



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00547

(22) Data de depozit: 28/08/2020

(41) Data publicării cererii:  
30/03/2022 BOPI nr. 3/2022

(71) Solicitant:  
• UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI  
FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU" DIN  
CLUJ-NAPOCA (UMF-IH),  
STR. VICTOR BABEȘ NR. 8,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:  
• JOOSTEN LEONARDUS ANTONIUS  
BERNARDUS, STR. KLEIDONK, NR.3, 6641  
LM PROVINCIA GELDERLAND,  
BEUNINGEN, NL;  
• CRIȘAN TANIA- OCTAVIA,  
CALEA DOROBANȚILOR, NR.112, BL.G2,  
ET.7, AP.87, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• POPP RADU ANGHEL, STR. HAȚEG  
NR. 4, AP. 28, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• REDNIC SIMONA,  
STR.ANATOLE FRANCE, NR.22, AP.2,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) **METODĂ DE INVESTIGARE A PREDISPOZIȚIEI  
PENTRU DEZVOLTAREA UNUI RĂSPUNS INFLAMATOR  
ACCENTUAT PE BAZA PRODUCȚIEI DE CITOKINE ÎN URMA  
EXPUNERII LA ACID URIC IN VITRO**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de investigare a predispoziției pentru dezvoltarea unui răspuns inflamator accentuat pe baza producției de citokine, în urma expunerii la acid uric, *in vitro*, cu aplicabilitate în straticificarea pacienților cu hiperuricemie. Metoda, conform invenției, constă în aplicarea unui protocol de stimulare a celulelor periferice mononucleare prin pre-expunerea celulelor la acid uric pentru 24 h, urmată de spălarea acidului uric și restimularea celulelor cu lipopolizaharid pentru inducție de citokine, după care se interpretează rezultatele privind magnitudinea producției de citokine

inflamatorii, în raport cu citokinele anti-inflamatorii, astfel că, o creștere de aproape 2 ori mai mare a producției de IL-1 $\beta$  ca răspuns la adăugarea de acid uric de 50 mg/dl versus control negativ la pacienții cu hiperuricemie, comparativ cu martorii normouricemici, include pacientul cu hiperuricemie în grupul suspectat cu predispoziție la sindrom inflamator.

Revendicări: 7  
Figuri: 5



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr. ....	a 2020 ee 547
Data depozit ....	28-08-2020

1

51

**METODĂ DE INVESTIGARE A PREDISPOZIȚIEI PENTRU DEZVOLTAREA  
UNUI RĂSPUNS INFLAMATOR ACCENTUAT PE BAZA PRODUCȚIEI DE  
CITOKINE ÎN URMA EXPUNERII LA ACID URIC *IN VITRO***

Invenția se referă la o metodă de investigare a predispoziției pentru dezvoltarea unui răspuns inflamator accentuat, cu aplicabilitate în stratificarea pacienților cu hiperuricemie pe baza unor teste de imunologie care determină capacitatea de producție de citokine a celulelor din sânge ca răspuns la stimularea acestora cu acid uric.

Domeniul tehnic.

Guta reprezintă una dintre cele mai vechi identificate și descrise patologii reumatologice și afectează aproximativ 1% din populația globului, atingând o prevalență de 2.5-3.9% în țările dezvoltate. Incriminate în patogenia gutei sunt cristalele de urat monosodic (MSU) care se formează în timpul hiperuricemiei și determină inflamație. Studii recente au demonstrat faptul că hiperuricemia este asociată și cu alte patologii precum boala cardiovasculară (BCV), diabetul zaharat de tip II și hipertensiunea (1,2). Bolile metabolice reprezintă astăzi cauza principală de morbiditate la nivel global, fiind responsabile de 40-50% din cauzele de mortalitate în Statele Unite ale Americii și Europa, inclusiv Romania.

Acidul uric este produsul metabolic al degradării purinelor și este considerat un semnal endogen de pericol (danger/damage associated molecular pattern) eliberat în stresul celular (1,2). Hiperuricemia este definită ca elevarea acidului uric peste 0.36mM (14), prag la care are loc cristalizarea acidului uric.

Acidul uric în stare solubilă are nivele mai crescute la primat în comparație cu alte vertebrate. Acest lucru se datorează unor mutații cu pierdere de funcție apărute în gena uricazei, ceea ce a făcut ca gena să fie complet nefuncțională. Uricaza este o enzimă care metabolizează acidul uric la alantoină solubilă. Deoarece această enzimă este absentă la oameni, nivelurile serice ale acidului uric sunt ridicate la un interval de 2-6 mg / dl. În contextul variației genetice și stilului de viață, concentrațiile serice ale acidului uric pot crește și mai mult, iar hiperuricemia apare atunci când nivelul de solubilitate este depășit. Hiperuricemia este cunoscută ca un factor metabolic asociat mai multor boli: cardiovasculare, renale, sindrom metabolic.



hiperuricemia conduce la suprasaturația acidului uric și la depunerea cristalelor de urați în țesuturi. Localizarea sinovială a cristalelor de acid uric determină inflamația la nivelul articulațiilor, mediată de citokina interleukina-1 beta (IL-1 $\beta$  - proteină de semnalizare cu rol proinflamator).

#### Prezentarea stadiului tehnicii.

Pînă în prezent, cercetările extensive care au investigat efectele proinflamatorii ale acidului uric s-au focalizat pe procesele mediate de cristalele MSU. Date recente sugerează însă faptul că și acidul uric în formă solubilă exercită efecte proinflamatoare. S-a arătat că șoarecii hiperuricemici, după stimulare cu lipopolizaharide (LPS), prezintă o producție citokinică mult amplificată comparativ cu animalele control (3) și că injectarea peritoneală de acid uric determină activarea NF-kB în țesutul renal și pancreatic la șoareci (4,5).

Recent, grupul nostru a descoperit faptul că acidul uric exercită proprietăți proinflamatorii prin efect direct asupra celulelor mononucleare periferice (PMBC) la oameni (6). Am arătat faptul că, după stimulare ex-vivo, PMBC-urile la pacienții cu hiperuricemie determină producerea unor valori mult amplificate de citokine proinflamatorii comparativ cu subiecții sănătoși [Figura 1; (6)], însă mecanismele responsabile pentru acest dezechilibru citokinic nu sunt încă elucidate. De remarcat este faptul că, la pacienții cu gută tratați cu hipouricemiant, capacitatea de a produce citokine pro-inflamatorii ex-vivo a fost semnificativ redusă (7). În acord cu această observație, cercetarea noastră a demonstrat că atunci când monocitele umane primare au fost preconditionate in-vitro cu acid uric în concentrație mare timp de 24 de ore și restimulate la 24 de ore cu liganzi TRL, răspunsul citokinic a fost semnificativ crescut. Aceste efecte au fost susținute pe termen lung, iar această amprentare metabolică este sugerată a fi mediată de reprogramare epigenetică, întrucât inhibitorii metiltransferazelor histonice abolesc efectul de reprogramare al acidului uric. Aceste rezultate sugerează că acidul uric constituie un semnal de pericol capabil a induce efecte asupra altor celule inflamatorii, prin modificări epigenetice, un proces reminescent al procesului de 'trained immunity', recent descris în infecții și vaccinări (8). Figura 1 arată că, la pacienții hiperuricemici, celulele mononucleare circulante produc mai multă IL-1 $\beta$  după stimulare ex-vivo cu liganzi inflamatori. Figura 2 evidențiază că producerea crescută de IL-1 $\beta$ , după stimulare ex-vivo după pre-expunerea la acid uric timp de 24 de ore este mediată de modificări epigenetice (MTA = inhibitor de metiltransferaza). PBMC's au fost stimulate cu cristale de MSU și liganzi TLR (LPS, lipopolizaharide; Pam3Cys, palmitoil-3-cisteina) timp de

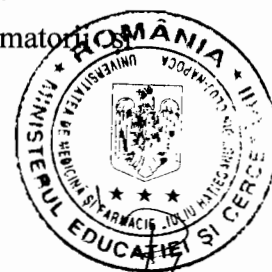


24 de ore după pre-tratare cu acid uric, MTA a fost adăugați numai după 24 de ore de expunere la acid uric (6).

Astăzi, înțelegerea uzuală a răspunsului imun nespecific al gazdei se confruntă cu întrebări deschise. Timp de mai multe decade, a existat un consens conform căruia răspunsul imun are la bază dihotomia răspuns adaptativ și înnăscut, în care răspunsurile se disting clar prin specificitate și prin memorie. Studii recente susțin astăzi faptul că celulele sistemului imun nespecific pot de asemenea să dezvolte memoria stimulării infecțioase trecute și să își modifice în consecință răspunsul la o nouă stimulare infecțioasă. La șoarecii cu depleția limfocitelor T și B funcționale, infecții non-letale cu *Candida albicans* au protejat de o infecție ulterioară cu o doză letală de patogen (9). Pretratarea in vitro a monocitelor umane purificate cu *C. albicans* sau componentul membranar  $\beta$ -glucan a determinat augmentarea răspunsului inflamator susținut inclusiv la o a doua stimulare(9). Rezultate similare au fost obținute pe studii in vitro și in vivo la șoareci după expunere la vaccinul BCG (*Bacille Calmette-Guérin*), precum și la voluntari sănătoși vaccinați cu BCG (10). Acest status crescut de activare imună a celulelor sistemului imun înnăscut a fost denumit “trained immunity” sau imunitate învățată, iar mecanismele sale și implicațiile în patologie și tratament constituie un domeniu fertil și provocator pentru cercetarea actuală în imunologie (11).

Mai mult decât atât, dincolo de stimularea cu liganzi microbieni, celulele pot fi stimulate cu substanțe non-infecțioase sau particule numite “danger signals” sau damage-associated molecular patterns (DAMPs) (12) (în traducere ad literam, “semnale de pericol”, “secvențe moleculare asociate distrucției tisulare”). Acestea sunt semnale endogene asociate cu distrucția tisulară ce induc activarea sistemului imun înnăscut și determină inflamație acută sterilă în grade diferite - de la minimală la severă. (13)

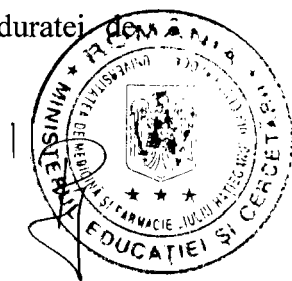
Invenția noastră își are fundamentul în rezultatele cercetării grupului nostru care a stabilit pentru prima dată faptul că celulele expuse la acid uric produc o cantitate mai mare de IL-1 $\beta$  și că acest fapt se datorează cel mai probabil unui fenomen epigenetic. Pornind de la rezultatele studiului nostru pe efectele de durată lungă ale expunerii la acid uric, propunem conceptul conform căruia imunitatea învățată (“trained immunity”) poate fi indusă nu numai de liganzi microbieni, ci și de DAMPs. Susținem ipoteza că acidul uric constituie un astfel de danger signal, capabil de a induce reprogramarea epigenetică a celulelor sistemului imun nespecific și că acest mecanism poate reprezenta o țintă terapeutică în bolile reumatologice autoinflamatorii și metabolice.



Prezentarea problemei tehnice.

Există în prezent multe limite ale diagnosticului, imagisticii și ale modalităților de tratament în gută. Guta reprezintă o patologie frecventă, în special la pacienții cu boli cardiovasculare. Diagnosticul este în unele cazuri facil și precoce datorită severității și frecvenței atacurilor de gută; alteleori însă se face cu întârziere considerabilă. Guta se poate manifesta nu numai prin inflamația cronică a articulațiilor, ci și prin afectarea funcției cardiace și renale. Unele subgrupuri de pacienți cu gută nu dezvoltă atacuri articulare tipice, ci manifestă un dezechilibru al balanței urice și progresează direct spre statusul de guta tofacee. Datorită acestei heterogeneități, boala este frecvent subdiagnosticată, fapt augumentat și de absența accesului universal la standardul de aur în diagnostic, respectiv microscopia cu lumină polarizată. În acest context, dezvoltarea unor noi mijloace de stratificare a pacienților este de importanță majoră. Elementul de noutate al prezentei invenții este reprezentat de faptul că investighează răspunsul celular la stimuli exogeni, fiind astfel un experiment funcțional care completează măsurătorile biochimice sau imagistice deja utilizate în practica clinică.

În prezent, standardul în tratamentul puseelor acute de gută este reprezentat de colchicină, alopurinol și glucocorticoizi. Colchicina reprezintă tratamentul cel mai eficient, dar administrarea este frecvent însoțită de reacții adverse severe (diareea). Terapia cu inhibitorii IL-1 $\beta$  este inaccesibilă în România, în pofida eficienței dovedite în studiile clinice. Elucidarea mecanismului precis de acțiune al acidului uric ar putea ar permite elaborarea unor noi agenți terapeutici în artrita gutoasă. Inhibitori noi ai modulării epigenetice ar putea constitui terapii noi în viitorul apropiat, având avantajul absenței reacțiilor adverse severe. Cunoașterea patogenezei statusului proinflamator în gută constituie premisa unor noi ținte terapeutice la pacienții cu artrită și boli autoinflamatorii. Impactul bolilor cardiovasculare asupra morbidității și mortalității este unul considerabil. Dacă ar putea fi demonstrat și descris rolul precis al acidului uric în patogeneza bolilor comune ale adultului, impactul dezvoltării unei terapii ar fi avea beneficii extrem de importante la o scară foarte largă. Este cunoscut faptul că acidul uric exercită efecte inflamatorii de durată, însă mecanismul exact de acțiune și durata impactului epigenetic nu au fost încă elucidate. Înțelegerea factorilor genetici și epigenetici de susceptibilitate pentru acest status hiperinflamator va permire o monitorizare și o intervenție terapeutică personalizată. Concret, identificarea variantelor genice care conferă anumitor indivizi o susceptibilitate mai mare în timp, ar permite identificarea acestor indivizi și prevenție. Invers, recunoașterea persistenței în timp a unor mărci epigenetice ar putea orienta monitorizarea terapeutică și controlul duratei



intervenție terapeutică până la dispariția markerilor proinflamatori. Bolile cardiovasculare și artrita gutoasă constituie probleme de sănătate în creștere în România și pe glob. Atunci când pacienții suferă de artrită gutoasă sau complicații cardiovasculare, contribuția acestora la economia globală se pierde. Incidența acestor patologii este în creștere, iar tratamentul cu medicamente biologice rămâne inaccesibil României în acest moment și mult restrâns la nivel global, datorită costurilor uriașe. Noi modalități terapeutice a inflamației induse de hiperuricemie vor fi cost-eficiente pentru societate. Importanța identificării unei baze epigenetice a inflamației rezidă în faptul că mărcile epigenetice, precum modificările histonice, sunt reversibile, context în care o terapie îndreptată împotriva acestui mecanism de acțiune ar avea un impact extrem de mare la scară largă.

Disocierea dintre producția IL-1 $\beta$  și IL-1Ra ca răspuns la expunerea la acid uric justifică nevoia pentru mai multă cercetare în viitor. Încă nu este complet înțeles în ce punct IL-1Ra este decuplată de calea de semnalizare a IL-1- $\beta$  sau dacă acestea sunt induse independent de cascade diferite de semnalizare. Mai mult, studiile genetice și genomice sunt esențiale pentru a afla care sunt factorii genetici de susceptibilitate asociați inflamației din gută, prin controlul riscului genetic asociat hiperuricemiei. Studiile de asociere genetică, în care controalele hiperuricemice sunt utilizate ca referință, reprezintă un efort promițător în cadrul comunității științifice din acest domeniu de cercetare.

Cercetarea în gută și hiperuricemie capătă o atenție sporită din cauza impactului acestei boli în termeni de prevalență, în termeni de consecințe bioeconomice, dar și pentru că dovezile noi au atras atenția asupra unor noi factori implicați în riscul și terapia gutei. Continuarea acestor studii necesită strategii inovatoare pentru a integra seturi de date și pentru a trage concluzii relevante din punct de vedere biologic. Dacă se demonstrează că acidul uric exercită efecte inflamatorii stabile, fără restricție la forma cristalizată, atunci domeniul de cercetare al hiperuricemiei este probabil să aibă un impact în viitor asupra unei game largi de boli inflamatorii care asociază nivele elevate ale acidului uric.

Problema pe care o rezolvă invenția propusă este de a realiza o metodă de stratificare a pacienților cu hiperuricemie pentru a detecta spectrul de pacienți la risc pentru evenimente inflamatorii datorate răspunsului crescut la acid uric în scopul aplicării unor metode de prevenție.

Această invenție nu reprezintă o metodă de diagnostic sau de tratament al vreunei patologii, ci aduce informații privind posibilitatea prezenței unor factori de risc pentru evenimente inflamatorii la unii pacienți. Astfel, se poate realiza clasificarea pacienților anterior



diagnosticați și managementul personalizat al acestora prin metode de prevenție a inflamației sau prin metode de reducere a nivelului de acid uric seric.

Expunerea invenției.

Metoda de investigare a răspunsului inflamator la acid uric se bazează pe studiul cantității citokinelor IL-1beta (proinflamatorie) și IL-1Ra (antiinflamatorie) în urma unor experimente *in vitro* utilizând celule proaspăt izolate din sângele pacienților testați și expunerea acestora la acid uric și alți stimuli inflamatori.

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției, în legătură cu figurile 1- 5, care reprezintă:

- figura 1, IL-1beta la pacienții hiperuricemici;
- figura 2, IL-1 $\beta$ , după stimulare ex-vivo și pre-expunerea la acid uric;
- figura 3, IL-1beta la pacienții normouricemici;
- figura 4, IL-1Ra, după pre-incubare cu acid uric;
- figura 5, IL-1 $\beta$ , efect al expunerii la acid uric.

Metoda de investigare a răspunsului inflamator la acid uric constă în realizarea următoarelor etape:

1. Izolarea de celule mononucleare periferice;
2. Efectuarea pre-expunerii celulelor la acid uric;
3. Efectuarea stimulărilor cu ligandul TLR4 (lipopolizaharid, LPS) pentru stimularea producției de citokine;
4. Recoltarea supernatantelor;
5. Determinarea concentrației de IL1beta și IL-1Ra produs în urma experimentelor;
6. Interpretarea rezultatelor.

#### 1. Izolarea de celule mononucleare periferice

Monocitele și limfocitele au densități diferite decât alte elemente figurate, precum neutrofilele și eritrocitele. Această proprietate este utilizată pentru a separa fracția care conține celule mononucleare din sângele periferic (PBMC, „peripheral blood mononuclear cells”) de restul sângelui cu ajutorul soluției Ficoll Paque sau altor soluții similare (16).



45

Se lucrează într-un cabinet de siguranță de tip II în timpul procedurii complete.

Se transferă sângele recoltat pe EDTA (10 mL de la fiecare pacient) în tuburi conice sterile de 50 ml (10-20 ml sânge / 50 ml tub).

Se clătesc tuburile goale de sânge cu PBS (soluție fosfat tamponată) și se adaugă sângele rezidual în tuburile de 50 mL.

Se aduce volumul la 35 ml cu PBS.

Se adaugă încet 15 ml Ficoll în fundul tubului sub sânge folosind o pipetă serologică de 10 ml.

Tuburile astfel pregătite vor fi supuse centrifugării cu gradient de densitate la viteza 616xg, timp de 20 de minute, la temperatura camerei, fără frână și cu accelerare lentă.

În urma centrifugării rezultă un strat de PBMC la interfața dintre soluția Ficoll și restul plasmiei cu PBS. Acest strat de celule reprezintă populația de interes, care va fi recoltată folosind o pipetă Pasteur sterilă și va fi transferată într-un tub conic de 50 mL curat.

După transferul tuturor celulelor vizibile, se ajustează volumul la 50 ml cu PBS rece (pe gheață)

Spălarea (de acum înainte lucrează pe gheață) va avea loc prin centrifugare repetată de trei ori la viteza 1700 rotații pe minut, timp de 10 minute, la temperatura de 4 ° C.

După fiecare centrifugare se va îndepărta supernatantul folosind un sistem de vid sau decantare.

Celulele se resuspendă după care spălarea se reia.

După ultima spălare, celulele vor fi resuspendate într-un volum cunoscut de mediu de cultură în RPMI (Roswell Park Memorial Institute).

Celulele vor fi numărate folosind orice sistem de contorizare, iar concentrația acestora va fi ajustată la 10 milioane celule/mL.

## 2. Efectuarea pre-expunerii celulelor la acid uric

În urma izolării, celulele aflate în suspensie sunt aduse la concentrația de lucru  $10 \cdot 10^6$ /ml (10 milioane celule/ml) și se pipetează 50 ul/godeu (500.000 PBMCs) într-o placă de 96 godeuri cu fund plat.

Se adaugă 100 ul/godeu de acid uric în concentrații de lucru calculate pentru a obține concentrațiile finale (în 200 uL volum final / godeu) de: 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.125 mg/ml și 0.0625 mg/ml.





Se pipetează 50 ul ser/godeu, unde serul este ser uman, în concentrație de lucru calculată pentru a obține concentrația finală de 10% ser.

Celulele sa pun la incubator, 24 h, la 37 grade Celsius, 5% CO<sub>2</sub>.

3. Efectuarea stimulărilor cu ligandul TLR4 (lipopolizaharid, LPS) pentru stimularea producției de citokine

La finalul celor 24h, conținutul godeurilor este eliminat fără a disloca celulele atașate pe fundul acestuia. Celulele se spală cu 200 ul PBS cald de 3 ori. Se adaugă 200 ul de stimul/godeu conținând concentrația de lucru 10 ng/mL lipopolizaharid (LPS). Celulele se pun la incubator, 24 h, la 37 grade Celsius, 5% CO<sub>2</sub>.

4. Recoltarea supernatantelor

Placa se centrifughează la 1700 rpm timp de 10 min. la temperatura camerei. Supernatantul se colectează în tuburi și se stochează la -20 grade Celsius până la măsurătorile ulterioare.

5. Determinarea concentrației de IL1beta și IL-1Ra produs în urma experimentelor

Determinarea concentrației de IL1beta și IL-1Ra se face prin utilizarea unor kituri comerciale, după metodologia internă a utilizatorului.

6. Interpretarea rezultatelor

În urma derulării experimentelor ex vivo conform protocolului descris, rezultatele așteptate sunt de elevare a producției de interleukina 1 beta (IL-1beta) și de reducere a antagonistului receptorului de IL1 (IL-1Ra) în celulele care au fost expuse la concentrații ridicate de acid uric. Controlul sănătos, normouricemic din cadrul acestui experiment trebuie să denote acest profil citokinic pentru ca rezultatele să fie analizate în continuare (Figura 3 și 4).

Figura 3 arată că, la pacienții normouricemici (control), celulele mononucleare circulante produc un nivel mai mare de IL-1 $\beta$ , după pre-incubare cu acid uric (mai ales 50 mg/dL) și restimulare cu lipopolizaharid, conform protocolului descris. Figura 4 evidențiază un nivel mai mic de IL-1Ra, după pre-incubare cu acid uric (mai ales 50 mg/dL) și restimulare cu lipopolizaharid, conform protocolului descris.



Calculând magnitudinea efectului asupra producției de citokine, la martorii normouricemici se observă o creștere a nivelului interleukine 1 beta de o medie de 3,35 de ori. Prin contrast, pacienții hiperuricemici înregistrează o creștere în medie de 2,094 ori. Maximul înregistrat este de 29,85 ori în cazul martorilor și de 13,03 ori în cazul persoanelor cu hiperuricemie. Totuși, se observă o variație mare a valorilor, dată de faptul că celulele utilizate sunt celule primare, ceea ce face necesară studierea unui număr mare de subiecți pentru a îngusta intervalul relevant al testului. Astfel, pacienții care înregistrează o creștere a nivelului IL-1beta în urma acestui experiment, de sub 2 ori mai mare în celulele tratate cu acid uric față de control, sunt pacienți care:

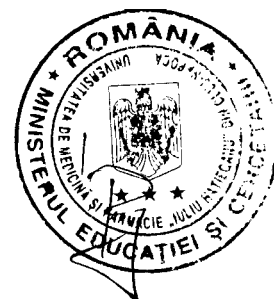
- a) sunt non-responsivi la stimularea cu acid uric;
- b) sunt responsivi la stimularea cu acid uric, însă celulele lor au fost deja expuse la acid uric in vivo, deci creșterea în urma expunerii ex vivo nu este la fel de mare cu a martorilor.

Categoria de pacienți descrisă la punctul b) se dorește a fi selectată prin acest test, însă deocamdată nu este discriminată față de punctul a). Totuși, testul restrânge populația necesară a fi urmărită din punct de vedere al sindromului inflamator, prezentând potențial de control și prevenție al statusului inflamator al acestor pacienți.

Figura 5 ilustrează efectul expunerii la acid uric exprimat în grade de magnitudine (fold change) a producției de IL1beta ca răspuns la diferite concentrații de acid uric. Comparând categoriile de voluntari, observăm o variabilitate mare a datelor, însă remarcăm caracterul similar al profilului datelor pacienților cu gută (tratați cu hipouricemiant) și al martorilor, comparativ cu profilul persoanelor cu hiperuricemie (mijloc).

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

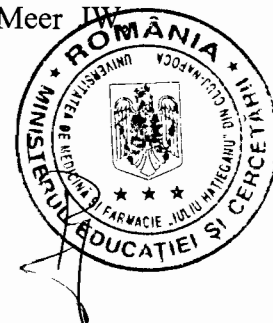
- Metoda propusă este informativă cu privire la capacitatea de producție a citokinelor IL-1beta și IL-1Ra în celule stimulate ex vivo de la pacienți cu hiperuricemie sau normouricemie și ilustrează gradul de condiționare inflamatorie a celulelor acestora;
- Metoda propusă este relativ ieftină, presupunând dotări minime ale unui laborator de imunologie. Necesitatea unui timp prelungit de lucru, cu celule proaspăt izolate din sânge proaspăt recoltat poate fi echilibrată de eficientizarea etapelor de prelucrare prin pregătirea tuturor stimulilor necesari înainte de efectuarea experimentelor;



- Toate acestea fac din metoda pe care o propunem un instrument care poate contribui la stratificarea pacienților cu profil inflamator ridicat pe baza acestui test funcțional și la ghidarea strategiei de management al sănătății pacientului de către medicul curant.

Referințe bibliografice:

- 1) Kanbay M, Segal M, Afsar B, Kang DH, Rodriguez-Iturbe B, Johnson RJ. The role of uric acid in the pathogenesis of human cardiovascular disease. *Heart*. 2013;99(11):759-66.
- 2) Johnson RJ, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, Shafiu M, Sundaram S, Le M, Ishimoto T, Sautin YY, Lanaspa MA. Sugar, uric acid, and the etiology of diabetes and obesity. *Diabetes*. 2013;62(10):3307-15.
- 3) Netea, M.G., Kullberg, B.J., Blok, W.L., Netea, R.T., and van der Meer, J.W. 1997. The role of hyperuricemia in the increased cytokine production after lipopolysaccharide challenge in neutropenic mice. *Blood* 89:577-582.
- 4) Zhou, Y., Fang, L., Jiang, L., Wen, P., Cao, H., He, W., Dai, C., and Yang, J. 2012. Uric acid induces renal inflammation via activating tubular NF-kappaB signaling pathway. *PLoS One* 7:e39738.
- 5) Jia, L., Xing, J., Ding, Y., Shen, Y., Shi, X., Ren, W., Wan, M., Guo, J., Zheng, S., Liu, Y., et al. 2013. Hyperuricemia causes pancreatic beta-cell death and dysfunction through NF-kappaB signaling pathway. *PLoS One* 8:e78284.
- 6) Crișan TO, Cleophas MC, Oosting M, Lemmers H, Toenhake-Dijkstra H, Netea MG, Jansen TL, Joosten LA. Soluble uric acid primes TLR-induced proinflammatory cytokine production by human primary cells via inhibition of IL-1Ra. *Ann Rheum Dis*. 2015 Feb 3. pii: annrheumdis-2014-206564. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-206564. [Epub ahead of print]
- 7) Jansen TL, Berendsen D, Crisan TO, Cleophas MC, Janssen MC, Joosten LA. New gout test: enhanced ex vivo cytokine production from PBMCs in common gout patients and a gout patient with Kearns-Sayre syndrome. *Clin Rheumatol*. 2014 Sep;33(9):1341-6
- 8) Netea MG, Quintin J, van der Meer JW. Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host Microbe*. 2011;9(5):355-61.
- 9) Quintin J, Saeed S, Martens JH, Giamarellos-Bourboulis EJ, Ifrim DC, Logie C, Jacobs L, Jansen T, Kullberg BJ, Wijmenga C, Joosten LA, Xavier RJ, van der Meer JW



Stunnenberg HG, Netea MG. *Candida albicans* infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of monocytes. *Cell Host Microbe* 2012;12(2):223-32.

10) Kleinnijenhuis J, Quintin J, Preijers F, Joosten LA, Ifrim DC, Saeed S,..., Stunnenberg HG, Xavier RJ, van der Meer JW, van Crevel R, Netea MG. Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Oct 23;109(43):17537-42.

11) Cheng SC, Quintin J, Cramer RA, Shepardson KM, Saeed S, Kumar V, Giamarellos-Bourboulis E, Rao NA, Aghajani-refah A, Ifrim DC, Deen PM, O'Neill LA, Willems P, van de Veerdonk F, van der Meer JMW, Ng A, Joosten LA, Wijmenga C, Stunnenberg HG, Xavier RJ, Netea MG. Epigenetic profiling identifies mTOR/HIF1 $\alpha$ -dependent induction of glycolysis as the cellular metabolic basis of trained immunity. *Science* 2015

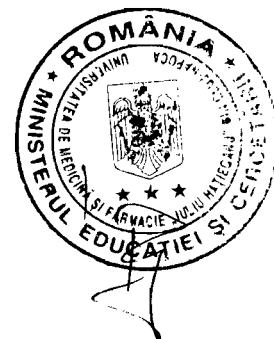
12) Matzinger, P., The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002. 296: 301-305.

13) Crişan TO, Netea MG, Joosten LAB. Innate immune memory: implications for host responses to damage-associated molecular patterns. *European journal of Immunology*, submitted

14) Joosten Arthritis and Rhem Joosten LA, Netea MG, Mylona E,...,van de Veerdonk FL, Stalenhoef AF, Giamarellos-Bourboulis EJ, Kanneganti TD, van der Meer JW. Engagement of fatty acids with Toll-like receptor 2 drives interleukin-1 $\beta$  production via the ASC/caspase 1 pathway in monosodium urate monohydrate crystal-induced gouty arthritis. *Arthritis Rheum.* 2010;62(11):3237-48.

15) Protocol oxonate Dankers AC, Mutsaers HA, Dijkman HB, van den Heuvel LP, Hoenderop JG, Sweep FC, Russel FG, Masereeuw R. Hyperuricemia influences tryptophan metabolism via inhibition of multidrug resistance protein 4 (MRP4) and breast cancer resistance protein (BCRP). *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(10):1715-22.

16) Highly purified selective isolation of eosinophils from human peripheral blood by negative immunomagnetic selection; Nilda M Munoz & Alan R Leff *Nature Protocols* 1, 2613 - 2620 (2007)



## REVENDICĂRI

1. Metodă de investigare a predispoziției pentru dezvoltarea unui răspuns inflamator accentuat pe baza producției de citokine în urma expunerii la acid uric *in vitro*, **caracterizată prin aceea că se bazează pe studiul cantității citokinelor IL-1beta (proinflamatorie) și IL-1Ra (antiinflamatorie) în urma unor experimente *in vitro* utilizând celule proaspăt izolate din sângele pacienților testați și expunerea acestora la acid uric și alți stimuli inflamatori, și presupune efectuarea următoarelor etape:**

A. Izolarea de celule mononucleare periferice;

B. Efectuarea pre-expunerii celulelor la acid uric;

C. Efectuarea stimulărilor cu ligandul TLR4 (lipopolizaharid, LPS) pentru stimularea producției de citokine;

D. Recoltarea supernatantelor;

E. Determinarea concentrației de IL1beta și IL-1Ra produs în urma experimentelor;

F. Interpretarea rezultatelor.

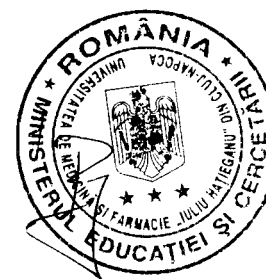
2. Metodă de investigare conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că izolarea de celule mononucleare periferice se realizează în următorii pași:**

i. se transferă sângele recoltat pe EDTA în tuburi conice sterile de 50 ml (10-20 ml sânge / 50 ml tub);

ii. se clătesc tuburile goale de sânge cu PBS (soluție fosfat tamponată) și se adaugă sângele reziduul în tuburile de 50 mL, iar apoi se aduce volumul la 35 ml cu PBS;

iii. se adaugă încet 15 ml Ficoll în fundul tubului sub sânge folosind o pipetă serologică de 10 ml;

iv. tuburile astfel pregătite se centrifughează cu gradient de densitate la viteza 616xg, timp de 20 de minute, la temperatura camerei, fără frână și cu accelerare lentă;



v. stratul de celulele de PBMC de la interfaza dintre soluția ficoll și restul plasmei cu PBS se recoltează folosind o pipetă Pasteur sterilă și va fi transferat într-un tub conic de 50 mL curat, iar apoi se adaugă PBS rece până la volumul de 50 ml;

vi. conținutul de la pasul v se spală pe gheața, prin centrifugare repetată de trei ori la viteza 1700 rotații pe minut, timp de 10 minute, la temperatura de 4° C, supernatantul fiind îndepărtat după fiecare centrifugare;

vii. după ultima spălare, celulele vor fi resuspendate într-un volum cunoscut de mediu de cultură în RPMI (Roswell Park Memorial Institute), iar concentrația acestora va fi ajustată la 10 milioane celule/mL.

3. Metoda de investigare conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** pre-expunerea celulelor rezultate în etapa A la acid uric se face astfel:

i. se pipetează 50 ul/godeu (500.000 PBMCs) într-o placă de 96 godeuri cu fund plat;

ii. se adaugă 100 ul/godeu de acid uric în concentrații de lucru calculate pentru a obține concentrațiile finale de: 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.125 mg/ml și 0.0625 mg/ml;

iii. se pipetează 50 ul ser uman /godeu, în concentrație de lucru calculată pentru a obține concentrația finală de 10% ser;

iv. celulele se pun la incubator, 24 h, la 37 °C grade Celsius, în atmosferă de 5% CO<sub>2</sub>.

4. Metodă de investigare conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** stimularea producției de citokine cu lipopolizaharid, LPS a celulelor din etapa B se face astfel:

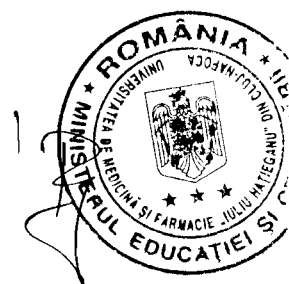
i. conținutul godeurilor este eliminat fără a disloca celulele atașate pe fundul acestora;

ii. celulele se spală cu 200 ul PBS cald de 3 ori;

iii. se adaugă 200 ul de stimul/godeu continuând concentrația de lucru 10 ng/mL lipopolizaharid (LPS);

iv. celulele se pun la incubator, 24 h, la 37 °C grade Celsius, în atmosferă de 5% CO<sub>2</sub>.

5. Metodă de investigare conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** recoltarea supernatantelor se face prin centrifugarea plăcii cu godeuri de la faza C, la 1700 rpm timp de 10 min. la temperatura camerei, iar supernatantul se colectează în tuburi și se păstrează la -20 °C.



6. Metodă de investigare a predispoziției pentru dezvoltarea unui răspuns inflamator accentuat pe baza producției de citokine în urma expunerii la acid uric in vitro, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** testarea funcțională a răspunsului citokinic se bazează pe prezența în experiment a:

- Celulelor mononucleare periferice, din care fracțiunea de interes este reprezentată de monocite;
- Acid uric în concentrații crescânde de la 0 la 50 mg/dL;
- Ser uman în concentrație 10%;
- Mediu de cultură RPMI;
- Lipopolizaharid.

7. Metodă de investigare a predispoziției pentru dezvoltarea unui răspuns inflamator accentuat pe baza producției de citokine în urma expunerii la acid uric in vitro, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** interpretarea rezultatelor se face în funcție de magnitudinea producției de citokine inflamatorii, în raport cu citokinele antiinflamatorii, creșterea producției de IL-1beta ca răspuns la adăugarea de acid uric 50 mg/dL versus control negativ de sub 2 ori mai mare la pacienții cu hiperuricemie comparativ cu martorii normouricemici, include pacientul cu hiperuricemie în grupul suspectat cu predispoziție la sindrom inflamator.



1

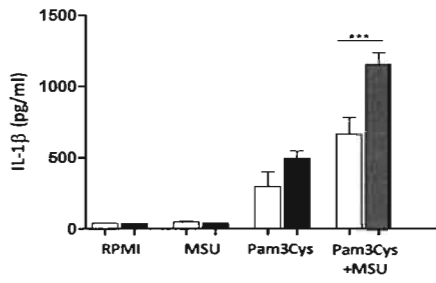


Figura 1

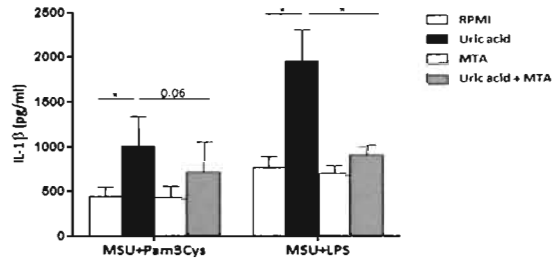


Figura 2

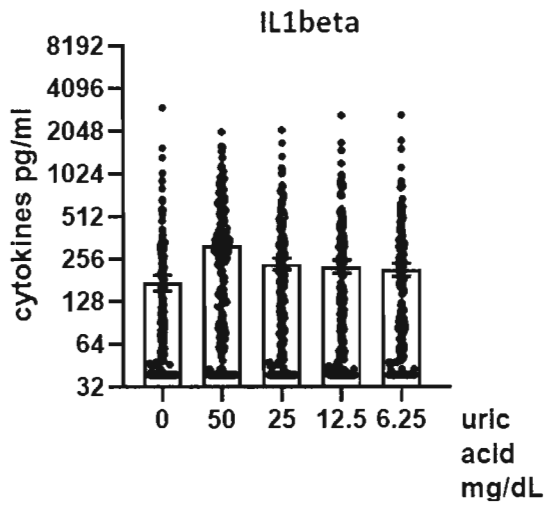


Figura 3

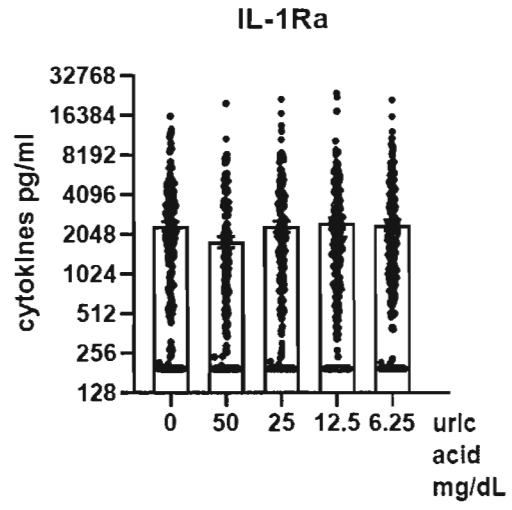


Figura 4





2

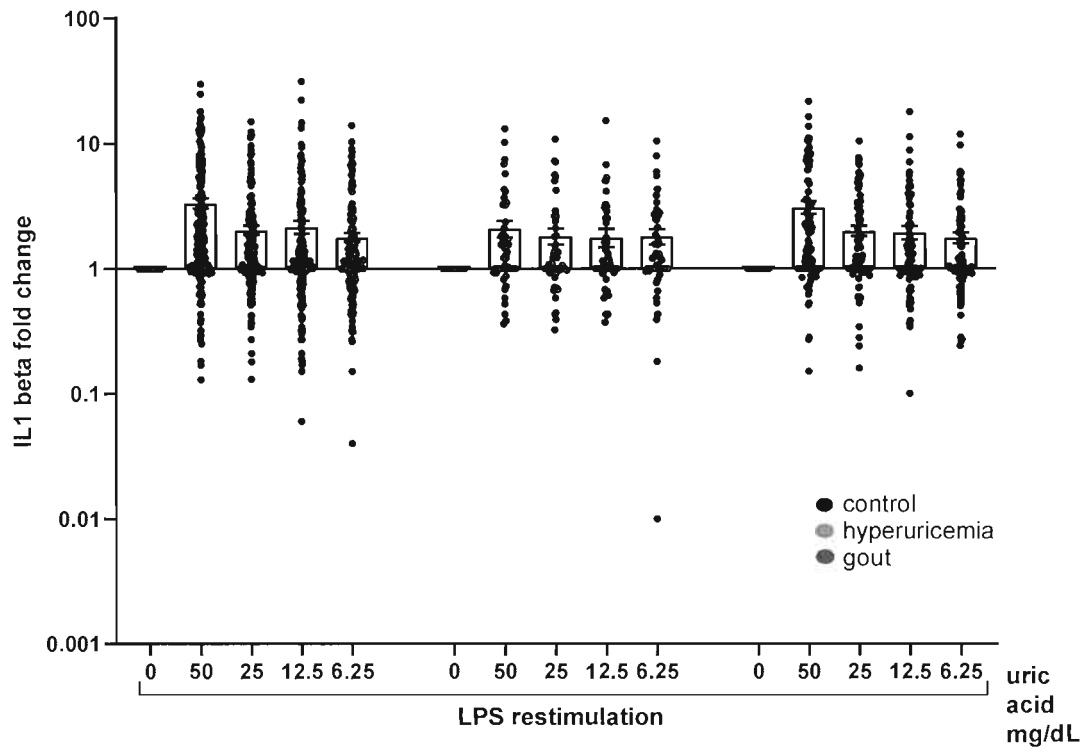


Figura 5

