УДК 616-002-008.953-091
DOI: https://doi.org/10.35693/SIM546016

This work is licensed under CC BY 4.0
© Authors, 2024

In vitro клеточная гиперурикемическая гемотест-система для определения цитокинового статуса пациентов с подагрическим артритом

Л.Т. Волова, Е.И. Пугачев, Т.В. Старикова, П.А. Лебедев, И.А. Шафиева, С.И. Кузнецов, О.А. Гусякова, Г.Н. Светлова, Н.К. Осина

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России (Самара, Россия)

Аннотация

Цель – разработать *in vitro* метод оценки активности инфламмасомы в условиях гиперурикемической стимуляции воспалительных интерлейкинов.

Материал и методы. Клетки цельной крови доноров и пациентов с гиперурикемией и обострением подагрического артрита культивировались *in vitro* в культуральной среде RPMI в присутствии разных концентраций мочевой кислоты. Продукция цитокинов, вырабатываемых в культуральную среду клетками крови, стимулированных мочевой кислотой, проводилась с помощью сравнительного иммуноферментного анализа.

Результаты. Имитируя условия гиперурикемии *in vivo*, была разработана *in vitro* клеточная тест-система стимуляции клеток крови индивидуальных доноров мочевой кислотой. С помощью разработанной гиперурикемической гемотест-системы *in vitro* обнаружены количественные различия в продукции воспалительных цитокинов, вырабатываемых клетками крови потенциально здоровых доноров и пациентов с гиперурикемией и подагрическим артритом.

Выводы. В рамках создания персонифицированной диагностики разработана гиперурикемическая гемотест-система, которая может служить клеточной моделью *in vitro* для изучения активации сигнальных молекул инфламмасомного воспаления при подагрическом артрите.

Ключевые слова: клеточная биология, цитокины, гиперурикемия, подагрический артрит, персонифицированная медицина.

Конфликт интересов: не заявлен.

Для цитирования:
Волова Л.Т., Пугачев Е.И., Старикова Т.В., Лебедев П.А., Шафиева И.А., Кузнецов С.И., Гусякова О.А., Светлова Г.Н., Осина Н.К. ***In vitro* клеточная гиперурикемическая гемотест-система для определения цитокинового статуса пациентов с подагрическим артритом.** *Наука и инновации в медицине.* 2024;9(1):14-21. https://doi.org/10.35693/SIM546016

Сведения об авторах
Волова Л.Т. – д-р мед. наук, профессор, директор НИИ «БиоТех». https://orcid.org/0000-0002-8510-3118 E-mail: l.t.volova@samsmu.ru
Пугачев Е.И. – научный сотрудник НИИ «БиоТех». https://orcid.org/0000-0002-3594-0874 E-mail: evgenesius@mail.ru
Старикова Т.В. – главный специалист НИИ «БиоТех». https://orcid.org/0000-0002-3811-3807 E-mail: t.v.starikova@samsmu.ru
Лебедев П.А. – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой терапии с курсом функциональной диагностики ИПО. https://orcid.org/0000-0003-1404-7099 E-mail: p.a.lebedev@samsmu.ru
Шафиева И.А. – канд. мед. наук, заведующая отделением эндокринологии и ревматологии. https://orcid.org/0000-0002-0475-8391 E-mail: i.a.shafieva@samsmu.ru
Кузнецов С.И. – канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник НИИ «БиоТех». https://orcid.org/0000-0003-4302-8946 E-mail: s.i.kuznecov@samsmu.ru
Гусякова О.А. – д-р мед. наук, заведующая кафедрой фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой. https://orcid.org/0000-0001-8140-4135 E-mail: o.a.gusyakova@samsmu.ru
Светлова Г.Н. – канд. мед. наук, доцент кафедры факультетской терапии. https://orcid.org/0000-0001-9400-8609 E-mail: g.n.svetlova@samsmu.ru
Осина Н.К. – канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник НИИ «БиоТех». https://orcid.org/0000-0002-0444-8174 E-mail: n.k.osina@samsmu.ru

Автор для переписки
Осина Наталья Константиновна
Адрес: Самарский государственный медицинский университет, ул. Арцыбушевская, 171, г. Самара, Россия, 443001. E-mail: n.k.osina@samsmu.ru

Список сокращений
МУН – моноурат натрия; ГУ – гиперурикемия; МК – мочевая кислота; IL-1β – интерлейкин 1β; IL-6 – интерлейкин 6; Il-18 – интерлейкин 18; TNF-α – фактор некроза опухоли-альфа; PBMC – мононуклеарные клетки периферической крови; NLRP3 – инфламмасома NOD-подобного рецепторного белка 3.

Рукопись получена: 12.07.2023
Рецензия получена: 03.12.2023
Статья опубликована: 01.02.2024

In vitro cell-based Hyperuricemia-hemotest bioassay for cytokine status evaluation in patients with gouty arthritis

Larisa T. Volova, Evgenii I. Pugachev, Tatyana V. Starikova, Petr A. Lebedev, Irina A. Shafieva, Sergei I. Kuznetsov, Oksana A. Gusyakova, Galina N. Svetlova, Natalya K. Osina

Samara State Medical University (Samara, Russia)

Abstract

Aim – to develop an *in vitro* method for assessing the activity of the inflammasome under conditions of hyperuricemic stimulation of inflammatory interleukins.

Material and methods. Whole blood cells of donors and patients with hyperuricemia and exacerbation of gouty arthritis diluted with RPMI were cultured *in vitro* in the presence of different concentrations of uric acid. The production of cytokines in the cell growth media of hematopoietic cells stimulated with uric acid was evaluated using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Results. By simulating the hyperuricemia *in vivo*, an *in vitro* cell-based bioassay was developed to stimulate blood cells of individual donors with

uric acid. Using the developed *in vitro* Hyperuricemia-hemotest bioassay, quantitative differences were found in the production of inflammatory cytokines by the blood cells of potentially healthy donors and patients with hyperuricemia and gouty arthritis.

Conclusion. As a new approach in personalized diagnostics, a hyperuricemic (HU)-hemotest system was developed, which can serve as an *in vitro* cell model for studying the activation of inflammasome by inflammatory signaling molecules in gouty arthritis.

Keywords: cell biology, cytokines, hyperuricemia, gouty arthritis, personalized medicine.

Conflict of interest: nothing to disclose.

Citation
Volova LT, Pugachev EI, Starikova TV, Lebedev PA, Shafieva IA, Kuznetsov SI, Gusyakova OA, Svetlova GN, Osina NK. ***In vitro* cell-based Hyperuricemia-hemotest bioassay for cytokine status evaluation in patients with gouty arthritis**. *Science & Innovations in Medicine*. 2024;9(1):14-21. https://doi.org/10.35693/SIM546016

Information about authors
Larisa T. Volova – PhD, Professor, Director of the RDC "BioTech". https://orcid.org/0000-0002-8510-3118 E-mail: l.t.volova@samsmu.ru
Evgenii I. Pugachev – researcher at the RDC "BioTech". https://orcid.org/0000-0002-3594-0874 E-mail: evgenesius@mail.ru
Tatyana V. Starikova – Senior researcher at the RDC "BioTech". https://orcid.org/0000-0002-3811-3807 E-mail: t.v.starikova@samsmu.ru
Petr A. Lebedev – PhD, Professor, Head of the Department of Therapy with a course of functional diagnostics at the Institute of Postgraduate Education. https://orcid.org/0000-0003-1404-7099 E-mail: p.a.lebedev@samsmu.ru
Irina A. Shafieva – PhD, Head of the Department of Endocrinology and Rheumatology. https://orcid.org/0000-0002-0475-8391 E-mail: i.a.shafieva@samsmu.ru
Sergei I. Kuznetsov – PhD, Leading researcher at the RDC "BioTech". https://orcid.org/0000-0003-4302-8946 E-mail: s.i.kuznecov@samsmu.ru
Oksana A. Gusyakova – PhD, Head of the Department of Fundamental and Clinical Biochemistry with Laboratory Diagnostics. https://orcid.org/0000-0001-8140-4135 E-mail: o.a.gusyakova@samsmu.ru
Galina N. Svetlova – PhD, Associate professor, Faculty Therapy Department. https://orcid.org/0000-0001-9400-8609 E-mail: g.n.svetlova@samsmu.ru
Natalya K. Osina – PhD, Leading researcher at the RDC "BioTech". https://orcid.org/0000-0002-0444-8174 E-mail: n.k.osina@samsmu.ru

Corresponding Author
Natalya K. Osina
Address: Samara State Medical University, 171, Artsybushevskaya st., Samara, Russia, 443001. E-mail: n.k.osina@samsmu.ru

Received: 12.07.2023
Accepted: 03.12.2023
Published: 01.02.2024

ВВЕДЕНИЕ

Подагра – системное заболевание, характеризующееся отложением кристаллов моноурата натрия (МУН) и образованием тофусов [1]. Острый подагрический артрит обычно начинается с внезапной острой боли. Характерно поражение плюснефалангового сустава большого пальца стопы (что и носит название «подагра»). Тофусы внутри и вне суставов могут ограничивать объем движений и вызывать деформации, приводя к развитию хронического подагрического артрита. Данная патология часто развивается у лиц с гиперурикемией (ГУ), то есть с повышенным уровнем мочевой кислоты (МК) в сыворотке крови. Хотя ГУ при отсутствии подагры часто описывается как «бессимптомная», новейшие исследования указывают на тесную связь ГУ и риском развития артериальной гипертензии, почечной недостаточности [2] и сердечно-сосудистых заболеваний [3–5]. МК является конечным продуктом метаболизма пуринов в организме человека и синтезируется преимущественно в печени, кишечнике и эндотелии сосудов [6]. Уровень МК в сыворотке, превышающий 420 мкМ, официально считается ГУ. При этом часто у женщин до менопаузы МК ≤360 мкМ, и после менопаузы МК повышается до концентраций, наблюдаемых у мужчин. Для детей и подростков МК считается нормой при концентрации ≤330 мкМ [7]. В водных растворах при концентрации 420 мкМ соли МК из растворимой формы переходят в кристаллическую, однако порог растворимости уратов в плазме значительно повышен и их концентрации могут достигать >600 мкМ без образования кристаллов. Острый приступ подагры всегда ассоциирован с выпадением кристаллов МК в полость сустава. Эпидемиологические данные указывают на тесную связь между ГУ и риском развития подагры [8]. Однако накопленные клинические данные свидетельствуют о том, что эта зависимость не линейна [9, 10]. Более того, отложение кристаллов МК обнаруживается в суставном хряще у пациентов без эпизодов подагрического артрита [11]. Объяснение может лежать в плоскости индивидуальной чувствительности инфламмасомы, ответственной за синтез воспалительных интерлейкинов, которая активируется под воздействием ГУ. Поэтому низкая чувствительность инфламмасомы вполне может объяснять бессимптомное накопление солей МК в суставных тканях. С другой стороны, атаки подагрического артрита всегда обусловлены синтезом воспалительных цитокинов. Высокие уровни цитокинов 1β (IL-1β), IL-6 и TNF-α найдены в синовиальной жидкости больных с подагрическим артритом в период обострения [12]. Повышенные уровни цитокинов IL-6 и TNF-α были обнаружены также в плазме больных с подагрой в период обострения, но не у больных с подагрой в фазе ремиссии [13]. Исследования по сравнению уровней цитокинов IL-1β, IL-6, IL-8, IL-17A, IL-18, IL-22 и IL-23 в сыворотке крови и клиническими проявлениями подагры обнаружили прямую корреляцию только в отношении IL-18, и очень незначительное увеличение IL-6 было зарегистрировано в сыворотке больных, имеющих тофусную форму подагры [14]. Повышенные значения IL-18 и IL-17A были найдены в сыворотках больных с подагрическим артритом [15]. Интересно, что у больных подагрой в сыворотке высокий уровень IL-1β не обнаруживается [13, 14]. Тем не менее существует достаточное количество клинических доказательств ключевой роли IL-1β в развитии подагры. Клинические исследования ингибиторов IL-1β продемонстрировали эффективность в борьбе с воспалительным процессом при подагре [16].

В настоящее время подагрический артрит рассматривается как системное воспалительное заболевание, вызванное активацией инфламмасомы NLRP3 (NOD-подобного рецепторного белка 3) [17, 18]. Инфламмасомы представляют собой многомолекулярные комплексы, которые создаются в цитоплазме клеток в ответ на клеточное повреждение и инфекции [19]. Общепринятая двухсигнальная система активации инфламмасомы NLRP3 продемонстрирована **на рисунке 1**. Только комбинация двух сигналов опосредует и индуцирует серию каскадных реакций подагрического воспаления при участии гемопоэтических клеток – макрофагов, моноцитов и нейтрофилов [14, 17, 20, 21]. Природа данных сигналов до конца не установлена. Считается, что сигнал 1 сенсибилизирует клетки через PRR-паттерн-распознающие рецепторы (priming) и только

после сенсибилизации клеток сигнал 2 (в частности МК) вызывает активацию инфламмасомы NLRP3. Изначально считалось, что МК вызывает воспаление через активацию инфламмасом NLPR3 только вследствие формирования кристаллов [22]. Позднее было продемонстрировано, что растворимая форма МК, проникая в клетки через специальные транспортеры, также может активировать инфламмасому NLPR3, вызывая высвобождение медиаторов воспаления [18]. Сигнал 1 обеспечивает транскрипцию компонентов инфламмасомы, про-caspase 1 и про-IL-1β через активацию транскрипционного фактора NF-kB. Надо отметить, что в отличие от IL-1β транскрипция IL-18 имеет конститутивный характер и, значит, мРНК IL-18 всегда находится в наличии для синтеза белковых форм IL-18 [23, 24]. Только при наличии двух сигналов идет образование Gasdermin-D – регулируемых мембранных пор и высвобождение зрелых форм интерлейкинов IL-1β и IL-18 в окружающую среду, что имеет решающее значение для инициирования острой воспалительной реакции при обострении подагры.

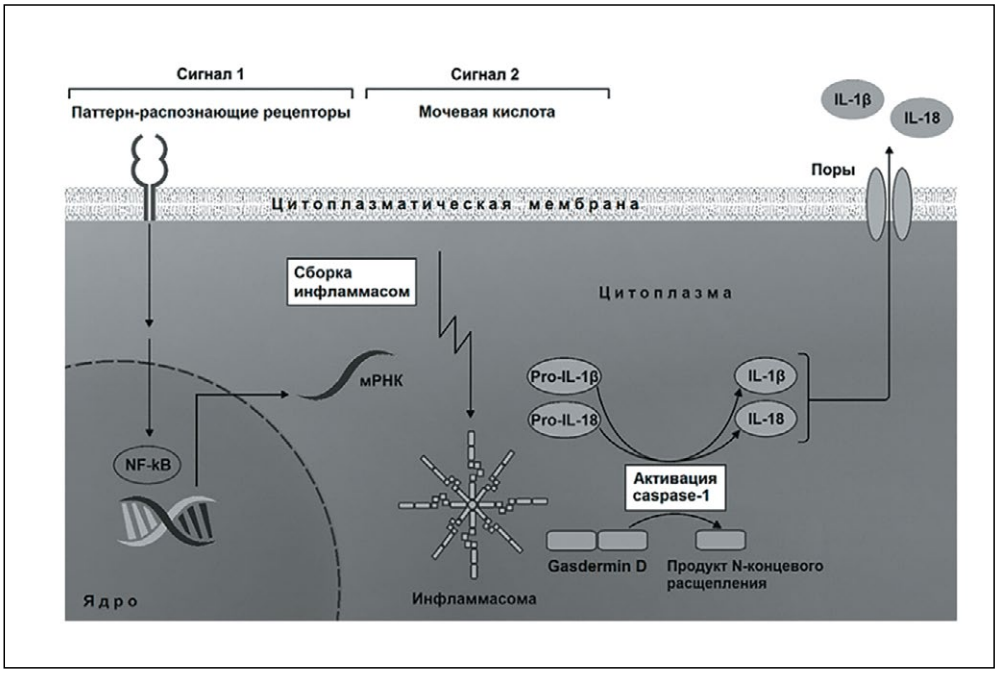

Рисунок 1. *Двухсигнальная активация NLRP3 инфламмасомы. Активированные инфламмасомы NLRP3 способствуют высвобождению Caspase-1, которые переводят неактивные формы про-IL-1β и про-IL-18 в зрелые активные IL-1β и IL-18 соответственно. Gasdermin-D-опосредованный каскад воспалительных реакций обеспечивает образование мембранных пор, через которые идет выброс зрелых IL-1β и IL-18 в окружающую среду.*

Figure 1. *Two-signal pathway activation of the NLRP3 inflammasome. Activated NLRP3 inflammasomes promote the release of Caspase-1, which converts the inactive forms of pro-IL-1β and pro-IL-18 to mature active IL-1β and IL-18, respectively. Gasdermin-D-mediated inflammatory signaling cascade provides the formation of membrane pores through which mature IL-1β and IL-18 are released into the environment.*

Активаторами инфламмасомы NLRP3 могут быть вирусы, бактерии, грибки, токсины, АТФ, частицы кристаллов квасцов, кремниевой кислоты, асбеста, холестерина, МК в растворимой и кристаллической форме, химические раздражители, УФ-свет В-диапазона, амилоид-β и амилин островков поджелудочной железы [25–27]. С учетом разнообразной природы активаторов NLRP3 было высказано предположение, что не все активаторы непосредственно связываются с инфламмасомой [28]. Большинство из них, вероятно, действует посредством выделения или модификации общего медиатора, который и является истинным лигандом NLRP3, природа которого остается пока неизвестной. В существующей на настоящий день модели активации инфламмасомы NLRP3 МК отводится роль сигнала 2, а природа сигнала 1, который сенсибилизирует (priming) клетки, еще до конца не выяснена.

Мы предположили, что клетки крови от пациентов с ГУ уже сенсибилизированы в условиях *in vivo* сигналом 1 и могут быть использованы в качестве персонифицированной клеточной тест-системы *in vitro* с добавлением контролируемой концентрации сигнала 2 (МК) для выявления индивидуальной картины продукции воспалительных цитокинов. Традиционно анализ стимуляции цитокинов *in vitro* выполняется на изолированных мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC). В предыдущей работе нами была продемонстрирована донор-специфическая продукция цитокинов мононуклеарными клетками крови *in vitro* под влиянием иммуномодуляторов [29]. Однако выделение PBMC является трудоемким процессом, что ограничивает возможность обработки большого количества образцов, необходимых для масштабированной диагностики. Кроме этого, в процессе выделения PBMC идет потеря как сигнальных молекул воспаления, так и клеточных популяций. При подагре, которая характеризуется системными признаками воспаления, клеточные источники медиаторов воспаления еще не охарактеризованы должным образом. В последние годы в диагностике наблюдается тенденция к использованию цельной крови для *ex vivo* стимуляции продукции цитокинов, что более точно имитирует физиологические условия *in vivo* по сравнению с методами, которые требуют изоляции PBMC [30]. Физиологические концентрации некоторых цитокинов в цельной крови могут быть достаточно высокими, поэтому, чтобы снизить их эффект воздействия на стимуляцию клеток *in vitro*, мы посчитали целесообразным использовать разбавленную кровь доноров питательной средой RPMI, предназначенной для культивирования клеток *in vitro*. Использование разбавленной крови доноров позволяет максимально сохранить популяционный набор гемопоэтических клеток, которые уже сенсибилизированы сигналом 1 *in vivo*, и при этом снизить уровень содержания сигнальных молекул 2.

В данной работе мы провели скрининг провоспалительных цитокинов в сыворотке доноров и отработали условия

индукции данных цитокинов *in vitro* при высоком содержании МК, используя клетки разбавленной крови индивидуальных доноров.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Провести скрининг провоспалительных цитокинов в сыворотке индивидуальных доноров, отработать *in vitro* условия стимуляции активности инфламмасомы NLRP3 с использованием МК и выяснить, продукция каких провоспалительных цитокинов может быть индуцирована в условиях *in vitro* высоким содержанием МК.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили образцы крови потенциально здоровых лиц из Самарской областной клинической станции переливания крови (СОКСПК) и образцы крови пациентов с гиперурикемией и диагнозом «подагрический артрит» из Клиник Самарского государственного медицинского университета (Клиники СамГМУ). В рамках проведения исследования была оформлена разрешительная документация биоэтического комитета СамГМУ (протокол №215 от 20.01.2021 г.). В 100% эпизодов с пациентами СОКСПК это были лица мужского пола. Пациенты из Клиник СамГМУ были обоего пола. Характеристики пациентов с подагрическим артритом представлены **в таблице 1**.

Отбор участников исследования из реестра доноров СОКСПК производили рандомизированно. Каждый участник подписал добровольное информированное согласие на обработку персональных данных, а также на передачу биологического материала (венозной крови) в рамках проводимого исследования. Венозную кровь забирали в вакуумные пробирки с ЭДТА (Kometaline, Россия). Процедуру проводили утром натощак. Вакутейнеры с кровью хранили при комнатной температуре не более 4 часов после забора крови. Для определения цитокинового статуса доноров изучали продукцию цитокинов IL-1β, IL-6, IL-18 и TNF-α в сыворотке доноров.

Приготовление растворимой МК (99+%, Thermo Fisher Scientific, США) проводили как описано в статье [18]. Исходный раствор МК (сток) был приготовлен следующим образом: 60 мг МК растворили в 70 мл дистиллированной воды, прогретой до 30°C. Затем с помощью 0,5 М NaOH раствор довели до pH 7,3. Конечная концентрация МК в 100 мл составляла 3,5 мМ. Раствор профильтровали через 0,22 микронный фильтр и аликвоты хранили в стерильных флаконах. В день эксперимента сток раствор МК прогревали до 37°C и разводили прогретой питательной средой RPMI («БиолоТ», Россия), содержащей 50 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина («БиолоТ», Россия). В поляризованном свете микроскопа кристаллы не были обнаружены ни в исходном 3,5 мМ растворе, ни в питательной среде, содержащей 1 мМ МК (данные не представлены).

Дизайн исследования. Цельную кровь доноров разводили питательной средой RPMI, содержащей 50 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина («БиолоТ», Россия). 200 мкл аликвоты десятикратно разбавленной крови с добавленной МК в концентрации 0,5 и 1 мМ разливали по лункам 96-луночного планшета (TPP, Швейцария) в

№ пациента	П МК 372,12	П МК 375,8	П МК 450	П МК 519	П МК 620
Пол	жен.	жен.	жен.	муж.	муж.
Возраст	68	66	63	47	43
Диагноз	подагрический артрит, обострение				
МК сыворотки, мкмоль/л	372,12	375,8	450	519	620
Количество деформированных суставов	0	0	3	2	2

Таблица 1. *Характеристика пациентов с подагрическим артритом из Клиник СамГМУ*

Table 1. *Profile of patients with gouty arthritis from the Clinics of the Samara State Medical University*

множественных репликах. Планшеты инкубировали при 37°C и 5% CO_2 в течение 16±4 часов. При оценке цитокинового статуса пациентов с острой формой подагры использовали пятикратно разбавленную кровь с добавленной МК в концентрации 1 мМ и полученные образцы разливали по 200 мкл на лунку в 96-луночный планшет (Biofil, Китай). Планшеты инкубировали при 37°C и 5% CO_2 в течение 22±4 часов. Через указанное время проводили отбор 100 мкл культуральной среды в 1,5 мл микропробирки, которые замораживали при -20°C для иммуноферментного анализа (ИФА).

Иммуноферментный анализ (ИФА). Образцы сывороток и культуральной среды клеток анализировали в соответствии с инструкциями производителя ИФА «Вектор-Бест» (ООО «Вектор», Россия). Чувствительность ИФА составляла 1; 0,5; 2 и 1 пг/мл для IL-1β, IL-6, IL-18 и TNF-α соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обычно для оценки цитокинового статуса больного исследуют уровень цитокинов в сыворотке или плазме. Для начала мы провели скрининг провоспалительных цитокинов в сыворотках доноров. Выбор был сделан в пользу нескольких провоспалительных молекул IL-1β, IL-6, IL-18 и TNF-α, которые описаны в литературе как принимающие участие в патогенезе подагры. Согласно опубликованным данным, средний уровень IL-1β, IL-6, IL-18 и TNF-α в сыворотках составлял 3,6±1,01; 4,7±0,84; 267,1±14,63; и 1,2±0,13 соответственно [31]. Анализ цитокинов в сыворотках здоровых доноров (СОКСПК) с помощью ИФА («Вектор-бест») продемонстрировал предельно низкие значения IL-1β и TNF-α на уровне порога детекции ИФА, а также показал донор-специфичное содержание цитокинов IL-6 и IL-18 (**рисунок 2А**). Примечательно, что уровни инфламмасом-регулируемых цитокинов IL-1β и IL-18 в сыворотке крови доноров кардинально отличались: IL-1β присутствовал в минимальных количествах (<10 пикограммы/мл), а концентрация IL-18 достигала 200 пг/мл.

По-видимому, это связано с конститутивной экспрессией IL-18 гена и альтернативными путями регуляции синтеза зрелых форм цитокина IL-18 [24, 32]. Нашей задачей было отработать *in vitro* стимуляцию клеток крови МК, имитируя условия ГУ. Учитывая, что формирование кристаллов *in vivo* возможно при сывороточном уровне МК >420–600 мкмоль/л, нами были выбраны две

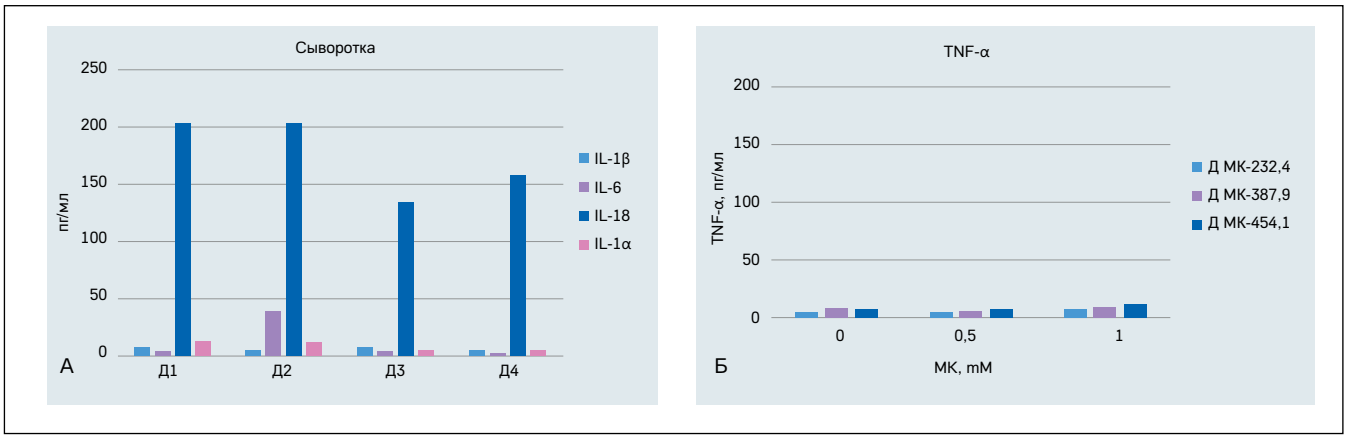

Рисунок 2. *(А) ИФА интерлейкинов в сыворотке доноров. (Б) Содержание TNF-α в культуральной среде клеток крови доноров с нормоурикемией (Д МК 232,4 и Д МК 387,9, с показателями мочевой кислоты в крови 232,4 и 387,9 мкмол/л соответственно) и гиперурикемией (ГУ МК 454,1, с показателем мочевой кислоты в крови 454,1 мкмол/л) при отсутствии (0) и присутствии мочевой кислоты (МК) в концентрации 0,5 и 1 мМ.*

Figure 2. *(A) Analysis of interleukins in donor serum by ELISA. (Б) The amount of TNF-α in the conditioned medium of blood cells, obtained from donors with normouricemia (Д МК 232.4 and Д МК 387.9, with an indicator of uric acid in the blood of 232.4 and 387.9 μmol/l, respectively) and hyperuricemia (ГУ МК 454.1, with an indicator of uric acid in the blood 454.1 μmol/l) in the absence (0) and the presence of uric acid (UA) at 0.5- and 1-mM concentration.*

концентрации МК: 0,5 мМ, что соответствует ГУ, и 1 мМ, что соответствует предельно высокой концентрации МК, при которой возможно образование кристаллов. Однако анализ среды RPMI, содержащей 1 мМ МК, в поляризационном свете микроскопа не обнаруживал кристаллы (данные не показаны). Чтобы быть уверенным, что концентрации МК соответствуют добавленным, был выбран донор с пограничным показателем МК в сыворотке 392,1 мкмоль/л и определены концентрации МК в культуральной среде десятикратно разбавленной крови данного донора с добавленной МК в конечной концентрации 0,5 и 1 мМ (**таблица 2**). Результаты анализа МК в культуральной среде 1 десятикратно разбавленных клеток крови донора сопоставимы с добавленным количествам МК.

Используя отработанные условия *in vitro* с добавлением 0,5 и 1 мМ МК в культуральную среду клеток, были проведены пилотные эксперименты по оценке продукции воспалительных цитокинов клетками крови доноров, у которых показания МК в сыворотке варьировали от нормальных (232,4 мкмоль/л) до соответствующих ГУ (454,1 мкмоль/л). Значения МК в сыворотке доноров указаны в идентификационном номере доноров – 232,4, 387,9 и 454,1 мкмоль/л соответственно. Результаты ИФА продемонстрировали фоновые показатели присутствия TNF-α в культуральной среде клеток крови доноров, инкубированных в присутствии повышенных концентраций МК (0,5 и 1 мМ). Чувствительность иммуноферментного анализа ИФА («Вектор-Бест») для TNF-α составляла 1 пг/мл. И хотя TNF-α концентрация в культуральной среде росла с увеличением концентрации МК, значения TNF-α варьировали в пределах 5–10 пг/мл, что недостаточно для диагностически значимой достоверности результатов, учитывая донор-специфические вариации (**рисунок 2Б**). При анализе продукции инфламмасом-регулируемого цитокина IL-1β мы столкнулись с проблемой существенной количественной вариабельности результатов, что требует более доскональных исследований (данные не приведены).

Клетки крови тех же доноров продуцировали значительные количества (сотни пикограмм на мл)

	Сыворотка донора	Десятикратно разбавленная кровь донора		
Добавленная МК (мкмоль/л)	0	0	535	1075
Результаты анализа МК (мкмоль/л)	392,1	43,1	607,3	916,8

Таблица 2. *Концентрация мочевой кислоты (МК) в сыворотке и культуральной среде клеток донора. Кровь донора с показателем МК в сыворотке 392,1 мкмол/л была десятикратно разбавлена средой RPMI, содержащей 0,535 и 1075 мкмоль/л МК, и затем концентрация МК в культуральной среде была определена с помощью анализатора крови BM/Hitachi 902*

Table 2. *The concentration of uric acid (UA) in the serum and cell growth medium of donor cells. Donor blood with a serum UA of 392.1 μmol/L was diluted 10-fold with RPMI medium containing 0.535 and 1075 μmol/L UA and then the concentration of UA in the cell growth medium was determined using a BM/Hitachi 902 blood analyzer*

провоспалительных цитокинов IL-6, IL-18 в ответ на повышенные концентрации мочевой кислоты в культуральной среде (**рисунок 3**).

При этом МК в концентрации 0,5 мМ не вызывала существенных изменений в продукции интерлейкинов IL-6, IL-18 (**рисунок 3**) и только в присутствии 1 мМ МК наблюдался выраженный стимулирующий эффект на продукцию данных цитокинов клетками крови доноров. Наиболее существенное 30–40-кратное увеличение продукции наблюдалось для инфламмасом-регулируемого цитокина IL-18, что делает его потенциальном маркером для анализа пациентов с ГУ. Интересно, что при оценке воспалительных цитокинов IL-6 в тех же образцах культуральных сред наблюдался обратный эффект продукции данного цитокина по сравнению с IL-18. В образцах клеток крови пациента с высоким содержанием МК (454,1) наблюдалась минимальная продукция IL-6. IL-6 описан как цитокин, значения которого повышены в плазме больных подагрой в период обострения, но не у пациентов с подагрой в период ремиссии [13]. Нас заинтересовал эффект обратной корреляции продукции IL-18 и IL-6 при *in vitro* стимуляции МК крови доноров. Были выбраны пациенты с подагрическим артритом в период обострения и проведен *in vitro* анализ

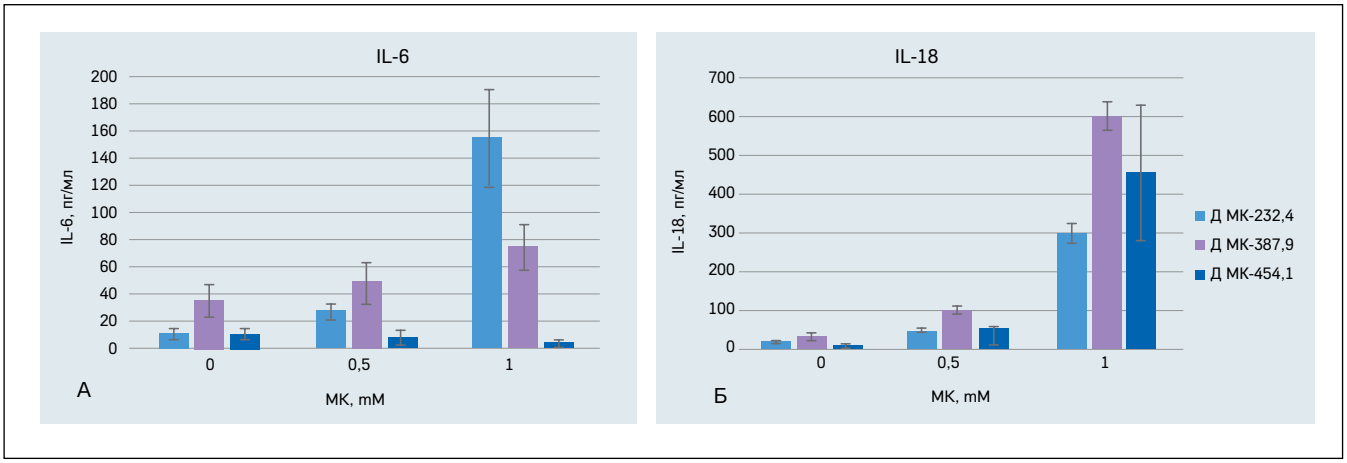

Рисунок 3. *ИФА IL-6 и IL-18 в культуральной среде, содержащей клетки крови доноров (Д с показателями МК в крови 232,4 и 387,9 мкмол/л соответственно) и пациента с гиперурикемией (ГУ с показателем МК в крови 454,1) в отсутствии (0) и присутствии МК (0,5 и 1 мМ).*

Figure 3. *ELISA analysis for IL-6 and IL-18 in a cell growth medium containing blood cells from donors (Д with UA in blood 232.4 and 387.9 μmol/L, respectively) and a patient with hyperuricemia (ГУ with UA in blood 454.1) in the absence of (0) and the presence of UA (0.5 and 1 mM).*

продукции IL-18 и IL-6 клетками крови данных пациентов в сравнении с потенциально здоровыми донорами (**рисунок 4**). При клиническом обострении подагры продукция IL-6 в культуральную среду клетками пациентов (П МК) была снижена, в то время как клетки потенциально здоровых доноров продолжали вырабатывать IL-6 (**рисунок 4А**). Анализ этих же культуральных сред показал активность клеток пациентов с подагрическим артритом в период обострения вырабатывать повышенные количества IL-18 в присутствии МК (**рисунок 4Б**), что соответствует литературным данным о повышенном содержании IL-18 в сыворотках больных с острой формой подагры.

Несмотря на пилотные исследования с маленькой выборкой пациентов, можно сказать, что эти результаты подтверждают наше предположение, что *in vivo* сенсибилизированные сигналом 1 клетки крови больных подагрой реагируют на стимуляцию МК иначе, чем клетки крови здоровых доноров.

Разработанная гиперурикемическая гемотест-система *in vitro* для анализа ГУ стимулированной активности инфламмасом пациентов является более адекватной моделью, чем цельная кровь или сыворотка, поскольку используются уже *in vivo* сенсибилизированные сигналом 1 клетки крови пациентов, природа которого до конца не выяснена, и в культуральную среду можно подобрать четко заданные концентрации МК (сигнал 2) и таким образом оптимизировать экспериментальные условия *in vitro*. Сывороточные значения большинства цитокинов находятся на границе уровня детекции, и их накопление в сыворотке зависит от многих факторов. Гиперурикемическая гемотест-система позволяет увеличить уровень детекции цитокинов по сравнению с сывороткой и при этом четко контролировать концентрацию сигнальных молекул, характерных для того или иного заболевания.

Недостатком данного подхода является чувствительность клеток к изменениям температуры, состава питательной

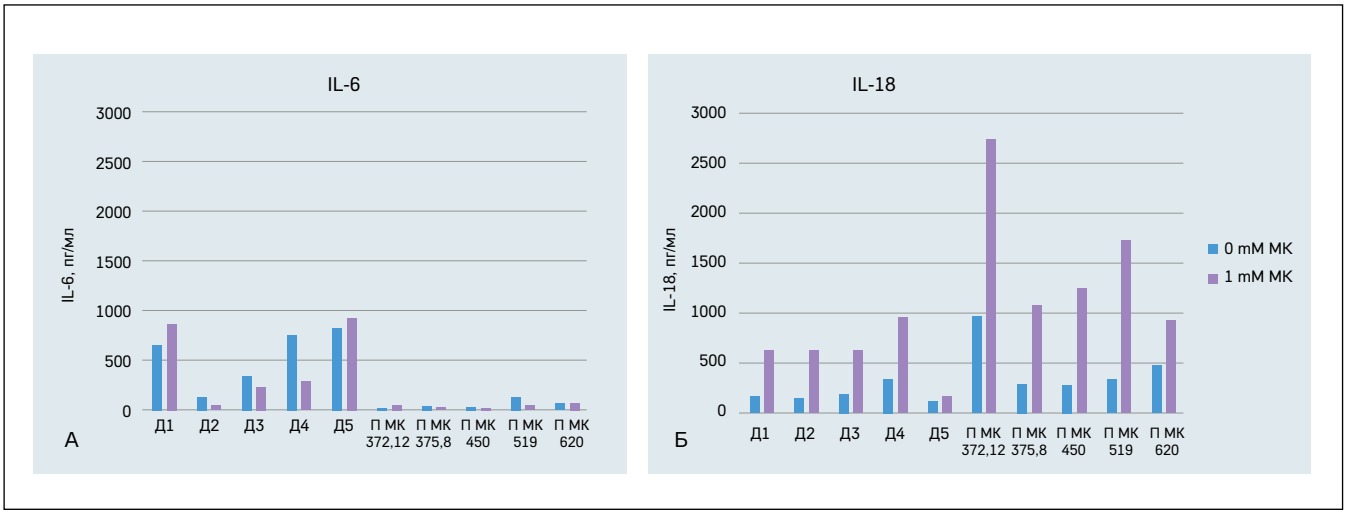

Рисунок 4. *ИФА IL-6 и IL-18 в культуральной среде, содержащей клетки крови доноров (Д) и пациентов с подагрическим артритом в период обострения в отсутствии (0) и присутствии мочевой кислоты (1 мМ МК).*

Figure 4. *ELISA analysis of IL-6 and IL-18 in a cell growth medium containing blood cells of donors (Д) and patients with acute gouty arthritis in the absence (0) and the presence of uric acid (1 mM UA).*

среды, производителю планшетов и ИФА, что влияет на количественные значения цитокинов. В частности, с такой проблемой мы столкнулись при анализе продукции инфламмасомного цитокина IL-1 (данные не приведены). Разрешить проблему количественных вариаций поможет нахождение закономерной корреляции в продукции нескольких цитокинов при равных условиях. Тогда после масштабированного исследования пациентов можно ввести индексы корреляции, характерные для той или иной патологии.

Выраженный эффект обратной корреляции между продукцией инфламмасомного интерлейкина IL-18 и цитокина широкого спектра действия IL-6 клетками крови пациентов с ГУ (включая больных с подагрическим артритом в период обострения) в условиях *in vitro* представляет собой особый научный интерес и требует дальнейших более масштабированных исследований в рамках создания гиперурикемической гемотест-системы для персонифицированной диагностики.

ВЫВОДЫ

В рамках создания персонифицированной клеточной тест-системы разработаны *in vitro* условия стимуляции МК клеток крови от индивидуальных доноров. Показано, что разработанная гиперурикемическая гемотест-система, основанная на использовании разведенной питательной средой крови индивидуальных доноров, может служить адекватной клеточной моделью *in vitro* для изучения влияния сигнальных молекул воспаления. Результаты анализа гиперурикемической гемотест-системы *in vitro* с использованием разбавленной крови потенциально здоровых доноров и пациентов, клетки которых были сенсибилизированы в условиях *in vivo* к присутствию специфичных факторов, характерных для подагры, показали различия в продукции цитокинов IL-18 и IL-6. Это может быть использовано в персонифицированной диагностике для прогнозирования развития не только подагры, но и других патологий.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ	ADDITIONAL INFORMATION
Источник финансирования. Исследование финансировалось при поддержке госзадания (номер государственного учета в системе ЕГИСУ НИОКТР 122020100107-2).	***Study funding.*** The study was funded by the state assignment (№122020100107-2).
Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с содержанием настоящей статьи.	***Conflict of Interest.*** The authors declare that there are no obvious or potential conflicts of interest associated with the content of this article.
Участие авторов. Л.Т. Волова – инициирование и организация исследования; редактирование рукописи. Е.И. Пугачев – проведение экспериментальных исследований; анализ результатов исследования. Т.В. Старикова – проведение экспериментальных исследований. П.А. Лебедев – организация теоретической и клинической части исследований; интерпретация результатов исследования. И.А. Шафиева – координация сбора лабораторного материала. С.И. Кузнецов – координация сбора лабораторного материала. О.А. Гусякова – организация и проведение лабораторных исследований. Г.Н. Светлова – координация исследования. Н.К. Осина – оформление дизайна исследования; интерпретация результатов исследования. Все авторы одобрили финальную версию статьи перед публикацией, выразили согласие нести ответственность за все аспекты работы, подразумевающую надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с точностью или добросовестностью любой части работы.	***Contribution of individual authors.*** L.T. Volova – initiated and managed the study; was responsible for manuscript editing. E.I. Pugachev – conducted experimental studies; provided detailed analysis of study results. T.V. Starikova – conducted experimental studies. P.A. Lebedev – managed theoretical and clinical part of the study; provided interpretation of study results. I.A. Shafieva – coordinated the laboratory material collection. S.I. Kuznetsov – coordinated the laboratory material collection. O.A. Gusyakova – managed the laboratory tests. G.N. Svetlova – coordinated the study. N.K. Osina – was responsible for study design; provided interpretation of study results. All authors gave their final approval of the manuscript for submission, and agreed to be accountable for all aspects of the work, implying proper study and resolution of issues related to the accuracy or integrity of any part of the work.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Lebedev PA, Garanin AA, Novichkova NL. Pharmacotherapy of gout – modern approaches and prospects. *Sovremennaya revmatologiya.* 2021;15(4):107-112. (In Russ.). [Лебедев П.А., Гаранин А.А., Новичкова Н.Л. Фармакотерапия подагры – современные подходы и перспективы. *Современная ревматология.* 2021;15(4):107-112]. https://doi.org/10.14412/1996-7012-2021-4-107-112

2. Roumeliotis A, Dounousi E, Eleftheriadis T, et al. Dietary antioxidant supplements and uric acid in chronic kidney disease: a review. *Nutrients*. 2019;11(8):1911. https://doi.org/10.3390/nu11081911

3. Bos MJ, Koudstaal PJ, Hofman A, et al. Uric acid is a risk factor for myocardial infarction and stroke: The Rotterdam Study. *Stroke*. 2006;37(6):1503-1507. https://doi.org/10.1161/01.STR.0000221716.55088.d4

4. Kim K, Kang K, Sheol H, et al. The Association between Serum Uric Acid Levels and 10-Year Cardiovascular Disease Risk in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Patients. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(3):1042. https://doi.org/10.3390/ijerph19031042

5. Duan X, Ling F. Is uric acid itself a player or a bystander in the pathophysiology of chronic heart failure? *Med Hypotheses*. 2008;70(3):578-581. https://doi.org/10.1016/j.mehy.2007.06.018

6. Yanai H, Adachi H, Hakoshima M, Katsuyama H. Molecular biological and clinical understanding of the pathophysiology and treatments of hyperuricemia and its association with metabolic syndrome, cardiovascular diseases and chronic kidney disease. *Int J Mol Sci*. 2021;22(17):9221. https://doi.org/10.3390/ijms22179221

7. Feig DI, Johnson RJ. Hyperuricemia in childhood primary hypertension. *Hypertension*. 2003;42(3):247-252. https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000085858.66548.59

8. Stamp L, Dalbeth N. Screening for hyperuricaemia and gout: A perspective and research agenda. *Nature Reviews Rheumatology.* 2014;10(12):752-756. https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.139

9. Bhole V, De Vera M, Rahman MM, et al. Epidemiology of gout in women: Fifty-two-year followup of a prospective cohort. *Arthritis Rheum*. 2010;62(4):1069-1076. https://doi.org/10.1002/art.27338

10. Richette P, Doherty M, Pascual E, et al. 2018 updated European League against Rheumatism evidence-based recommendations for the diagnosis of gout. *Ann Rheum Dis*. 2020;79(1):31-38. https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-215315

11. Shiozawa A, Szabo SM, Bolzani A, et al. Serum uric acid and the risk of incident and recurrent gout: A systematic review. *J Rheumatol*. 2017;44(3):388-396. https://doi.org/10.3899/jrheum.160452

12. Scanu A, Oliviero F, Ramonda R, et al. Cytokine levels in human synovial fluid during the different stages of acute gout: Role of transforming growth factor β1 in the resolution phase. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(4):621-624. https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2011-200711

13. Jiang X, Li M, Yang Q, et al. Oxidized Low Density Lipoprotein and Inflammation in Gout Patients. *Cell Biochem Biophys*. 2014;69(1):65-69. https://doi.org/10.1007/s12013-013-9767-5

14. Cavalcanti NG, Marques CDL, Lins TU, et al. Cytokine Profile in Gout: Inflammation Driven by IL-6 and IL-18? *Immunol Invest*. 2016;45(5):383-395. https://doi.org/10.3109/08820139.2016.1153651

15. Verma AK, Hossain MS, Ahmed SF, et al. In silico identification of ethoxy phthalimide pyrazole derivatives as IL-17A and IL-18 targeted gouty arthritis agents. *J Biomol Struct Dyn*. 2022;41(1):1-15. https://doi.org/10.1080/07391102.2022.2071338

16. Tran AP, Edelman J. Interleukin-1 inhibition by anakinra in refractory chronic tophaceous gout. *Int J Rheum Dis*. 2011;14(3):33-37. https://doi.org/10.1111/j.1756-185X.2011.01629.x

17. So AK, Martinon F. Inflammation in gout: Mechanisms and therapeutic targets. *Nat Rev Rheumatol*. 2017;13(11):639-647. https://doi.org/10.1038/nrrheum.2017.155

18. Braga TT, Forni MF, Correa-Costa M, et al. Soluble Uric Acid Activates the NLRP3 Inflammasome. *Sci Rep*. 2017;7:1-14. https://doi.org/10.1038/srep39884

19. Spel L, Martinon F. Inflammasomes contributing to inflammation in arthritis. *Immunol Rev*. 2020;294(1):48-62. https://doi.org/10.1111/imr.12839

20. Cavalcanti NG, Bodar E, Netea MG, et al. Crystals of monosodium urate monohydrate enhance lipopolysaccharide-induced release of interleukin 1-β by mononuclear cells through a caspase 1-mediated process. *Ann Rheum Dis*. 2016;68(2):273-278. https://doi.org/10.1136/ard.2007.082222

21. Malyshev IY, Pihlak AE, Budanova OP. Molecular and Cellular Mechanisms of Inflammation in Gout. *Pathogenesis*. 2019;17(4):4-13. (In Russ.). [Малышев И.Ю., Пихлак А.Э., Буданова О.П. Молекулярные и клеточные механизмы воспаления при подагре. *Патогенез*. 2019;17(4):4-13]. https://doi.org/10.25557/2310-0435.2019.04.4-13

22. Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 2006;440(7081):237-241. https://doi.org/10.1038/nature04516

23. Prencipe G, Bracaglia C, De Benedetti F. Interleukin-18 in pediatric rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol*. 2019;31(5):421-427. https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000634

24. Kaplanski G. Interleukin-18: Biological properties and role in disease pathogenesis. *Immunol Rev*. 2018;281(1):138-153. https://doi.org/10.1111/imr.12616

25. Takahashi M. NLRP3 inflammasome as a novel player in myocardial infarction. *Int Heart J*. 2014;55(2):101-105. https://doi.org/10.1536/ihj.13-388

26. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, et al. Activated By Cholesterol Crystals That Form Early in Disease. *Nature*. 2010;464(7293):1357-1361. https://doi.org/10.1038/nature08938.NLRP3

27. Liu W, Yin Y, Zhou Z, et al. OxLDL-induced IL-1beta secretion promoting foam cells formation was mainly via CD36 mediated ROS production leading to NLRP3 inflammasome activation. *Inflamm Res*. 2014;63(1):33-43. https://doi.org/10.1007/s00011-013-0667-3

28. Pirozhkov SV, Litvitskiy PF. Inflammasomal diseases. *Immunologiya*. 2018;39(2):158-165. (In Russ.). [Пирожков С.В., Литвицкий П.Ф. Инфламмасомные болезни. *Иммунология*. 2018;39(2):158-165]. https://doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-2-3-158-165

29. Volova LT, Osina NK, Kuznetsov SI, et al. Donor-specific production of cytokines by blood cells under the influence of immunomodulators: New aspects of a personalized approach in medicine. *Science and Innovations in Medicine*. 2022;7(4):250-257. (In Russ.). [Волова Л.Т., Осина Н.К., Кузнецов С.И., и др. Донор-специфичная продукция цитокинов клетками крови под влиянием иммуномодуляторов: новые аспекты персонифицированного подхода в медицине. *Наука и инновации в медицине*. 2022;7(4):250-257]. https://doi.org/10.35693/2500-1388-2022-7-4-250-257

30. Damsgaard CT, Lauritzen L, Calder PC, et al. Whole-blood culture is a valid low-cost method to measure monocytic cytokines – A comparison of cytokine production in cultures of human whole-blood, mononuclear cells and monocytes. *J Immunol Methods*. 2009;340(2):95-101. https://doi.org/10.1016/j.jim.2008.10.005

31. Zaitseva GA, Vershinina OA, Matrokhina OI, et al. Cytokine status of blood donors and its components. *Fundamental research*. 2011;3:61-65. (In Russ.). [Зайцева Г.А., Вершинина О.А., Матрохина О.И., и др. Цитокиновый статус доноров крови и ее компонентов. *Фундаментальные исследования*. 2011;3:61-65].

32. Miyazawa H, Wada T. Immune-mediated inflammatory diseases with chronic excess of serum interleukin-18. *Front Immunol*. 2022;13:1-14. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.930141