±0.26**

Data represent mean value and standard deviation (mean value ± SD) for groups of 8 rats. Significantly different from arthritic control rats: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Significantly different from arthritic rats treated with MTX: ‡ $p < 0.05$.

Tabela II. Wpływ MTX, POX i ich kombinacji na obrzęk tylnych łap (ml) u szczurów z AA

Grupa szczurów	Dzień 14.	Dzień 21.	Dzień 28.
zdrowe osobniki z grupy kontrolnej	1,34 ±0,02***	1,41 ±0,04***	1,42 ±0,04***
nielezione osobniki z AA	1,98 ±0,23	2,41 ±0,25	2,19 ±0,15
szczury z AA leczone:			
POX	2,09 ±0,14	2,43 ±0,22	2,21 ±0,26
MTX	1,44 ±0,04***	2,14 ±0,13*	1,94 ±0,19*
MTX + POX	1,44 ±0,03***	1,88 ±0,32**‡	1,81 ±0,26**

Dane przedstawiono jako średnie wartości z odchyleniem standardowym (średnia wartość ± SD) dla grup po 8 szczurów. Znamienne różnica w stosunku do grupy szczurów kontrolnych z AA: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Znamienne różnica w stosunku do grupy szczurów z AA leczonych MTX: ‡ $p < 0,05$.

Table III. The effect of MTX, POX and their combination on the arthrogram score in AA rats

Groups of rats	Day 14	Day 21	Day 28
Untreated AA controls	9.63 ±2.45	16.13 ±2.03	14.50 ±1.07
AA rats treated with:			
POX	11.00 ±2.14	16.75 ±2.76	15.3 ±2.10
MTX	4.25 ±0.46***	12.75 ±2.49**	12.13 ±2.64*
MTX + POX	4.13 ±3.00***	8.38 ±2.58***‡	9.63 ±2.96***‡

Data represent mean value and standard deviation (mean value ± SD) for groups of 8 rats.

Significantly different from arthritic control rats: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Significantly different from arthritic rats treated with MTX: ‡ $p < 0.05$.

Tabela III. Wpływ MTX, POX i ich kombinacji na nasilenie zmian w punktacji artrogramów szczurów z AA

Grupa szczurów	Dzień 14.	Dzień 21.	Dzień 28.
nieleczone osobniki kontrolne z AA	9,63 ±2,45	16,13 ±2,03	14,50 ±1,07
szczury z AA leczone:			
POX	11,00 ±2,14	16,75 ±2,76	15,3 ±2,10
MTX	4,25 ±0,46***	12,75 ±2,49**	12,13 ±2,64*
MTX + POX	4,13 ±3,00***	8,38 ±2,58***‡	9,63 ±2,96***‡

Dane przedstawiono jako średnie wartości z odchyleniem standardowym (średnia wartość ± SD) dla grup po 8 szczurów.

Znamienna różnica w stosunku do grupy szczurów kontrolnych z AA: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Znamienna różnica w stosunku do grupy szczurów z AA leczonych MTX: ‡ $p < 0,05$.

Discussion

This experiment was focused on the effect of POX on the inflammatory and arthritic markers in rats with AA during basal treatment with MTX. The treatment was prophylactic, which means that the animals were treated immediately after administration of the adjuvant.

The results of our investigation confirmed the previously reported effect of MTX treatment in rats with AA [13, 14]. Methotrexate at a dose of 1 mg/kg/week suppressed, but did not prevent, arthritis development. In our study, MTX significantly suppressed the hind paw swelling and decreased arthrogram scores. Polyoxidonium alone did not aggravate or ameliorate the arthritis process in rats. However, POX potentiated the beneficial effect of MTX, which was clearly demonstrated by more significant reduction of hind paw swelling and arthrogram scores on days 21 and 28 as compared to the rats treated with MTX alone.

Serum albumin acts as a negative acute-phase reactant in rat arthritis. Decreased levels of serum albumin reflect the changes in synthesis of this protein in liver secondary to the activation of hepatic cells by inflammatory cytokines, mainly IL-1 [14]. Our results correlate with the observation that MTX markedly prevents the albumin decrease in AA rats. The combination of MTX + POX had no additional effect as compared to MTX alone (Table IV).

Experiments on Wistar rats with acute methanol or organophosphorus compounds intoxication [15] have

zmniejszyło w stopniu statystycznie bardziej znamiennym zarówno obrzęk tylnych łap, jak i punktację nasilenia zapalenia stawów w artrogramach w 21. i 28. dniu.

Stężenie albumin w surowicy. Albuminy w surowicy pełnią funkcję ujemnego białka reakcji ostrej fazy zapalenia stawów zarówno u szczurów, jak i u ludzi. Mniejsze stężenia albumin w surowicy odpowiadają większemu natężeniu procesów zapalnych. Stężenie albumin w surowicy zwierząt z zapaleniem stawów było znamiennie niższe niż u zdrowych osobników z grupy kontrolnej (zdrowe osobniki kontrolne vs szczury z AA, $p < 0,001$). Zarówno monoterapia MTX, jak i leczenie skojarzone MTX + POX znamiennie hamowały zmniejszenie się stężenia albumin w surowicy w porównaniu ze stężeniem albumin u szczurów z grupy kontrolnej z zapaleniem stawów oraz u szczurów leczonych POX (tab. IV).

Dyskusja

W przeprowadzonym doświadczeniu badano wpływ POX na aktywność markerów stanu zapalnego i zapalenia stawów u szczurów z AA w czasie leczenia zasadniczego MTX. Leczenie było profilaktyczne, co oznacza, że zwierzęta leczono bezpośrednio po podaniu adiuwantu.

Wyniki badania potwierdziły opisywany we wcześniejszych doniesieniach wpływ leczenia MTX u szczurów z AA [13, 14]. Metotreksat w dawce 1 mg/kg m.c. na tydzień hamował zapalenie stawów, lecz nie zapobiegał jego rozwojowi. W przeprowadzonym badaniu MTX znacznie hamował występowanie obrzęku tylnych łap i obniżał punktację ocenianych artrogramów. Monoterapia POX nie

Table IV. The effect of MTX, POX and their combination on albumin serum concentrations (g/l) in AA rats

Groups of rats	Day 14	Day 21	Day 28
Healthy controls	29.00 ±2.23***	28.36 ±2.47***	30.40 ±2.06***
Untreated AA controls	22.88 ±1.58	23.01 ±1.89	24.15 ±2.23
AA rats treated with:			
POX	23.76 ±2.12	23.11 ±2.60	23.49 ±1.53
MTX	25.20 ±0.88*	25.89 ±0.93*	27.60 ±1.07**
MTX + POX	25.43 ±1.20*	26.11 ±1.71*	27.44 ±1.22**

Data represent mean value and standard deviation (mean value ± SD) for groups of 8 rats. Significantly different from arthritic control rats: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Tabela IV. Wpływ MTX, POX i ich kombinacji na stężenie albumin w surowicy (g/l) u szczurów z AA

Grupa szczurów	Dzień 14.	Dzień 21.	Dzień 28.
zdrowe osobniki z grupy kontrolnej	29,00 ±2,23***	28,36 ±2,47***	30,40 ±2,06***
nieleczone osobniki kontrolne z AA	22,88 ±1,58	23,01 ±1,89	24,15 ±2,23
szczury z AA leczone:			
POX	23,76 ±2,12	23,11 ±2,60	23,49 ±1,53
MTX	25,20 ±0,88*	25,89 ±0,93 *	27,60 ±1,07**
MTX + POX	25,43 ±1,20*	26,11 ±1,71*	27,44 ±1,22**

Dane przedstawiono jako średnie wartości z odchyleniem standardowym (średnia wartość ± SD) dla grup po 8 szczurów. Znamienne różnica w stosunku do grupy szczurów kontrolnych z AA: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

shown that POX completely restores the cellular and humoral immune responses, the activity of killers and the synthesis of cytokines IFN- γ , IL-4 and ratio IFN- γ /IL-4 suppressed by these compounds. A similar effect of POX was observed in ethanol intoxicated non-inbred rats [16]. Protective effects of POX were described in suppurative-septic complications in severe burns in experimental models [10]. It is suggested that POX may restore the cellular and humoral responses also in arthritic rats induced by pathological process and MTX treatment. This effect of POX may contribute to the beneficial effect of MTX in arthritic rats.

Methotrexate remains the gold standard and is most often considered the drug of choice in the treatment of rheumatic arthritis. However, it can cause bone marrow suppression, pulmonary toxicity, and hepatic fibrosis and therefore requires careful monitoring in clinical practices [17]. Methotrexate treatment is also associated with a higher risk of infections resulting from long-term immunosuppression. Polyoxidonium may also be useful in human RA according to its pronounced antioxidant and immunomodulatory activity which may restore the immunological homeostasis, increase the treatment effectiveness of MTX and protect against infections.

In our study we tested the pure synthetic immunomodulator POX. This immunomodulator had an additional ben-

wplywała ani na nasilenie, ani na złagodzenie procesu zapalenia stawów u szczurów. Podanie POX wzmacniało natomiast korzystne działanie MTX, co zostało wyraźnie wykazane na podstawie większego zmniejszenia się obrzęku tylnych łap i obniżenia punktacji ocenianych artrogramów w 21. i 28. dniu u badanych szczurów w porównaniu ze szczurami leczonymi wyłącznie MTX.

Albuminy w surowicy funkcjonują u szczurów jako ujemne białka ostrej fazy zapalenia stawów. Zmniejszone stężenie albumin w surowicy odzwierciedla wtórną zmianę w syntezie tego białka w wątrobie w wyniku aktywacji hepatocytów przez cytokiny zapalne, głównie IL-1 [14]. Uzyskane wyniki są zgodne z obserwacjami, że MTX znamienne zapobiega zmniejszaniu się stężenia albumin u szczurów z AA. Łączne podanie MTX + POX nie spowodowało dodatkowych działań w porównaniu z MTX podawanym w monoterapii (tab. IV).

Doświadczenia na szczurach ze szczepu Wistar dotyczące wywoływania ostrego odurzenia metanolem lub związkami fosfoorganicznymi [15] wykazały, że POX w pełni przywraca komórkowe i humoralne odpowiedzi odpornościowe, aktywność zabójców oraz syntezę cytokin IFN- γ , IL-4 i stosunek IFN- γ /IL-4, hamowanych przez te związki. Podobne działanie POX zaobserwowano u niewsobnych szczurów odurzonych etanolem [16]. Opisano działanie ochronne POX w ropno-septycznych powikłaniach ciężkich oparzeń w modelach eksperymentalnych [10]. Suge-

eficial effect on methotrexate treatment in adjuvant arthritis.

ruje się, że POX może również przywracać odpowiedź komórkową i humoralną u szczurów z zapaleniem stawów wywołanym procesem patologicznym i leczeniem MTX. Ta właściwość POX może się przyczyniać do korzystnego wpływu MTX u szczurów z zapaleniem stawów.

Terapia MTX pozostaje złotym standardem, lek ten jest uważany za lek z wyboru w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS). Może on jednak doprowadzić do supresji szpiku kostnego, wystąpienia niepożądanych objawów ze strony płuc i zwłóknienia wątroby; jego stosowanie w praktyce klinicznej wymaga zatem uważnego monitorowania [17]. Podawanie MTX wiąże się również z większym ryzykiem wystąpienia zakażeń, wynikającym z przewlekłej immunosupresji. Polioksydonium może również wywierać korzystne działanie w RZS u ludzi z uwagi na swoją znaczną aktywność antyoksydacyjną i immunomodulacyjną, dzięki czemu może doprowadzić do przywrócenia homeostazy immunologicznej, zwiększyć skuteczność leczenia MTX i chronić przed zakażeniami.

Przedmiotem badania był czysty, syntetyczny immunomodulator – POX, który wywarł dodatkowy korzystny wpływ na skuteczność leczenia MTX w adiuwantowym zapaleniu stawów.

References

Piśmiennictwo

- Dyakonova VA, Dambaeva SV, Pinegin BV, Khaitov RM. Study of interaction between the polyoxidonium immunomodulator and the human immune system cells. *Int Immunopharmacol* 2004; 4: 1615-1623.
- Dambaeva SV, Mazurov DV, Golubeva NM, et al. Effect of polyoxidonium on the phagocytic activity of human peripheral blood leukocytes. *Russ J Immunol* 2003; 8: 53-60.
- Pinegin BV, Nekrasov AV, Khaitov RM. Immunomodulator polyoxidonium: mechanisms of action and aspects of clinical application. *Cytokines and Inflammation* 2004; 3: 41-47.
- Petrov RV, Khaitov RM. Vaccines of new generation on the base of synthetic polyions: the history of design, phenomenology and mechanisms of action, implementation to practice. *Immunologiya* 1998; 5: 4-11 (in Russian).
- Kazeko NI, Zhmurov VA, Borovskii AA, et al. Polyoxidonium in the treatment of calculous pyelonephritis. *Urologiya* 2006; 2: 9-62 (in Russian).
- Borisova AM, Laktionova LV, Setdikova NK. Clinical trial of domestic drug polyoxidonium in secondary immunodeficiency. *Ter Arkh* 1998; 70: 52-57 (in Russian).
- Mikheeva GN, Khaitov RM. Current aspects of diagnosis and treatment of atopic diseases complicated by secondary immunodeficiency. *Ter Arkh* 1998; 70: 54-60 (in Russian).
- Zemskov AM, Kiselev AV, Koveshnikov VV. Immune status of patients with exacerbation of chronic suppurative otitis media and its correction. *Vestn Otorinolaringol* 2010; 5: 38-40 (in Russian).
- Buniatian AA, Inviaeva EV, Nikoda VV, Vinnitskii LI. Immunocorrectors in the complex treatment of postoperative suppurative-inflammatory complications in surgical patients and monitoring of immunological parameters. *Anesteziol Reanimatol* 2004; 5: 79-83 (in Russian).
- Pylaeva SI, Gordinskaia NA, Vazina IR, Sidorkin VG, Bushuev Iul. The prevention of suppurative-septic complications in severe burns by using immunotropic drug preparations in an experiment. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 2000; 1: 72-75 (in Russian).
- West SG. Methotrexate hepatotoxicity. *Rheum Dis Clin North Am* 1997; 23: 83-91.
- Kremer JM, Alarcón GS, Lightfoot RW Jr, et al. Methotrexate for rheumatoid arthritis. Suggested guidelines for monitoring liver toxicity. *American College of Rheumatology. Arthritis Rheum* 1994; 37: 316-328.
- Welles WL, Silkworth J, Oronsky AL, Kerwar SS, Galivan J. Studies on the effect of low dose methotrexate in adjuvant arthritis. *J Rheumatol* 1985; 12: 904-906.
- Connolly KM, Stecher VJ, Danis E, et al. Alteration of interleukin-1 production and the acute phase response following medication of adjuvant arthritic rats with cyclosporin-A or methotrexate. *Int J Immunopharmacol* 1988; 10: 717-728.
- Zabrodskii PF, Kirichuk VF, Iafarova IKh, et al. Reduction of the immune responses and synthesis of cytokines associated with Th1 and Th2 lymphocyte function and their correction by polyoxidonium under conditions of subacute intoxication by organophosphorus compounds. *Eksp Klin Farmakol* 2009; 72: 33-35 (in Russian).
- Zabrodskii PF, Svistunov AA, Lim VG, et al. Pharmacological correction of Th1 and Th2 lymphocyte activity and cytokine profile in ethanol intoxicated rats. *Eksp Klin Farmakol* 2010; 73: 19-21 (in Russian).
- Morrow J, Nelson JL, Watts R, Isenberg D. Therapeutic manipulation of the immune system. In: *Autoimmune Rheumatic Disease*, 2nd edition, (eds.) Morrow J, Nelson JL, Watts R, Isenberg D. Oxford University Press, Oxford 1999; 43-56.