

УДК 616-092

## Антивоспалительный искусственно запрограммированный М3 фенотип макрофагов ограничивает кристалл-индуцированное подагрическое воспаление *in vitro*

Калиш С.В.<sup>1</sup>, Лямина С.В.<sup>1</sup>, Кузнецова Л.В.<sup>1</sup>, Буданова О.П.<sup>2</sup>, Логачев В.А.<sup>1</sup>, Пихлак А.Э.<sup>1</sup>, Малышев И.Ю.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
127473, Москва, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»  
125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

Подагра является частой причиной воспалительного артрита, разрушения суставов, образования камней в почках и почечной недостаточности. Причиной воспаления в суставе является взаимодействие кристаллов мочевой кислоты (monosodium urate – MSU) и пирофосфата кальция (calcium pyrophosphate – CaPP) с макрофагами. Мы предположили, что подавлять кристалл-индуцированное воспаление мог бы М3 фенотип макрофагов, который увеличивает продукцию противовоспалительных цитокинов при действии воспалительных индукторов (АВ-М3 фенотип).

**Цель работы** состояла в проверке этой гипотезы.

**Методы.** Подагрическое воспаление моделировали с помощью добавления кристаллов MSU и CaPP к культуре макрофагов. Для программирования АВ-М3 фенотипа использовали ингибитор инфламмосомы MCC950 и IL-4. Воспалительную реакцию оценивали по продукции IL-1b и TGFb1.

**Результаты.** Реакция нативных (M0) макрофагов и на кристаллы MSU, и на кристаллы CaPP воспроизвела острое подагрическое воспаление в форме 3-кратного увеличения продукции IL-1b ( $p < 0,05$ ). При добавлении кристаллов MSU к АВ-М3 макрофагам содержание IL-1b в культуральной среде было меньше в 25 раз ( $p < 0,05$ ), а содержание TGFb больше почти в 2 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению со средой M0 макрофагов с кристаллами MSU. Аналогичный результат был получен при добавлении кристаллов CaPP к АВ-М3 макрофагам.

**Заключение.** Таким образом, АВ-М3 фенотип отвечает на провоспалительное действие кристаллов MSU и CaPP снижением продукции IL-1b и усилением продукции TGFb1. Результаты работы подтвердили гипотезу о том, что АВ-М3 фенотип может ограничить кристалл-индуцированное воспаление. Соответственно, разработка клинической версии технологии АВ-М3 макрофагов представляется весьма перспективной.

**Ключевые слова:** макрофаги; подагра; кристаллы мочевой кислоты; кристаллы пирофосфата кальция; воспаление; инфламмосома; IL-1b.

**Для цитирования:** Калиш С.В., Лямина С.В., Кузнецова Л.В., Буданова О.П., Логачев В.А., Пихлак А.Э., Малышев И.Ю.

Антивоспалительный искусственно запрограммированный М3 фенотип макрофагов ограничивает кристалл-индуцированное подагрическое воспаление *in vitro*. Патогенез. 2020; 18(2): 45-52.

**DOI:** 10.25557/2310-0435.2020.02.45-52

**Для корреспонденции:** Малышев Игорь Юрьевич, e-mail: iymalyshev1@gmail.com

**Финансирование.** Работа проведена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) совместно с Японским фондом медицинских исследований, Договор № 18-515-57003\18 от 24.05.2018

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 29.02.2020

## The anti-inflammatory, artificially programmed M3 macrophage phenotype restricts crystal-induced gouty inflammation *in vitro*

Kalish S.V.<sup>1</sup>, Lyamina S.V.<sup>1</sup>, Kuznetsova L.V.<sup>1</sup>, Budanova O.P.<sup>2</sup>, Logachev V.A.<sup>1</sup>, Pikhak A.E.<sup>1</sup>, Malyshev I.Yu.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry,  
Delegatskaya Str. 20, Bldg. 1, Moscow 127473, Russian Federation

<sup>2</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology,  
Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

Gout is a common cause of inflammatory arthritis, joint damage, kidney stones, and kidney failure. Joint inflammation is induced by interaction of uric acid (monosodium urate, MSU) crystals and calcium pyrophosphate (CaPP) crystals with macrophages. We hypothesized that the crystal-induced inflammation could be suppressed by the M3 switch phenotype, which increases production of anti-inflammatory cytokines under the action of inflammation inducers (AB-M3 phenotype).

**The aim of the present study** was to test this hypothesis.

**Methods.** Gouty inflammation was modeled by adding MSU and CaPP crystals to cultured macrophages. The inflammasome inhibitor, MCC950, and IL-4 were used for programming the AB-M3 phenotype. The inflammatory response was evaluated by production of IL-1 $\beta$  and TGFb1.

**Results.** The response of native (M0) macrophages to either MSU crystals or CaPP crystals reproduced acute gouty inflammation in the form of a 3-fold increase in IL-1 $\beta$  production ( $p < 0.05$ ). When MSU crystals were added to AB-M3 macrophages, the IL-1 $\beta$  content in the culture medium became 25 times lower ( $p < 0.05$ ), and the TGF- $\beta$ 1 content became almost twice higher ( $p < 0.05$ ) than the respective values in the M0 macrophage medium with MSU crystals. A similar result was obtained when CaPP crystals were added to AB-M3 macrophages.

**Conclusion.** The AB-M3 phenotype responds to the pro-inflammatory action of MSU and CaPP crystals by decreasing the IL-1 $\beta$  production and increasing the TGF- $\beta$ 1 production. These results confirmed the hypothesis that the AB-M3 phenotype restricts the crystal-induced production of inflammatory IL-1 $\beta$  and increases the production of anti-inflammatory TGF- $\beta$ 1. Therefore, development of a clinical version of the AB-M3 macrophage technology is very promising.

**Key words:** macrophages; gout; uric acid crystals; calcium pyrophosphate crystals; inflammation, inflammasome, IL-1 $\beta$ .

**For citation:** Kalish S.V., Lyamina S.V., Kuznetsova L.V., Budanova O.P., Logachev V.A., Pikhla A.E., Malyshev I.Yu. [The anti-inflammatory, artificially programmed M3 macrophage phenotype restricts crystal-induced gouty inflammation *in vitro*]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2020; 18(2): 45-52. (in Russian)

**DOI:** 10.25557/2310-0435.2020.02.45-52

**For correspondence:** Malyshev Igor Yurievich, e-mail: iymalyshev1@gmail.com

**Financing.** The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR) jointly with the Japanese Foundation for Medical Research, Agreement #18-515-57003 \ 18 of 05.24.2018

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Received:** 29.02.2020

### Основные сокращения:

**AB-M3** – антивоспалительный M3 фенотип макрофагов (фенотип переключения); **CaPP** (calcium pyrophosphate) – кристаллы пирофосфата кальция; **IL-1 $\beta$**  – провоспалительный цитокин; **MCC950** – диарилсульфонилмочевина-содержащее соединение; **MSU** (monosodium urate) – кристаллы урата мононатрия; **NF- $\kappa$ B** – фактор транскрипции; **NLRP3 инфламасома** – инфламасома, которая ответственна за активацию каспазы-1; **TGF- $\beta$ 1** – антивоспалительный цитокин; **TLR** – лиганды Toll-подобных рецепторов.

### Введение

Подагра является распространенной формой кристаллической артропатии, самой частой причиной воспалительного артрита, прогрессирующего разрушения суставов, а также образования камней в почках и развития почечной недостаточности [1]. В России подагра выявляется у 0,1%, а в США и Европе – у 2% жителей. В возрастной группе 50-60 лет подагрой болеют 4-6% [1]. Это заболевание характеризуется гиперурикемией (концентрация мочевой кислоты в крови превышает 7 мг/л) и отложением кристаллов моноурата натрия (monosodium urate, MSU) в суставах, мочевых путях и мягких тканях. Основной причиной гиперурикемии являются генетические факторы, которые повышают продукцию, реабсорбцию и/или снижают экскрецию мочевой кислоты с мочой, а факторами риска – ожирение, алкоголь и животный белок в больших количествах.

При высоких концентрациях мочевой кислоты образуются кристаллы MSU. Эти кристаллы могут инициировать воспаление в суставе и провоцировать приступ подагры. Кроме кристаллов MSU, кристаллы пирофосфата кальция (calcium pyrophosphate, CaPP) также могут вносить вклад в рецидивирующие воспалительные вспышки в суставах [2]. Отложение кри-

сталлов также может быть следствием гормональных нарушений, терапии глюкокортикостероидами, перенесённой менискэктомии, накопления амилоида и метаболических изменений в суставе.

Кристаллы MSU и CaPP индуцируют воспалительную реакцию схожим образом – путем активации макрофагов. Макрофаги взаимодействуют с обнаженной поверхностью кристалла и/или с белками, адсорбированными на его поверхности, или посредством прямого контакта плазматической мембраны с кристаллом, или посредством связывания клеточных рецепторов с ним [3, 4]. На поверхности макрофага кристаллы MSU и CaPP могут связываться с Toll-подобными рецепторами (TLR) 2 и 4, Fc-рецептором CD16, интегрином CD11b/CD18 и рецептором иммуноглобулина на миелоидной клетке 1 [5]. Взаимодействие кристаллов с макрофагами стимулирует внутриклеточные пути активации фактора транскрипции NF- $\kappa$ B и инфламасомы NLRP3 [6]. NF- $\kappa$ B активирует экспрессию воспалительных медиаторов, включая предшественник IL-1b (про-IL-1b) и компоненты инфламасомы [5]. Активная инфламасома NLRP3 позволяет каспазе-1 расщеплять про-IL-1 $\beta$  до зрелого IL-1 $\beta$  [6].

IL-1 $\beta$  определяет специфику кристалл-индуцированного воспаления [5]. IL-1 $\beta$  активирует NF- $\kappa$ B, а NF- $\kappa$ B, в свою очередь – синтез про-IL-1b и компонентов инфламасомы [5]. В результате формируется положительная обратная связь кристалл-индуцированного воспаления. Клинически это проявляется приступом подагрического артрита, гипертермией сустава и лихорадкой. IL-1 $\beta$  стимулирует выработку ферментов, разрушающих костную и хрящевую ткани. Это может привести к необратимым изменениям в суставе.

Особенностью подагры является чередование приступов с периодами ремиссии. В разрешении воспаления при подагре участвуют клетки, которые индуцировали воспаление – макрофаги. Завершение воспалительного ответа макрофагов сопровождается

усилением продукции TGF-β1. У пациентов это приводит к увеличению содержания TGF-β1 в синовиальной жидкости и спонтанному разрешению приступа подагры [7].

Таким образом, кристалл-индуцированная активация макрофагов на продукцию IL-1β, с переключением на TGF-β1 формирует клиническую картину подагрического приступа с последующим разрешением.

Существующая терапия подагры недостаточно эффективна, часто сопровождается побочными эффектами и рисками развития инфекционных и онкологических заболеваний. Для лечения подагры используют: (1) традиционную терапию глюкокортикоидами, нестероидными противовоспалительными средствами и колхицином; (2) анти-IL-1β терапию антителами к IL-1β (канакинумаб) и антагонистами рецепторов IL-1β (анакинра).

В Евросоюзе канакинумаб был официально одобрен для лечения приступов подагры, не восприимчивых к традиционной терапии [8]. Однако в США для лечения подагры этот препарат не рекомендован из-за риска развития иммуносупрессии и высокой стоимости [9]. Анакинра является более предпочтительным анти-IL-1β препаратом, благодаря короткому периоду полураспада и более низкой стоимости [10].

Также идет активный поиск малых молекул, способных ингибировать киназы, связанные с IL-1β или инфламмасомы NLRP3 [5].

Потребность в эффективных и безопасных способах лечения подагры стимулировало разработку клеточной противовоспалительной терапии на основе макрофагов [11, 12]. Макрофаги могут иметь или воспалительный

M1, или противовоспалительный M2 фенотип. Была высказана гипотеза о том, что увеличение количества M2 макрофагов в зоне воспаления будет способствовать подавлению воспалительной реакции [13]. Действительно, при артрите адоптивный трансфер макрофагов был терапевтически эффективным [14]. Однако фенотип макрофагов зависит от микроокружения. Введение M2 макрофагов в зону воспаления не приводило к стойкому противовоспалительному эффекту, потому что воспалительная среда быстро перепрограммировала M2 макрофаги в провоспалительный M1 фенотип.

Мы предположили, что эффективно подавлять кристалл-индуцированное воспаление мог бы особый противовоспалительный M3 фенотип переключения (AB-M3 фенотип) [15], который, в отличие от M2 макрофагов, способен увеличивать продукцию противовоспалительных цитокинов в ответ на действие воспалительных индукторов.

Цель настоящей работы состояла в проверке этой гипотезы путем получения AB-M3 макрофагов и оценки их эффективности на *in vitro* модели подагрического воспаления.

При разработке способа программирования AB-M3 макрофагов мы исходили из представлений о дихотомии провоспалительного сигнала в макрофагах [16] и из того, что продуцентом IL-1β при подагре является инфламмасома (рис. 1). Логика программирования AB-M3 фенотипа состояла в том, чтобы при действии кристаллов заблокировать внутриклеточный провоспалительный сигнал, идущий через активацию инфламмасомы, и сохранить противовоспалительный сигнал, идущий на активацию продукции TGF-β1.

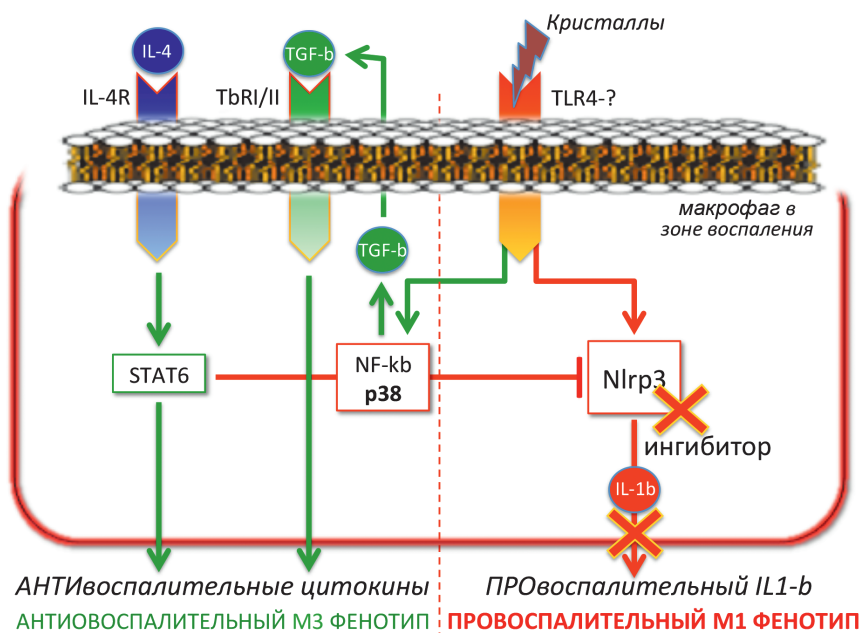


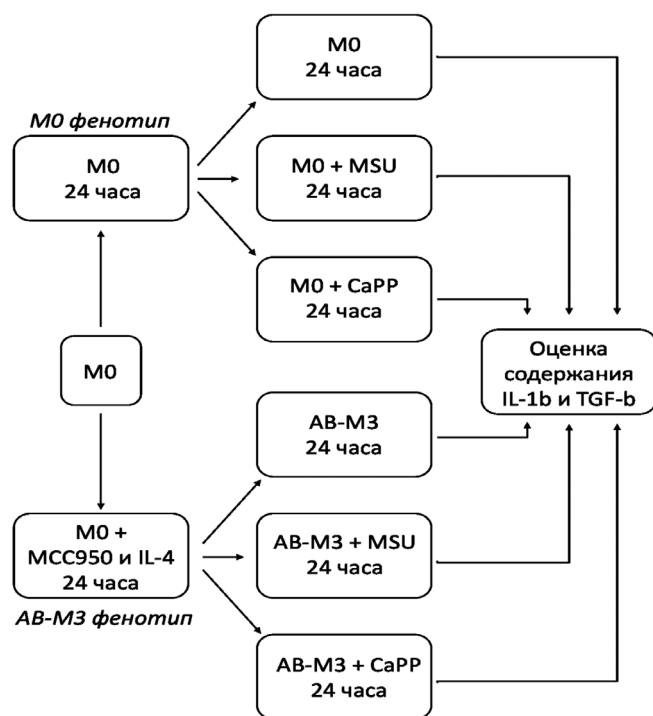
Рис. 1. Переключение внутриклеточного сигнала от кристаллов на формирование AB-M3 фенотипа с помощью ингибитора NLRP3 и IL-4.

Для программирования АВ-М3 фенотипа мы использовали два фактора: MCC950 – ингибитор инфламмосомы NLRP3 [5, 16] в концентрации 5 мкмоль/мл (24 часа) для блокады провоспалительного кристалл-индуцированного внутриклеточного пути, предполагая, что кристалл-индуцированный сигнал, идущий на активацию синтеза TGF- $\beta$ , будет сохранен; и IL-4 – противовоспалительный цитокин в концентрации 40 нг/мл для дополнительного ингибирования инфламмосомы и стимуляции секреции противовоспалительных цитокинов.

## Материалы и методы исследования

**Экспериментальные животные.** Моделирование подагры *in vitro* проводили с помощью перитонеальных макрофагов мышей самцов линии C57/BL6J весом  $23,8 \pm 1,8$  г из вивария Андреевка (Москва, Россия). Всего было использовано 20 мышей.

Эксперименты проводили в соответствии с руководством ВОЗ по биомедицинским исследованиям. Протокол соответствия запланированного (протокол № 4 от 02.09.2019) и выполненного научного исследования (протокол № 1 от 20.02.2020) этическим принципам обращения с животными был утвержден Комитетом по этике ФГБНУ НИИОПП.



**Рис. 2.** Экспериментальный дизайн. Перитонеальные макрофаги M0 фенотипа были поделены на два пула клеток: макрофаги M0 фенотипа – культивирование в стандартных условиях 24 часа и макрофаги M0 фенотипа – культивирование в течение 24 часов в среде с добавлением MCC950 и IL-4. Эта группа позволила получить АВ-М3 фенотип макрофагов.

**Реактивы.** Mouse IL-4 (США, Invitroge кат. PMC0045), FBS (США, Gibco2017, кат SH30071), культуральная среда DMEM/F12 (Россия, ПанЭко, кат. С470п), PBS приготовленный из NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, антибиотики (США, Thermo Scientific, кат. SV300102015), кристаллы MSU (США, Invivogen, кат. 1198-77-2), ингибитор инфламмосомы (США, Invivogen, кат. MCC950), кристаллы CaPP приготовленные из CaCl<sub>2</sub> и NaPP. Экспериментальный дизайн представлен на **рис. 2**.

Затем и в первом и во втором пуле среда культивирования была заменена на новую, каждый пул макрофагов был разделен на 3 группы и культивирование было продолжено:

«M0» – культивирование в стандартных условиях без кристаллов в течение 24 часов. Эта группа позволила оценить продукцию IL-1b и TGF-b1 M0 макрофагами в течение одного дня в стандартных условиях.

«M0 + MSU» – культивирование в стандартных условиях с кристаллами MSU в течение 24 часов. Эта группа позволила оценить эффект кристаллов MSU на продукцию IL-1b и TGF-b1 M0 макрофагами в стандартных условиях культивирования.

«M0 + CaPP» – культивирование в стандартных условиях с кристаллами CaPP в течение 24 часов. Эта группа позволила оценить эффект кристаллов CaPP на продукцию IL-1b и TGF-b1 M0 макрофагами в стандартных условиях культивирования.

«AB-M3» – культивирование АВ-М3 макрофагов без кристаллов с MCC950 и IL-4 в течение 24 часов. Эта группа позволила оценить эффект АВ-М3 макрофагов на секрецию IL-1b и TGF-b1 в течение 24 часов.

«AB-M3 + MSU» – культивирование АВ-М3 макрофагов с кристаллами MSU, MCC950 и IL-4 в течение 24 часов. Эта группа позволила оценить эффект MSU на секрецию IL-1b и TGF-b1 АВ-М3 макрофагами в течение 24 часов.

«AB-M3 + CaPP» – культивирование АВ-М3 макрофагов с кристаллами CaPP, MCC950 и IL-4 в течение 24 часов. Эта группа позволила оценить эффект CaPP на секрецию IL-1b и TGF-b1 АВ-М3 макрофагами в течение 24 часов.

**Выделение перитонеальных макрофагов.** За 48 часов до выделения макрофагов, мышам в/б вводили 1,5 мл 5% раствора пептонного бульона (37°C). Выделение макрофагов проводили из перитонеального смыва. Перитонеальный смыв центрифугировали 5 мин при 1500 об/мин при 4°C и проводили четырехкратную отмывку клеточного осадка раствором PBS (4°C). Клеточный осадок ресуспендировали в 1 мл среды RPMI-1640 без FBS. В камере Горяева подсчитывали количество клеток и определяли их жизнеспособность с помощью трипанового синего ([http://www.hyclone.com/pdf/procedure\\_assay.pdf](http://www.hyclone.com/pdf/procedure_assay.pdf)). Процент живых клеток был не менее 95%. После этого готовили суспензию клеток 1,2 млн/мл в среде RPMI 1640 без FBS. Для отделения макрофагов от других клеток суспензию помещали в лунки 48-луночного планшета по 0,5 мл в каждую лунку. Плашки убирали в

CO<sub>2</sub>-инкубатор (5% CO<sub>2</sub>, 37°C). Через 1 час среду вместе с неадгезировавшимися клетками (около 100 тыс. клеток на лунку) удаляли и заменяли на 0,5 мл среды RPMI-1640 с 10% FBS, 2 ммоль/л L-глутамин, 100 Ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. В лунках оставалось по 500 тыс. прикрепившихся ко дну макрофагов.

**Приготовление кристаллов.** Использовали два типа кристаллов: кристаллы MSU, размер которых (150 мкм) был больше макрофагов (15-80 мкм) и не позволял макрофагам фагоцитировать эти кристаллы, и кристаллы СаРР, размер которых (15-20 мкм) был меньше или сопоставим с размером макрофагов, и макрофаги, возможно, могли фагоцитировать СаРР. Из сухих кристаллов готовили суспензию кристаллов MSU и суспензию кристаллов СаРР с концентрацией 5 мкг/мл. Суспензии автоклавились при 120°C в течение 20 мин.

**Моделирование подагрического воспаления in vitro** проводили на основе работ Sil P. и соавт., Jeong JH и соавт. [2, 17] с помощью добавления к культуре макрофагов 200 нг/мл кристаллов. Такая концентрация сопоставима с содержанием солей мочевой кислоты в синовиальной жидкости суставов пациентов с подагрой. В клинике максимально выраженное кристалл-индуцированное воспаление развивается в первые сутки от начала приступа. Поэтому противовоспалительная клеточная терапия должна проводиться именно в это время и, поэтому мы оценили влияние АВ-М3 макрофагов на кристалл-индуцированное воспаление также в первые сутки после добавления кристаллов.

Интенсивность воспалительной реакции макрофагов оценивали по продукции воспалительного цитокина IL-1b и противовоспалительного цитокина TGF-b1. Концентрации цитокинов IL-1b и TGF-b1 определяли в среде макрофагов с помощью Mouse IL-1b ELISA kit (Invitrogen, BenderMedSystems, BMS6002, Lot 184937033) и Mouse TGF-b1 ELISA kit (Invitrogen, BenderMedSystems, BMS608-4, Lot 189457029) методом ELISA на ридере Bio-Rad Model 680 в соответствии с инструкцией производителя китов.

Эксперименты проводились в двух повторах, на макрофагах, выделенных из разных партий мышей. Статистическая обработка данных проведена в программе Minitab. Нормальность распределения проверяли по тесту Райана-Джойнера. Данные представлены как медиана (нижний квартиль; верхний квартиль) и проанализированы с использованием непараметрического теста Манна-Уитни. При  $p < 0,05$  различия рассматривали как статистически достоверные.

## Результаты исследования

**Культивирование макрофагов с кристаллами MSU или СаРР воспроизводит подагрическое воспаление.** Содержание IL-1b и TGF-b1 в среде культивирования макрофагов без кристаллов и с кристаллами MSU или СаРР представлено в **таблице 1**.

Видно, что добавление кристаллов MSU к M0 макрофагам привело к почти 3-кратному увеличению содержания IL-1b в среде культивирования макрофагов ( $p < 0,05$ ). При этом содержание TGF-b в среде культивирования M0 макрофагов без кристаллов и с кристаллами MSU достоверно не отличались.

Добавление кристаллов СаРР к M0 макрофагам, так же, как и при добавлении кристаллов MSU, привело к увеличению содержания IL-1b в среде в 3 раза по сравнению со средой M0 макрофагов без кристаллов ( $p < 0,05$ ). При этом содержание TGF-b в среде культивирования M0 макрофагов без кристаллов и с кристаллами СаРР, также, как и с кристаллами MSU, достоверно не отличались.

Таким образом, реакция макрофагов и на кристаллы MSU, и на кристаллы СаРР в форме продукции IL-1b воспроизвела острое подагрическое воспаление.

**АВ-М3 макрофаги предупреждают развитие острого кристалл-индуцированного воспаления in vitro.** Данные, представленные в табл. 1, показывают, что АВ-М3 фенотип в нормальных условиях, без действия кристаллов, продуцировал в 12 раз меньше IL-1b, по сравнению с M0 фенотипом ( $p < 0,05$ ). При этом базальная продукция TGF-b1 M0 и АВ-М3 фенотипов достоверно не различалась.

При добавлении кристаллов MSU противовоспалительный эффект АВ-М3 фенотипа макрофагов был хорошо выражен. Содержание IL-1b в культуральной среде АВ-М3 макрофагов с кристаллами MSU было меньше в 25 раз ( $p < 0,05$ ), а продукция TGF-b1 больше почти в 2 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению со средой M0 макрофагов с кристаллами MSU.

При действии кристаллов СаРР противовоспалительный эффект АВ-М3 макрофагов также хорошо проявлялся. При добавлении кристаллов СаРР содержание IL-1b в среде культивирования АВ-М3 макрофагов было меньше в 15 раз ( $p < 0,05$ ), а содержание TGF-b1 больше в 5 раз ( $p < 0,05$ ), по сравнению со средой M0 макрофагов с кристаллами СаРР.

Таким образом, АВ-М3 фенотип отвечает на провоспалительное действие кристаллов отсутствием ро-

Таблица 1

Содержание IL-1b и TGFb1 в среде культивирования макрофагов без кристаллов и с кристаллами MSU или СаРР

Группа	IL-1b	TGFb
M0 контроль	108,6 (68,4; 164,3)	18,2 (13,0; 24,1)
M0 MSU	303,0 (238,0; 1206,0)*	27,5 (19,7; 36,5)
M0 СаРР	316,7 (291,0; 345,1)*	14,2 (11,4; 17,2)
M3 контроль	9,3 (0; 21,4)*	26,9 (13,7; 42,2)
M3 MSU	11,9 (9,6; 233,8)+	51,3 (42,2; 61,3)+
M3 СаРР	21,7 (18,5; 26,82)#	69,4 (52,0; 89,0)†#

**Примечание:** статистическая значимость отличий: \* – от M0 контроль; † – от M3 контроль; + – от M0 MSU; # – от M0 СаРР.

ста продукции IL-1b и усилением продукции TGF-b1, по сравнению с M0 макрофагами.

### Обсуждение результатов

Результаты работы подтвердили нашу гипотезу о том, что АВ-М3 фенотип, полученный с помощью сочетанного блокирования инфламасомы и активации противовоспалительных путей, может ограничить кристалл-индуцированное воспаление. АВ-М3 макрофаги ограничили и MSU-, и CaPP-индуцированную продукцию воспалительного цитокина IL-1b, и увеличили продукцию противовоспалительного цитокина разрешения подагрического воспаления TGF-b, по сравнению с M0 макрофагами.

Сопоставление двух видов кристаллов показало, что противовоспалительный эффект АВ-М3 фенотипа, по крайней мере, в первые сутки кристалл-индуцированного воспаления, не зависит от типа кристаллов. Кристаллы CaPP, также, как и кристаллы MSU могут откладываться в суставах больных, и могут вызывать приступы псевдоподагрического артрита. Наши данные, полученные *in vitro*, согласуются с клиническими наблюдениями.

Между кристаллами MSU и кристаллами CaPP имеется несколько отличий.

Во-первых, кристаллы MSU, в отличие от кристаллов CaPP, содержат натрий. При фагоцитозе кристаллов с натрием в макрофагах должно возрасть содержание натрия, и, как следствие, снижаться содержание калия. Снижение концентрации калия способствует активации инфламасомы. Однако наши кристаллы MSU из-за больших размеров не захватывались макрофагами и, соответственно, эффекты натрия на активацию инфламасомы не могли реализоваться.

Во-вторых, кристаллы MSU и CaPP имеют разное сродство к TLR 2 и 4 и могут взаимодействовать с разными типами рецепторов на поверхности макрофагов [5], а также могут иметь разное белковое и липидное покрытие. Однако эти отличия также не проявились в разной индукции воспаления и эффектах АВ-М3 макрофагов.

В-третьих, кристаллы CaPP, в отличие от кристаллов MSU, могут иметь несколько морфологических форм с разной способностью индуцировать воспаление [18]. Наибольшей способностью индуцировать воспаление, сопоставимое с кристаллами MSU, обладают моноклинные формы (m-CaPP), существенно меньшей — триклинные (t-CaPP) и бета-тетрагидратная форма (m-CaPPТβ), а аморфная форма (a-CaPP) вообще не индуцируют воспаление [18]. Наши кристаллы CaPP могли иметь моноклинную форму, которая обладает сопоставимой с кристаллами MSU способностью активировать воспаление.

Мы можем выдвинуть предположение: отсутствие отличий в уровне воспалительной реакции макрофагов на кристаллы MSU и кристаллы CaPP определяет-

ся тем, что оба типа кристаллов индуцируют продукцию IL-1b благодаря активации инфламасомы [5, 6], а дальше IL-1b, уже независимо от кристалла-индуктора, активируя NF-kB, замыкает положительную обратную связь кристалл-индуцированного воспаления, и делает интенсивность воспаления не зависимым от первоначального индуктора воспаления.

Несмотря на оставшиеся вопросы, например, а как АВ-М3 макрофаги влияют на фазу разрешения подагрического воспаления, главное, что показала наша работа — макрофаги могут стать хорошей мишенью для лечения не только опухолевых образований [19], но и приступов подагры. Соответственно разработка клинической версии технологии АВ-М3 макрофагов представляется весьма перспективной.

Однако прежде необходимо оценить, какие преимущества может дать подавление воспаления с помощью АВ-М3 макрофагов в ситуации, когда подагрическое воспаление и так самостоятельно разрешается к 3-7 дню. И насколько технология, основанная на АВ-М3 макрофагах, может быть успешнее в лечении подагры, по сравнению с уже используемыми блокаторами IL-1b, такими как анакинра (anakinra), рилонасепт (rilonasept) и канакинумаб (canakinumab).

Можно обозначить несколько потенциальных преимуществ АВ-М3 макрофагов в лечении подагры.

Во-первых, по сравнению с самостоятельным разрешением воспаления, АВ-М3 макрофаги могут подавлять воспаление на несколько дней раньше, и тем самым ограничивать выработку IL-1b и металлопротеиназ, повреждающих ткани сустава.

Во-вторых, лекарственные препараты антител против IL-1b, такие как канакинумаб, блокируют лишь один конечный продукт подагрического воспаления — IL-1b, не затрагивая механизм производства IL-1b, и не снижают содержание других воспалительных медиаторов, которые выделяют активированные кристаллами макрофаги. АВ-М3 макрофаги снижают кристалл-индуцированную продукцию IL-1b. С большой вероятностью АВ-М3 макрофаги также снижают продукцию других кристалл-индуцированных воспалительных цитокинов.

В-третьих, введенные АВ-М3 макрофаги, продуцируя TGF-b в больших количествах, а также возможно и других противовоспалительных цитокинов, будут перепрограммировать резидентные M1 макрофаги на противовоспалительный M2 фенотип. Это будет способствовать подавлению воспаления в суставе.

В-четвертых, терапия, действующая на специфическую инфламасому и не затрагивающая другие инфламасомы и механизмы высвобождения IL-1β, вероятно, будет обладать большей безопасностью для пациентов, так как незатронутые инфламасомы будут обеспечивать иммунную защиту организма. Кроме того, избирательная блокада NLRP3-инфламасомы может иметь более высокий терапевтический потенциал, по сравнению с анти-IL-1β терапией, так как приводит к одновременной блокаде IL-1β, IL-18 и пироптоза.

Но самое главное, совсем недавно несколько крупных двойных слепых рандомизированных контролируемых клинических исследований, нацеленных на IL-1b как на терапевтическую мишень при остеоартрите, потерпели неудачу [20]. Эти данные серьезно дискредитируют использование анти-IL-1b терапии при артритах и делают поиск новых путей лечения подагры еще более актуальным.

Вместе с тем, некоторые существующие препараты уже зарекомендовали себя с хорошей стороны и, возможно, что комбинированная терапия с АВ-М3 даст наилучший результат в лечении вспышек подагрического воспаления.

### Заключение

Результаты подтвердили гипотезу, что АВ-М3 фенотип ограничивает MSU- и CaPP-индуцированную продукцию воспалительного IL-1b, и увеличивает продукцию противовоспалительного цитокина разрешения подагрического воспаления TGF- $\beta$ . Эти данные делают перспективным разработку клинической версии использования АВ-М3 фенотипа макрофагов при подагре.

### Список литературы

1. Kuo C.F., Grainge M.J., Zhang W., Doherty M. Global epidemiology of gout: prevalence, incidence and risk factors. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2015; 11(11): 649-662. DOI:10.1038/nrrheum.2015.91
2. Jeong J.H., Jung J.H., Lee J.S., Oh J.S., Kim Y.-G., Lee C.-K., Yoo B., Hong S. Prominent Inflammatory Features of Monocytes/Macrophages in Acute Calcium Pyrophosphate Crystal Arthritis: a Comparison with Acute Gouty Arthritis. *Immune Netw.* 2019; 19(3): e21. DOI: 10.4110/in.2019.19.e21
3. Liu-Bryan R., Scott P., Sydlaske A., Rose D.M., Terkeltaub R. Innate immunity conferred by Toll-like receptors 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation. *Arthritis Rheum.* 2005; 52(9): 2936-2946. DOI: 10.1002/art.21238
4. Renaudin F., Sarda S., Campillo-Gimenez L., Séverac C., Léger T., Charvillat C., Rey C., Lioté F., Camadro J.M., Ea H.K., Combes C. Adsorption of Proteins on m-CPPD and Urate Crystals Inhibits Crystal-induced Cell Responses: Study on Albumin-crystal Interaction. *J. Funct. Biomater.* 2019; 10(2): E18. DOI: 10.3390/jfb10020018
5. So A.K., Martinon F. Inflammation in gout: mechanisms and therapeutic targets. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2017; 13(11): 639-647. DOI: 10.1038/nrrheum.2017.155
6. Place D.E., Kanneganti T.-D. Recent advances in inflammasome biology. *Curr. Opin. Immunol.* 2018; 50: 32-38. DOI: 10.1016/j.coi.2017.10.011
7. Chen Y.H., Hsieh S.C., Chen W.Y., Li K.J., Wu C.H., Wu P.C., Tsai C.Y., Yu C.L. Spontaneous resolution of acute gouty arthritis is associated with rapid induction of the anti-inflammatory factors TG- $\beta$ 1, IL-10 and soluble TNF receptors and the intracellular cytokine negative regulators CIS and SOCS3. *Ann. Rheum. Dis.* 2011; 70(9): 1655-1663. DOI: 10.1136/ard.2010.145821
8. Schlesinger N., Alten R.E., Bardin T., Schumacher H.R., Bloch M., Gimson A., So A.K. Canakinumab for acute gouty arthritis in patients with limited treatment options: Results from two randomised, multicentre, active-controlled, double-blind trials and their initial extensions. *Ann. Rheumat. Dis.* 2012; 71(11): 1839-1848. DOI: annrheumdis-2011-200908
9. *IL-1 and Gout: Proof of Concept vs Cost | Medpage Today.* 2018. Пе- жим доступа: <https://www.medpagetoday.com/rheumatology/generalrheumatology/77147> Дата обращения: 07.08.2019
10. Janssen C.A., Oude Voshaar M.A.H., Vonkeman H.E., Jansen T.L.T.A., Janssen M., Kok M.R., Radovits B., van Durme C., Baan H., van de Laar M.A.F.J. Anakinra for the treatment of acute gout flares: a randomized, double-blind, placebo-controlled, active-com-

parator, non-inferiority trial. *Rheumatology (Oxford).* 2019; 58(8): 1344-1352. DOI: 10.1093/rheumatology/key402

11. Regmi S., Pathak S., Kim J.O., Yong C.S., Jeong J.H. Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of inflammatory diseases: Challenges, opportunities, and future perspectives. *Eur. J. Cell Biol.* 2019; 98 (5-8): 151041. DOI: 10.1016/j.ejcb.2019.04.002
12. Chan M.W.Y., Viswanathan S. Recent progress on developing exogenous monocyte/macrophage-based therapies for inflammatory and degenerative diseases. *Cytotherapy.* 2019; 21(4): 393-415. DOI: 10.1016/j.jcyt.2019.02.002
13. Alvarez M.M., Liu J.C., Trujillo-de Santiago G., Cha B. H., Vishwakarma A., Ghaemmaghami A.M., Khademhosseini A. Delivery strategies to control inflammatory response: Modulating M1-M2 polarization in tissue engineering applications. *J. Control. Release.* 2016; 240: 349-363. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.01.026
14. Chan M., Gómez-Aristizábal A., Gandhi R., Marshall W., Mahomed N., Viswanathan S. Ex vivo polarized pro-inflammatory vs. homeostatic monocytes/macrophages elicit differential responses within a human osteoarthritic joint explant model. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2019; 27(Suppl. 1): 379-380. DOI: 10.1016/j.joca.2019.02.378
15. Malyshev I., Malyshev Yu. Current Concept and Update of the Macrophage Plasticity Concept: Intracellular Mechanisms of Reprogramming and M3 Macrophage "Switch" Phenotype. *BioMed Res. Int.* 2015; 341308. DOI: 10.1155/2015/341308
16. Primiano M.J., Lefker B.A., Bowman M.R., Bree A.G., Hubeau C., Bonin P.D., Mangan M., Dower K., Monks B.G., Cushing L., Wang S., Guzova J., Jiao A., Lin L.-L., Latz E., Hepworth D., Hall J.P. Efficacy and Pharmacology of the NLRP3 Inflammasome Inhibitor CP-456,773 (CRID3) in Murine Models of Dermal and Pulmonary Inflammation. *J. Immunol.* 2016; 197(6): 2421-2433. DOI: 10.4049/jimmunol.1600035
17. Sil P., Wicklum H., Surell C., Rada B. Macrophage-derived IL-1 $\beta$  enhances monosodium urate crystal-triggered NET formation. *Inflamm. Res.* 2017; 66(3): 227-237. DOI: 10.1007/s00011-016-1008-0
18. Campillo-Gimenez L., Renaudin F., Jalabert M., Gras P., Gosset M., Rey C., Sarda S., Collet C., Cohen-Solal M., Combes C., Lioté F., Ea H.K. Inflammatory Potential of Four Different Phases of Calcium Pyrophosphate Relies on NF- $\kappa$ B Activation and MAPK Pathways. *Front. Immunol.* 2018; 9: 2248. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02248
19. Калиш С.В., Лямина С.В., Усанова Е., Бахтина Л.Ю., Буданова О.П., Малышев И.Ю. Репрограммированные in vitro M1 макрофаги увеличивают продолжительность жизни мышей с асцитной карциномой Эрлиха. *Патогенез.* 2015; 13(1): 35-42.
20. Vincent T.L. IL-1 in osteoarthritis: time for a critical review of the literature. *F1000Res.* 2019; 8: F1000 Faculty Rev-934. DOI: 10.12688/f1000research.18831.1

### References

1. Kuo C.F., Grainge M.J., Zhang W., Doherty M. Global epidemiology of gout: prevalence, incidence and risk factors. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2015; 11(11): 649-662. DOI:10.1038/nrrheum.2015.91
2. Jeong J.H., Jung J.H., Lee J.S., Oh J.S., Kim Y.-G., Lee C.-K., Yoo B., Hong S. Prominent Inflammatory Features of Monocytes/Macrophages in Acute Calcium Pyrophosphate Crystal Arthritis: a Comparison with Acute Gouty Arthritis. *Immune Netw.* 2019; 19(3): e21. DOI: 10.4110/in.2019.19.e21
3. Liu-Bryan R., Scott P., Sydlaske A., Rose D.M., Terkeltaub R. Innate immunity conferred by Toll-like receptors 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation. *Arthritis Rheum.* 2005; 52(9): 2936-2946. DOI: 10.1002/art.21238
4. Renaudin F., Sarda S., Campillo-Gimenez L., Séverac C., Léger T., Charvillat C., Rey C., Lioté F., Camadro J.M., Ea H.K., Combes C. Adsorption of Proteins on m-CPPD and Urate Crystals Inhibits Crystal-induced Cell Responses: Study on Albumin-crystal Interaction. *J. Funct. Biomater.* 2019; 10(2): E18. DOI: 10.3390/jfb10020018
5. So A.K., Martinon F. Inflammation in gout: mechanisms and therapeutic targets. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2017; 13(11): 639-647. DOI: 10.1038/nrrheum.2017.155
6. Place D.E., Kanneganti T.-D. Recent advances in inflammasome biology. *Curr. Opin. Immunol.* 2018; 50: 32-38. DOI: 10.1016/j.coi.2017.10.011
7. Chen Y.H., Hsieh S.C., Chen W.Y., Li K.J., Wu C.H., Wu P.C., Tsai C.Y., Yu C.L. Spontaneous resolution of acute gouty arthritis is associated with rapid induction of the anti-inflammatory factors TG-

- Fβ1, IL-10 and soluble TNF receptors and the intracellular cytokine negative regulators CIS and SOCS3. *Ann. Rheum. Dis.* 2011; 70(9): 1655-1663. DOI: 10.1136/ard.2010.145821
8. Schlesinger N., Alten R.E., Bardin T., Schumacher H.R., Bloch M., Gimona A., So A.K. Canakinumab for acute gouty arthritis in patients with limited treatment options: Results from two randomised, multicentre, active-controlled, double-blind trials and their initial extensions. *Ann. Rheumat. Dis.* 2012; 71(11): 1839-1848. DOI: annrheumdis-2011-200908
  9. *IL-1 and Gout: Proof of Concept vs Cost | Medpage Today. 2018.* Available at: <https://www.medpagetoday.com/rheumatology/generalrheumatology/77147> Retrieved: 07.08.2019
  10. Janssen C.A., Oude Voshaar M.A.H., Vonkeman H.E., Jansen T.L.T.A., Janssen M., Kok M.R., Radovits B., van Durme C., Baan H., van de Laar M.A.F.J. Anakinra for the treatment of acute gout flares: a randomized, double-blind, placebo-controlled, active-comparator, non-inferiority trial. *Rheumatology (Oxford)*. 2019; 58(8): 1344-1352. DOI: 10.1093/rheumatology/key402
  11. Regmi S., Pathak S., Kim J.O., Yong C.S., Jeong J.H. Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of inflammatory diseases: Challenges, opportunities, and future perspectives. *Eur. J. Cell Biol.* 2019; 98 (5-8): 151041. DOI: 10.1016/j.ejcb.2019.04.002
  12. Chan M.W.Y., Viswanathan S. Recent progress on developing exogenous monocyte/macrophage-based therapies for inflammatory and degenerative diseases. *Cytotherapy*. 2019; 21(4): 393-415. DOI: 10.1016/j.jcyt.2019.02.002
  13. Alvarez M.M., Liu J.C., Trujillo-de Santiago G., Cha B. H., Vishwakarma A., Ghaemmaghami A.M., Khademhosseini A. Delivery strategies to control inflammatory response: Modulating M1-M2 polarization in tissue engineering applications. *J. Control. Release*. 2016; 240: 349-363. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.01.026
  14. Chan M., Gómez-Aristizábal A., Gandhi R., Marshall W., Mahomed N., Viswanathan S. Ex vivo polarized pro-inflammatory vs. homeostatic monocytes/macrophages elicit differential responses within a human osteoarthritic joint explant model. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2019; 27(Suppl. 1): 379-380. DOI: 10.1016/j.joca.2019.02.378
  15. Malyshev I., Malyshev Yu. Current Concept and Update of the Macrophage Plasticity Concept: Intracellular Mechanisms of Reprogramming and M3 Macrophage "Switch" Phenotype. *BioMed Res. Int.* 2015; 341308. DOI: 10.1155/2015/341308
  16. Primiano M.J., Lefker B.A., Bowman M.R., Bree A.G., Hubeau C., Bonin P.D., Mangan M., Dower K., Monks B.G., Cushing L., Wang S., Guzova J., Jiao A., Lin L.-L., Latz E., Hepworth D., Hall J.P. Efficacy and Pharmacology of the NLRP3 Inflammasome Inhibitor CP-456,773 (CRID3) in Murine Models of Dermal and Pulmonary Inflammation. *J. Immunol.* 2016; 197(6): 2421-2433. DOI: 10.4049/jimmunol.1600035
  17. Sil P., Wicklum H., Surell C., Rada B. Macrophage-derived IL-1β enhances monosodium urate crystal-triggered NET formation. *Inflamm. Res.* 2017; 66(3): 227-237. DOI: 10.1007/s00011-016-1008-0
  18. Campillo-Gimenez L., Renaudin F., Jalabert M., Gras P., Gosset M., Rey C., Sarda S., Collet C., Cohen-Solal M., Combes C., Lioté F., Ea H.K. Inflammatory Potential of Four Different Phases of Calcium Pyrophosphate Relies on NF-κB Activation and MAPK Pathways. *Front. Immunol.* 2018; 9: 2248. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02248
  19. Kalish S.V., Lyamina S.V., Usanova E., Bakhtina L.Yu., Budanova O.P., Malyshev I.Yu. [Reprogrammed in vitro M1 macrophages increases life expectancy of mice with Ehrlich ascites carcinoma]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2015; 13(1): 35-42. (in Russian)
  20. Vincent TL. IL-1 in osteoarthritis: time for a critical review of the literature. *F1000Res.* 2019; 8: F1000 Faculty Rev-934. DOI: 10.12688/f1000research.18831.1

#### **Сведения об авторах:**

**Калиш Сергей Валерьевич** — старший лаборант кафедры патологической физиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Лямина Светлана Владимировна** — доктор медицинских наук, профессор кафедры патологической физиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; <https://orcid.org/0000-0001-8300-8988>

**Кузнецова Лариса Вячеславовна** — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных биотехнологий Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Буданова Ольга Петровна** — старший научный сотрудник лаборатории регуляторных механизмов стресса и адаптации Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; <https://orcid.org/0000-0002-6650-5082>

**Логачев Владимир Алексеевич** — ассистент кафедры ревматологии и медико-социальной реабилитации Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Пихлак Андрей Эдуардович** — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой ревматологии и медико-социальной реабилитации Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Малышев Игорь Юрьевич** — доктор медицинских наук, заведующий кафедрой патологической физиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; заведующий лабораторией регуляторных механизмов стресса и адаптации Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; <http://orcid.org/0000-0002-2381-9612>